



HAL
open science

Isolement et caractérisation de cellules souches cancéreuses dans un modèle murin de tumorigénèse mammaire

Lu Tian

► **To cite this version:**

Lu Tian. Isolement et caractérisation de cellules souches cancéreuses dans un modèle murin de tumorigénèse mammaire. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2018. Français. NNT : 2018LILUS001 . tel-01967626

HAL Id: tel-01967626

<https://theses.hal.science/tel-01967626>

Submitted on 1 Jan 2019

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

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

Université de Lille

Thèse de Doctorat

Pour l'obtention du grade de Docteur d'Université

Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille (ED-446)

Discipline : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Spécialité : Biologie Cellulaire

Présentée par

Lu TIAN

**Isolement et caractérisation de cellules souches cancéreuses
dans un modèle murin de tumorigénèse mammaire**

Soutenue publiquement le mercredi 28 mars 2018

Devant le jury composé de:

| | |
|--------------------|---------------------------------|
| Présidente : | Pr. Xuefen Le BOURHIS |
| Rapporteurs : | Pr. Emmanuelle CHARAFE-JAUFFRET |
| | Dr. Stéphane ANSIEAU |
| Examineurs : | Dr. Ruth RIMOKH |
| | Pr. Philippe DELANNOY |
| Directeur de Thèse | Dr. Roland BOURETTE |

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement le Dr Roland Bourette, mon directeur de thèse qui m'a accueilli dans son équipe il y a presque 4 ans pour ma thèse. Il m'a fait confiance depuis le premier jour et a toujours su être ouvert à la discussion. Il m'a apporté de précieux conseils et m'a donné la liberté pour la réalisation de ma thèse. Il a su me communiquer la rigueur et la ténacité nécessaire à la poursuite de ce métier!

Je remercie vivement le Pr Xuefen Le Bourhis d'avoir accepté de présider le jury de thèse. J'adresse également toute ma reconnaissance aux Pr. Emmanuelle Charafe-Jauffret, Dr. Stéphane Ansieau, Dr. Ruth Rimokh, et Pr Philippe Delannoy pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de lire et d'évaluer mon travail. Je remercie à nouveau tout particulièrement le Pr Xuefen Le Bourhis et le Pr Philippe Delannoy pour tous vos aides et conseils durant ma thèse comme membres de mon CST.

Je souhaite remercier le Pr Yvan De Launoit et le Dr. Oleg Melnyk de m'avoir accueilli dans l'unité CNRS UMR 8161 et l'équipe CBC pour effectuer ma thèse ainsi pour leurs conseils durant ma thèse.

Je souhaite également remercier tous mes collègues présents et passés avec qui j'ai eu la chance de travailler durant ces années. Alex, Eva, Hélène, Bérénice, Claire, Constance et Solenne, merci pour tous les bons moments passés ensemble, pour tous les soutiens dans les moments difficiles et les bons conseils dans les moments de doute. Manu, merci pour ton aide et ta disponibilité pour faire les manip à l'animalerie. Marie-Jo, merci pour ta précieuse aide technique et ton soutien moral. Jérôme et Eric, merci pour les enseignements que j'ai pu recevoir à vos écoutes. Merci à tous les chimistes pour les bons moments que nous avons pu partager au cours de ces années.

Je remercie l'ensemble de l'unité Inserm U908 pour les discussions scientifiques intéressantes, plus particulièrement Chann et Xuefen pour vos conseils et implications dans ma thèse. Justine, je te souhaite le meilleur pour la fin de thèse et la suite !

Je remercie également l'animalerie de l'Institut Pasteur de Lille, plus particulièrement Thierry et David pour avoir pris soin de mes souris qui sont essentielles pour le bon déroulement de ma thèse.

Je souhaite aussi remercier les jeunes stagiaires avec qui j'ai eu la chance de travailler durant ma thèse et qui m'ont apporté beaucoup d'aide à différents moments de mon projet de thèse : Yucui et Robin.

Merci également à toute l'équipe CBA avec qui j'ai pu partager des déjeuners, des pauses-café ou des fous rires.

Merci aussi à mes amis et ma famille en Chine et en France qui m'ont soutenu durant cette belle aventure. Je souhaite remercier particulièrement mes beaux-parents Lélia et Michel, pour la relecture du manuscrit, la correction de fautes d'orthographe et la vérification de la liste d'abréviation ! Je n'oublie pas non plus mes belles-sœurs Lorène et Laetitia, et nos chers amis Marie-Claire et Max qui ont toujours été présents pour passer un dîner en famille ou à d'autres occasions. Merci à mes parents, qui ont tant sacrifié pour moi et m'ont transmis la valeur de travail, pour leur soutien et leurs encouragements de chaque instant.

Enfin et surtout, je remercie mon mari Cédric. Merci pour ton soutien au quotidien, ton optimisme et ta patience notamment à la fin de ma thèse. Merci d'avoir toujours cru en moi et je t'aime. On ira à un endroit plus chaud la prochaine fois☺.

Je dédie cette thèse à mon grand-père qui nous a quitté trop tôt à cause d'un cancer.

Résumé

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme. Les patientes traitées par chirurgie, radiothérapie et/ou chimiothérapie peuvent souffrir de rechute et de métastases à plus ou moins long terme. Il est à présent admis qu'une sous-population de cellules particulières dénommées cellules souches cancéreuses (CSC) jouent un rôle important dans ces événements. Il est donc crucial d'isoler et de caractériser ces cellules pour comprendre leurs propriétés particulières d'autorenouvellement et de résistance aux traitements, ce qui permettra de les cibler pour obtenir des traitements plus efficaces. C'est dans ce contexte que s'inscrit ma thèse. Au laboratoire, j'ai mis en place un modèle de souris bi-transgéniques (bi-Tg) en croisant les souris C3(1)-Tag qui est un modèle de tumorigenèse mammaire (et prostatique) bien établi, avec les souris Tg s-SHIP-GFP qui ont déjà permis l'isolement de CS normales mammaires (et prostatiques). Dans ces souris, le promoteur de s-SHIP contrôle l'expression de la protéine fluorescente GFP ce qui permet de marquer et d'isoler les cellules. Dans les tumeurs mammaires développées par ces souris biTg, j'ai isolé une population rare de cellules s-SHIP/GFP⁺ possédant des propriétés de CSC, surtout une capacité à former des sphères en culture non adhérente et à générer des tumeurs par transplantation en série très supérieure à celle des autres cellules de la tumeur. Une analyse transcriptomique globale qui compare les gènes dérégulés dans les cellules GFP⁺ et GFP⁻ a mis en évidence le rôle d'un composant de la voie Notch dans le maintien de la pluripotence.

Nous avons également dérivé plusieurs lignées cellulaires dénommées MAM (pour mammary) à partir des tumeurs mammaires. L'une d'entre, MAM326 est une lignée de cellules épithéliales cancéreuses avec environ 10 % de cellules GFP⁺ et j'ai démontré que les cellules GFP⁺ sont plus résistantes à différentes drogues anti-cancéreuses ainsi qu'à l'irradiation. Une analyse transcriptomique a été réalisée pour déterminer la signature moléculaire de cette résistance. Cette analyse a mis en évidence une vingtaine de gènes significativement surexprimés dans les cellules GFP⁺, et dont la nature et/ou la fonction est pertinente dans le contexte d'une résistance aux traitements antitumoraux. L'un de ces gènes est la synucléine-gamma dont le rôle dans la radiorésistance du cancer du sein a été suggéré mais non démontré expérimentalement. Par la surexpression ectopique et l'inhibition par siRNA, nous avons démontré que la synucléine gamma peut induire la radiorésistance dans plusieurs lignées cellulaires de cancer du sein. En conclusion, ces résultats démontrent que l'expression de s-SHIP est un marqueur de CSC mammaires chez la souris et son intérêt dans l'étude du cancer du sein.

Isolation and characterization of mammary cancer stem cells in a transgenic mouse model

Breast cancer is the most common cancer in women worldwide. The isolation and characterization of breast cancer stem cells (CSC) are crucial for understanding cancer biology and revealing potential therapeutic targets. One of the major issues in the study of CSC is the lack of reliable markers. A transgenic mouse model (Tg 11.5kb-GFP) was generated using the 11.5kb s-SHIP (stem-SH2-containing 5'-Inositol Phosphatase) promoter that specifically expressed enhanced green fluorescent protein (GFP) in embryonic and various tissue stem cells. In the mammary gland, previous experiments showed that GFP labels puberty cap cells and pregnancy basal alveolar bud cells, and it has been demonstrated that these mammary GFP+ cells are activated tissue stem cells. In order to determine if s-SHIP promoter expression could also mark mammary cancer stem cells, we generated a bi-transgenic mouse model by crossing Tg 11.5kb-GFP mice with Tg C3(1)/Tag mice. Tg C3(1)/Tag mice express SV40 T antigen under the regulatory control of the rat prostatic steroid binding protein C3(1) gene. In female mice, the transgene is expressed primarily in the mammary gland. Mice develop mammary hyperplasia by 3 months of age with subsequent development of mammary adenocarcinoma by 6 months of age.

Here we show the presence of a rare population of GFP+ cells, which are also CD24+/CD49f+/CD29+ in mammary tumors of female bi-transgenic mice. As compared to GFP- cells, GFP+ cells exhibit both a higher tumor sphere-forming potential, and a higher tumorigenicity when transplanted into SCID and FVB recipient mice. Moreover, upon subsequent transplantation, the GFP+ cells generated heterogeneous tumors that displayed properties similar to the primary tumor. Transcriptomic analysis of these GFP+ vs GFP- cells revealed several differentially expressed genes including one protein implicated in the Notch pathway. In addition, from the murine mammary tumor, I have derived a cell line containing a s-SHIP/GFP+ subpopulation that shows resistance to chemotherapy and radiation. I have further studied this subpopulation and found that synuclein gamma could confer radiation resistance to breast cancer cells. Altogether, these results demonstrate that s-SHIP promoter expression is a marker of mammary CSC that enables their identification and isolation via a single consistent parameter.

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| Sommaire des figures | 9 |
| Sommaire des tableaux..... | 11 |
| Abréviation et acronymes..... | 12 |
| Introduction bibliographique | 14 |
| A. Le cancer du sein : une maladie très hétérogène | 14 |
| 1. Généralité | 14 |
| 2. Anatomie et cancérogénèse de la glande mammaire..... | 14 |
| a) Anatomie générale | 14 |
| b) Le développement et l'organisation de la glande mammaire..... | 16 |
| c) Les tumeurs mammaires | 19 |
| (1) Les cancers du sein..... | 19 |
| (2) La classification et les sous-types moléculaires..... | 21 |
| (3) Le cancer du type basal-like | 23 |
| (4) Altérations génétiques et épigénétiques | 24 |
| d) Cancer du sein et thérapies..... | 28 |
| B. Cellules souches et cancer du sein | 31 |
| 1. La théorie des cellules souches cancéreuses (CSC) | 31 |
| a) Qu'est-ce qu'une CSC ?..... | 31 |
| (1) Définition et modèle de CSC | 31 |
| (2) CSC et cellule à l'origine des cancers ? Questions et controverses | 33 |
| (3) Propriétés des CSC | 34 |
| b) Plasticité des CSC..... | 38 |
| (1) L'origine des CSC..... | 38 |
| (2) La reprogrammation de cellules cancéreuses non souches en CSC..... | 39 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| (i) | La transition épithélio-mésenchymateuse : génératrices des CSC ?..... | 39 |
| (ii) | CSC, TEM et la métastase..... | 40 |
| c) | La CSC et son microenvironnement..... | 42 |
| (1) | L'interaction des CSC avec la niche cellulaire..... | 42 |
| (2) | La niche et l'hypoxie..... | 44 |
| (3) | Les voies de signalisation régulant les CSC..... | 45 |
| (i) | La voie Notch..... | 45 |
| (ii) | La voie Wnt/ β -caténine..... | 47 |
| (iii) | La voie Hedgehog..... | 48 |
| (iv) | La voie Bmi1..... | 49 |
| 2. | CSC dans le cancer du sein..... | 50 |
| a) | Les cellules souches dans la glande mammaire normale..... | 50 |
| b) | Les cellules souches cancéreuses mammaires..... | 53 |
| c) | Isolement des CSC du sein..... | 54 |
| (1) | Culture en suspension (formation des sphères)..... | 54 |
| (2) | Side population : marqueur de cellules souches normales et cancéreuses..... | 55 |
| (3) | Activité enzymatique de l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH)..... | 55 |
| (4) | Marqueurs de surface..... | 56 |
| (5) | Les différents marqueurs = signatures de CSC hétérogènes ?..... | 58 |
| (6) | s-SHIP: un nouveau marqueur de cellules souches..... | 60 |
| (i) | Structure, rôle et implication dans les cellules souches..... | 60 |
| (ii) | Les souris transgéniques 11.5kb-GFP: un modèle pour l'étude de cellule souches..... | 62 |
| 3. | Les CSC du sein : conséquences thérapeutiques..... | 65 |
| a) | Mécanismes de résistance aux traitements..... | 65 |
| b) | Stratégies thérapeutiques ciblant les CSC..... | 66 |
| C. | Modèles murins dans l'étude de cancer du sein..... | 69 |

| | |
|--|------------|
| 1. Les xénogreffes | 69 |
| a) Les CDX (Cell-line-derived xenografts)..... | 69 |
| b) Les PDX (Patient-derived xenografts)..... | 70 |
| 2. Les souris transgéniques (GEMM) | 71 |
| a) Différents modèles de souris transgéniques | 71 |
| b) Le modèle C3(1) Tag: un modèle de cancer du sein basal-like | 73 |
| D. La synucléine gamma et la radiorésistance dans le cancer du sein ... | 77 |
| 1. La radiothérapie dans le traitement des cancers | 77 |
| a) Généralités..... | 77 |
| b) Effet de la radiation ionisante sur le vivant..... | 78 |
| (1) Effet direct | 79 |
| (2) Effet indirect | 79 |
| (3) Effet <i>bystander</i> | 80 |
| (4) Instabilité génétique transgénérationelles..... | 80 |
| c) Réponse cellulaire aux dommages radioinduits | 81 |
| d) Morts cellulaires radioinduites | 83 |
| e) Radiothérapie dans le cancer du sein | 87 |
| 2. La synucléine gamma (SNCG) | 88 |
| a) Découverte et rôle dans le cancer du sein | 89 |
| b) Implication dans la résistance au traitement anti-tumoral | 91 |
| Projet de recherche et résultats | 94 |
| A. L'expression du promoteur de s-SHIP est un marqueur de cellules souches cancéreuses mammaires | 96 |
| Présentation de l'article I..... | 96 |
| Article I..... | 100 |
| B. La synucléine gamma peut induire la radiorésistance dans des lignées cellulaires de cancer du sein | 134 |

Sommaire des figures

| | |
|-----------------------------------|-----|
| Présentation de l'article II..... | 138 |
| Article II..... | 140 |
| Résultats complémentaires | 172 |
| Discussion et perspectives..... | 176 |
| Références bibliographiques | 183 |
| Annexe I..... | 215 |

Sommaire des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Représentations schématiques des glandes mammaires chez la femme et la souris. | 15 |
| Figure 2. Développement post-natal de la glande mammaire murine. | 17 |
| Figure 3: Représentation schématique de l'épithélium mammaire murin. | 19 |
| Figure 4 : Modèle de progression tumorale du sein. | 20 |
| Figure 5 Le modèle stochastique traditionnel et le modèle hiérarchique des CSC. | 33 |
| Figure 6 Caractéristiques des cellules souches : la division symétrique et asymétrique. | 35 |
| Figure 7. Le paradigme de résistance des cellules souches cancéreuses. | 36 |
| Figure 8. Comment se forment les CSC ? | 39 |
| Figure 9. Représentation schématique des interactions entre le CSC et leur microenvironnement tumoral. | 44 |
| Figure 10. Voie de signalisation Notch. | 46 |
| Figure 11. Voie de signalisation Wnt. | 48 |
| Figure 12. Voie de signalisation Hedgehog. | 49 |
| Figure 13. Modèle de différenciation hiérarchique de l'épithélium mammaire. | 52 |
| Figure 14. Association entre les sous-types moléculaire de cancer du sein, le profil d'expression de marqueurs de CSC et la transition épithélio-mésenchymateuses (TEM). | 60 |
| Figure 15. Structure des isoformes de SHIP et leur implication dans la voie PI3K. | 61 |
| Figure 16. Structure du 11.5kb-GFP promoteur transgénique. | 63 |
| Figure 17. L'expression de la GFP (s-SHIP) dans les glandes mammaires et tumeurs mammaires. | 64 |
| Figure 18. Lésions de la glande mammaire. | 74 |
| Figure 19. Effets d'IR sur les cellules. | 78 |
| Figure 20. La réponse aux dommages à l'ADN. | 82 |
| Figure 21. Principales modalités de mort cellulaire induite par les rayonnements ionisants. | 83 |
| Figure 22. Schéma représentatif des synucléines α, β, et γ. | 89 |
| Figure 23. Mécanisme de résistance au paclitaxel induite par SNCG. | 92 |
| Figure 24. Le protocole expérimental pour tester la radiorésistance des cellules GFP⁺. | 99 |

Sommaire des figures

| | |
|--|-----|
| Figure 25. Analyse de pourcentage de cellules GFP⁺ dans les tumeurs après irradiation. | 99 |
| Figure 26. Etablissement de la lignée MAM326. | 134 |
| Figure 27. L'expression de s-SHIP/GFP est associée à une résistance aux drogues et à l'irradiation. | 136 |
| Figure 28. Les cellules GFP⁺ sont plus résistantes à l'apoptose induite par les traitements. | 136 |
| Figure 29: Analyse de l'expression de SNCG au niveau protéique par western blot. | 173 |
| Figure 30: Inhibition de SNCG favorise la senescence induite par IR dans la lignée MCF7. | 174 |
| Figure 31: Inhibition de p21 favorise l'apoptose induite par IR dans la lignée SUM159PT. | 175 |

Sommaire des tableaux

| | |
|--|-----|
| Tableau 1. Classification TNM des stades de cancer du sein. | 21 |
| Tableau 2. Classification moléculaire des cancers du sein. | 23 |
| Tableau 3. Principaux oncogènes surexprimés dans le cancer du sein | 25 |
| Tableau 4. Principaux gènes suppresseurs de tumeurs mutés dans le cancer du sein | 26 |
| Tableau 5. Principaux promoteurs utilisés dans l'établissement de GEMM pour le cancer du sein. | 72 |
| Tableau 6. Résultats d'injection dans les souris SCID. | 135 |
| Tableau 7. Résultats d'injection dans les souris FVB. | 135 |
| Tableau 8. Exemples de gènes surexprimés dans les cellules GFP+ | 137 |
| Tableau 9. Caractéristiques des lignées cellulaires mammaires humaines utilisées dans cette étude | 172 |

Abréviation et acronymes

A

aSMA a-actine du muscle lisse

AACR Association for Cancer Research

ABC ATP-Binding Cassette

ALDH Aldéhyde déshydrogénase

ATM Ataxia Téléngectasia Mutation

ATRA Acide trans-retinoïque

B

Bmi1 B Lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog ou B-cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1

BRCA BReast CAncer

BUB1-3 Budding inhibited by benzimidazole

BubR1 Budding inhibited by benzimidazole-related 1

C

CENP-E Centromere-associated protein E

CHK Checkpoint Kinase

CCIS Carcinome canalaire in situ

CDX Cell-line-derived xenografts

CTC Cellules Tumorales Circulantes

CTL Lymphocytes T cyclotoxiques

CS Cellules souches

CSC Cellules souches cancéreuses

D

DDR DNA damage response

DLK1 Delta like no-canonical Notch ligant 1

DSB Double strandbreak

ECM Extracellular matrix

E

EGFR Epidermal Growth Factor

EMT Transition épithéliale-mésenchymateuse

ER Récepteur aux œstrogènes

F

FGF Fibroblast Growth Factor

G

GEMM Genetically Engineered Mouse Models

GFP Green Fluorescent Protein

GI Genomic Instability

Grb2 Growth factor receptor-bound protein 2

H

Her2+ Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

HIF Hypoxia-induced factor

Abréviation et acronymes

| | | | |
|--------------|---|----------|--|
| I | | ROS | Reactive Oxygen Species |
| IFN γ | Interféron gamma | S | |
| IR | Rayonnements ionisants | SAC | Spindle assembly checkpoint |
| L | | SCE | Sister chromatide exchange |
| LIF | Leukemia inhibitory factor receptor | SNCG | Synucléide gamma |
| M | | SP | Side population |
| MAPK | Mitogen-activated protein kinases | SSB | Simple strand break |
| MaSCs | Cellules souches mammaires | T | |
| MDSC | Myeloid-derived supressor cells | TAM | Tumor-associated macrophages |
| MEC | Matrice extracellulaire | TAN | Tumor-associated neutrophils |
| MOMP | Membrane externe de la mitochondrie | TEBs | Terminal End Buds |
| N | | TEM | Transition épithélio-mésenchymateuse |
| NICD | Domaine intracellulaire Notch | TME | Tarnsition mésenchymateuse-épithéliale |
| NK | Natural Killer | TGF-a | Transforming Growth Factor-a |
| NOD/SCID | Non-Obese Diabetic Severe Combined ImmunoDeficiency | TGF-b | Transforming Growth Factor-b |
| P | | TIC | Tumor Initiating Cells |
| PDX | Patient-derived xenografts | TNBC | Cancer du sein triple négatif |
| PR | Récepteur à la progestérone | TNM | (classification des tumeurs) |
| Prrx 1 | Paired-related homeobox transcription factor 1 | U | |
| PTEN | Phosphatase and TENsin Homolog | UTDL | Unités terminales ductolobulaires |
| R | | V | |
| RIBE | Ionizing radiation-induced bystander effects | VEGF | Vascular endothelial growth factor |
| | | vSMC | Vascular smooth muscle cells |

Introduction bibliographique

A. Le cancer du sein : une maladie très hétérogène

1. Généralité

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez les femmes dans les pays développés et son incidence ne cesse d'augmenter dans les pays en voie de développement. En France, le nombre de nouveaux cas en 2012 est estimé à 53 000, ce qui représente environ un tiers des cas de cancer dépistés chez la femme. Le nombre de décès par le cancer du sein en France s'élevait à 11 600 en 2012, soit environ 20 % des décès par cancer chez la femme. L'incidence de ce cancer a beaucoup augmenté entre 1980 et 2000 mais le nombre de cas observés chaque année a tendance à diminuer depuis 2005. Néanmoins, durant cette même période on constate une diminution du taux de mortalité, grâce entre autres aux avancées médicales et à la généralisation du dépistage par mammographie. En effet, le taux global de survie atteint 85% après 5 ans, et 76% après 10 ans. Plus que 50% des cancers du sein surviennent après 50 ans et l'âge médian au diagnostic est estimé à 63 ans.

Le cancer du sein est une maladie multifactorielle. On peut distinguer des facteurs externes, qui sont liés à l'environnement et aux modes de vie, comme par exemple l'alcool, l'obésité, l'inactivité physique et le traitement hormonal substitutif. Il existe également des facteurs internes qui sont l'âge, le sexe, l'histoire familiale et les mutations génétiques. (Les cancers en France - Edition 2014 - V5)

2. Anatomie et cancérogénèse de la glande mammaire

a) Anatomie générale

La glande mammaire est une glande exocrine d'origine ectodermique qui est destinée à sécréter du lait adapté à la nutrition du nouveau-né chez la femme. Elle reste en effet immature et non fonctionnelle chez l'homme. Sa structure tubulo-alvéolaire est constituée d'une série de conduits ramifiés. La morphologie et le nombre de glandes mammaires est variable selon l'espèce : chez la souris par exemple, l'épithélium mammaire est intégré dans un tampon de

Introduction bibliographique

graisse mammaire, alors que chez les humains, il est intégré dans un tissu fibreux et un tissu conjonctif gras. La glande mammaire humaine est composée de 15-20 lobes drainés par des canaux galactophores collecteurs « lactifères » s'ouvrant individuellement à la peau au niveau du mamelon. Ces lobes sont eux-mêmes composés de plusieurs unités terminales ducto-lobulaires (UTDL) constituées d'alvéoles sécrétoires. Chez la souris, une architecture similaire est observée seulement à la gestation pendant laquelle les conduits et les alvéoles sont enrobés dans le stroma. Ainsi on trouve une paire pectorale chez l'espèce humaine contre cinq paires chez la souris (Fig. 1).

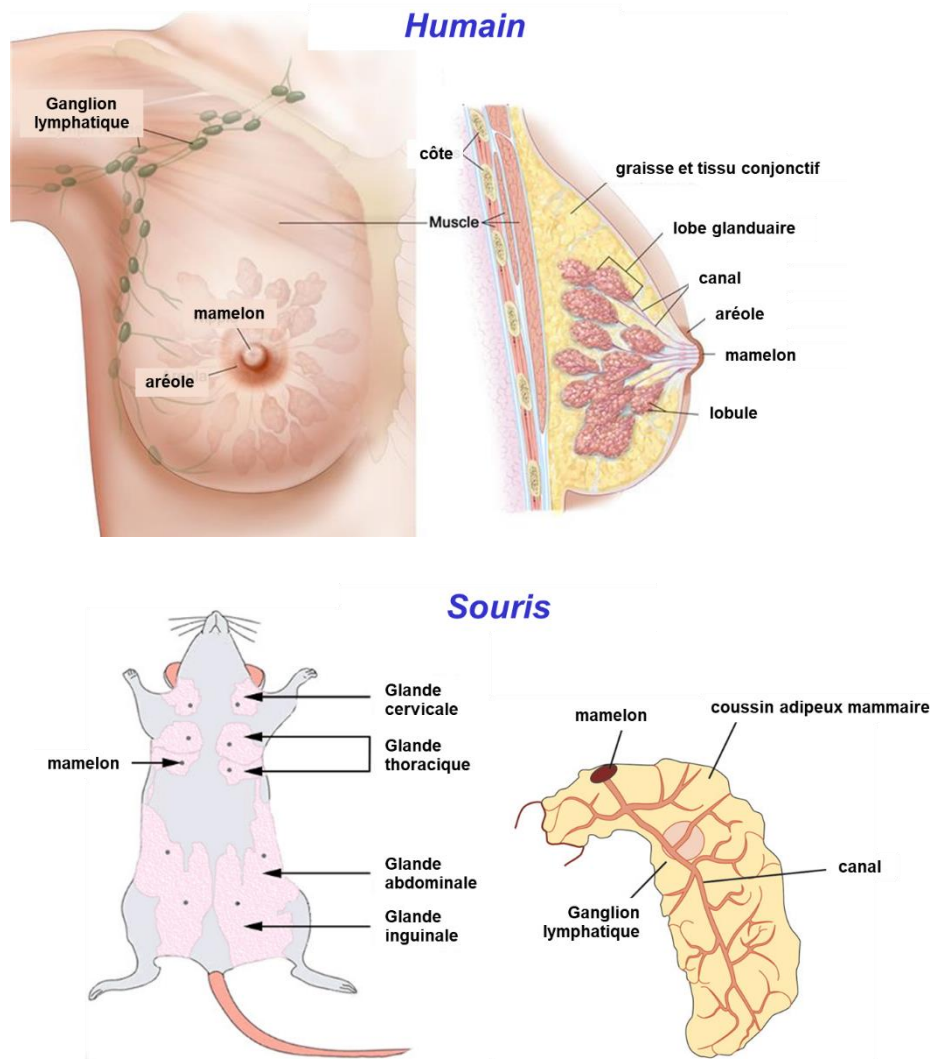


Figure 1 : Représentations schématiques des glandes mammaires chez la femme et la souris.

Les glandes mammaires humaines se caractérisent par les unités terminales ducto-lobulaires (UTDL) qui sont drainées par un réseau de canalicules (en haut). En revanche, l'épithélium mammaire de souris ne possède pas d'UTDL, mais comprend un canal primaire traversant la glande constituée des canaux ramifiés qui donnent naissance aux bourgeons alvéolaires au cours de chaque gestation (en bas).

(Modifié d'après NCI Dictionary of Cancer Terms: mammary gland) (Modifié d'après (Visvader, 2009).

Introduction bibliographique

Nous exposerons d'abord le développement et l'organisation cellulaire de la glande mammaire chez la femme puis plus en détail chez la souris, puisque cet animal est le modèle d'étude de ce travail de thèse. Nous analyserons également les mécanismes moléculaires conduisant à la tumorigenèse mammaire.

b) Le développement et l'organisation de la glande mammaire

Chez la femme, le développement de la glande mammaire est un processus en plusieurs étapes qui se déroule tout au long de la vie. Il s'étend du stade fœtal à la ménopause et se caractérise par la formation progressive des canaux et des lobes à partir de bourgeons terminaux. Au cours de la vie de la femme, la glande mammaire subit de nombreux changements dans la structure et la fonction, sous l'influence des hormones sexuelles (œstrogènes et progestérone) et d'un certain nombre de facteurs de croissance, comme l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), l'FGF (*Fibroblast Growth Factor*), le TGF- α (*Transforming Growth Factor- α*). On observe ainsi des variations importantes au cours de la grossesse, la lactation et l'involution (régression du tissu). Au cours de ces différentes étapes, les cellules de la glande mammaire prolifèrent, se différencient ou entrent en apoptose en réponse à des stimuli, provoquant un remodelage significatif de l'architecture du tissu glandulaire (Radisky et al., 2003).

Chez la souris, le développement de la glande mammaire commence durant l'embryogenèse et n'est pas complètement terminé à la puberté (Hens and Wysolmerski, 2005; Veltmaat et al., 2003). Le dimorphisme sexuel chez la souris commence environ au 13^{ème} jour du développement embryonnaire : le développement de la glande mammaire chez le mâle subit une inhibition suite à l'activation du récepteur à l'androgène alors que chez la femelle la prolifération cellulaire se poursuit et s'accompagne d'une différenciation cellulaire formant des canaux en forme de branche dès la troisième semaine (Inman et al., 2015). La majeure partie de la mammogénèse se déroule lors de la vie postnatale. Les étapes essentielles de la morphogénèse mammaire sont résumées en [Figure 2](#).

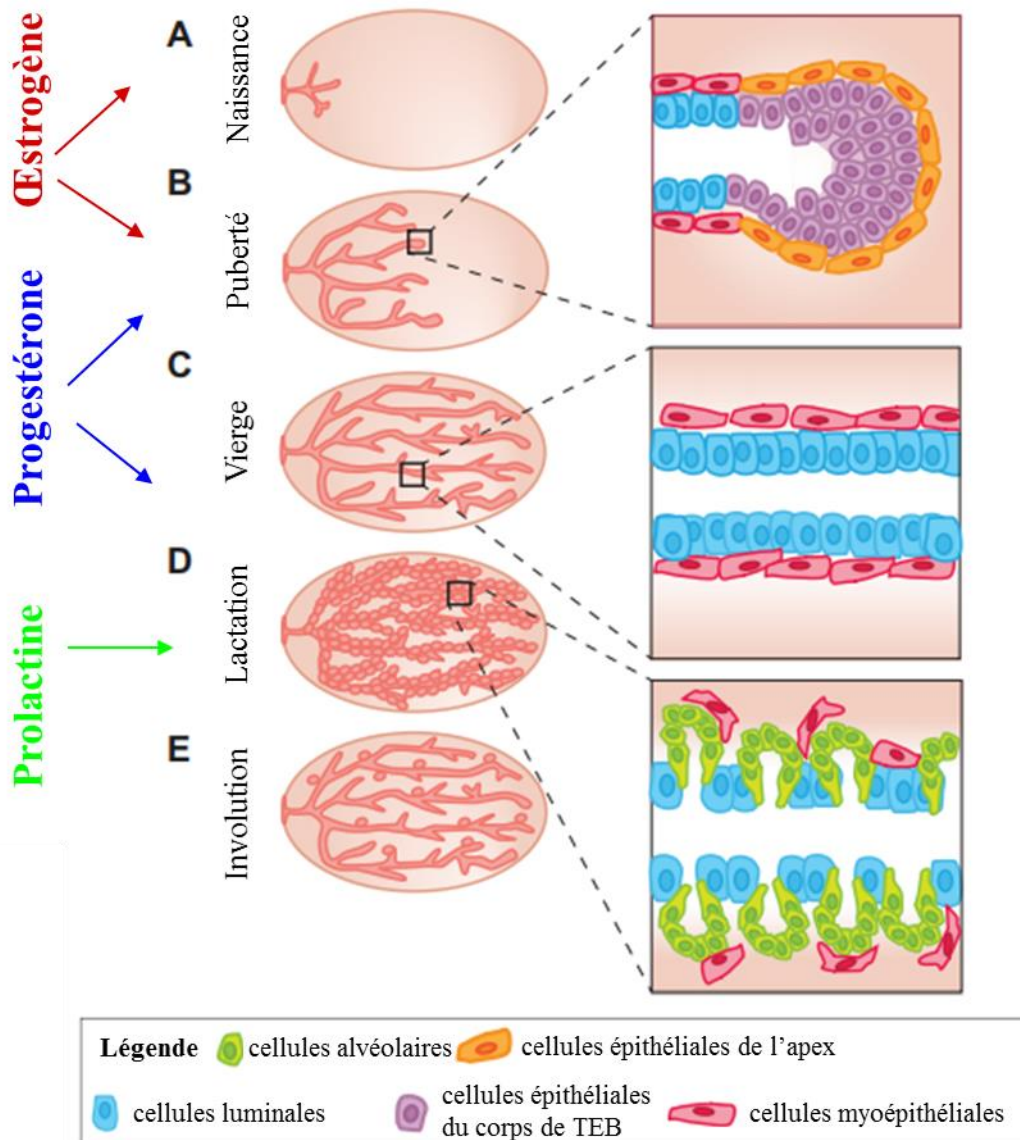


Figure 2. Développement post-natal de la glande mammaire murine.

Au cours de la puberté, les bourgeons terminaux (TEBs=Terminal End Buds) apparaissent aux extrémités distales des canaux sous l'influence des hormones sexuelles, et particulièrement des œstrogènes. Les canaux s'allongent et émettent des bifurcations jusqu'à ce que les limites du coussin adipeux mammaire soient atteintes. La stimulation répétée par la progestérone produite pendant le cycle oestral, entraîne la formation de branches latérales. La complexité de ce réseau continue d'augmenter pendant la première moitié de la gestation. Au cours du dernier tiers de la gestation, les structures sécrétoires en forme de sac, les alvéoles, se forment et se différencient sous le contrôle des récepteurs de la prolactine afin de produire du lait. A la fin de la lactation, le tissu sécrétoire est éliminé par apoptose au cours de l'involution, et la glande mammaire retrouve un état quiescent jusqu'à une nouvelle gestation. (Modifié d'après (Inman et al., 2015).

Introduction bibliographique

Chez la souris, l'épithélium mammaire est organisé en une bicouche composée de deux types cellulaires, les cellules basales myoépithéliales reposant sur une membrane basale, et les cellules luminales épithéliales formant la lumière des tubules mammaires (ou lumen) (figure 3). Ces deux types cellulaires sont identifiables par leur localisation et leur expression de protéines spécifiques. Les cellules myoépithéliales expriment les cytokératines K5 et K14, la P-cadhérine et le facteur de transcription P63, marqueurs caractéristiques des couches basales des épithéliums stratifiés. Elles possèdent la particularité d'être contractiles car elles contiennent aussi des protéines spécifiques des cellules du muscle lisse (comme l' α -actine du muscle lisse, α -SMA).

Les cellules luminales sont caractérisées par l'expression des cytokératines K8 et K18, des récepteurs hormonaux aux œstrogènes, à la progestérone et à la prolactine. Pendant la gestation et la lactation, les cellules luminales dans les alvéoles synthétisent les protéines du lait et par la production de protéines du lait (comme la β -caséine).

L'épithélium mammaire est entouré par la membrane basale et une matrice extracellulaire (MEC) spécialisée qui fournit un support structurel et une information contextuelle aux cellules sous-jacentes. La membrane basale sépare l'épithélium mammaire du tissu conjonctif adjacent appelé stroma mammaire qui est composé d'adipocytes, de fibroblastes, de cellules immunitaires, de vaisseaux sanguins et lymphatiques, tous incorporés dans une ECM fibreuse (Richert et al., 2000). Les adipocytes sont les cellules majoritaires du stroma mammaire et sont à l'origine du nom de coussin adipeux. D'une manière dynamique et réciproque, ces cellules stromales contribuent à la structure, au développement et à la fonction de la glande mammaire pendant la puberté, ainsi que lors du développement lobulo-alvéolaire au cours de la gestation (Tanos and Briskin, 2008).

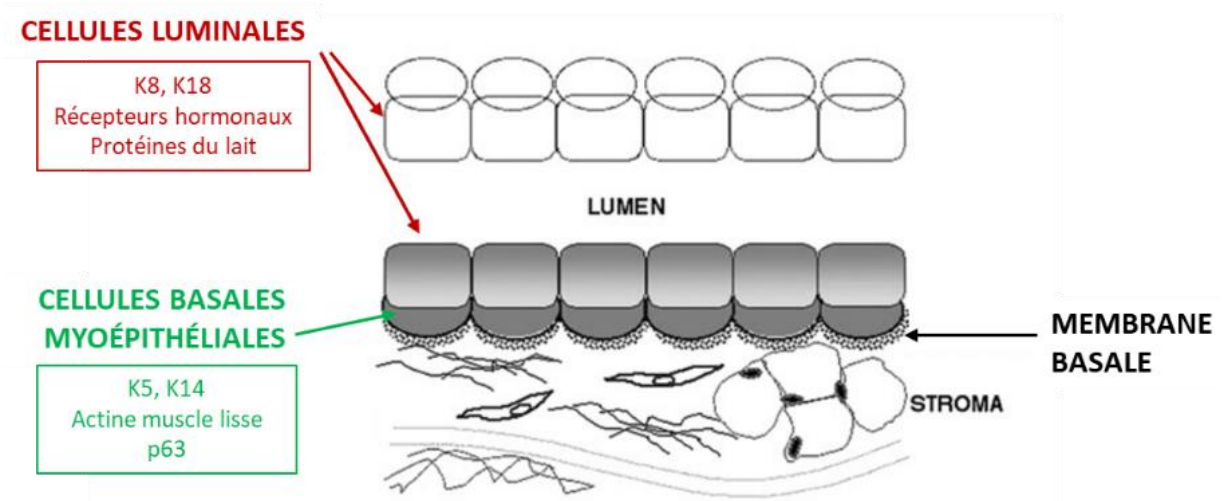


Figure 3: Représentation schématique de l'épithélium mammaire murin.

L'épithélium mammaire est organisé en bicouche, avec une couche de cellules luminales et une couche basale de cellules myoépithéliales. Chaque type cellulaire possède des marqueurs spécifiques, tels que K8 et K18 pour les cellules luminales et K5 et K14, la P-cadhérine, le facteur de transcription p63 et les protéines spécifiques du muscle lisse pour les cellules basales. La lame basale, formée de protéines et de protéoglycanes, entoure complètement l'épithélium mammaire, le séparant du stroma environnant. (Modifié d'après (Faraldo et al., 2005).

c) *Les tumeurs mammaires*

Il existe différents types de cancer du sein. Les plus fréquents se développent à partir des cellules des canaux (cancer canalaire) et plus rarement à partir de cellules des lobules (cancer lobulaire).

(1) Les cancers du sein

Histologiquement, l'histoire naturelle du cancer du sein implique une progression à travers des stades pathologiques et cliniques définis, en commençant par l'hyperprolifération canalaire, avec une évolution ultérieure en carcinomes in situ et invasifs, et finalement en maladie métastatique. (figure 4)

- **les carcinomes in situ/non-infiltrants (non invasifs)** : comme son nom l'indique, cette forme de cancer se développe uniquement à l'intérieur des canaux ou des lobules, sans que la tumeur ait infiltré le tissu qui l'entoure. Le cancer canalaire in situ ou carcinome canalaire in situ (CCIS) est le plus fréquent: huit cancers in situ sur dix sont des cancers canaux in situ. Le CCIS est généralement de bon pronostic et le traitement est un traitement local comme la chirurgie ou la radiothérapie. Néanmoins il peut éventuellement évoluer vers une forme plus invasive et est considéré alors comme un

Introduction bibliographique

précurseur du carcinome canalaire invasif basé sur des études moléculaires, épidémiologiques et pathologiques.

- **les carcinomes infiltrants (invasifs)** : c'est le type le plus commun de cancer du sein (environ 80%). Il s'agit d'un envahissement du tissu environnant par les cellules cancéreuses. Le cancer canalaire est le cancer infiltrant le plus fréquent. Les cancers infiltrants peuvent se propager vers les ganglions ou vers d'autres parties du corps. Le traitement des cancers infiltrants repose sur une association d'un traitement local à un traitement général (chimiothérapie, hormonothérapie).
- **les cancers métastatiques** : les cellules cancéreuses peuvent se détacher de la tumeur initiale et migrer dans d'autres parties du corps par la circulation sanguine ou le système lymphatique et y développer une nouvelle tumeur. Dans la majorité des cancers du sein, les métastases sont principalement localisées au niveau des os, du foie, des poumons et du cerveau. Chez certaines patientes, les cancers métastatiques peuvent survenir des mois ou des années après le traitement d'un cancer du sein local. Ceci est parfois appelé une récurrence à distance.

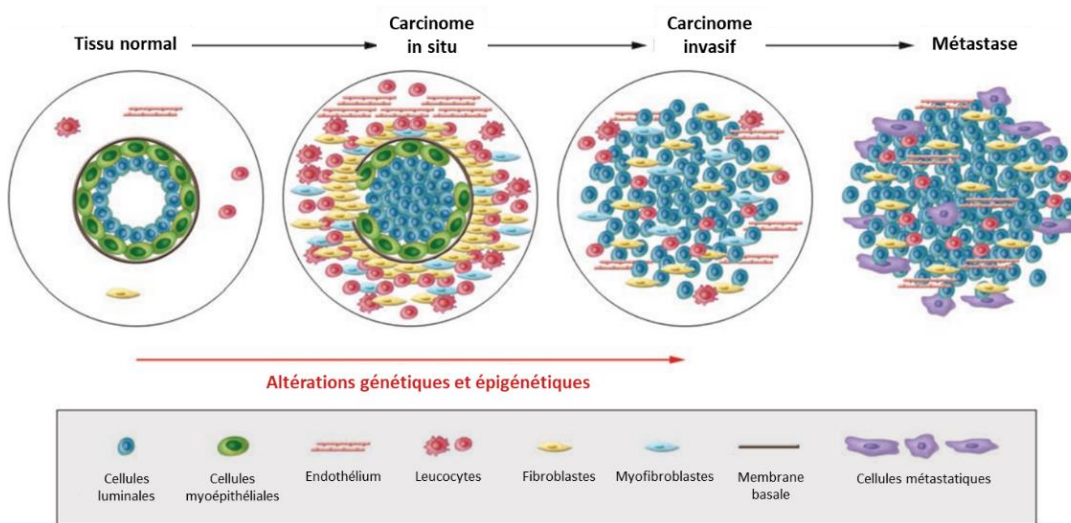


Figure 4 : Modèle de progression tumorale du sein.

Les canaux mammaires normaux sont composés de la membrane basale et d'une couche de cellules luminales. Les cellules composant le stroma comprennent divers types cellulaires tel que les leucocytes, fibroblastes, myofibroblastes et cellules endothéliales. Dans les carcinomes in situ, les cellules myoépithéliales sont altérées par différents mécanismes génétiques et épigénétiques, conduisant à une diminution du nombre de cellules basales et la dégradation de la membrane basale. En même temps, le nombre de cellules du stroma augmente. La perte de cellules myoépithéliales et de la membrane basale aboutit à des carcinomes invasifs, dans lesquels les cellules tumorales peuvent envahir les tissus environnants et migrer vers des organes distants, conduisant éventuellement à des métastases. (Modifié d'après (Polyak, 2007).

Introduction bibliographique

(2) La classification et les sous-types moléculaires

Le cancer du sein est une maladie génétiquement et cliniquement hétérogène (Simpson et al., 2005). Afin de mieux comprendre cette hétérogénéité, des systèmes de classification ont été développés. Les différents types de cancer du sein peuvent être identifiés en fonction de différents critères histologiques : la composition cellulaire, la morphologie, l'indice prolifératif. Au cours de ces dernières années, l'analyse des profils transcriptionnels des tumeurs mammaires humaines a révélé différentes signatures moléculaires permettant d'affiner la classification des cancers du sein.

- **Les différents stades du cancer du sein: la classification TNM** : c'est le système le plus répandu dans le monde (source : National Cancer Institut). Elle a pour but d'évaluer l'étendue de la maladie au moment du diagnostic pour estimer précisément le degré et l'avancé du cancer. Elle repose sur la taille, l'infiltration de la tumeur (T), l'atteinte éventuelle de ganglions (N) et la présence de métastases (M). Ces trois facteurs sont combinés pour obtenir un stade d'ensemble compris entre 0 et IV. Un petit nombre indique un cancer qui en est à ses débuts et un nombre plus élevé indique un cancer plus avancé ([Tableau 1](#)).

| Stade | Tumeur (T) | Ganglion (N) | Métastase (M) | Description |
|-------|------------|--------------|---------------|---|
| 0 | In situ | N0 | M0 | Le cancer in situ à un stade précoce |
| I | T1 | N0 | M0 | Tumeur (<2cm) ne s'est pas propagée |
| II | T0/1 | N1 | M0 | Tumeur (2-5 cm) avec souvent des atteintes ganglionnaires mineures |
| | T2 | N0/1 | | |
| | T3 | N0 | | |
| III | T1/2/3 | N2/3 | M0 | Tumeur (2-5 cm) avec des atteintes ganglionnaires majeures |
| | T3 | N1 | | |
| | T4 | Tout N | | |
| IV | Tout T | Tout N | M1 | Le cancer s'est propagé (métastasé) vers d'autres parties du corps. |

Tableau 1. Classification TNM des stades de cancer du sein.

- **Les différents sous-types moléculaires :** les analyses génomiques, surtout les études de microarray sur puces à ADN ont eu un impact majeur sur notre compréhension du cancer du sein. Le cancer du sein est aujourd'hui perçu comme un groupe hétérogène de différentes maladies caractérisées par des aberrations moléculaires distinctes, plutôt qu'une maladie avec des caractéristiques histologiques et un comportement clinique variables. L'étude de l'expression génique a ainsi permis d'identifier au moins 5 sous-types moléculaires : luminal A, luminal B, Her2+ (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*), basal-like et normal-like qui montrent des différences significatives au niveau de l'incidence, la survie et la réponse au traitement (Perou et al., 2000; Sørlie et al., 2001, 2003). Depuis, les marqueurs biologiques exprimés ainsi que les types histologiques des tumeurs ont été étudiés pour chaque sous-type. Les techniques génomiques ont évolué et un nouveau sous-type classé « claudin-low » a également été identifié (Herschkowitz et al., 2007; Prat et al., 2010). Ces catégories moléculaires ont des pronostics différents ce qui apporte un intérêt majeur dans le traitement de cancers du sein. De plus, cette classification moléculaire a permis de stratifier la population ER + en plusieurs sous-types. Ceci est important car même si l'évaluation clinique du carcinome invasif canalaire utilise le statut ER, PR et ErbB2, ces marqueurs n'ont pas permis la séparation des deux sous-types ER + distincts (à savoir, Luminal A et Luminal B) qui ont des résultats cliniques très différents (Sørlie et al., 2001, 2003). Le [tableau 2](#) résume les caractéristiques des différents sous-types moléculaires des cancers du sein.

Introduction bibliographique

| Sous-type | Description |
|-------------|--|
| Luminal A | Positifs pour les récepteurs hormonaux (ER- α et/ou Pr), HER2- et présentent de faibles taux de protéine Ki-67 donc une faible prolifération cellulaire. Les cancers luminaux A sont de bas grade et ont tendance à croître lentement avec le meilleur pronostic. |
| Luminal B | Expression de ER- α légèrement moins importante que le type luminal A, avec un taux de ki-67 plus élevé. Peut être HER2+ ou HER2-. Mauvais pronostic avec la mutation du gène p53 (environ 40%). |
| HER2+ | Caractérisés par la surexpression des gènes Erb-B2 (HER2) et GRB7 (Growth factor receptor-bound protein 7). Prolifération cellulaire importante et un pronostic plus mauvais, souvent traités avec succès avec des thérapies ciblées telles que les anticorps monoclonaux contre HER2 (par exemple trastuzumab et pertuzumab). |
| Basal-like | Composé de tumeurs triple négatives: ER-/PR-/HER2- avec peu ou pas d'expression de HER2. Forte expression des marqueurs de cellules basales (tels que les kératines 5/6, 14 et 17, EGFR) et des gènes apparentés à la prolifération. Souvent associée à une mutation de BRCA1 (Breast CAncer1) et une mutation porteuse de TP53. Tumeurs agressives et ont un pronostic plus défavorable par rapport aux autres sous-types. Ne répondent pas aux thérapies ciblées laissant la chimiothérapie la seule option. |
| Normal-like | Sous-type assez mal défini. Similaire à luminal A: ER+ ou PR+, HER2-, faible prolifération. Pronostic légèrement plus mauvais que le cancer luminal. |
| Claudin-low | Caractérisés par la faible expression des gènes impliqués dans les jonctions serrées et l'adhésion cellules-cellules épithéliales, y compris les claudines 3, 4 et 7, l'occludine et l'E-cadhérine. Enrichis pour les gènes associés à la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), l'infiltration de cellules immunitaires, l'activation de l'IFN γ (Interferon gamma) et les cellules souches cancéreuses. |

Tableau 2. Classification moléculaire des cancers du sein.

(3) Le cancer du type basal-like

Le cancer du sein basal-like représente entre 10 et 20% des tumeurs du sein. Ces tumeurs sont souvent appelées cancer du sein triple négatif (TNBC) parce que la plupart des tumeurs basal-like sont généralement négatives pour ER, PR et HER2. Cependant, environ 75% des TNBC sont de type basal, les autres 25% étant constitués des autres sous-types (Perou, 2011). Les tumeurs basales se caractérisent par un niveau élevé d'expression de protéines présentes dans les cellules basales/myoépithéliales du sein normal telles que les kératines de type basal : K5, K6, K14, K17, la P-cadhérine, les cavéolines 1 et 2, la nestine, le récepteur de l'Epidermal Growth factor (EGFR). Histologiquement, elles présentent un indice mitotique très élevé avec des zones centrales nécrotiques ou fibrotiques et une infiltration lymphatique visible (Rakha et

al., 2008). Les altérations génétiques les plus fréquentes observées dans les tumeurs basales incluent des mutations inactivatrices du facteur de transcription Trp53 (84%), la perte de l'expression de PTEN (35%), la perte de Rb1 et l'inactivation de Brca1 ainsi qu'une altération de la voie PI3K. (Network, 2012). Le sous-type basal est souvent lié à une forte expression des marqueurs de l'EMT (Transition Epithélio-Mésenchymateuse) comme par exemple la N-cadhérine, la vimentine et l' α -SMA qui pourrait expliquer leur agressivité et le fort potentiel métastatique (Sarrió et al., 2008).

Le cancer basal-like est souvent associé à un mauvais pronostic. En dépit de leur phénotype très agressif qui a tendance à développer des métastases, il y a une vraie difficulté au niveau du diagnostic liée au manque de compréhension sur son origine. Ainsi, le cancer basal-like a souvent un phénotype triple-négatif; par conséquent, la majorité de ces tumeurs ne peuvent pas être traitées efficacement avec les traitements ciblés existants (par exemple le trastuzumab ciblant HER2 et des traitements hormonaux). L'identification et la caractérisation de cellules souches cancéreuses dans les tumeurs basal-like ont permis une meilleure compréhension de ces tumeurs (Charafe-Jauffret et al., 2009) et ouvert de nouvelles perspectives dans le développement de thérapies spécifiques plus efficaces dans le cancer du sein basal-like.

(4) Altérations génétiques et épigénétiques

- Altérations génétiques

Le cancer est lié à des altérations génétiques impliquant des mutations dans les proto-oncogènes aboutissant à l'indépendance vis-à-vis des signaux de croissance cellulaire, ainsi que dans les gènes suppresseurs de tumeurs (Hanahan and Weinberg, 2011).

- Activation des proto-oncogènes : les proto-oncogènes, sont des gènes susceptibles de favoriser la transformation et/ou le développement tumoral après modification de leur expression ou de leur activité. Dans le cancer du sein, les principaux oncogènes codent des protéines qui sont impliquées dans les voies de la prolifération et de la survie cellulaire, et dans la régulation du cycle cellulaire (Lee and Muller, 2010). L'activation des oncogènes peut se produire par amplification génique (surproduction de la protéine, par exemple HER2), par mutation ponctuelle (activation consécutive de la protéine, par exemple BRCA) ou par translocation chromosomique générant un gène de fusion à l'expression inadaptée (comme le gène *NRG1/heregulin*) (Huang et al., 2004; Osborne et al., 2004). Dans le cancer du sein, le nombre d'oncogènes identifiés ne cesse de

Introduction bibliographique

s'accroître. Le [tableau 3](#) résume les principaux oncogènes impliqués dans le cancer du sein. Les anomalies génétiques les plus fréquemment observées déterminant l'activation des pro-oncogènes sont des amplifications d'ADN. Trois oncogènes ont été retrouvés amplifiés dans plus de 15% de tumeurs mammaires : Erb-B2 (HER2), c-Myc (MYC), et Cycline-D1 (CCND1) (Osborne et al., 2004).

| Oncogènes | Fonction | Fréquence dans le cancer du sein |
|----------------|--|---|
| Erb-B2 (HER-2) | Récepteur à tyrosine kinase qui joue un rôle essentiel dans le développement, l'activité de la MAPK et la voie de signalisation PI3K | Amplification 20–30% |
| c-Myc | Facteur de transcription qui régule les gènes impliqués dans la prolifération, l'apoptose, la différenciation | Amplification 1-94% (selon le type de cancer); 15,5% en moyenne |
| Cycline D1 | Régulateur de la progression du cycle cellulaire | Amplification 15-20% |
| Ras | GTPase qui régule les voies de signalisation impliquées dans la prolifération, la différenciation, l'apoptose, l'adhésion cellulaire et la migration | Amplification <5% |
| PI3K | Lipid Kinase qui régule la croissance cellulaire, la différenciation, la survie cellulaire, le cycle cellulaire et synthèse protéique | Mutation 21–40% |
| MAPK | Protéine kinase qui régule la prolifération cellulaire, la survie cellulaire, et l'apoptose | Mutation MAP3K1 6% |
| Akt1 | Sérine-thréonine protéine kinase qui joue un rôle dans la croissance cellulaire, la prolifération, la survie et l'angiogenèse | Mutation 1,8–8% |

Tableau 3. Principaux oncogènes surexprimés dans le cancer du sein

- Inhibition des gènes suppresseurs de tumeurs : les gènes suppresseurs de tumeurs sont des gènes dont la perte de fonction peut entraîner le développement tumoral. Les gènes suppresseurs de tumeurs sont habituellement des régulateurs négatifs de la croissance cellulaire ou d'autres fonctions qui peuvent affecter le potentiel invasif et métastatique des cellules tumorales. D'une manière générale, il existe deux types de gènes suppresseurs de tumeurs: les «gatekeeper» et les «caretaker». Les gènes «gatekeeper» inhibent la prolifération cellulaire et la tumorigenèse, comme le gène du rétinoblastome (Rb), inhibiteur du cycle cellulaire, ou la protéine PTEN (Phosphatase and TENsin Homolog), inhibiteur de la PI3K. En revanche, les gènes «caretaker» ne régulent pas directement la prolifération, mais lorsqu'ils sont mutés, ils conduisent à une conversion accélérée d'une cellule normale

Introduction bibliographique

en une cellule néoplasique, tels que TP53 ou BRCA, impliqués dans la réparation de l'ADN. De nombreux gènes «gatekeeper» sont requis pour le maintien de l'intégrité du génome (Levitt and Hickson, 2002). Le [tableau 4](#) résume les principaux gènes suppresseurs de cancer inhibés dans le cancer du sein.

| Gènes suppresseurs de tumeurs | Fonction | Fréquence dans le cancer du sein |
|-------------------------------|--|---|
| P53 | Activer la réparation de l'ADN, induire l'arrêt du cycle cellulaire, initier l'apoptose, activation du point de contrôle du cycle cellulaire | Mutation 20% |
| BRCA-1 / BRCA-2 | Réparation des cassures double-brin de l'ADN | Mutation 5-10% |
| PTEN | Protéine/lipide phosphatase, régulateur négatif de la voie de signalisation PI3K/Akt | Perte de fonction 30-40% Mutation < 5% |
| Rb | Gène du rétinoblastome, point de contrôle du cycle cellulaire en phase G1 | Rb1 Perte d'hétérozygotie (LOH) |
| p27 (CDKN1B, KIP1) | Inhibiteur des protéines kinases cycline-dépendantes. Arrêt du cycle en phase G1 | Mutation 1% |
| ATM | Serine-thréonine protéine kinase impliquée dans la réparation d'ADN, activer protéines clés, y compris p53, CHK2, H2AX | Augmentation du risque 2X |
| CHK1 | Protéine checkpoint kinase 1 contrôle le cycle cellulaire, arrêtent le cycle de cellules suite aux dommages d'ADN | Mutation 1% |

Tableau 4. Principaux gènes suppresseurs de tumeurs mutés dans le cancer du sein

- Altérations épigénétiques

Les altérations épigénétiques du génome telles que la méthylation de l'ADN au niveau des promoteurs et le remodelage de la chromatine jouent un rôle important dans la tumorigenèse et elles peuvent contribuer à la pathogenèse et à l'hétérogénéité moléculaire des cancers. De plus en plus d'études ont démontré que les mécanismes épigénétiques jouent un rôle clé dans le développement du cancer du sein et peuvent être utiles dans la prévention, le pronostic, le traitement et le suivi de la maladie. Les principales modifications épigénétiques impliquées dans le développement et la progression de cancer du sein sont la méthylation aberrante de l'ADN au niveau des îlots de dinucléotides CpG, les modifications post-traductionnelles des histones et les ARN non codants, notamment les long ARN non codants (lncRNA) et les microARN (miRNA) (Basse and Arock, 2015).

Introduction bibliographique

Les dinucléotides CpG sont sous-représentés dans le génome à l'exception de petits groupes, appelées des îlots CpG qui sont situés dans ou près du promoteur de nombreux gènes. Les îlots CpG sont non méthylés dans les cellules normales permettant la transcription et l'expression de différents gènes. Cependant, dans les cellules cancéreuses, les profils de méthylation sont souvent perturbés avec une hyperméthylation au niveau des îlots CpG, rendant ces régions inaccessibles aux complexes de transcription et empêchant l'expression de gènes. Dans le cancer du sein, ces gènes correspondent souvent aux gènes supresseurs de tumeurs tels que BRCA1, TP53, CDKN2A et PTEN (Lustberg and Ramaswamy, 2011).

Les modifications post-traductionnelles des histones, comme par exemple le niveau d'acétylation des résidus lysines des histones peuvent aussi affecter l'état transcriptionnel de la chromatine : l'acétylation conduit à une chromatine avec une structure plus accessible pour la transcription, tandis que la désacétylation des histones conduit à une structure plus fermée donc réprimée pour la transcription.

De petites molécules d'ARN non codantes, telles que les microARN, agissent comme régulateur négatif de gènes en ciblant la dégradation de l'ARN. Ces microARN sont également capables de cibler les promoteurs de gènes et conduire à l'inactivation transcriptionnelle des ARNm (Esquela-Kerscher and Slack, 2006). L'expression aberrante des miARN est souvent observée dans le cancer du sein. Par exemple, une augmentation de l'expression de miR-21 est associée à des stades avancés de cancer et celle de miR-155 est en corrélation avec des métastases et un mauvais pronostic (Iorio et al., 2005; Mattiske et al., 2012). Différentes études ont démontré que miR-21 ont comme cibles les composants des voies apoptotiques (Papagiannakopoulos et al., 2008) ainsi que les gènes supresseurs de tumeur dont PTEN (Gong et al., 2011) et PDCD4 (Asangani et al., 2008). Les longs ARN non codants (lncRNA) sont définis comme des transcrits de plus de 200 nucléotides qui ne codent pas pour les protéines (Ponting et al., 2009). Ils jouent un rôle important dans la régulation de l'expression génique à différents niveaux, tels que l'épissage alternatif, la régulation de l'activité protéique et l'altération de la localisation protéique, et la modification de la chromatine. Leur dérégulation est ainsi impliquée dans différents types de cancer (Zhang et al., 2013). Dans le cas de cancer du sein, une étude récente a démontré que le lncRNA H19 induit l'expression de miR-675 qui à son tour inhibe l'expression c-Cbl et Cbl-b, entraînant la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses *in vitro* et *in vivo* (Vennin et al., 2015).

Les altérations épigénétiques sont clairement impliquées dans l'initiation et la progression du cancer du sein. Une meilleure compréhension sur des altérations épigénétiques spécifiques contribuant à la tumorigenèse et au pronostic de cette maladie pourra conduire à des progrès

significatifs dans le traitement du cancer du sein. Les thérapies qui ciblent la méthylation de l'ADN et les modifications des histones dans le cancer du sein sont déjà en essais cliniques (Byler et al., 2014; Nebbioso et al., 2012). De plus, les modifications épigénétiques peuvent également être utilisées comme biomarqueurs pour le développement de thérapies ciblées ou de composants naturels comme mesures de prévention. Par exemple, les miARN dans la circulation sanguine des patients pourraient être un biomarqueur dans le dépistage de cancer du sein (Hamam et al., 2017).

d) Cancer du sein et thérapies

Les stratégies thérapeutiques actuelles contre le cancer du sein comprennent l'ablation chirurgicale de la tumeur (chirurgie mammaire conservatrice ou mastectomie), la radiothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie et la thérapie ciblée. Un seul type de traitement ou une association de plusieurs traitements peut être utilisé pour maîtriser la maladie (« les traitements des cancers du sein », Octobre 2013, site internet de l'Institut National du Cancer).

- Les traitements locaux
 - La chirurgie : La chirurgie est le plus souvent réalisée en premier et peut être suivie d'une chimiothérapie et/ou d'une radiothérapie et/ou d'une hormonothérapie. Elle a pour objectif d'enlever les tissus atteints par les cellules cancéreuses. Deux types d'interventions chirurgicales peuvent être pratiqués : une chirurgie mammaire conservatrice, appelée tumorectomie ou segmentectomie où le chirurgien retire seulement la tumeur ainsi qu'une petite quantité de tissu sain autour ; ou une chirurgie mammaire non conservatrice, appelée mastectomie qui consiste à retirer la totalité du sein y compris l'aréole et le mamelon.
 - La radiothérapie : La radiothérapie utilise des rayonnements ionisants de haute énergie pour détruire les cellules cancéreuses ou empêcher leur multiplication. Dans le cancer du sein, la radiothérapie fait partie du traitement standard dans le cadre d'un contrôle loco-régional de la maladie. Elle peut être utilisée en complément de la chirurgie dans le but de détruire les cellules cancéreuses résiduelles qui auraient échappé à l'intervention chirurgicale et diminuer le risque de récurrence. Elle peut également être utilisée pour traiter des métastases osseuses ou cérébrales dans un stade avancé de la maladie.

Introduction bibliographique

- Les traitements systémiques
 - La chimiothérapie : la chimiothérapie peut être utilisée dans le cancer du sein à un stade précoce ou avancé. Il s'agit de l'utilisation d'un ou plusieurs agents cytotoxiques qui ciblent les cellules à croissance rapide, c'est-à-dire les cellules cancéreuses mais aussi certains types cellulaires à renouvellement élevé, ce qui entraîne des effets indésirables. La chimiothérapie est actuellement le seul traitement efficace contre le cancer du sein triple négatif (TNBC).
 - L'hormonothérapie : ce traitement est uniquement possible lorsque la tumeur est hormonosensible, c'est-à-dire que les cellules tumorales présentent à leur surface des récepteurs hormonaux : les récepteurs aux œstrogènes (ER) et/ou à la progestérone (PR). L'objectif de l'hormonothérapie est d'inhiber l'action stimulante de l'œstrogène sur la croissance des cellules tumorales. Le tamoxifène, un modulateur sélectif des récepteurs aux œstrogènes, et les inhibiteurs de l'aromatase qui empêchent la conversion de la testostérone en œstrogène sont des exemples d'hormonothérapie utilisée dans les cancers du sein classés comme ER positifs (Dowsett et al., 2010).
 - La thérapie ciblée : les avancées majeures dans la compréhension du mécanisme moléculaire dans le cancer du sein ont contribué au développement de thérapies ciblées. Contrairement aux chimiothérapies classiques, les substances utilisées sont plus sélectives et entraînent moins d'effets secondaires. Ces nouveaux agents incluent des anticorps monoclonaux se complexant à des antigènes des cellules cancéreuses, mais également des molécules impliquées dans le blocage des voies de signalisation clé dans la tumorigénèse. Un exemple de thérapie ciblée est l'anticorps monoclonal recombinant humanisé Trastuzumab (HERCEPTIN®) utilisé dans la prise en charge du cancer du sein de sous-type HER2+. Il est dirigé contre le récepteur HER2 et sa liaison au récepteur empêche l'activation de HER2, ce qui inhibe la prolifération des cellules tumorales.
 - L'immunothérapie dans le cancer du sein : depuis quelques années, l'immunothérapie est en passe de bouleverser la prise en charge des cancers. Les traitements par des anticorps qui ciblent la relation entre le système immunitaire et les cellules cancéreuses, permettent de progresser dans le traitement de plusieurs cancers, dont le mélanome et le cancer du poumon. Diverses approches immunothérapeutiques ont déjà été développées et testées, comme par exemple

Introduction bibliographique

le blocage des points de contrôle immunologiques en utilisant des anticorps neutralisants ou bloquants, l'induction de lymphocytes T cytotoxiques (CTL), la thérapie adoptive par transfert cellulaire et la modulation du microenvironnement tumoral pour améliorer l'activité de CTL (Jia et al., 2017). Traditionnellement, le cancer du sein n'est pas considéré comme une tumeur immunogène et différents essais cliniques sont en cours mais il n'existe pas d'immunothérapie approuvée en clinique à ce jour. La combinaison de l'immunothérapie avec des traitements conventionnels pourrait avoir un intérêt particulier pour traiter le TNBC (Vonderheide et al., 2017). Une étude récente a démontré que 26% des TNBC primaires analysées (51 sur 193) exprimaient PD-L1 (*Programmed death-ligand 1*) à la surface des cellules cancéreuses, suggérant la possibilité de cibler PD-L1 pour le traitement de TNBC (Tung et al., 2016). En effet, une étude de phase I indique que l'association de l'atezolizumab (anti-PDL1) avec le Nab-Paclitaxel (Abraxane®) est bien tolérée et montre un effet prometteur chez les patientes atteintes de TNBC métastatiques (Adams et al., 2016). Ces résultats préliminaires encourageants ont conduit à une étude de phase III pour évaluer l'effet de cette association thérapeutique sur les patients TNBC métastatiques qui n'ont jamais été traités (NCT01633970).

- La résistance aux traitements

Malgré les progrès considérables dans l'efficacité de différentes thérapies contre le cancer du sein, les cellules tumorales pourraient développer une résistance non seulement aux agents cytotoxiques, mais aussi aux médicaments ciblés. De plus, le taux de mortalité du cancer du sein reste élevé en raison de la récurrence tumorale. La résistance peut être multifactorielle et plusieurs mécanismes y sont impliqués. Depuis quelque temps, des études semblent indiquer que cela pourrait être lié à l'échec de l'éradication de toutes les cellules tumorales, en particulier une sous-population de cellules tumorales qui est responsable de l'initiation et de la progression de la tumeur. En effet, les cellules souches cancéreuses (CSC) pourraient contribuer à la résistance et la rechute de la tumeur. Les différents mécanismes de résistance aux traitements et les propriétés de CSC seront traités dans le chapitre B. Le développement de thérapies ciblant spécifiquement les CSC devrait donc améliorer l'issue clinique des patients.

B. Cellules souches et cancer du sein

1. La théorie des cellules souches cancéreuses (CSC)

a) Qu'est-ce qu'une CSC ?

(1) Définition et modèle de CSC

Les cellules souches (CS) totipotentes sont des cellules capables de s'auto-renouveler et de générer des cellules filles capables de se différencier pour former tous les types cellulaires que l'on trouve dans l'organisme (Seaberg and van der Kooy, 2003). Des cellules souches dites somatiques ou adultes ont été décrites dans la grande majorité des tissus où elles sont présentes tout au long de la vie. Elles se distinguent par deux propriétés majeures : d'une part, elles ont la capacité de se diviser pour donner une cellule identique (auto-renouvellement) assurant ainsi leur maintien au sein du tissu, et d'autre part elles peuvent donner naissance à des cellules plus spécialisées qui vont se différencier dans tous les types cellulaires du tissu (différenciation). Elles possèdent également la capacité de moduler l'équilibre entre la différenciation et l'auto-renouvellement en fonction des stimuli environnementaux (Dalerba et al., 2007). Il est maintenant admis que dans la majorité des tumeurs il existe une population rare de cellules souches cancéreuses (CSC) possédant des propriétés similaires aux CS normales et qui permettent la croissance de la tumeur, et surtout sa résistance à certains traitements anticancéreux (Batlle and Clevers, 2017; Reya et al., 2001). En effet, de par leur fonction dans un tissu normal, les CS possèdent une physiologie spécifique qui leur permet d'être plus résistantes aux agressions auxquelles elles seront soumises tout au long de la vie (Pattabiraman and Weinberg, 2014).

L'American Association for Cancer Research (AACR) a défini les CSC comme des cellules tumorales qui possèdent la capacité de s'auto-renouveler et de générer tous les types de cellules cancéreuses présentes dans la tumeur (Clarke et al., 2006). Par définition, les CSC ne peuvent donc être définies expérimentalement que par leur capacité à régénérer une tumeur dont l'hétérogénéité est identique à celle de la tumeur d'origine lors de transplantations en série. Même s'il n'est pas parfait, on considère que le meilleur test fonctionnel pour définir une CSC est actuellement la transplantation en série sur des modèles animaux. Ce test est associé à l'étude de l'expression de marqueur de CSC et à des essais *in vitro* (Tang, 2012). Les travaux

Introduction bibliographique

sur la mise en évidence des CSC ont été d'abord menés dans les leucémies dont l'accès est plus facile que dans les tumeurs solides. Ces études ont bénéficié des connaissances acquises sur l'isolement et la caractérisation des cellules souches hématopoïétiques normales (Baum et al., 1992; Morrison and Weissman, 1994; Osawa et al., 1996; Spangrude et al., 1988). Dick et ses collaborateurs ont démontré que dans le cas de la leucémie myéloïde aigue, seule une population minoritaire de cellules cancéreuses $CD34^+CD38^-$ (environ 0,2%) est capable d'induire une leucémie une fois injectée dans des souris immunodéprimées de type NOD/SCID (Bonnet and Dick, 1997). Depuis un nombre croissant de données expérimentales a également démontré l'existence des CSC putatives dans les tumeurs solides, telles que le cancer du sein (Al-Hajj et al., 2003; Ginestier et al., 2007; Ponti et al., 2005), du cerveau (Galli et al., 2004; Singh et al., 2003, 2004), du poumon (Kim et al., 2005), de la prostate (Collins et al., 2005), de la peau (Fang et al., 2005) et d'autres types de cancers (Ailles and Weissman, 2007). Ensemble, ces résultats démontrent qu'il existe une hiérarchie au sein de la population tumorale et seuls les CSC sont capables d'initier le cancer et reproduire l'hétérogénéité de la tumeur d'origine.

L'apparition de la théorie des cellules souches cancéreuses (CSC) a modifié le concept de l'origine clonale des tumeurs (Nowell, 1976). Ce concept, aussi appelé **modèle stochastique**, repose sur la possibilité que chaque cellule d'un tissu, même différenciée, peut proliférer de manière incontrôlée et initier la formation tumorale suite à l'accumulation de mutations acquises de façon aléatoire ([Figure 5](#)) (Reya et al., 2001). Cependant, certaines observations sont difficilement compatibles avec ce modèle, surtout l'hétérogénéité tumorale et la rechute après traitement. En effet, le modèle stochastique n'apporte pas directement d'explication à cette hétérogénéité et suggère que celle-ci résulte de divers facteurs intrinsèques (coexistence de multiples sous-clones génétiquement différents) et extrinsèques (variations du microenvironnement tumoral) (Nowell, 1976).

En revanche, le **modèle hiérarchique**, ou le **modèle CSC**, envisage les tumeurs non pas comme de simples expansions monoclonales de cellules transformées, mais plutôt comme des tissus tridimensionnels complexes où les cellules souches cancéreuses seraient le moteur du développement tumoral. Les CSC, comme leurs contreparties dans les tissus normaux, dotées de la capacité d'autorenouveaulement, deviennent fonctionnellement hétérogènes à la suite de la différenciation aberrante ([Figure 5](#)) (Clarke and Fuller, 2006; Dick, 2008; Reya et al., 2001).

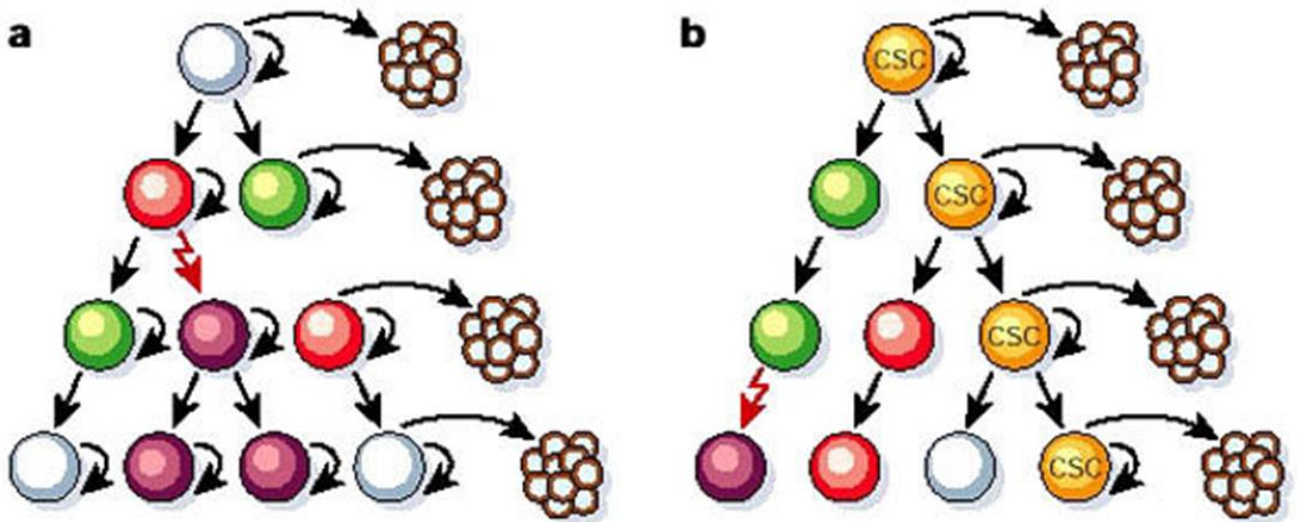


Figure 5 Le modèle stochastique traditionnel et le modèle hiérarchique des CSC.

(a) les cellules tumorales sont hétérogènes mais, la plupart des cellules peuvent proliférer de manière extensive et former de nouvelles tumeurs; (b) les cellules tumorales sont hétérogènes et seul le sous-ensemble des cellules souches cancéreuses (CSC ; en jaune) a la capacité de proliférer de manière extensive et de former de nouvelles tumeurs. (Modifié d'après (Reya et al., 2001).

Cependant, ces deux modèles ne sont pas mutuellement exclusifs et peuvent coexister pour créer une hétérogénéité au sein de la population tumorale. Il se peut que les CSC ne soient pas des entités statiques mais puissent évoluer au cours du développement de la tumeur: elles peuvent subir des changements génétiques et donner naissance aux différents sous clones où la fréquence de CSC varie (Kreso et al., 2013; Notta et al., 2011; Sarry et al., 2011).

(2) CSC et cellule à l'origine des cancers ? Questions et controverses

Les études sur les CSC ont explosé depuis les années 2000. Cependant, certains termes utilisés dans la littérature peuvent susciter des confusions. Dans certaines études, le terme « tumorigène » a été utilisé pour désigner la capacité de ces cellules à **initier** des tumeurs lorsqu'elles sont transplantées dans des souris. En effet, la mise en œuvre de la transplantation explique l'utilisation de termes alternatifs dans la littérature, tels que cellule initiatrice de tumeurs (*Tumor Initiating Cells* = TIC) et cellule tumorigène pour désigner les cellules souches cancéreuses. Or, il est important de noter la différence entre la cellule à l'origine d'un cancer et les CSC. Une tumeur provient d'une cellule normale qui a subi une transformation tumorigène à la suite de mutations génétiques. Cette cellule transformée est la cellule à l'origine d'une tumeur. Les cellules souches sont de bons candidats pour les cellules à l'origine de cancer car leur longue durée de vie pourrait leur permettre d'accumuler les mutations nécessaires à la

formation tumorale. Il est aussi possible que les cellules progénitrices puissent accumuler suffisamment de lésions génétiques pour générer une tumeur (Dontu et al., 2003a). En revanche, la cellule souche cancéreuse est une sous-population cellulaire de la tumeur qui peut initier et maintenir la propagation tumorale lorsqu'elle est transplantée. La cellule à l'origine d'une tumeur fait référence à TIC alors que les CSC sont plutôt des cellules propagatrices de tumeur (Rycaj and Tang, 2015; Visvader, 2011). Cependant, les phénotypes entre ces deux types cellulaires peuvent différer et changer d'une manière dynamique, et dans la plupart des cas, la relation entre les deux n'est pas claire. Dans certains cancers à un stade précoce, la CSC pourrait ressembler étroitement à la cellule d'origine, bien que cela reste à prouver (Visvader, 2011).

Malgré le nombre croissant de données expérimentales en faveur de la théorie des CSC, le débat reste ouvert concernant l'identification des CSC et la pertinence des modèles d'étude. En effet, les études de transplantation ont été réalisées chez les souris immunodéprimées, dépourvues de systèmes immunitaires adaptatifs et dont le microenvironnement diffère sensiblement de celui chez l'homme (Pattabiraman and Weinberg, 2014). Ainsi, la faible fréquence de CSC observées dans les études de xénogreffes résulte d'une sous-estimation de celle-ci, qui peut refléter la capacité limitée des cellules tumorales humaines à s'adapter à un environnement étranger (souris) (Kelly et al., 2007). Les CSC ne sont pas nécessairement une population rare et leur fréquence peut varier en fonction des tumeurs comme dans le cas de mélanome (Quintana et al., 2008). Depuis quelques années, les modèles de souris transgéniques et la technique de traçage cellulaire (*lineage tracing*) ont permis de mettre en évidence des CSC dans différentes tumeurs dans un environnement syngénique (Batlle and Clevers, 2017; Cho et al., 2008; Schepers et al., 2012).

(3) Propriétés des CSC

Les CSC partagent plusieurs caractéristiques communes avec les cellules souches normales, comme l'auto-renouvellement, la capacité de reproduire une hétérogénéité cellulaire et des voies de signalisation communes. Néanmoins, il faut noter que les CSC ne sont pas des cellules souches normales. Elles subissent une différenciation incomplète, produisant des cellules non fonctionnelles. Elles possèdent des altérations génétiques et évoluent dans un microenvironnement pathologique. L'interaction entre les CSC et leur microenvironnement n'est pas identique à celle des cellules souches normales (Tang, 2012).

- Auto-renouvellement et différenciation

L'auto-renouvellement et la différenciation sont les caractéristiques de toute cellule souche. L'auto-renouvellement désigne le fait qu'une cellule souche est capable de donner au moins une cellule identique à elle-même. La différenciation décrit la possibilité pour une cellule souche de se diviser en s'engageant de façon irréversible vers une ou plusieurs lignées. Ces deux propriétés fondamentales de CS sont régies par différents modes de division cellulaire. Les cellules souches peuvent avoir deux modes de division: la division symétrique et la division asymétrique (figure 6).

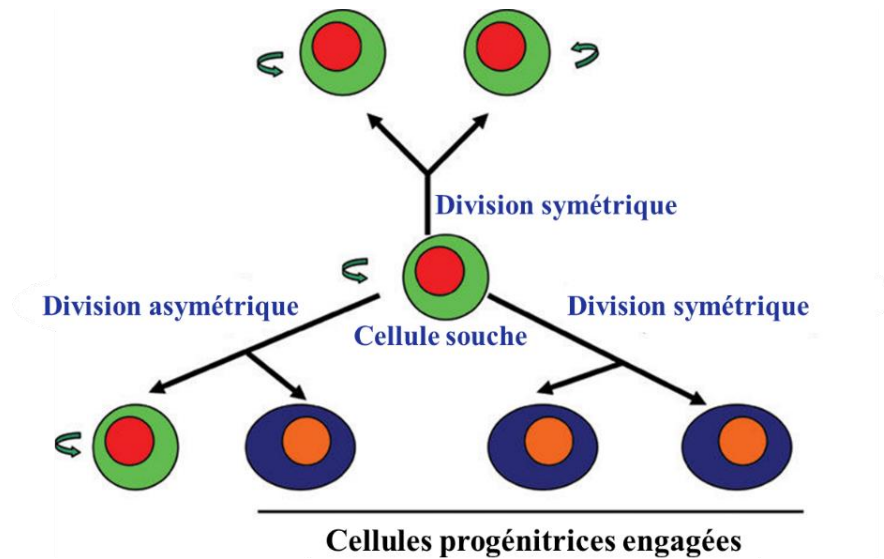


Figure 6 Caractéristiques des cellules souches : la division symétrique et asymétrique.

Dans le modèle de division asymétrique, une cellule souche produit une cellule différenciée et une cellule souche. Dans le modèle de division symétrique, une cellule souche produit deux cellules progénitrices engagées ou deux cellules souches. (Modifié d'après (Tang, 2012).

Dans le cas de la division symétrique, une cellule souche peut produire deux cellules filles identiques, soient deux cellules souches, qui permettent d'accroître le stock de cellules souches au cours du développement et maintenir le réservoir de cellules souches dans les tissus adultes. La division symétrique peut également donner naissance à deux cellules filles progénitrices qui s'engagent à la différenciation dans le tissu où elles se situent. Quant à la division asymétrique, elle génère une cellule souche identique à la cellule d'origine et une cellule progénitrice engagée. Dans le cas de cellules souches normales et de CSC, l'équilibre entre la division symétrique et asymétrique est contrôlé par différents signaux développementaux et environnementaux tels que les voies de signalisation clé : Wnt, Notch, Hedgehog. Ces facteurs jouent un rôle crucial dans le maintien de la régénération tissulaire et l'homéostasie cellulaire ainsi que la survie des CSC (Clarke and Fuller, 2006; Morrison and Kimble, 2006).

- Résistance aux traitements anti-tumoraux

Il a été proposé que les CSC possèdent divers mécanismes de résistances aux différents traitements anti-cancéreux qui sont à l'origine des échecs thérapeutiques. De ce fait, les CSC devraient être ciblées en combinaison avec des interventions conventionnelles afin d'éradiquer la tumeur (figure 7) (Reya et al., 2001).

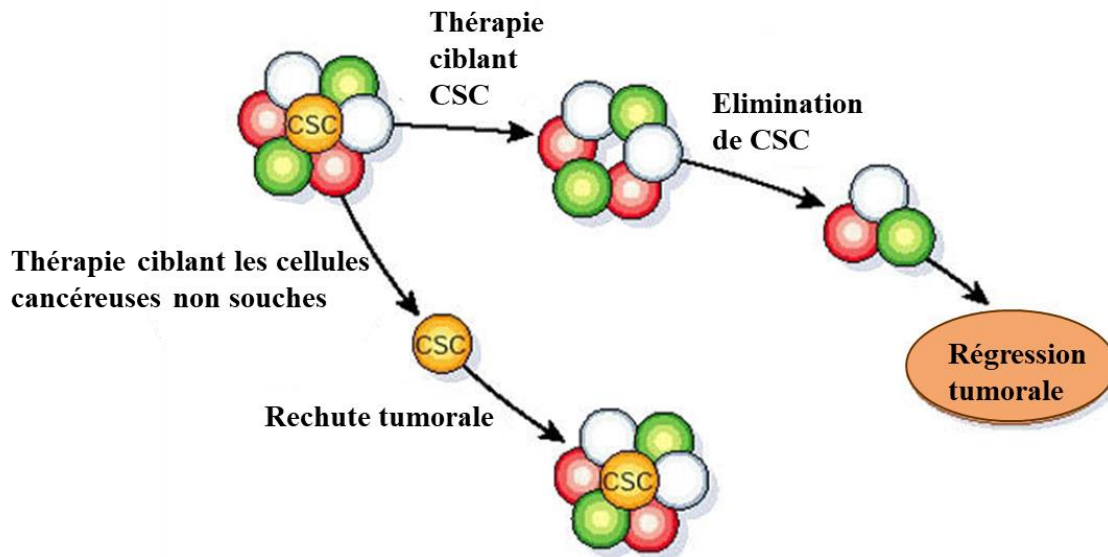


Figure 7. Le paradigme de résistance des cellules souches cancéreuses.

Les thérapies conventionnelles ne peuvent pas éliminer les CSC qui restent après le traitement et rétablissent la tumeur. En revanche, les thérapies ciblant spécifiquement les CSC et peuvent les tuer, rendant les tumeurs incapables de se maintenir ou de se développer. (Modifié d'après (Reya et al., 2001).

Ces mécanismes comprennent, par exemple, la quiescence, la surexpression de transporteurs membranaires de type ABC (*ATP-Binding Cassette*), la surexpression de protéines anti-apoptotiques et la résistance aux dommages à l'ADN (Clevers, 2011; Zhou et al., 2009). Par exemple, dans le cas de gliome, les CSC ($CD133^+$) sont plus résistantes à l'irradiation que les cellules tumorales non souches ($CD133^-$). Cette radiorésistance est principalement liée à une activation plus rapide des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN telles qu'ATM (*ataxia télangectasia mutation*), Rad17 et des protéines Chk1 et Chk2 (*checkpoint kinase 1 et 2*) (Bao et al., 2006). Une autre étude a montré que les CSC mammaires ($CD44^{high}CD24^{low}$) sont aussi plus résistantes à l'irradiation et ceci est dû à un niveau plus bas de ROS (*reactive oxygen species*) par rapport aux autres cellules de la masse tumorale. Les CSC développent moins de dommages à l'ADN et sont préférentiellement épargnées après l'irradiation par rapport aux cellules non souches (Diehn et al., 2009).

Introduction bibliographique

L'un des principaux mécanismes de résistance des CSC aux chimiothérapies est la surexpression de la famille de transporteurs membranaires ABC (ATP-Binding Cassette). Il s'agit d'un mécanisme d'efflux membranaire (pompe) qui permet de faire sortir notamment les drogues anti-cancéreuses dans le milieu extracellulaire. Il a été démontré que les transporteurs ABC sont associés à la chimiorésistance des CSC dans plusieurs types de cancers, tels que les cancers du sein, du côlon, du cerveau et du poumon (Bleau et al., 2009; Chikazawa et al., 2010; Singh et al., 2010; Wang et al., 2013). D'autre part, les CSC peuvent également échapper à la mort cellulaire (par exemple apoptose) induite par les traitements grâce à la surexpression des protéines anti-apoptotiques. C'est le cas de la protéine Bcl-2, une molécule clé dans la régulation d'apoptose par voie intrinsèque. Bcl-2 exerce sa fonction anti-apoptotique en inhibant l'activité des protéines pro-apoptotique telles que BAX et BAK. Différentes études ont montré que les CSC mammaires surexpriment Bcl-2 (Madjd et al., 2009) et Bcl-2 contribue à la chimiorésistance en activant la voie de survie Akt/PKB dans le cas des CSC d'hépatocarcinomes (Ma et al., 2008). Des études cliniques suggèrent aussi les CSC pourraient être utilisées comme biomarqueurs pendant la chimiothérapie. Une étude sur les patients atteints de cancer du sein montre que la chimiothérapie fait augmenter le pourcentage de CSC ($CD44^{high}CD24^{low}$) alors que les cellules non souches sont tuées par le traitement (Li et al., 2008).

- Métastase et rechute

La résistance aux traitements anti-tumoraux des CSC suggère leur rôle dans la métastase et la rechute. En effet, si les CSC sont capables d'échapper aux traitements (résistance), alors la métastase et la rechute (initiation d'une nouvelle tumeur) sont très probables même dans les cas où peu de CSC auraient survécu (Peitzsch et al., 2017). Cette hypothèse est renforcée par une autre caractéristique des CSC : la quiescence où le cycle cellulaire est bloqué en phase G0. La quiescence transitoire et à long terme (la dormance) a été montrée comme une caractéristique des cellules souches normales dans différents tissus (Cotsarelis et al., 1990; Jensen and Watt, 2006). Les CSC quiescentes ont été isolées dans certaines tumeurs telles que le mélanome, le cancer des ovaires et le cancer du sein (Gao et al., 2010; Pece et al., 2010; Roesch et al., 2010). Comme les traitements conventionnels ciblent les cellules qui se divisent rapidement, la quiescence peut aussi être un mécanisme par lequel les CSC échappent à la mort cellulaire. Les CSC ainsi que leur microenvironnement jouent un rôle important dans la régulation de l'alternance entre la dormance et la croissance tumorale qui peut induire la rechute (Kleffel and Schatton, 2013).

Un autre mécanisme qui peut être essentiel dans la métastase et la rechute est la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Dave et al., 2012). Dans le cas d'hépatocarcinome, il a été montré qu'il y a plus de CSC qui expriment également des marqueurs de la TEM chez les patients atteints d'une maladie métastatique ou récidive (Sun et al., 2013). Le lien entre les CSC et la TEM est traité plus en détail dans le paragraphe c)-2)-(i) suivant.

b) Plasticité des CSC

(1) L'origine des CSC

Le terme cellule souche cancéreuse a conduit à une certaine confusion. Beaucoup interprètent l'origine des CSC comme étant des cellules souches du tissu correspondant. Les CSC peuvent en effet provenir de cellules souches normales par mutation de gènes qui les rendent cancéreuses. Mais cela n'est pas obligatoirement le cas dans toutes les tumeurs. (Visvader, 2011). Il est proposé que des cellules plus différenciées pourraient, grâce à de multiples événements mutagènes, se comporter comme des CSC en re-exprimant un programme d'auto-renouvellement. En effet, dans le modèle CSC classique ([figure 6](#)), la conversion de CSC en non-CSC (cellules progénitrices et différenciées) est un processus unidirectionnel : une fois qu'une CSC a engendré une cellule fille non-CSC, celle-ci devrait rester dans un état non-CSC, avec une tumorigénicité plus faible et donner naissance à des cellules différenciées. Selon cette idée, les non-CSC sont incapables de remonter dans la hiérarchie et d'acquérir une activité similaire à une CSC (Marjanovic et al., 2013). Cependant, un nombre croissant d'études ont démontré que des cellules non-CSC peuvent subir un processus de dédifférenciation en CSC suites aux altérations génétiques ou épigénétiques (Chaffer et al., 2011; Cozzio et al., 2003; Huntly et al., 2004; Yu et al., 2011) ou par la transition épithélio-mésenchymateuse (TME) (Mani et al., 2008; Morel et al., 2008). Les non-CSC peuvent aussi être reprogrammées en CSC suite à l'irradiation dans le cas de cancer du sein (Lagadec et al., 2012) et d'hépatocarcinome (Ghisolfi et al., 2012). La [figure 8](#) illustre les origines probables de CSC. Cette plasticité cellulaire est aussi décrite dans le cas de cellules souches normales en réponse à des blessures ou en conditions expérimentales, mais pas encore démontrés dans les conditions physiologiques (Tang, 2012). La plasticité est étroitement régulée par les signaux dans le microenvironnement (la niche cellulaire) que nous discuterons dans la partie (c) dans ce chapitre.

Introduction bibliographique

et les lésions tissulaires, la TEM peut être réactivée induisant une reconversion de cellules non souches en cellules souches (Singh and Settleman, 2010). Dans le cas de cancer, l'induction de la TEM est étroitement liée aux divers signaux provenant du stroma de la tumeur, comme les composants de la matrice extracellulaire, les facteurs sécrétés tel que le TGF β (*transforming growth factor β*), ainsi que les voies de signalisation Wnt, Notch, et Hedgehog (Thiery et al., 2009). Ainsi, l'induction de la TEM dans des cellules mammaires suite à l'expression ectopique de Twist ou Snail (facteurs de transcription impliqués dans la TEM) ou après un traitement par TGF β 1 s'accompagne de l'acquisition de caractéristiques de cellules souches (Mani et al., 2008; Morel et al., 2008). De plus, les cellules souches mammaires isolées à partir de tissus sains ou de tumeurs expriment des marqueurs de la TEM (Mani et al., 2008). Les liens moléculaires entre les facteurs induisant la TEM et l'acquisition des caractéristiques de cellules souches ont été décrits dans différentes études. Par exemple, le gène *Bmi1* (*B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog*) fait partie du groupe de gènes *Polycomb* qui participe au maintien de la pluripotence (Jiang et al., 2009). Il a été montré que *Zeb1*, un facteur de transcription impliqué dans la TEM, peut moduler de manière indirecte l'expression de *Bmi1* en inhibant les microARN de la famille miR-200 (Burk et al., 2008). En revanche, un autre facteur de transcription de TEM, *Twist1* semble stimuler directement l'expression de *Bmi1* qui favorise le maintien de l'auto-renouvellement (Yang et al., 2010). Une autre étude démontre que *Snail* et *Slug* (impliqués dans la TEM) modulent l'expression des gènes régulant l'auto-renouvellement tels que *Nanog*, *Klf4* et *TCF4*, induisant une résistance aux traitements dans les cellules cancéreuses de l'ovaire (Kurrey et al., 2009). Cependant, certaines études montrent des résultats contradictoires concernant le lien entre les CSC et la TEM. Dans des lignées de cellules cancéreuses de la prostate et de la vessie, la surexpression de *Snail1* a supprimé leurs capacités d'auto-renouvellement et métastatique (Celià-Terrassa et al., 2012). Une autre étude a montré que *Prrx1* (*paired-related homeobox transcription factor 1*), un régulateur de la TEM, entraîne une diminution des caractéristiques des cellules souches et sa suppression a permis une restauration de CSC mammaires (Ocaña et al., 2012).

(ii) CSC, TEM et la métastase

Comme décrit précédemment, le processus de la TEM est lié à la perte de polarité et du gain des caractéristiques migratoires des cellules mésenchymateuses. Dans le contexte du cancer, la TEM est associée à la capacité des cellules cancéreuses à envahir les tissus voisins et à se disséminer dans la circulation lymphatique ou sanguine vers des organes distants, où elles

Introduction bibliographique

peuvent ensuite déclencher des métastases (Nieto, 2011). Plusieurs études ont démontré le rôle important de la TEM dans la métastase ; par exemple Snail1 peut augmenter l'expression des métalloprotéinases pour induire la dégradation de la matrice extracellulaire (Ota et al., 2009), et Zeb1 est impliqué dans l'invasion de la barrière de cellules endothéliales (Drake et al., 2009). De manière intéressante, l'expression de marqueurs de TEM tels que Twist1 et Zeb2, a été détectée dans des cellules tumorales circulantes (CTC) au stade initial du cancer (Hüsemann et al., 2008; Rhim et al., 2012) et l'activation de Twist1, Snail1 et Snail2 augmente le nombre de CTC et de métastases, suggérant que la TME contribue directement à la métastase (Bonnomet et al., 2012; Tsai et al., 2012).

La colonisation de nouveaux tissus et la formation de macrométastases sont les dernières étapes de la cascade invasion-métastase qui nécessite l'adaptation de cellules cancéreuses disséminées au nouveau microenvironnement. La capacité des CSC à initier une nouvelle tumeur suite à une implantation expérimentale et le processus de colonisation après dissémination métastatique semblent très similaires. En effet, comme démontré précédemment, la TEM peut induire la dédifférenciation de cellules cancéreuses vers un phénotype de cellules souches, ce qui conduit au concept de « cellules souches cancéreuses migrantes » comme la base de la métastase (Brabletz et al., 2005). De même, des travaux suggèrent que les cellules cancéreuses épithéliales, qui subissent une dédifférenciation par la TEM pour initier des métastases, doivent subir une transition réciproque appelée mésenchymateuse-épithéliale (TME) lors de la colonisation (Ocaña et al., 2012; Tsai et al., 2012). Une des explications pour cette transition en cellules épithéliales est que les cellules dédifférenciées suite à la TEM montrent un arrêt en prolifération, rendant impossible la colonisation de nouveau site. Cette hypothèse est soutenue par le fait que les facteurs de transcription de la TEM tel que Snail1 peuvent inhiber directement la prolifération cellulaire (Vega et al., 2004).

Introduction bibliographique

c) *La CSC et son microenvironnement*

Les cellules souches se trouvent dans une « niche de cellules souches », un microenvironnement spécifique qui joue un rôle clé dans la régulation de l'auto-renouvellement par divers facteurs sécrétés ou interactions directes avec les cellules. Le concept de la niche a été initialement proposé dans le contexte du système sanguin (Schofield, 1978) et il a été mis en évidence *in vivo* grâce aux études chez la *Drosophile* (Ferraro et al., 2010; Lin, 2002). Une niche fonctionnelle sert à maintenir l'équilibre de la quiescence et de l'activation des cellules souches (Mesa et al., 2015). Dans le cas des CSC, une « niche de cellules souches cancéreuses » est également présente et les interactions avec cette niche sont essentielles pour le maintien des CSC (Plaks et al., 2015). La niche elle-même est une partie du microenvironnement tumoral (TME), qui est un terme collectif pour désigner le stroma adjacent des cellules normales et tumorales (Hanahan and Coussens, 2012).

(1) L'interaction des CSC avec la niche cellulaire

Les tumeurs d'origines différentes et aux différents stades de progression ne contiennent pas nécessairement les mêmes composants. Néanmoins, ces trois classes de composants représentent les éléments les plus abondants présents dans le microenvironnement des tumeurs solides (figure 9). Les composants primaires de la niche peuvent être classés en trois groupes (Ye et al., 2014):

- Les cellules stromales comprennent les fibroblastes, les myofibroblastes, les cellules souches mésenchymateuses, les adipocytes et les cellules endothéliales. Les cellules souches mésenchymateuses ont été d'abord dérivées de la moelle osseuse puis de presque tous les tissus (Ullah et al., 2015). Ce sont un des composants critiques de la niche qui sécrètent une variété de cytokines assurant la régulation paracrine et autocrine dans le microenvironnement tumoral, favorisant la prolifération et la métastase des cellules cancéreuses (Cuiffo and Karnoub, 2012). Il a été décrit que les cellules souches mésenchymateuses participent à créer une niche favorable à la formation des CSC et à la progression tumorale grâce à la sécrétion de la prostaglandine E2 (Li et al., 2012). Les CSC mammaires peuvent produire de l'interleukine-6 qui attire et active les cellules souches mésenchymateuses qui sécrètent la cytokine CXCL7 pour le maintien de CSC (Liu et al., 2011). Les cellules endothéliales qui constituent la paroi des vaisseaux sanguins jouent un rôle important dans la fonctionnalité vasculaire, l'angiogenèse ainsi

Introduction bibliographique

que la régulation de la dissémination des cellules cancéreuses. Il a été montré que les cellules endothéliales de la niche peuvent produire la forme soluble de Jagged-1 qui conduit à l'activation de la voie Notch et favorise les cellules souches cancéreuses du côlon (Lu et al., 2013).

- Les cellules immunitaires comprennent les cellules de la lignée lymphoïde telles que les lymphocytes T, B et les cellules NK (*Natural killer*), ainsi que les cellules de la lignée myéloïde comme les macrophages, les neutrophiles et les cellules myéloïdes suppressives (MDSC pour *myeloid-derived suppressor cells*) (Plaks et al., 2015). Le rôle de la niche de CSC dans la modulation d'immunité tumorale est un domaine qui attire de plus en plus l'attention. Le microenvironnement tumoral est caractérisé par une inflammation chronique qui stimule la prolifération de cellules tumorales et la métastase (Cabarcas et al., 2011). Afin d'échapper à la surveillance immunitaire, les cellules cancéreuses induisent une immunosuppression par différents mécanismes. Par exemple, elles peuvent sécréter des chémokines et cytokines pour recruter les macrophages associés aux tumeurs (*Tumor-associated macrophages = TAM*), les neutrophiles associés aux tumeurs (*Tumor-associated neutrophils = TAN*), et les cellules myéloïdes suppressives qui contribuent à cette immunosuppression (Chanmee et al., 2014; Kitamura et al., 2015).
- La matrice extracellulaire se compose de protéines, glycoprotéines et protéoglycanes qui possèdent différentes fonctions physiques et biochimiques (Lu et al., 2012). La matrice extracellulaire assure non seulement la structure du tissu, mais effectue aussi diverses fonctions régulatrices. Dans le cancer, elle est considérée comme une barrière physique contre les agents thérapeutiques, ce qui peut protéger les CSC des traitements anticancéreux (Wong and Rustgi, 2013). Il a été montré que les propriétés mécaniques de la matrice peuvent également influencer les fonctions de CSC : une matrice rigide favorise la prolifération et la résistance aux chimiothérapies tandis qu'une matrice souple induit les caractéristiques de CSC (clonogénicité accrue et expression de marqueurs de CSC) (Schrader et al., 2011).

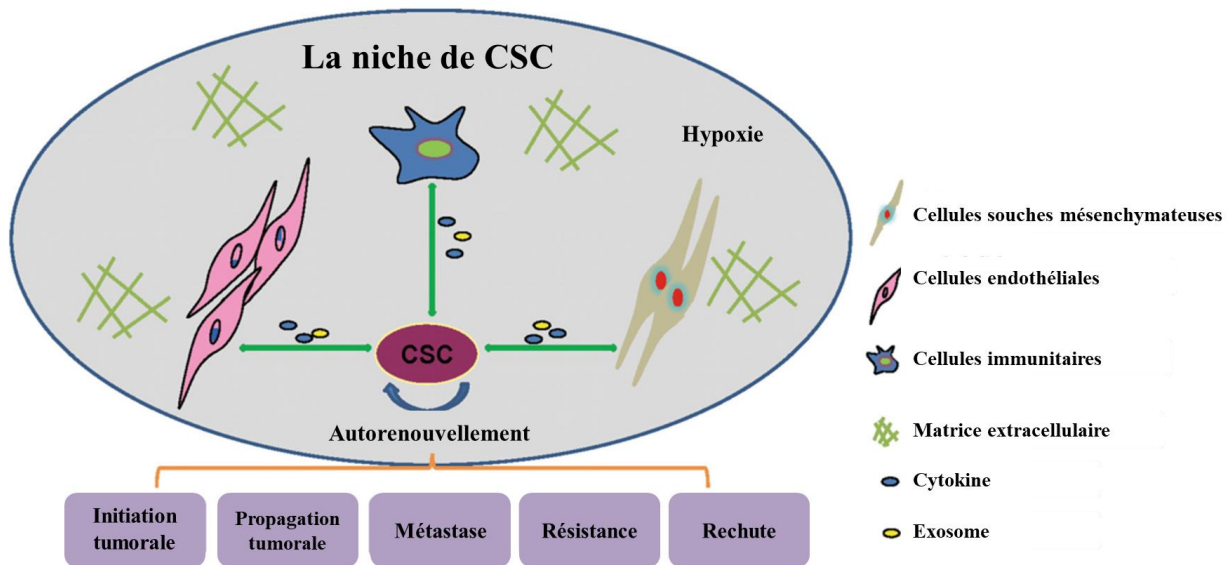


Figure 9. Représentation schématique des interactions entre le CSC et leur microenvironnement tumoral.

La progression tumorale nécessite une coopération entre les CSC et leur niche. La rétroaction réciproque entre les CSC et les composants de la matrice extracellulaire, les cellules stromales et, plus encore, les réseaux de cytokines et d'exosomes est importante pour la prolifération et la survie des CSC. (Modifié d'après (Ye et al., 2014).

(2) La niche et l'hypoxie

Les tumeurs solides sont connues pour contenir des régions qui sont caractérisées par une faible concentration d'oxygène (hypoxie), un pH bas et une carence en nutriments due à une division cellulaire rapide et une formation aberrante des vaisseaux sanguins (Keith and Simon, 2007). De plus en plus de travaux suggèrent que les CSC résident dans un microenvironnement hypoxique qui offre des avantages pour la survie des CSC (Casazza et al., 2014). L'hypoxie protège notamment des CSC contre le stress oxydatif lié à la génération d'ions peroxyde (*Reactive Oxygen Species = ROS*) qui peuvent endommager l'ADN (Diehn et al., 2009). De plus, l'hypoxie favorise l'auto-renouvellement de CSC en induisant l'expression de facteurs de transcription importants tels qu'Oct4, Nanog et c-myc dans le cas de glioblastome (Li et al., 2013). L'hypoxie participe également à l'immunosuppression en potentialisant l'inhibition de la prolifération et l'activation de lymphocytes T induite par CSC dans les gliomes (Wei et al., 2011). Plusieurs études ont aussi montré que l'hypoxie favorise la dédifférenciation des cellules cancéreuses du sein (Helczynska et al., 2003; Louie et al., 2010).

Introduction bibliographique

Les facteurs induits par l'hypoxie (*Hypoxia-induced factor*=*HIF*) semblent jouer un rôle déterminant dans la survie de cellules cancéreuses en ciblant les régulateurs clé dans l'angiogenèse et le maintien de l'auto-renouvellement tels que VEGF (*Vascular endothelial growth factor*), GLUT-1 (*Glucose transporter 1*), Oct4 et Notch (Cabarcas et al., 2011). Plusieurs études ont démontré qu'une expression élevée d'HIF1 α favorise la TEM, et donc potentiellement le CSC (Gammon et al., 2013). Des études récentes ont montré le rôle important de HIF2 α dans le maintien de CSC où HIF2 α est exprimé de manière significative dans la sous-population de CSC et favorise la prolifération tumorale et la résistance aux irradiations (Bertout et al., 2009; Li et al., 2009). Ainsi, HIF2 α et plusieurs autres gènes régulés par HIF sont préférentiellement exprimés dans les CSC par rapport aux autres cellules tumorales plus différenciées (Heddleston et al., 2009). De plus, dans le cancer du sein, l'hypoxie peut favoriser la métastase grâce à l'activation de HIF qui module la signalisation paracrine entre les cellules cancéreuses et les cellules souches mésenchymateuses en induisant la sécrétion de la chémokine CXCL10 dans la niche (Chaturvedi et al., 2013).

(3) Les voies de signalisation régulant les CSC

De nombreux mécanismes moléculaires régulent la biologie de cellules souches. Les voies de signalisation qui modulent l'homéostasie des cellules souches normales sont hautement régulées. Dans le contexte du cancer, beaucoup de ces voies sont anormalement activées ou réprimées et ces anomalies contribuent aux propriétés d'auto-renouvellement, de prolifération et de survie des CSC. Ces voies sont activées par de nombreux signaux moléculaires extrinsèques présents dans la niche et intrinsèques tels que les facteurs de transcription liés à la pluripotente.

(i) La voie Notch

La voie Notch est une voie importante impliquée dans la régulation de diverses fonctions biologiques critiques telles que l'embryogenèse, la différenciation cellulaire, la prolifération et l'apoptose (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Elle intervient aussi dans le développement de la glande mammaire, l'hématopoïèse, la régulation immunitaire et la survie des cellules souches neurales (Takebe et al., 2011). L'activation de la voie Notch dépend d'une interaction entre des ligands spécifiques et ses récepteurs membranaires. Chez les mammifères, les ligands

canoniques de Notch peuvent être classés en deux familles qui ont des structures distinctes : les ligands Delta-like (DLL) 1, 3, 4 et les ligands Jagged 1 et 2 qui interagissent avec les 4 récepteurs Notch 1, 2, 3, et 4 (Dontu et al., 2004). La liaison du ligand au récepteur Notch induit un clivage protéolytique du récepteur et génère des fragments intracellulaires et extracellulaires. Le fragment intracellulaire (NICD) est la forme active du récepteur qui est ensuite relocalisée dans le noyau où il va jouer son rôle de facteur de transcription en modulant l'expression des gènes cibles (figure 10) (Kadesch, 2000). Selon le contexte cellulaire spatio-temporel, les gènes exprimés lors d'une réponse à la voie Notch vont orienter le devenir cellulaire. Alors que les ligands canoniques sont responsables de la majorité de la signalisation Notch, un groupe diversifié de ligands non canoniques structurellement non apparentés a également été identifié, ce qui élargit le répertoire des ligands rapporté pour activer la voie Notch. L'activité du ligand peut également être régulée indirectement par d'autres voies de signalisation, ce qui fait de l'activation de la voie Notch un mécanisme complexe et finement régulé. (D'SOUZA et al., 2010).

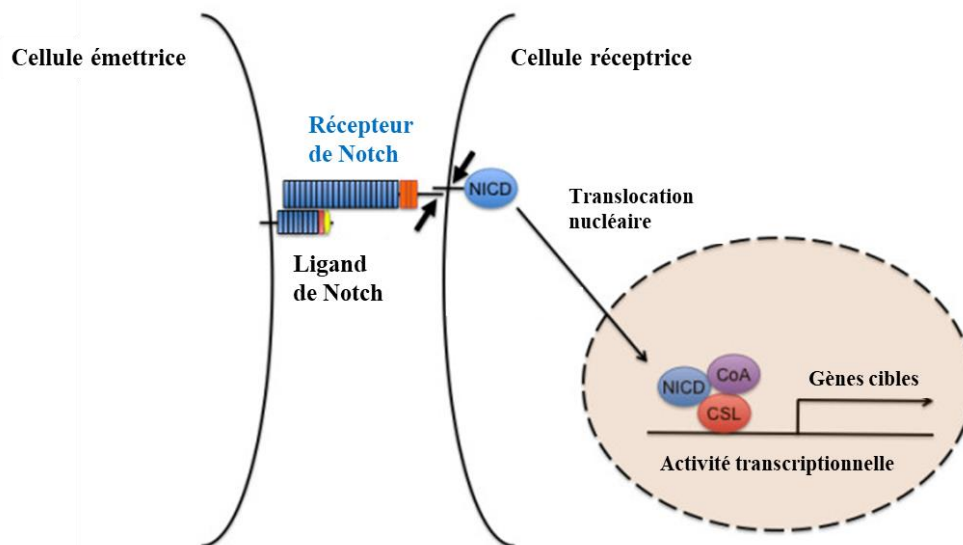


Figure 10. Voie de signalisation Notch.

Lors de la liaison du ligand, un processus de clivage protéolytique en deux étapes (petites flèches) dans la région juxtamembranaire et le domaine transmembranaire du récepteur Notch, puis le domaine intracellulaire Notch (NICD) est libéré de la membrane et relocalisé vers le noyau, où il forme un complexe d'activation transcriptionnelle avec le facteur de transcription CSL et les coactivateurs (CoA), induisant ainsi la transcription des gènes cibles. (Modifié d'après (Kume, 2009).

Etant donné le nombre de fonctions importantes qui lui sont associées, la dérégulation de la voie Notch peut conduire au développement tumoral (Allenspach et al., 2002). Le rôle

Introduction bibliographique

potentiel de la voie Notch dans les CSC est dépendant du contexte cellulaire car elle peut interagir avec d'autres voies de signalisation. Dans les tumeurs intestinales induites par la mutation Apc (molécule de régulation de la concentration en β -caténine), l'inhibition de Notch a induit la différenciation des cellules tumorales, suggérant que l'activation des voies Wnt et Notch est nécessaire pour maintenir les CSC en état non différencié (van Es et al., 2005). Ainsi, les CSC dérivées de patients atteints de cancer du pancréas expriment un niveau plus élevé de gènes de la voie Notch et l'inhibition de Notch a diminué le nombre de CSC et Leur potentiel pour former des sphères *in vitro* (Abel et al., 2014). La voie Notch est également impliquée dans la reprogrammation des cellules cancéreuses du sein non-CSC en CSC après irradiation (Lagadec et al., 2012). En revanche, dans les souris Notch1-null, la délétion de Notch1 entraîne le développement de tumeurs de la peau. Et les études sur le mécanisme ont révélé que les voies Hedgehog et Wnt sont activées en absence de Notch pour la tumorigenèse (Nicolas et al., 2003).

(ii) *La voie Wnt/ β -caténine*

La voie Wnt est une voie essentielle pour le développement embryonnaire et l'homéostasie tissulaire dans les tissus adultes. Similaire à la voie Notch, elle intervient dans le contrôle de la prolifération, la différenciation et l'autorenouvellement des cellules souches (Clevers, 2006; MacDonald et al., 2009). Les protéines Wnt sont une famille de glycoprotéines sécrétées qui agissent comme ligands pour les récepteurs membranaires Frizzled (Fz). La liaison de Wnt à son récepteur entraîne une cascade de signalisation aboutissant à l'accumulation de la β -caténine dans le cytosol et à sa translocation dans le noyau. La β -caténine forme ensuite un complexe avec les facteurs de transcription TCF/LEF et module l'expression de gènes cibles (figure 11).

Une activation aberrante de la voie Wnt a été rapportée dans de nombreuses tumeurs et a été associée à l'activité des cellules souches (Reya and Clevers, 2005). L'activation de la voie Wnt induit l'expression de HoxB4 et Notch1 qui jouent un rôle dans l'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques (Reya et al., 2003). Dans le cas du cancer du sein, il a été montré que les activateurs de la voie Wnt sont souvent amplifiés ou surexprimés tandis que les inhibiteurs sont inhibés ou inactivés (Incassati et al., 2010). Dans les souris transgéniques MMTV-Wnt1 modèle de cancer du sein, la délétion du récepteur Lrp5 (corécepteur de Frizzled) entraîne l'inhibition de la tumorigenèse induite par l'expression de Wnt1 et une diminution du nombre de CSC mammaires (Lindvall et al., 2006). En revanche, le blocage de la voie Wnt

diminue la prolifération et l'invasion cellulaire en inhibant les CSC mammaires CD44⁺CD24⁻ALDH1⁻ dans la lignée murine de cancer du sein 4T1 (Jang et al., 2015).

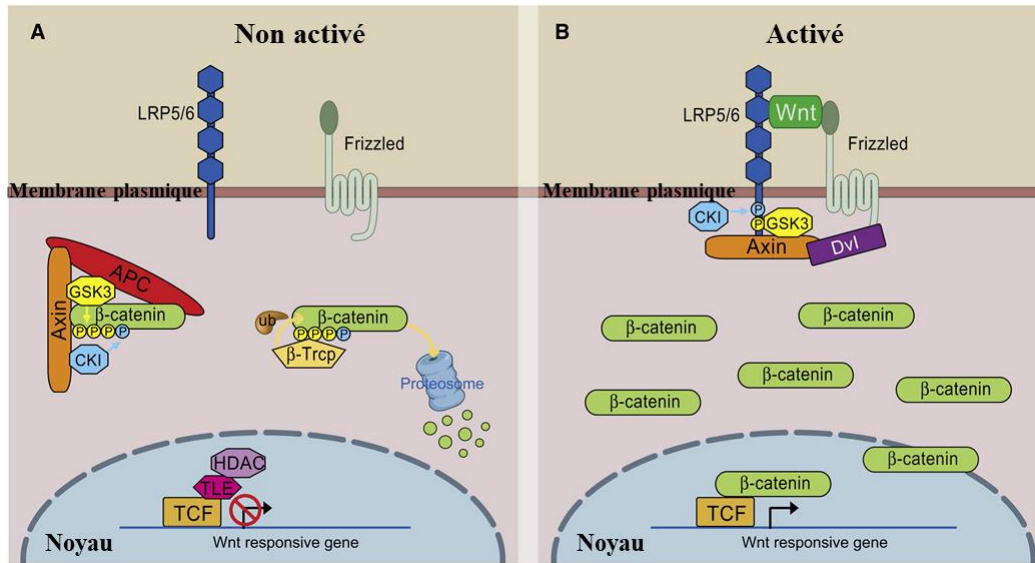


Figure 11. Voie de signalisation Wnt.

(A) En absence de Wnt, la β -caténine forme un complexe avec l'axine, APC et GSK3 β . Cela entraîne sa dégradation par le protéasome; ses gènes cibles sont ainsi réprimés (B) Lorsque Wnt se lie au récepteur Frizzled, la β -caténine est libérée du complexe de dégradation et s'accumule dans le cytosol. Sa translocation dans le noyau permet son lien avec les facteurs de transcription TCF/LEF induisant l'expression de gènes cibles. (Modifié d'après (MacDonald et al., 2009).

(iii) *La voie Hedgehog*

La voie Hedgehog (Hh) est une voie complexe qui participe activement à l'embryogenèse et à la morphogenèse de nombreux organes. Elle assure diverses fonctions cellulaires telles que la prolifération et la différenciation cellulaire, et la mise en place de nombreux tissus. Chez l'adulte, elle participe à la régulation de la survie et à la prolifération de cellules souches (Briscoe and Théron, 2013). L'activation de la voie Hh est initiée par la liaison d'un ligand Hh (Sonic, Indian ou Desert) au récepteur membranaire Ptch1 qui libère son co-récepteur Smoothened (Smo). Smo migre ensuite de la membrane plasmique vers le cil primaire et intervient dans l'activation de facteurs de transcription de la famille Gli dans le noyau (Figure 12).

Chez l'adulte, la voie Hh est en grande partie inactivée dans de nombreux tissus sauf le système nerveux central, la peau, les cheveux et les dents. Il a été démontré récemment que la voie Hh joue un rôle dans la régulation des cellules souches et sa dérégulation a été décrite dans de nombreux types de cancers (Merchant and Matsui, 2010). Des études ont montré que l'activation de la voie Hh est nécessaire pour la prolifération de CSC dans le myélome multiple

et sa suppression limite l'auto-renouvellement et induit la différenciation (Hahn et al., 1996; Peacock et al., 2007). Dans le cas de gliome, les CSC surexpriment les gènes impliqués dans la voie Hh comme Gli1, SHH et Ptch1 et un traitement par un inhibiteur de Hh entraîne une diminution de la prolifération, de l'auto-renouvellement et de la clonogénicité (Clement et al., 2007).

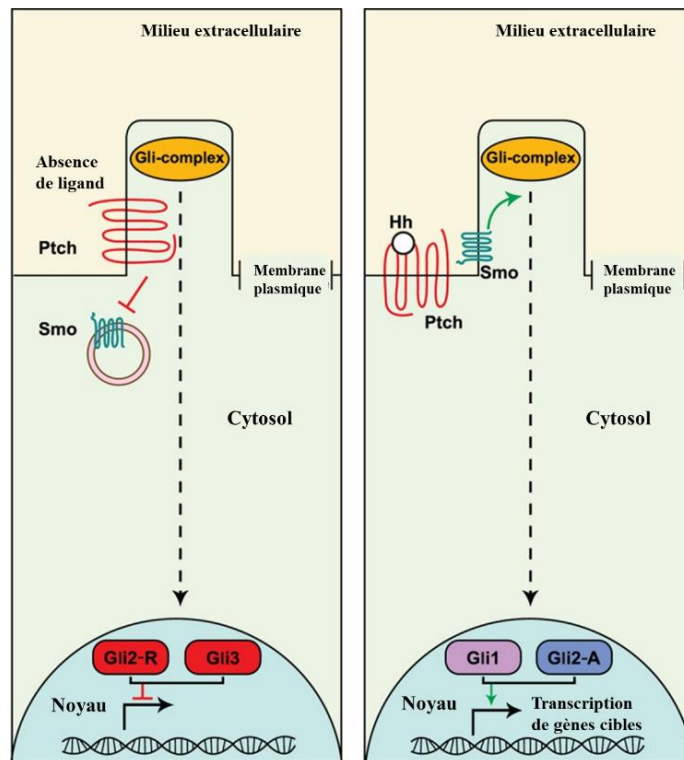


Figure 12. Voie de signalisation Hedgehog.

En absence de ligands Hh, le récepteur Patched (Ptch) inhibe la protéine membranaire Smoothed (Smo) et la transcription du gène cible est inhibée par Gli3 et Gli2-R (R pour répresseur). Lorsque les ligands Hh se fixent à Ptch, l'inhibition de Smo est levée, induisant l'activation de Gli1 et Gli2-A (A pour activateur) qui déclenche la transcription du gène cible de la voie Hedgehog (Modifié d'après (Matsui, 2016)).

(iv) *La voie Bmi1*

Le gène *Bmi1* (*B-cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1*) fait partie de la famille des gènes Polycomb qui agissent comme des inhibiteurs transcriptionnels avec des rôles essentiels dans le développement de l'organisme. Il a été démontré que *Bmi1* est impliqué dans de multiples processus biologiques, tels que le développement embryonnaire, le maintien des cellules souches, la différenciation et la tumorigenèse (van der Lugt et al., 1994). Par exemple, *Bmi1* est fortement exprimée dans les cellules souches hématopoïétiques murines et humaines où il est nécessaire à leur auto-renouvellement (Park et al., 2003). Il a été montré

que les CSC sont aussi enrichies en Bmi1 et cette expression est corrélée avec les marqueurs de CSC tels que CD133 (Bertolini et al., 2009). De manière intéressante, il a été démontré que Bmi1 est un gène en aval de la voie Hedgehog et Bmi1 serait impliqué dans la régulation des cellules souches mammaires normales et cancéreuses par la voie Hh (Liu et al., 2006). Alors que le mécanisme moléculaire par lequel Bmi1 régule l'auto-renouvellement et la différenciation des cellules souches reste inconnu, une des hypothèses est sa fixation aux promoteurs de p16^{INK4a} et p19^{ARF} entraînant une diminution de l'expression de ces gènes donc une inhibition de la senescence cellulaire. En inhibant ces deux protéines, Bmi1 pourrait favoriser la prolifération cellulaire et activer l'auto-renouvellement des cellules souches neurales (Molofsky et al., 2005). Une étude récente propose que Bmi1 pourrait contrôler l'auto-renouvellement des cellules souches mammaires par l'activation de l'expression de Nanog via la voie NFκB (Paranjape et al., 2014).

2. CSC dans le cancer du sein

a) *Les cellules souches dans la glande mammaire normale*

La glande mammaire est un organe dont la structure dynamique varie avec l'âge, le cycle menstruel et l'état reproducteur de la femme comme décrit précédemment. Les capacités de développement et de régénération de la glande mammaire suggèrent que l'épithélium mammaire abrite des cellules souches. Pour rappel, l'épithélium mammaire est composé de deux lignées (*lineage*) cellulaires principales : les cellules luminales qui entourent une lumière centrale et les cellules myoépithéliales reposant sur la membrane basale. Les cellules souches sont dites bi/multipotentes lorsqu'elles donnent naissance à plus d'une lignée de leur tissu d'origine, unipotentes si leur destin est restreint à une seule lignée. Puisque les cellules souches mammaires (MaSCs) et les CSC du sein partagent des nombreuses propriétés importantes, une meilleure compréhension de la différenciation cellulaire dans la glande mammaire normale est donc fondamentale pour comprendre l'origine et l'hétérogénéité du cancer du sein (Lloyd-Lewis et al., 2017; Visvader and Stingl, 2014).

- Cellules souches mammaires murines

En 1959, DeOme et ses collaborateurs ont présenté la première étude démontrant que des fragments d'épithélium isolés de différentes régions de la glande mammaire murine étaient

Introduction bibliographique

capables de reconstituer une arborescence canalaire complète après transplantation orthotopique (Medina, 2010). Depuis, différentes études ont été publiées ayant pour but d'identifier et de caractériser les MaSCs dans les modèles murins en s'appuyant sur deux techniques principales : la transplantation *in vivo* et le *lineage tracing* (le traçage de lignée). La capacité d'une cellule unique à régénérer une glande entière comprenant des cellules luminales et myoépithéliales organisées en bicouche lors d'une greffe en série chez la souris a été pendant longtemps considérée comme le test de référence pour la détection des MaSCs. En effet, grâce à la transplantation, il a été montré qu'une seule cellule est capable de former une glande mammaire fonctionnelle (Shackleton et al., 2006; Stingl et al., 2006). Ainsi, différentes populations épithéliales de la glande mammaire adulte ont pu être identifiées grâce à l'utilisation de la cytométrie en flux et caractérisées par leur expression de différents marqueurs de surface : par exemple, la population $\text{Lin}^- \text{CD49f}^{\text{hi}} \text{CD29}^{\text{hi}} \text{CD24}^{+\text{mod}} \text{Sca1}^{\text{low}}$ est enrichie en MaSCs (Shackleton et al., 2006; Shehata et al., 2012; Sleeman et al., 2005; Stingl et al., 2006). Ces travaux ont également suggéré que des MaSCs multipotentes étaient localisées dans le compartiment basal. Cependant, différentes études suggèrent que la transplantation ne permet pas de refléter le véritable comportement des cellules souches, puisque le processus de dissociation cellulaire et la transplantation dans le fat pad (coussin adipeux mammaire) peut avoir un impact sur les potentialités cellulaires (van Amerongen et al., 2012; Van Keymeulen et al., 2011). Néanmoins, cette technique reste un outil important pour évaluer les propriétés d'auto-renouvellement et de régénération des cellules souches de manière pertinente. Une autre approche consiste en la technique de *lineage tracing* qui permet d'évaluer le devenir des cellules souches *in vivo* dans les conditions physiologiques en utilisant des modèles de souris transgéniques. Elle a permis de mettre en évidence des MaSCs unipotentes à la fois dans la lignée luminale et la lignée myoépithéliale mais aussi des MaSCs bi/multipotentes (Rios et al., 2014; Van Keymeulen et al., 2011; de Visser et al., 2012). Cependant, le *lineage tracing* présente aussi ses limites qui sont surtout liées à une efficacité d'expression limitée de certains promoteurs et/ou leur faible activité transcriptionnelle. Néanmoins, les résultats de la transplantation et le *lineage tracing* ont démontré une hiérarchie cellulaire dans la glande mammaire (figure 13).

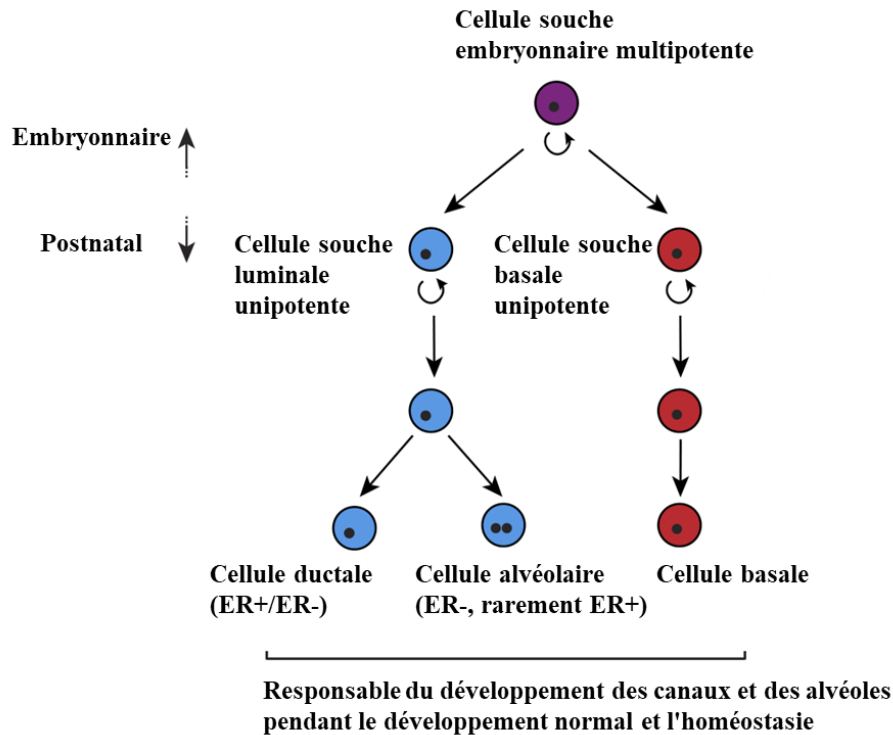


Figure 13. Modèle de différenciation hiérarchique de l'épithélium mammaire.

Les MaSCs multipotentes sont présentes dans l'embryon. Bien que le stade exact de spécification de la lignée ne soit pas clair, le développement de la glande mammaire postnatale est principalement conduit par des cellules souches unipotentes lumineales et basales. Les cellules souches lumineales donnent naissance à des cellules canalaies et alvéolaires qui peuvent être positives aux récepteurs des œstrogènes (ER) ou négatives. (Modifié d'après (Lloyd-Lewis et al., 2017).

- Cellules souches mammaires humaines

De nombreux groupes ont identifié des cellules souches/progénitrices épithéliales mammaires humaines en se basant sur les découvertes dans les modèles murins. Les approches les plus utilisées à ce jour pour détecter les MaSCs humaines putatives reposent sur la culture de sphères *in vitro* et la transplantation dans des souris immunodéprimées de différentes sous-populations de cellules mammaires afin de comparer leur capacité d'auto-renouvellement et de différenciation. Les principaux défis techniques dans ces études sont liés à la détermination d'un environnement approprié à la prolifération et la différenciation des MaSCs (Kuperwasser et al., 2004). De plus, différents groupes ont obtenu des données contradictoires concernant le phénotype des MaSCs humaines. Par exemple, plusieurs études indiquent que les MaSCs bipotentes sont caractérisées par un phénotype CD49f^{hi}EpCAM^{lo} et sont limitées au compartiment des cellules basales (Eirew et al., 2008; Lim et al., 2009; Stingl et al., 1998). En revanche, un autre rapport (Keller et al., 2012) suggère que les compartiments luminal et basal contiennent tous les deux des cellules progénitrices bipotentes. Il existe également des

divergences liées aux marqueurs et stratégies de transplantation. Par exemple, l'aldéhyde déshydrogénase 1 (ALDH1) a été établi comme un marqueur fonctionnel pour les cellules souches mammaires (Ginestier et al., 2007) puisque seules les cellules ALDH1⁺ pourraient générer des glandes mammaires lors de l'injection orthoptique chez les souris humanisées. Cependant, avec une autre technique d'implantation, il a été montré que les MaSCs se trouvent dans la fraction ALDH^{low} du compartiment basal (Eirew et al., 2012).

b) Les cellules souches cancéreuses mammaires

Le cancer du sein fait partie des premières tumeurs solides à partir desquelles les CSC ont pu être identifiées et isolées. En utilisant des marqueurs de surface cellulaire, Al-Hajj et ses collègues ont découvert que les cellules Lin⁻CD44⁺CD24^{-/low}ESA⁺ isolées de tumeurs primaires et de métastases de patients atteints de cancer du sein étaient enrichies en CSC. Seulement 100 cellules Lin⁻CD44⁺CD24^{-/low}ESA⁺ étaient capables de générer des tumeurs chez les souris immunodéprimées NOD/SCID (*Non Obese Diabetic Severe Combined ImmunoDeficiency*) alors que plusieurs dizaines de milliers de cellules non tirées de la même tumeur, en étaient incapables (Al-Hajj et al., 2003). De plus, les tumeurs formées par les cellules Lin⁻CD44⁺CD24^{-/low}ESA⁺ pouvaient reproduire l'hétérogénéité tumorale observée dans la tumeur initiale. D'autres travaux ont utilisé l'activité de l'ALDH comme marqueur pour enrichir la population de CSC (ALDH⁺) dans le cancer du sein. Il est intéressant de noter que les deux sous-populations de CSC : CD44⁺CD24^{-/low} et ALDH⁺, se chevauchent mais ne sont pas identiques (Ginestier et al., 2007). Il a été montré ensuite que les cellules CD44⁺CD24^{-/low} sont plutôt quiescentes et mésenchymateuses alors que l'ALDH marquent des cellules prolifératives et épithéliales, ce qui révèle la plasticité entre différentes populations de CSC et leur implication dans différentes étapes de la tumorigénèse (Liu et al., 2014b). Ainsi, plusieurs études ont suggéré que les différents sous-types de cancers du sein peuvent contenir des CSC de différentes origines avec des marqueurs de surfaces distincts (Charafe-Jauffret et al., 2009; Wright et al., 2008).

Le cancer du sein a été classé en six sous-types moléculaires (cf. chapitre A). Il a été proposé que les différents sous-types pourraient provenir de différentes cellules à l'origine de cancer : le sous-type basal ayant pour l'origine des cellules souches basales et le sous-type luminal provenant de cellules progénitrices engagées dans la différenciation luminale (Dontu et al., 2003a; Melchor and Benítez, 2008). Cependant, les cellules progénitrices luminales ont été récemment identifiées comme étant les cellules à l'origine des tumeurs basales avec la

mutation BRCA1. En effet, l'analyse transcriptomique de différentes sous-populations épithéliales mammaires et de différents sous-types de cancers du sein ont révélé que la signature génétique des cellules progénitrices luminales est associée au sous-type basal tandis que la signature des MaSCs est corrélée aux sous-types normal-like et claudin-low (Lim et al., 2009). D'autres études sur les modèles de souris transgéniques ont confirmé ces observations (Molyneux et al., 2010; Proia et al., 2011). Ces travaux soulignent le rôle important de cellules progénitrices luminales dans l'initiation de tumeurs mammaires basales et pourraient avoir des impacts sur le développement des cibles thérapeutiques contre ce sous-type très agressif.

c) *Isolement des CSC du sein*

Afin d'élucider les fonctions et les populations de CSC dans le cancer du sein, il faut les isoler et enrichir en utilisant différentes méthodes. Comme dans d'autres types de cancers, les méthodes de culture, les marqueurs de surfaces ou les marqueurs qui confèrent des propriétés fonctionnelles des cellules souches mammaires normales ont été étendus et utilisés pour identifier les populations de cellules souches cancéreuses.

(1) Culture en suspension (formation des sphères)

La culture de sphères dans des conditions non adhérentes a été initialement adaptée dans les études de cellules souches mammaires normales. Les cellules souches et progénitrices mammaires sont capables de survivre à la culture en suspension dans du milieu asérique et produire des colonies sphériques (*mammospheres*). Il a été montré que ces mammosphères sont enrichies en population de cellules souches et capables de se différencier pour générer des structures fonctionnelles complexes tridimensionnelles *in vitro* (organoïdes) (Dontu et al., 2003b). Ce système est maintenant largement utilisé dans l'étude des CSC mammaires, par exemple pour établir des cultures à long terme enrichies en cellules souches / progénitrices de tumeurs (*tumorspheres*). Ainsi, afin d'évaluer la capacité d'autorenouvellement de cellules souches, qui est considérée comme une propriété unique des cellules souches, les sphères sont dissociées pour former des sphères de deuxième et troisième génération. Cependant, il faut souligner que certaines lignées cellulaires semblent posséder cette capacité de façon omniprésente, ce qui suggère que les cellules qui forment des sphères *in vitro* ne sont pas obligatoirement des CSC. De même, toutes les CSC ne sont pas capables de générer des sphères en culture, par exemple lorsqu'elles sont quiescentes (Pastrana et al., 2011).

Introduction bibliographique

(2) Side population : marqueur de cellules souches normales et cancéreuses

La Side Population (SP) est caractérisée comme une sous-population cellulaire qui est faiblement marquée par des colorants vitaux en cytométrie en flux, tels que Hoechst 33342 ou Rhodamine 123. Cette technique est basée sur l'efflux du colorant via des transporteurs membranaires de la famille ABC (*ATP binding cassettes*) qui sont surexprimées sur la surface des cellules souches normales et cancéreuses (Goodell et al., 1996). Il a été montré que les SP provenant des lignées de cellules cancéreuses ont des propriétés de cellules souches (clonogécité accrue et expression de gènes de la voie Notch et Wnt) et peuvent également générer des tumeurs chez les souris immunodéprimées (Patrawala et al., 2005). Cependant, les études fonctionnelles utilisant le colorant Hoechst sont limitées par la toxicité de cet agent, mettant des doutes sur l'interprétation des expériences. De plus, des cellules souches ont également été isolées à partir des cellules non SP, suggérant que l'efflux de colorant n'est pas suffisant pour détecter tous les types de cellules souches (Golebiewska et al., 2011).

(3) Activité enzymatique de l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH)

L'ALDH est une enzyme cytosolique impliquée dans la détoxification des aldéhydes intracellulaires par oxydation et conversion du rétinol en acide rétinoïque et participe à la résistance aux traitements anti-cancéreux comme la cyclophosphamide (Russo and Hilton, 1988). Différentes études ont démontré que les cellules souches possèdent une forte activité enzymatique de l'ALDH, telles que les cellules souches hématopoïétiques et les cellules souches neurales (Corti et al., 2006; Hess et al., 2004). Dans le cancer du sein, l'activité élevée de l'ALDH est associée à un risque métastatique important, à une résistance aux traitements et un mauvais pronostic (Crocker et al., 2009; Ohi et al., 2011; Tanei et al., 2009). L'activité élevée de l'ALDH a été décrite dans les CSC des cancers du sein, du colon et les leucémies (Cheung et al., 2007; Ginestier et al., 2007; Huang et al., 2009). Cette activité est mesurable par cytométrie en flux en utilisant le kit ALDEFLUOR (STEMCELL Technologies) et considérée comme un marqueur fonctionnel et universel des CSC. Cependant, des résultats contradictoires montrent certaines limites de cette technique. Par exemple, dans une lignée cellulaire cancéreuse du poumon, les cellules ALDEFLUOR^{high} et ALDEFLUOR^{low} sont capables de générer de manière équivalente des tumeurs chez les souris immunodéprimées par transplantation en série (Ucar et al., 2009). De plus, les CSC ALDEFLUOR^{high} ne semblent pas

être une population homogène : la combinaison avec d'autres marqueurs de surface tels que CD133 et CD44/CD24 a mis en évidence des sous-populations présentant des potentiels tumorigéniques et métastatiques distincts au sein de la population ALDFLUOR^{high} (Croker et al., 2009).

(4) Marqueurs de surface

Les populations de cellules souches peuvent être identifiées par un ou plusieurs marqueurs exprimés au niveau de la membrane cellulaire. Ces marqueurs sont souvent tissus spécifiques et dans la plupart de cas, les mêmes marqueurs sont utilisés pour identifier les cellules souches normales et cancéreuses du même tissu. Les principaux marqueurs utilisés dans l'identification des CSC mammaires sont :

- CD44⁺/CD24^{-low} :

CD44 est une protéine membranaire qui joue un rôle dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire et CD24 est une molécule d'adhésion dont l'expression a été trouvée dans les cellules hématopoïétiques et certaines cellules épithéliales. La première étude sur les CSC mammaires s'appuie sur l'expression de ces deux marqueurs dans les cellules Lignée⁻ (Marqueurs de lignage : CD5, CD45R (B220), CD11b, CD30 et Ter-119) afin d'identifier une population enrichie en CSC (Al-Hajj et al., 2003). Depuis, ces marqueurs ont été utilisés pour enrichir les CSC dans les tissus tumoraux ainsi que dans les lignées cellulaires du cancer du sein (Charafe-Jauffret et al., 2009). De manière intéressante, les études génétiques dans les glandes mammaires normales et les tumeurs montrent que le profil des cellules CD44⁺ correspond à une signature 'stem-like' alors que les cellules CD24^{high} présentent plutôt à une expression génétique de cellules différenciées (Shipitsin et al., 2007). Dans les glandes mammaires murines, CD24 peut aussi servir de marqueur de cellules souches. En effet, l'expression de CD24 a permis de distinguer les populations myoépithéliales/basales (CD24^{low}), luminales (CD24^{high}) et non épithéliales (CD24^{neg}) et la population CD24^{low} est enrichie par la capacité de cellules souches de former une glande mammaire fonctionnelle (Sleeman et al., 2005). Cependant, certaines études montrent des restrictions quant à l'utilisation du CD44⁺/CD24^{-low} dans l'étude de CSC mammaires. D'une part, il semble que les cellules CD44⁺/CD24^{-low} contiennent une partie mais pas toute la population de CSC (Ginestier et al., 2007). D'autre part, bien que ce phénotype soit associé à un profil invasif, il n'est pas corrélé avec la tumorigénicité globale de la lignée cellulaire. De plus, sa combinaison avec un marqueur

de cellules épithéliales ESA⁺ permet d'enrichir la population en CSC tumorigènes par rapport au tri de cellules CD44⁺/CD24^{-low} uniquement (Fillmore and Kuperwasser, 2008). Il a été aussi décrit que les niveaux d'expression CD44 et CD24 montrent une grande variation entre les lignées cellulaires et même dans les cellules du même sous-type de cancer (Stuelten et al., 2010). Toutefois et malgré ces restrictions, le marquage CD44⁺/CD24^{-low} est le plus couramment utilisé dans la littérature pour étudier les CSC mammaires (Paula and Lopes, 2017).

- Les intégrines

Comme décrit précédemment, les cellules souches mammaires murines ont été identifiées en utilisant les intégrines : CD29 (*β1-integrin*), CD49f (*α6-integrin*) en combinaison avec CD24 (Shackleton et al., 2006; Stingl et al., 2006). Ces mêmes marqueurs ont également été utilisés pour l'isolement des CSC mammaires à partir des lignées cellulaires (Vassilopoulos et al., 2008). Il est intéressant de noter qu'une sous-population surexprimant CD49f a été identifiée dans la lignée de cancer du sein MCF7. Cette sous-population était capable de former des tumorsphères, était résistante aux agents pro-apoptotiques et présentaient une tumorigénicité accrue par rapport à l'ensemble de la population. De plus, la délétion de CD49f a entraîné la perte de capacité de former des sphères et la tumorigénicité chez les souris, ce qui suggère le rôle de CD49f dans le maintien de cette sous-population hautement tumorigène (Cariati et al., 2008). Dans les modèles de souris, CD29 et CD61 (*β3-integrin*) ont été décrits en tant que protéines impliquées dans la décision du destin des cellules luminales. Ainsi, au sein de la population CD24⁺, l'expression de CD29 a permis de distinguer deux populations : l'une enrichie en cellules luminales (CD29^{low}) et l'autre en cellules souches mammaires (CD29^{high}) (Shackleton et al., 2006). L'addition de CD61 au sein de la population CD24⁺CD29^{low} permet une séparation supplémentaire des cellules luminales progénitrices (CD61⁺) et des cellules différenciées matures (CD61⁻) (Asselin-Labat et al., 2007). Des travaux dans différents modèles murins de tumorigénèse mammaire ont montré que dans deux d'entre eux (MMTV-Wnt-1, et p53 +/-), une sous-population CD61⁺ est fortement enrichie en capacité tumorigénique par rapport aux cellules CD61⁻ (Vaillant et al., 2008). Bien que les intégrines aient été largement utilisées pour isoler les CSC mammaires, leur implication dans la biologie de CSC reste à définir. Il a été démontré que CD49f et CD29 contribuent à la résistance au traitement dans le cancer du sein (Hu et al., 2016; Huang et al., 2011). Par conséquent, le développement d'inhibiteurs qui ciblent ces deux intégrines pourrait être intéressant dans le traitement de

cancer du sein. Une étude récente a montré que l'inhibition de CD29 par le miARN 9-3p sensibilise le cancer du sein de sous-type claudin-low au traitement (Zawistowski et al., 2013).

- CD133 (ou PROM1/prominin-1)

CD133 est une glycoprotéine membranaire initialement identifiée dans les cellules hématopoïétiques immatures. Il est maintenant un marqueur couramment utilisé dans l'identification des CSC dans plusieurs types de cancers comme par exemple le glioblastome (Singh et al., 2004). Dans les lignées cellulaires de cancer du sein portant la mutation BRCA1, les cellules CD133⁺ montrent des propriétés de CSC telles qu'une capacité accrue de formation de colonies et une capacité tumorigène plus élevée chez les souris NOD/SCID (Wright et al., 2008). Dans le cancer du sein, CD133⁺ est souvent utilisé en association avec d'autres marqueurs de CSC. Par exemple, il a été montré que dans les lignées cellulaires, les cellules ALDH⁺/CD44⁺/CD133⁺ et ALDH⁺/CD44⁺/CD24⁻ prolifèrent plus vite, montrent une invasion plus importante *in vitro* et un potentiel métastatique plus élevé *in vivo* par rapport aux cellules ALDH⁻CD44⁻ (Crocker et al., 2009).

Il faut souligner qu'aucun des marqueurs de surface utilisés pour isoler les cellules souches dans divers tissus normaux et tumoraux n'est exprimé exclusivement par des cellules souches. Leurs rôles physiologiques dans les tissus normaux et tumoraux ainsi que leur implication probable dans la régulation de cellules souches méritent plus d'investigations.

(5) Les différents marqueurs = signatures de CSC hétérogènes ?

De manière tout à fait semblable à l'hétérogénéité des cellules souches normales dans un organe, les CSC montrent également une hétérogénéité, surtout dans le cancer du sein. D'une part, la nature hétérogène du cancer du sein rend improbable l'existence d'un marqueur universel des cellules souches. Comme décrit précédemment, le cancer du sein a été divisé en différents sous-types moléculaires: basal-like, HER2 +, normal-like, luminal A et luminal B, et le sous-type claudin-low récemment identifié. Un certain nombre de marqueurs différents ont été utilisés pour isoler des CSC du sein et chacun montre différents degrés de spécificité à travers les sous-types moléculaires (Hwang-Verslues et al., 2009). Par exemple, il a été montré que le phénotype CD44⁺/CD24⁻ ne permet pas d'enrichir la population CSC dans tous types de cancers du sein, mais plus particulièrement dans le sous-type basal-like (Honeth et al., 2008).

Introduction bibliographique

En analysant les coupes immunohistochimiques de tumeurs humaines, les auteurs ont démontré que le phénotype CD44⁺/CD24⁻ était minoritaire dans les tumeurs de type HER2⁺, et largement majoritaire dans les tumeurs de type basal-like porteuse de la mutation BRCA1 (Honeth et al., 2008). Un autre marqueur couramment utilisé dans l'isolement de CSC mammaires est l'ALDH et le phénotype ALDH⁺ permettrait d'identifier une population de CSC dans les tumeurs triple négatives et ERBB2⁻ et les lignées cellulaires de type basal-like (Charafe-Jauffret et al., 2009; Ginestier et al., 2007). Plusieurs études ont également suggéré que l'hétérogénéité des marqueurs présents dans la tumeur refléterait l'identité de la cellule cancéreuse d'origine et le sous-type cancéreux. Ces études démontrent que les cellules CD44⁺CD24⁻ sont les plus fréquentes dans les tumeurs de type basal et la proportion de cellules ALDH1⁺ est plus élevée dans les tumeurs HER2⁺ et basale, alors que l'expression de CK18, GATA3 et MUC1 est plus fréquente dans les sous-types luminaux (Figure 14) (Beça et al., 2013; Park et al., 2010; Ricardo et al., 2011).

D'autre part, un nombre croissant d'études a démontré qu'il existe plus d'une population de CSC, même au sein d'une seule tumeur ou d'une seule lignée cellulaire. Par exemple, bien qu'il n'y existe qu'un faible chevauchement entre les phénotypes ALDH⁺ et CD44⁺/CD24⁻, les cellules double positives (ALDH⁺CD44⁺) semblent être plus tumorigènes que les cellules exprimant l'un ou l'autre marqueur seul (Ginestier et al. 2007). Dans la plupart des cas, il n'est pas clair si les populations de CSC phénotypiquement diverses sont également fonctionnellement distinctes. Il se peut que les différentes populations de CSC soient organisées de manière hiérarchique et toutes proviennent d'une même population de CSC 'primitive'. Une autre hypothèse est que de multiples populations de CSC ayant des origines différentes capables de proliférer et évoluer indépendamment, peuvent cohabiter au sein d'une même tumeur. En réalité, les deux hypothèses peuvent coexister pour créer l'hétérogénéité de CSC.

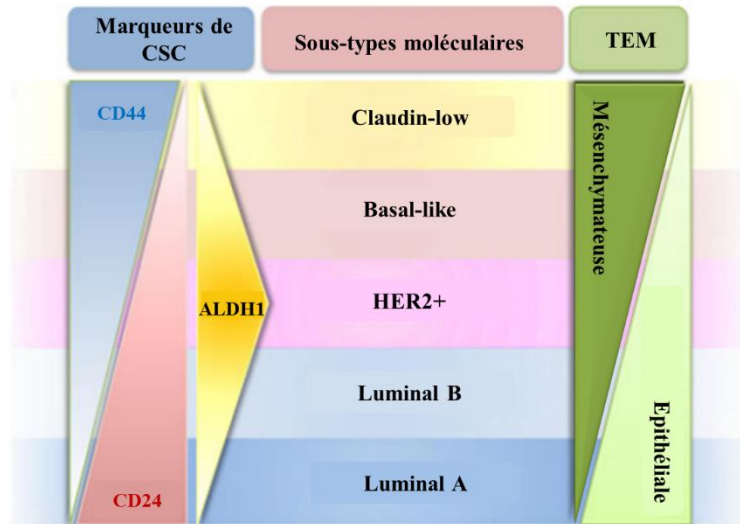


Figure 14. Association entre les sous-types moléculaire de cancer du sein, le profil d'expression de marqueurs de CSC et la transition épithélio-mésenchymateuses (TEM).

(Modifié d'après (Schmitt et al., 2012))

(6) s-SHIP: un nouveau marqueur de cellules souches

(i) *Structure, rôle et implication dans les cellules souches*

La protéine SHIP-1, une inositol 5'-phosphatase contenant le domaine SH2 (*Src homology 2*), a été observée pour la première fois comme une protéine tyrosine-phosphorylée après la stimulation des cellules sanguines par différents cytokines et facteurs de croissance (Rohrschneider et al., 2000; Sly et al., 2003). Son expression est majoritairement hématopoïétique-spécifique et différentes isoformes par épissage alternatif ont été décrites. Au niveau de sa structure, SHIP-1 contient 1190 acides aminés et se compose de plusieurs motifs importants pour les interactions protéine-protéine. Le domaine SH2 au niveau N-terminal est suivi d'un domaine à activité catalytique inositol-polyphosphate 5' phosphatase centrale et d'une région C-terminale riche en prolines pouvant s'associer à différents domaines SH3 (Rohrschneider et al., 2000). Il existe une isoforme de 150-kDa dénommé SHIP-2, codé par un gène différent de SHIP-1 et dont l'expression est ubiquitaire (Pesesse et al., 1997). La fonction biologique des protéines SHIP1/2 reposent principalement sur leur rôle de régulateur négatif de la voie PI3K par la déphosphorylation de PI-3,4,5-P3 (*Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate*) en PI-3,4-P2 (*Phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate*) au niveau de la membrane cellulaire (Figure 15). Pour cela, il a été montré que le domaine SH2 joue un rôle important dans le

recrutement de SHIP1/2 par les récepteurs membranaires contenant des tyrosines phosphorylées (Sly et al., 2003).

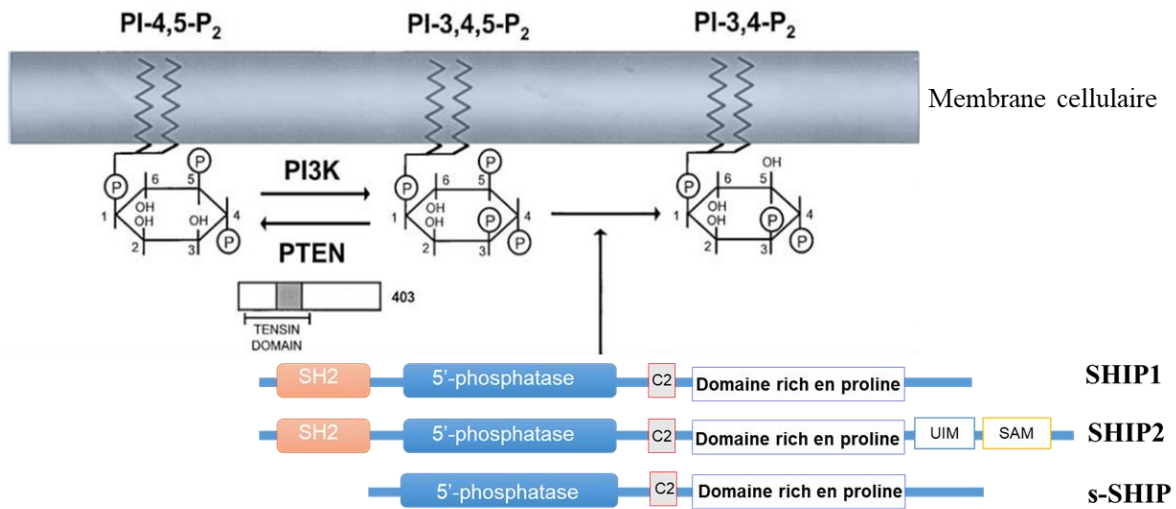


Figure 15. Structure des isoformes de SHIP et leur implication dans la voie PI3K.

Lorsque la tyrosine est phosphorylée, les motifs NPXY ont un potentiel de liaison au domaine PTB (*phosphotyrosine binding*) ou éventuellement domaine SH2. PxxP : domaine riche en proline. (Modifié d'après Sly et al. 2003)

De nombreuses études se sont focalisées sur la régulation de la voie PI3K par SHIP1 et SHIP2 dans différents contextes cellulaires tandis que très peu se sont intéressées au rôle de s-SHIP. s-SHIP est une plus petite protéine de 104 kDa dépourvue du domaine SH2 au N-terminal par rapport au SHIP1. Elle est produite par le locus *ship1* et le préfixe "s" (pour *stem*) signifie son expression dans les cellules souches embryonnaires murines et les cellules souches hématopoïétiques (Tu et al., 2001). Cette protéine a été décrite pour la première fois dans les années 90 et appelé SIP-110 chez l'humain (Kavanaugh et al., 1996). Son existence a été confirmée par l'équipe de Kerr qui a défini l'ADNc murin complet et démontré l'expression endogène dans les deux types cellulaires décrits ci-dessus (Tu et al., 2001). s-SHIP ne diffère de SHIP1 que par l'absence de séquence nucléotidique codant pour les 224 acides aminés de la région N-terminale, contenant le domaine SH2. Il a été proposé que s-SHIP est généré à partir d'un promoteur interne qui réside dans l'intron entre les exons 5 et 6 du gène SHIP (Tu et al., 2001). Biochimiquement, s-SHIP ne peut pas être phosphorylée sur ses tyrosines, ni associée avec Shc (Kavanaugh et al., 1996; Tu et al., 2001). L'absence du domaine SH2 dans s-SHIP suggère que son mécanisme d'interaction avec les protéines cibles diffère probablement de celui de SHIP1. Il a été proposé que malgré l'absence du domaine SH2, s-SHIP est recrutée sur la membrane plasmique des cellules souches via l'adaptateur Grb2 (*Growth factor receptor-bound*

protein 2). Ceci impliquerait l'interaction des régions riches en proline de s-SHIP avec le domaine SH3 de Grb2 pour réguler le niveau de PI-3,4,5-P3 dans les cellules souches (Tu et al., 2001). Une autre étude a démontré que s-SHIP s'associe avec glycoprotéine 130, qui forme un complexe hétérodimérique avec le récepteur LIF (*Leukemia inhibitory factor receptor*) dont la signalisation est essentielle pour la croissance et la survie des cellules souches embryonnaires et hématopoïétiques (Desponts et al., 2006). Plus récemment, notre équipe a démontré que la lignée cellulaire de la prostate RWPE-1 exprimant s-SHIP présentaient des caractéristiques de cellules souches telles que l'expression des marqueurs de surface (CD44, CD166, TROP2) et des facteurs de transcription régulant la pluripotence (Oct4 et Sox2) ainsi qu'une résistance à la mort cellulaire induite par l'arsénite. De manière intéressante, cette étude a révélé un rôle de l'ARN non codant H19 dans la régulation de la pluripotence (Bauderlique-Le Roy et al., 2015). Dans le contexte du cancer, l'expression élevée de s-SHIP a été détectée dans les tumeurs murines correspondant au sous-type claudin-low, un sous-type décrit comme enrichi en CSC mammaires (Herschkowitz et al., 2012). Une autre étude a démontré que l'expression de s-SHIP était augmentée en réponse à l'hypoxie, non seulement dans les cellules cancéreuses, mais aussi dans les cellules souches embryonnaires (Leszczynska et al., 2015). De manière intéressante, il a été montré que l'isoforme SHIP2 joue un rôle important dans le maintien des CSC mammaires ER-négatives (Fu et al., 2014). Le rôle précis de s-SHIP dans la prolifération, la différenciation et/ou d'autres fonctions de cellules souches reste à définir. De plus, il sera important de déterminer comment et quand le locus *ship1* passe de l'expression de l'isoforme s-SHIP par un promoteur intronique dans les cellules souches, à la production des isoformes contenant le domaine SH2 prédominant dans les cellules plus différenciées (Kerr, 2008).

(ii) *Les souris transgéniques 11.5kb-GFP: un modèle pour l'étude de cellule souches*

Afin de répondre aux questions ci-dessus, les souris transgéniques (Tg) 11.5kb-GFP ou s-SHIP-GFP ont été développées (Rohrschneider et al., 2005). Dans ces souris, le promoteur de s-SHIP contrôle l'expression de la protéine fluorescente GFP, ce qui permet de marquer les cellules exprimant le promoteur, et ainsi de les isoler (Figure 16). Les résultats obtenus indiquent que l'activité du promoteur s-SHIP est détectée spécifiquement dans les cellules souches embryonnaires (ES) *in vitro* et pour les différentes populations de cellules souches connues tout au long du développement embryonnaire dans les souris transgéniques. Par exemple, une expression spécifique de la GFP a été observée dans les cellules épithéliales

Introduction bibliographique

embryonnaires et les tissus dérivés de cette population: le follicule pileux, la glande mammaire et la prostate. Les auteurs ont également observé une expression de la GFP dans les ostéoblastes et les vSMC (*vascular smooth muscle cells*) entre jour 15,5 et jour 18,5 du développement embryonnaire chez les souris 11.5kb-GFP (Rohrschneider et al., 2005). Ces résultats suggèrent le rôle de s-SHIP comme une protéine importante dans la fonction des cellules souches.

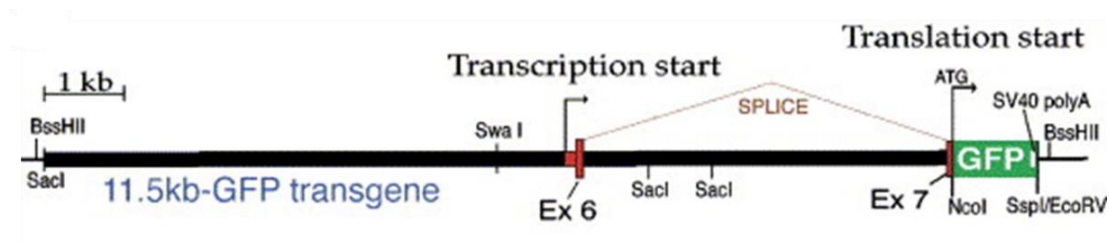


Figure 16. Structure du 11.5kb-GFP promoteur transgénique.

Le transgène contient un segment génomique *ship1* commençant par le site SacI près de l'extrémité 5' de l'intron 5 jusqu'au site putatif de départ de la traduction (ATG) précédé d'une séquence Kozak dans l'exon 7. Le début traductionnel ATG pour la GFP est fusionné (encadré) au démarrage de la traduction ATG probable pour s-SHIP. (Modifié d'après Rohrschneider et al., 2005)

L'équipe du Dr Rohrschneider a ensuite utilisé ces souris pour étudier les cellules souches mammaires postnatales. Ils ont démontré que les cellules GFP⁺ résidant dans les bourgeons terminaux à la puberté et les bourgeons alvéolaires pendant la gestation présentent des capacités d'auto-renouvellement et de régénération d'une nouvelle glande mammaire fonctionnelle lors de la transplantation (Figure 17 a) (Bai and Rohrschneider, 2010). De plus, les cellules épithéliales mammaires GFP⁺ présentent un phénotype de MaSCs: elles sont p63⁺, CD24^{mod}, CD49^{high} et CD29^{high} et prolifèrent activement (Ki67⁺). Ainsi, l'expression du promoteur de s-SHIP a permis d'identifier une population de MaSCs activée dans un modèle *in vivo* (Bai and Rohrschneider, 2010). De manière intéressante, quand les souris Tg s-SHIP-GFP sont croisées avec des souris modèles de tumeurs mammaires MMTV-Wnt1 (tumeurs mixte basale et luminales) ou MMTV-ErbB2 (tumeurs de type luminales) des cellules GFP⁺ sont observées uniquement dans les tumeurs mammaires des souris MMTV-Wnt1 (Figure 17b) (Bai and Rohrschneider, 2010). Les auteurs n'ont pas développé cette partie de l'étude qui est resté à l'état d'observation. Les souris Tg s-SHIP-GFP ont été utilisées par d'autres équipes notamment pour étudier le développement mammaire (Kogata et al., 2013) et l'expression de s-SHIP promoteur a été associée aux différents facteurs impliqués dans le maintien de MaSCs tels que la protéine Par3-L (Huo and Macara, 2014) et la voie Wnt (Roarty et al., 2015). Notre équipe a étudié l'expression de s-SHIP/GFP dans la prostate néonatale et adulte de souris Tg 11.5kb-GFP. Nous avons montré que les cellules épithéliales prostatiques exprimant s-

SHIP/GFP représentent une sous-population des cellules basales uniquement au stade néonatal (moins de 10 jours) ; à la puberté et chez l'adulte, l'expression de s-SHIP/GFP n'est plus détectée dans la prostate. Les cellules GFP⁺ prostatiques présentent un phénotype basal Lin⁻CD24⁺Sca-1⁺CD49f⁺, possèdent une capacité supérieure de formation de sphères *in vitro*, et peuvent régénérer les tubules prostatiques *in vivo*, ce qui suggèrent fortement que ce sont des cellules souches (Brocqueville et al., 2016). L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'expression du promoteur de s-SHIP pourrait être un marqueur pour identifier des populations de cellules souches normales et cancéreuses dans les tissus mammaires et prostatiques.

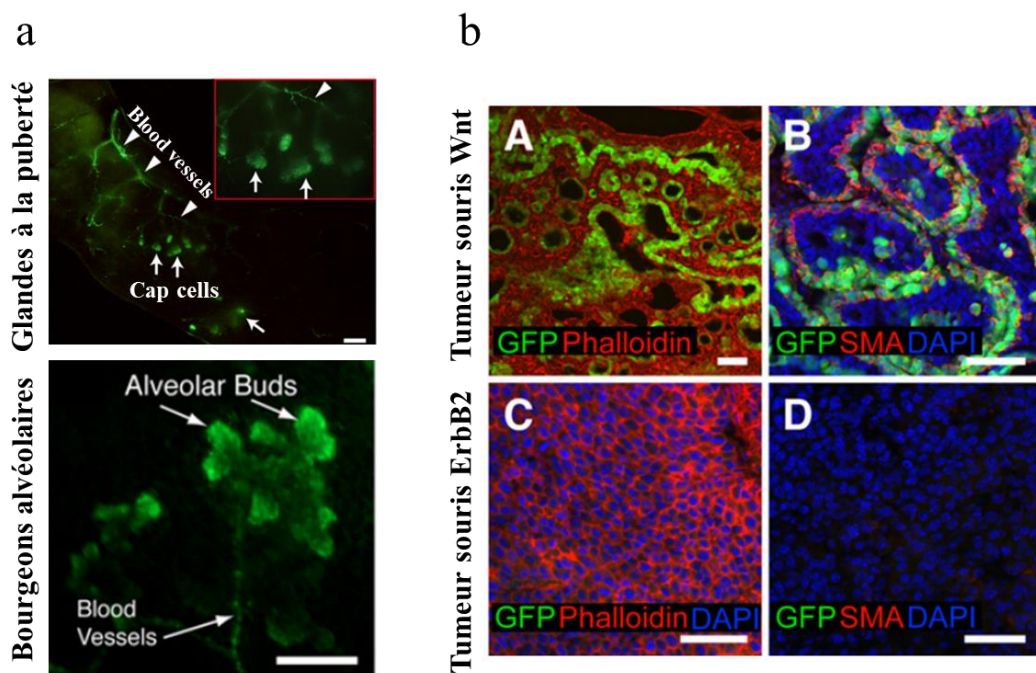


Figure 17. L'expression de la GFP (s-SHIP) dans les glandes mammaires et tumeurs mammaires.

a. En haut: cellules GFP⁺ dans les TEB (flèches) et vaisseaux sanguins (têtes de flèches) de la glande mammaire d'une souris Tg s-SHIP-GFP âgée de 4 semaines. En bas : Bourgeons alvéolaires d'une souris Tg s-SHIP-GFP à J12 de gestation. Expression de la GFP est détectée dans les bourgeons alvéolaires apicaux, et certains vaisseaux sanguins. **b.** La GFP est exprimée dans les tumeurs Wnt (A) et les cellules GFP⁺ sont SMA⁺ (B). (C, D) Aucune expression de la GFP n'a été détectée dans les tumeurs ErbB2 (C), ni les cellules SMA⁺. (Modifié d'après Bai and Rohrschneider, 2010)

3. Les CSC du sein : conséquences thérapeutiques

a) Mécanismes de résistance aux traitements

Les thérapies anticancéreuses classiques utilisées pour traiter les cancers du sein agressifs peuvent être efficaces au départ, mais avec le temps, de nombreux patients rechutent. Une des explications pour cette rechute est la résistance thérapeutique des CSC dans la tumeur. Bien que la plupart des cellules cancéreuses soient tuées par des agents cytotoxiques, les CSC peuvent survivre et redonner une tumeur comme nous l'avons vu précédemment (Chapitre B-a-1-3). La résistance à la chimiothérapie et/ou à la radiothérapie des CSC du sein a été démontrée dans différentes publications. Par exemple, les cellules de types ALDH⁺/CD44⁺ et ALDH⁻/CD44⁻ ont été triées à partir de lignées cellulaires de cancer du sein humain et ont été exposées aux drogues doxorubicin/paclitaxel ou à l'irradiation. Au bout de 72h de traitement, les cellules ALDH⁺/CD44⁺ présentent un meilleur taux de survie ; l'inhibition de l'activité ALDH par le DEAB permet de sensibiliser ces cellules à la chimio- et radiothérapie (Croker and Allan, 2012).

De plus, les CSC du sein peuvent aussi être enrichies par ces mêmes thérapies, comme l'irradiation (Lagadec et al. 2012), l'épirubicine (Yu et al., 2007), ou encore la doxorubicine et le cyclophosphamide (Li et al., 2008). Un nombre croissant d'études a aussi souligné le rôle des CSC du sein dans la résistance et la récurrence après traitement mais on connaît encore mal les mécanismes moléculaires qui sont à l'origine de cette résistance accrue. Il a été suggéré que les CSC du sein sont résistantes aux thérapies conventionnelles grâce à leurs propriétés intrinsèques dues aux altérations génétiques mais aussi aux influences d'un microenvironnement spécifique impliquant l'hypoxie ou favorisant la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Rebucci and Michiels, 2013).

La surexpression de transporteurs d'efflux est l'un des principaux mécanismes de résistance des CSC aux chimiothérapies. Cette propriété, aussi appelée MDR (*Multi Drug Resistance*) est liée à la surexpression de transporteurs ABC car les agents thérapeutiques sont transportés à l'extérieur des CSC via ces transporteurs ABC (Dean et al., 2005) . Les CSC du sein surexpriment notamment ABCG1 (MDR1) et ABCG2 qui les protègent contre les dommages causés par les chimiothérapies. La présence d'une forte activité ALDH dans les CSC du sein pourrait aussi expliquer leur résistance à certaines drogues. Il a été montré que l'ALDH a la capacité de métaboliser des agents chimiothérapeutiques, en particulier le cyclophosphamide (Russo and Hilton, 1988; Sládek et al., 2002).

Introduction bibliographique

Les principaux mécanismes qui participent à la résistance des CSC à l'irradiation sont la détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ROS) radioinduits et la réparation des dommages à l'ADN. Il a été montré que suite à l'irradiation ionisante, les CSC du sein de type CD44⁺/CD24⁻ cultivées en sphères présentent un plus faible niveau de ROS et de cassures double-brin de l'ADN (Phillips et al., 2006). Les auteurs suggèrent que la détoxification de ROS et l'activation de la voie Notch sont impliquées dans la radiorésistance (Phillips TM et al. 2006). Les travaux de Diehn et al. ont montré que les cellules souches normales et cancéreuses du sein présentent un niveau de base de ROS moins élevé et que certains gènes impliqués dans la détoxification de ROS sont surexprimés dans ces cellules, tels que Gclm (*Glutamate-cysteine ligase regulatory subunit*) et Foxo1 (*Forkhead box protein O1*). Les CSC mammaires murines montrent moins de cassures de l'ADN et sont enrichies après irradiation (Diehn et al., 2009). Karimi-Busheri et al. ont aussi démontré que les CSC mammaires dans la lignée MCF7 ont un taux réduit de ROS et une voie de réparation de cassure simple brin d'ADN plus active (Karimi-Busheri et al., 2010). Une autre étude a montré qu'il y a une augmentation d'ATM activé (ATM phosphorylé), un gène impliqué dans la réparation de l'ADN, dans les CSC (Yin and Glass, 2011). L'ensemble de ces travaux fournissent des explications encourageantes sur la façon dont les CSC résistent aux radiothérapies mais ne démontrent pas un mécanisme de résistance précis.

Enfin, le microenvironnement tumoral joue aussi un rôle dans la résistance des CSC. Par exemple, la plasticité des CSC du sein induite par la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) a été associée à la résistance au traitement (Singh and Settleman, 2010). Les cellules tumorales résiduelles dans le cancer du sein triple négatif après chimiothérapie ou dans le cancer du sein luminal après traitement hormonal expriment un phénotype de cellule mésenchymateuse, ce qui suggère que la TEM leur confère la chimiorésistance (Creighton et al., 2009). Les CSC résident dans un microenvironnement hypoxique comme décrit précédemment et les facteurs HIF impliqués dans la régulation de l'hypoxie pourrait contribuer à la chimiorésistance de CSC du sein (Crowder et al., 2014).

b) Stratégies thérapeutiques ciblant les CSC

La théorie de CSC présentée par Reya et al. a souligné plusieurs implications cliniques pertinentes nous permettant de comprendre la façon dont les CSC influencent la résistance au traitement (Reya et al., 2001) (Figure 7). Les CSC ont été identifiées comme des cibles thérapeutiques prioritaires pour leur rôle dans les maladies primaires, métastatiques et récidivantes. D'une part, le faible nombre de CSC résistantes au traitement était suffisant pour

Introduction bibliographique

entraîner une nouvelle tumeur et il a été suggéré que cette résistance serait transmise à la progéniture entière des CSC qui constitue la nouvelle tumeur. Cela pourrait expliquer le niveau de résistance thérapeutique plus élevé retrouvé dans les maladies résiduelles par rapport aux tumeurs primaires. D'autre part, le concept de CSC migratoire suggère fortement leur implication dans la métastase (Brabletz et al., 2005; Hermann et al., 2007). Par conséquent, le ciblage des CSC devrait présenter un avantage supplémentaire pour réduire les métastases.

Différentes stratégies thérapeutiques contre les CSC ont été proposées telles que le ciblage direct des marqueurs de surface qui caractérisent les CSC. Cependant, cette stratégie semble controversée pour plusieurs raisons. D'une part, l'utilisation des marqueurs n'est pas universelle mais dépendante du type tumoral. D'autre part, différents marqueurs pourraient identifier plusieurs populations de CSC au sein d'une même tumeur : laquelle est la population « réelle » de CSC responsable de la résistance? De plus, comme nous avons vu précédemment, les CSC et les cellules souches normales partagent souvent les mêmes marqueurs de surface, ce qui peut diminuer la spécificité de cette stratégie (Chen et al., 2013). Les mécanismes métaboliques impliqués dans le maintien de CSC peuvent aussi être une cible intéressante. L'hypoxie au sein d'une tumeur peut entraîner des altérations du métabolisme des cellules cancéreuses et la TEM contribue à la génération de CSC (Li and Rich, 2010; Wouters and Koritzinsky, 2008). En effet, une étude récente a rapporté le lien entre la glycolyse, la TEM et la génération de CSC (Dong et al., 2013). D'autres études indiquent également que les composants de la voie métabolique du mévalonate sont importants dans la production de CSC mammaires (Ginestier et al., 2012).

Si le ciblage direct de CSC s'avère difficile, le traitement induisant l'activation de CSC quiescentes et leur différenciation semble être prometteur. Cette approche a été étudiée dans plusieurs types de cancers notamment les cancers hématopoïétiques. Il a été montré que l'acide trans-rétinoïque (ATRA) est capable d'induire la maturation des cellules malignes dans plusieurs cancers hématopoïétiques tels que le myélome multiple et la leucémie myéloïde chronique (Kast, 2008; Loaiza-Bonilla et al., 2010). Seul ou en association avec d'autres thérapies, l'ATRA a également montré des effets dans diverses tumeurs solides, comme par exemple le cancer de la prostate et le gliome (Haque et al., 2007; Pasquali et al., 2006). Malgré ses effets intéressants dans les cancers hématopoïétiques, les essais cliniques sur l'effet de l'ATRA dans la prévention et le traitement d'un certain nombre de tumeurs solides n'ont pas montré de bénéfice significatif (Connolly et al., 2013). L'exemple de l'ATRA suggère que les stratégies efficaces pour cibler les CSC pourraient être spécifiques à chaque type tumoral.

Introduction bibliographique

Comme nous avons vu précédemment, le microenvironnement tumoral fournit non seulement des signaux et des facteurs nécessaires à la survie de CSC mais intervient en particulier dans l'activation de la TEM qui régule la plasticité de CSC. La plasticité de CSC contribue également à la résistance au traitement. Une stratégie indirecte pour cibler les CSC propose donc de cibler son microenvironnement tumoral. Par exemple, des petites molécules peuvent être efficace pour bloquer la signalisation pro-CSC des composants du microenvironnement tels que les cellules souches mésenchymateuses et les cellules immunitaires (Li et al., 2009; Ma et al., 2013). Les voies de signalisation impliquées dans le maintien des CSC peuvent aussi être des cibles intéressantes. Cependant, l'inhibition de ces voies pourrait aussi entraîner conjointement l'inhibition de signalisation dans les cellules souches normales. La voie Wnt est connue pour réguler l'homéostasie de cellules souches intestinales et l'utilisation des inhibiteurs de Wnt pourrait conduire à un appauvrissement de la population de cellules souches intestinales normales (Pinto et al., 2003). Cependant, la dépendance des CSC colorectaux sur la signalisation Wnt/ β -caténine pourrait dépasser celle des cellules souches intestinales normales, suggérant qu'un traitement à faible dose pourrait réduire l'activité CSC sans affecter l'homéostasie normale (Chen et al., 2009; Liu et al., 2013).

Depuis une dizaine d'année, les travaux sur la relation entre les CSC et les ARN non codants sont en pleine expansion. En effet, un nombre croissant d'études a montré l'importance des miARN et long ARN non codants (LncRNA) dans le maintien de CSC, faisant de ces ARN non codants des cibles thérapeutiques prometteuses (Huang et al., 2013). Par exemple, LncRNA 00617 est fortement exprimé dans le cancer du sein, pouvant favoriser l'invasion et la TEM des cellules cancéreuses en activant le facteur de transcription SOX2 (Li et al., 2017). Les travaux de Takahashi et al. ont montré que la diminution de MiR-27b favorise la formation de CSC dans les lignées cellulaires de cancer du sein, suggérant que la modulation de l'expression de miR-27b en combinaison avec la chimiothérapie peut améliorer les résultats thérapeutiques des patients (Takahashi et al., 2015). Une autre étude récente montre que la suppression de MiR-60 entraîne l'expansion de CSC du sein tandis que sa surexpression réduit l'auto-renouvellement et la tumorigénicité des CSC *in vivo* (El Helou et al., 2017).

La théorie des cellules souches cancéreuses a élargi nos horizons et fourni une nouvelle approche pour comprendre et traiter les tumeurs malignes. Cependant, le défi majeur dans l'étude des CSC est leur isolement et leur caractérisation. Enfin, l'identification de stratégies qui exploitent les caractéristiques uniques des CSC nécessite une étude plus approfondie et une collaboration multidisciplinaire.

C. Modèles murins dans l'étude de cancer du sein

Les modèles murins de cancérogenèse ont permis depuis plusieurs décennies de mieux comprendre les mécanismes fondamentaux des fonctions cellulaires, ainsi que ceux de la tumorigenèse et de la dissémination métastatique. Dans le cancer du sein, un grand nombre de modèles différents sont maintenant disponibles, correspondant aux différents types et stades de la maladie.

1. Les xénogreffes

a) *Les CDX (Cell-line-derived xenografts)*

Les xénogreffes de lignées cellulaires (CDX) figurent parmi les modèles les plus simples et les plus fréquemment utilisés dans la recherche sur le cancer avec notamment une perspective thérapeutique. Ces modèles sont établis par injection ectopique ou orthotopique de lignées cellulaires cancéreuses humaines immortalisées dans des souris immunodéprimées. Ils se sont révélés extrêmement utiles pour l'évaluation de la génétique du cancer du sein, son processus biologique et, dans une certaine mesure, son potentiel métastatique. Malgré la simplicité technique relative pour la mise en place et le maintien de ces modèles, ils présentent certaines limites (Whittle et al., 2015). En effet, les souris hôtes étant dépourvues de système immunitaire, elles ne permettent pas d'étudier le rôle du système immunitaire dans le développement tumoral. Le microenvironnement tumoral (stroma murin) n'est pas idéal pour les lignées cellulaires humaines. De plus, les tumeurs dans les modèles CDX représentent souvent une masse tumorale relativement homogène de cellules épithéliales mammaires transformées et ne captent pas l'hétérogénéité des tumeurs mammaires humaines (Holen et al., 2017). Enfin, le choix du site d'injection peut aussi jouer un rôle sur la pertinence du modèle. Il a été montré que selon les sites d'injection : sous-cutanée (ectopique) ou dans les glandes mammaires (orthotopique), la croissance tumorale, l'administration voire l'efficacité des traitements testés peuvent varier de manière significative (Fleming et al., 2010; Fung et al., 2015). Ceci est notamment lié aux différents microenvironnements de chaque site, en particulier la vascularisation tumorale.

b) *Les PDX (Patient-derived xenografts)*

Un autre défaut des CDX est le fait que des lignées cellulaires sont cultivées à long terme *in vitro*, ce qui peut entraîner des pressions de sélection induisant des changements génotypiques et phénotypiques irréversibles. Les PDX issues de l'implantation directe de tumeurs primaires de patients dans des souris receveuses immunodéficientes sont développés pour surmonter cette limitation. Les PDX ont été développés avec succès pour plusieurs types de cancers. La première étude de PDX remonte dans les années 60 réalisée par Rygaard et Povlsen qui ont implanté un morceau de tumeur du côlon d'un patient par voie sous-cutanée chez les souris nude. Cette implantation s'est développée comme un adénocarcinome bien différencié et similaire à celui du patient donneur (Rygaard and Povlsen, 1969). Les PDX de diverses tumeurs humaines ont été développés avec succès, bien que ceux du cancer du sein aient été particulièrement difficiles à établir (Tentler et al., 2012). DeRose et collaborateurs ont réussi à établir plusieurs modèles de PDX dérivées de tumeurs de patients de différents sous-types : ER-, PR+, ER- et PR-, et HER2+ (DeRose et al., 2011). De plus, ces modèles récapitulent la biologie des tumeurs d'origine et développent des métastases à des sites similaires à ceux observés chez les patients donneurs (DeRose et al., 2011). L'établissement du sous-type luminal ER + qui est la forme la plus commune des cas patients diagnostiqués (plus de 70%) a été un défi majeur et le taux de réussite est significativement moins élevé par rapport aux sous-types plus agressifs (Cottu et al., 2012). Les techniques d'implantation ont évolué et les PDX des principaux sous-types observés en clinique : ER +, HER2 + et triple-négative, ont été décrits (Dobrolecki et al., 2016).

L'avantage des PDX repose sur le fait que ces modèles peuvent représenter le spectre complet de l'hétérogénéité des cancers du sein, et conserver les propriétés moléculaires et biologiques de leurs tumeurs d'origine ainsi que leur capacité de métastase d'où leur grand intérêt pour la recherche translationnelle. Ainsi, les PDX permettraient d'étudier plus en profondeur les aspects biologiques et moléculaires de la tumeur qu'un échantillon limité de patients. Concernant les études sur les CSC, les PDX peuvent être un outil utile pour évaluer l'existence de CSC et déterminer leurs caractéristiques intrinsèques. Il a été rapporté que la prise de greffe pour l'établissement PDX des cancers du sein est corrélée avec la présence de CSC (ALDH1+). Les auteurs ont déterminé une signature de gènes exprimés par ces CSC qui est associée à un mauvais pronostic chez les patients (Charafe-Jauffret et al., 2013). De plus, les PDX peuvent être utilisées pour tester différentes molécules thérapeutiques ou schémas de traitement variés dans une période relativement courte par rapport aux essais cliniques.

Introduction bibliographique

Les PDX représentent en effet une avancée majeure dans la modélisation de cancer du sein (et d'autres types de cancer) mais peuvent avoir certaines limites. Un point important est l'investissement financier et le temps (des mois voire des années) nécessaires pour établir et maintenir ces modèles. En effet, les PDX sont intéressants pour tester différents traitements et certains ont même évoqué la possibilité de les utiliser comme souris « Avatars » pour le traitement individuel des patients. Cependant, la longue période pour établir une PDX pour un patient donné et l'utiliser pour tester la réponse à différents schémas thérapeutiques n'est pas compatible avec la prise de décision clinique rapide (semaines). Concernant le développement de métastase, un certain nombre d'études ont signalé des divergences apparentes entre les PDX et les patients d'origine. Le site métastatique le plus commun dans les modèles PDX est les poumons et les ganglions lymphatiques, alors que les métastases osseuses et du cerveau qui sont fréquentes chez les patients sont rarement rapportées (Whittle et al., 2015). Enfin, l'étude du microenvironnement tumoral est compromise à la fois par des différences intrinsèques entre espèce (les glandes mammaires humaines et murines) et le manque de cellules immunitaires chez les souris immunodéprimées. (Holen et al., 2017)

2. Les souris transgéniques (GEMM)

a) Différents modèles de souris transgéniques

Les modèles de souris transgéniques (*Genetically Engineered Mouse Models = GEMM*) sont utilisés depuis plusieurs décennies dans l'étude des cancers. Ils permettent en premier lieu une approche pertinente et unique pour étudier les premiers stades de la maladie et notamment l'initiation des tumeurs. Dans le cas du cancer du sein, ce sont des modèles cliniquement pertinents qui permettent d'étudier les différents stades retrouvés chez les patients : hyperplasie, adénome puis stades précoces et invasifs du carcinome. Certains modèles peuvent être utilisés pour le suivi du processus métastatique. De plus, la tumorigénèse se produit dans le stroma natif de la souris avec le système immunitaire compétent permettant d'évaluer l'effet du microenvironnement tumoral. Une première étude a été publiée par le groupe de Leder décrivant une souris transgénique dans laquelle l'expression de l'oncogène Myc était sous contrôle d'un promoteur de virus de tumeur mammaire de souris inducible par des hormones pour générer des adénocarcinomes mammaires spontanées (Stewart et al., 1984). Depuis, différents modèles ont été développés soit en induisant l'expression d'un oncogène, soit en

Introduction bibliographique

inactivant un gène suppresseur de tumeur sous contrôle d'un promoteur spécifique. Les principaux promoteurs utilisés dans les GEMM sont listés dans le [tableau 5](#).

| Promoteur | Origine | Site d'expression | Activation |
|-----------|---|---|---|
| MMTV-LTR | <i>Mouse Mammary Tumor Virus long terminal repeat</i> | Cellules épithéliales mammaires, plusieurs autres tissus | Hormones stéroïdiennes (au cours de gestation) |
| WAP | <i>Whey acidic protein</i> | Épithélium mammaire sécrétoire | Hormones de lactation (au cours de gestation) |
| C3(1) | <i>Rat prostate steroid-binding protein (PSBP)</i> | Cellules épithéliales de la prostate et de la glande mammaire | Estrogène (canalaire et épithélium mammaire alvéolaire) |
| B-LT | <i>Bovine β-lactoglobulin</i> | Glande mammaire | Gestation et lactation |

Tableau 5. Principaux promoteurs utilisés dans l'établissement de GEMM pour le cancer du sein.

De nombreux oncogènes ont été exprimés sous leur contrôle pour initier ou moduler la carcinogenèse mammaire chez la souris, tels que ErbB2 / Neu, l'antigène T moyen du virus polyome (PyMT), l'antigène T du virus simien 40 (SV40), Ha-Ras, Wnt-1, TGF- α et c-Myc. La diversité des oncogènes utilisés pour générer des modèles transgéniques du cancer du sein a abouti à une multitude de modèles qui imitent des sous-types moléculaires observés en clinique, confirmés par des analyses comparatives d'expression de tumeurs murines et des échantillons de tumeurs humaines (Pfefferle et al., 2013). Par exemple, les souris transgéniques C3(1)-Tag développent des carcinomes mammaires invasifs indépendamment de la supplémentation hormonale ou de la gestation, avec environ 15% de métastases. Ce modèle récapitule la perte d'expression du récepteur de l'oestrogène- α fréquemment observée dans le cancer du sein basal-like. Les souris transgéniques MMTV-Neu et MMTV-PyMT ressemblent respectivement aux sous-types luminal A et luminal B. Un certain nombre de GEMM issus de perte de gènes suppresseur de tumeur, comme par exemple le gène Tp53, Brca1, Brca2 et E-Cadherine ont été développés. La plus couramment étudiée est la souris knock-out Tp53 (Medina et al., 2002).

Des techniques plus sophistiquées ont aussi été développées pour produire des modèles transgéniques plus fidèles aux maladies humaines, par régulation spatiale et/ou temporelle d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeurs ciblées dans la glande mammaire, y compris la recombinaison homologe et l'utilisation d'un système Cre-loxP pour activer des oncogènes, ou déléter des gènes suppresseurs de tumeurs dans des organes spécifiques, entraînant parfois des tumeurs. Ces GEMM appelés « conditionnels » utilisent souvent le système Cre / loxP où

tout gène flanqué par les sites de recombinaison loxP sera supprimé après l'activation de la recombinase Cre ou activé si les sites Lox encadrent un codon STOP (Menezes et al., 2014).

Comme décrit précédemment, les GEMM sont des outils importants pour comprendre la progression du cancer du sein dans un microenvironnement physiologique intact. Le fait de surexprimer/inactiver spécifiquement un ou plusieurs transgènes nous a permis de déterminer leur rôle tout au long du développement tumoral, permettant de développer des thérapies ciblées mais aussi étudier les mécanismes moléculaires de la résistance au traitement. Enfin, les GEMM ont également été utilisés dans l'étude de cellule à l'origine de cancer du sein. Par exemple, il a été montré que les cellules progénitrices luminales sont à l'origine de cancers du sein avec la mutation BRCA1 en utilisant des souris MMTV-Cre Brca1^{ff} (Lim et al., 2009). Cependant, comme les PDX, l'utilisation des GEMM est aussi limitée par le temps, les dépenses et les ressources nécessaires pour les dériver, les établir et les maintenir. Parfois, les oncogènes responsables de la formation des tumeurs chez la souris ne sont pas ceux observés chez l'homme, comme par exemple l'Ag T de SV40. Comme les CDX et certaines PDX, les métastases développées chez les GEMM sont presque exclusivement pulmonaires, alors que les patients peuvent avoir plusieurs sites métastatiques (surtout le cerveau et l'os).

b) Le modèle C3(1) Tag: un modèle de cancer du sein basal-like

L'équipe de Green a développé des souris transgéniques C3(1) Tag dans lesquelles l'antigène T du virus SV40 est sous le contrôle transcriptionnel du promoteur C3(1) (Maroulakou et al., 1994). Le gène C3(1) code pour une sous-unité de la protéine sécrétée C3, une protéine majeure de la prostate ventrale. Sa région promotrice/enhancer a été utilisée pour diriger l'expression de l'antigène T de SV40 dans les cellules prostatiques (Maroulakou et al., 1994). Mais ce promoteur C3(1) a également ciblé l'expression du transgène dans l'épithélium mammaire (Green et al., 2000). Contrairement aux promoteurs MMTV et WAP, l'expression du promoteur C3(1) n'est pas influencée par la gestation et ne présente donc pas certains effets artificiels de la gestation sur les modèles transgéniques (Green et al., 2000). Le virus simien 40 (SV40) est un membre de *Polyomavirus* trouvés chez le macaque rhésus. C'est un virus à l'ADN qui provoque des tumeurs lorsqu'il est injecté dans des hamsters nouveau-nés (Duffell et al., 1964). Les singes sont l'hôte naturel du virus SV40. Bien que l'antigène T du SV40 ne soit pas connu pour initier le cancer du sein humain, il dérégule les voies cellulaires qui sont impliquées dans le cancer du sein humain : il se lie et inactive fonctionnellement à la fois les protéines suppresseurs de tumeurs p53 et Rétinoblastome (Rb) (Ahuja et al., 2005). Chez les

souris C3(1) Tag, les auteurs ont observé que les souris mâles développent une hyperplasie prostatique qui progresse vers un adénome ou un adénocarcinome chez la plupart des animaux survivant à plus de 7 mois. Les femelles développent généralement une hyperplasie mammaire à l'âge de 3 mois avec un développement ultérieur d'adénocarcinome mammaire à l'âge de 6 mois chez 100% des animaux. Des métastases aux poumons ont été observées chez les deux sexes (Maroulakou et al., 1994).

Je vais vous présenter les souris femelles qui servent de modèle pour cette étude de thèse. Chez les femelles, l'apparition de tumeurs mammaires était en corrélation avec l'expression de l'antigène T (Figure 18).

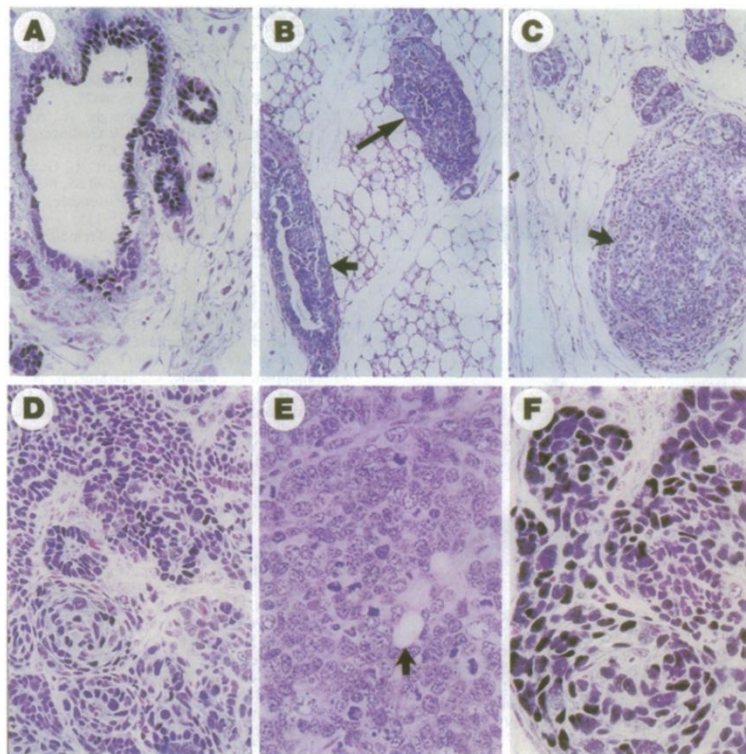


Figure 18. Lésions de la glande mammaire.

(A) Canaux non prolifératifs avec marquage nucléaire pour l'antigène T (points noirs) (X400) (B) Canal (petite flèche) et acinus (grosse flèche) avec hyperplasie atypique (X100) (C) Adénocarcinome microscopique (flèche) (X100) (D) Adénocarcinome avec de nombreux noyaux positifs pour l'antigène T (X400) (E) Adénocarcinome composé d'acini irréguliers (flèche) et des feuilles de cellules épithéliales indifférenciées. Nombreuses figures mitotiques (X630) (F) Adénocarcinome avec de nombreux noyaux positifs pour l'antigène T (X630). (Dans A, souris âgée de 1-2 mois) (Dans B souris âgée de 3 mois) (Dans C-F : souris âgée de 6 mois) (Modifié d'après Maraoulakou et al., 1994).

Bien que l'activation de l'antigène T soit la mutation initiatrice dans ce modèle, ces tumeurs hébergent souvent de nombreuses altérations génétiques. Par exemple, la mutation du proto-oncogène ki-Ras (amplification) joue un rôle important dans la progression tumorale puisque la perte d'un seul allèle de ki-Ras retarde significativement le développement tumoral

Introduction bibliographique

(Liu et al., 1998, 2001). De plus, chez ces souris l'apoptose s'est produite par des voies indépendantes de p53 et de Bcl-2, et diminuait pendant la transition de la lésion pré-néoplasique au carcinome. Ainsi, la suppression de l'apoptose semble jouer un rôle dans le processus tumorigène (Shibata et al., 1999). Puisque la protéine Bax (pro-apoptotique) est l'une des protéines fortement exprimée au cours des stades pré-néoplasiques des tumeurs mammaires, le rôle de Bax dans la progression tumorale a été évalué en croisant des souris Tg C3(1) Tag avec des souris inactivée pour le gène de Bax. Les résultats ont montré que la perte d'un seul allèle Bax était suffisante pour accélérer la tumorigenèse par rapport au Bax sauvage, suggérant le rôle de Bax comme un suppresseur critique de la progression de la tumeur mammaire au stade pré-néoplasique par augmentation d'apoptose. Mais cet effet protecteur 'anti-tumoral' est perdu lors de la transition vers le carcinome invasif (Shibata et al., 1999). Enfin, dans ce modèle, l'inactivation de p53 a induit une diminution des protéines cibles de p53, telle que p21. Comme la réduction de l'expression de p21 est fréquemment observée dans le cancer du sein humain, ce modèle a permis de tester l'effet de la restauration de p21 sur le développement de la tumeur. En effet, quand p21 est ré-exprimée dans les souris Tg C3(1) Tag par induction rétrovirale, cela entraîne une augmentation de l'apoptose, une réduction de la prolifération cellulaire *in vitro* et de la croissance tumorale *in vivo*, suggérant que la restauration de p21 par thérapie génique pourrait inhiber la progression tumorale (Shibata et al., 2001). Les souris C3(1) Tag ont été utilisées par différentes équipes pour étudier différents aspects de cancer du sein comme par exemple la résistance au traitement (Farrugia et al., 2015), la détection de rares cellules tumorales circulantes (CTC) par microfluidique (Kang et al., 2012), et l'identification de cible thérapeutique potentielle (Song et al., 2017).

Des analyses génomiques et des études des voies de signalisation ont révélé que la majorité de tumeurs mammaires de souris Tg C3(1) Tag sont homogènes phénotypiquement et correspondent au sous-type basal-like (Herschkowitz et al., 2007; Pfefferle et al., 2013). Il a été montré que les tumeurs basales humaines sont déficientes en protéine du rétinoblastome (pRB) et qu'elles expriment un taux d'ARNm le plus faible que les autres sous-types (Herschkowitz et al., 2007). D'autres études sur de nombreuses cohortes ont également montré que les tumeurs basales présentent une fréquence élevée de mutation ou de délétion de p53, ce qui pourrait expliquer la forte ressemblance entre les tumeurs C3(1) Tag et le sous-type basal-like (Sørli et al., 2001; Troester et al., 2006). Comme nous avons vu précédemment, le sous-type basal-like est le plus agressif et il n'existe pas de thérapies ciblées efficace contre ces tumeurs. Les souris Tg C3(1) Tag est un modèle intéressant pour comprendre l'origine des tumeurs basales, découvrir de cibles thérapeutiques potentielles et tester de nouveaux traitements anti-cancéreux

Introduction bibliographique

(Roberts et al., 2012; Usary et al., 2013). Il est intéressant de noter que 5 à 10% des tumeurs C3-Tag présentent les caractéristiques du sous-type claudin-low, ce qui pourrait être intéressant dans l'étude de CSC (Usary et al., 2016). En effet, une étude récente a utilisé les souris C3(1) Tag pour examiner le rôle de Lgr5, un marqueur controversé de cellules souches mammaires (Trejo et al., 2017). Les auteurs ont démontré que les cellules souches mammaires embryonnaires exprimant Lgr5 peuvent donner lieu à la fois à des lignées de cellules myoépithéliales et luminales (bipotence) alors que leurs homologues adultes sont restreints au phénotype myoépithélial. De plus, Lgr5 n'est pas indispensable pour l'activité des cellules souches mammaires embryonnaires et adultes et pour le développement de tumeurs mammaires (Trejo et al., 2017).

D. La synucléine gamma et la radiorésistance dans le cancer du sein

1. La radiothérapie dans le traitement des cancers

a) Généralités

La radiothérapie est un outil très efficace pour le traitement du cancer. Chez les patients atteints de tumeurs inopérables, la radiothérapie est souvent la seule option pour diminuer la masse tumorale. De plus, les patients chez qui les tumeurs n'ont pas été enlevées complètement ou qui récidivent après une intervention chirurgicale sont pour la plupart traités par la radiothérapie (Durante and Loeffler, 2010). La première utilisation clinique du rayonnement ionisant pour le traitement du cancer datait de la fin du XIXe siècle, peu après la découverte des rayons X par Wilhelm Röntgen en 1895 (Connell and Hellman, 2009). La radiothérapie utilise de fortes doses de rayonnement pour détruire ou ralentir la croissance tumorale en se basant sur le principe que les cellules cancéreuses à prolifération rapide sont plus sensibles aux dommages à l'ADN causés par l'irradiation que les cellules normales. Les rayonnements ionisants (IR), tels que les rayons X et les rayons γ , sont généralement utilisés pour le traitement du cancer par voie externe, mais d'autres particules comme les électrons, les neutrons et les protons peuvent aussi être utilisés, surtout par voie interne. Dans le traitement du cancer, l'efficacité de la radiothérapie dépend de plusieurs facteurs tels que le type de rayonnement, la dose totale délivrée, le fractionnement du traitement et la radiosensibilité des tumeurs. Même si les effets bénéfiques de la radiothérapie ont été démontrés sur de nombreux patients atteints de différents types de cancer, il y a une proportion non négligeable d'entre eux qui ne répondent pas à la radiothérapie ou rechutent après le traitement. De plus, la prévention ou la réduction des effets secondaires qui sont parfois tardifs est en train de devenir un problème de santé publique important, en particulier chez les jeunes adultes ou les enfants. Les enfants sont intrinsèquement plus radiosensibles et ont plus d'années de vie restantes pendant lesquelles l'effet tardif induit par l'irradiation dans les cellules normales peut se manifester par une hyperprolifération entraînant un deuxième cancer (en anglais *Therapy-related cancers*) (Allan and Travis, 2005). Une meilleure compréhension de la biologie de la tumeur ainsi que des progrès techniques sur la modalité de la radiothérapie pourraient contribuer à améliorer son efficacité et bénéficier à un plus grand nombre de patients.

b) *Effet de la radiation ionisante sur le vivant*

Un rayonnement particulaire ou électromagnétique est ionisant lorsqu'il est capable d'arracher des électrons à la matière. Quand une cellule est exposée à une irradiation ionisante, les rayonnements ionisants brisent les liaisons entre les atomes et endommagent les macromolécules constituant la cellule. Les conséquences biologiques les plus importantes des radiations sont essentiellement dues aux lésions des molécules d'ADN. En même temps, la dissociation de molécules simples comme l'eau, très abondante dans l'organisme vivant, libère aussi des radicaux libres très actifs chimiquement et donc agressifs. Dans le cas de cancer, ces effets 'ciblés' d'irradiation sur les cellules cancéreuses irradiées sont à distinguer des effets 'non ciblés' sur les cellules saines voisines (effet *bystander*) et de l'instabilité génomique observée chez la descendance d'une cellule irradiée (instabilité génétique transgénérationnelle) (Figure 19).

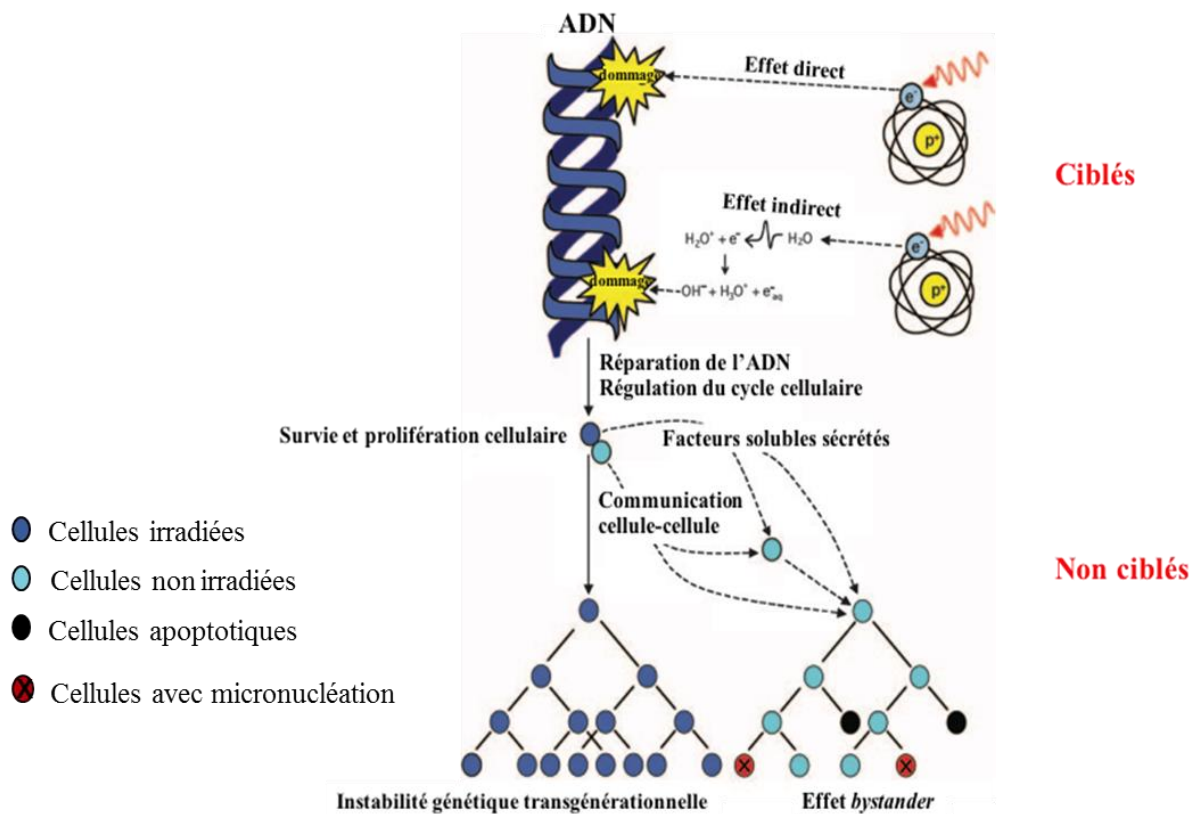


Figure 19. Effets d'IR sur les cellules.

Après IR, une cellule est soit éliminée soit réparée par différents mécanismes. Une cellule survivante irradiée (bleue marine) peut proliférer, transmettant l'effet du rayonnement à ses descendants (instabilité génétique transgénérationnelle), initiant potentiellement le processus cancérogène. La cellule irradiée peut également communiquer avec des cellules voisines non irradiées (bleu claire) par communication cellule-cellule et/ou sécrétion de facteurs solubles provoquant une apoptose non ciblée (en noir) ou une micronucléation (en rouge) dans les dernières (effet *bystander*). (Modifié d'après (Morgan and Sowa, 2005).

Introduction bibliographique

(1) Effet direct

L'effet direct d'IR se traduit par l'endommagement des molécules biologiques essentielles à la survie cellulaire telle que l'ADN et une induction des lésions directes des composants cellulaires. D'une manière générale, les modifications moléculaires produites dans l'ADN par les radicaux oxydants vont aboutir, selon leur complexité, à des coupures simple-brin (*simple strand break = SSB*) ou à des coupures double-brin (*double strand break = DSB*) de la double hélice d'ADN. Les lésions simple-brin sont souvent réparées rapidement, de manière exacte et complète par la cellule. En revanche, les cassures doubles brin induites par les radiations représentent les types les plus délétères de lésions de l'ADN, conduisant à la mort cellulaire si elles ne sont pas réparées. Cependant, les mécanismes de réponse aux dommages de l'ADN représentent une ligne de défense essentielle contre les dommages exogènes et endogènes causés par les radiations et favorisent la survie et le maintien de la stabilité génomique. Ces mécanismes de réparation de l'ADN seront discutés dans la partie 1-c dans ce chapitre.

(2) Effet indirect

L'essentiel de la matière vivante étant constitué d'eau et le rayonnement interagissant avec les molécules d'eau cela entraîne la radiolyse de l'eau. Celle-ci se traduit par la production de radicaux libres, qui sont des atomes ou des molécules qui ont un électron non apparié et sont donc très réactifs. Ces radicaux libres peuvent alors se diffuser dans les cellules et attaquer des cibles critiques telles que l'ADN. Ainsi, les dommages dus à l'action indirecte sont beaucoup plus fréquents que les dommages dus à l'action directe, en particulier pour les rayonnements à faible ionisation spécifique comme les rayons X. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont naturellement présentes dans les cellules aérobies et leur niveau de base est maintenu à un taux variable selon les types cellulaires permettant le contrôle de la prolifération et de la survie. Les ROS sont généralement définis comme des espèces chimiques réactives contenant de l'oxygène qui génèrent des radicaux libres hautement énergétiques. Elles comprennent principalement l'anion superoxyde (O_2^-), le radical hydrolyse (HO^\bullet), le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Plus généralement, elles comprennent aussi l'oxyde nitrique NO (Birben et al., 2012). En condition physiologique, la source principale de ROS endogène est la mitochondrie et l'équilibre entre la production d'oxydants et d'anti-oxydants est étroitement régulé par la cellule afin de maintenir la balance oxydative (Vera-Ramirez et al., 2011). Lorsque les cellules sont

Introduction bibliographique

irradiées, le niveau de ROS augmente considérablement dans les cellules et cause une rupture de la balance oxydative, entraînant un stress oxydatif. Ceci est à l'origine de nombreux dommages cellulaires à différents niveaux pouvant induire la mort cellulaire (Azzam et al., 2012).

(3) Effet *bystander*

Les preuves expérimentales accumulées au cours des deux dernières décennies ont montré que l'exposition des populations cellulaires aux rayonnements ionisants entraîne des effets biologiques importants non seulement dans les cellules irradiées mais aussi les cellules non irradiées de la population. Ce phénomène, appelé effet *bystander* ou *ionizing radiation-induced bystander effects* (RIBE), a été démontré pour la première fois par Nagasawa et Little en 1992. Ils ont observé que dans une lignée cellulaire en culture 2D, lorsque seulement 1% de la population cellulaire avait été irradiée par des particules α fortement ionisantes, 30% de la population présentait des lésions chromosomiques sous forme d'échange de chromatides sœurs (*sister chromatide exchange* = SCE) (Nagasawa and Little, 1992). Depuis, ce phénomène a été démontré dans les modèles *in vitro* et *in vivo* avec différents types de sources de rayonnement (Azzam et al., 2004; Seymour and Mothersill, 2004). La découverte des effets *bystander* a changé notre vision sur les mécanismes d'action d'IR. Les cellules *bystander* dans une population de cellules exposées peuvent être décrites comme les cellules non irradiées qui ont reçu des signaux de cellules irradiées voisines ou distantes, entraînant différentes conséquences sur ces cellules telles que l'induction de la mutagenèse, les SCE, les aberrations chromosomiques, la formation des micronoyaux, la transformation néoplasique, la mort cellulaire (Desouky et al., 2015).

Différents mécanismes de signalisation inter- et intra- cellulaires peuvent intervenir dans la communication d'une cellule irradiée vers une cellule non irradiée : soit par un contact direct de cellule à cellule (jonction cellulaire), soit par des facteurs solubles libérés par les cellules irradiées, notamment les cytokines dans le milieu de culture (Little, 2006). Ainsi, différents types cellulaires réagiront différemment aux voies de signalisation stimulées.

(4) Instabilité génétique transgénérationnelles

L'instabilité génétique (*Genomic Instability* = GI) est un phénomène complexe observé au cours du développement de certains cancers et peut être induit par les rayonnements ionisants.

Introduction bibliographique

La GI transgénérationnelle peut être défini comme une augmentation persistante du taux de mutation observée dans la descendance des cellules irradiées durant plusieurs générations (Dubrova, 2003). Soupçonné depuis les années 80, l'équipe de Wright a été la première à mettre en évidence ce phénomène expérimentalement. Ces auteurs ont démontré que les particules α induisaient une instabilité chromosomique dans les descendants des cellules souches hématopoïétiques (Kadhim et al., 1992) et que cette instabilité était aussi observée dans la descendance des cellules non irradiées à long terme, suggérant le couplage d'un effet *bystander* avec la GI transgénérationnelle (Lorimore et al., 1998). Les études sur les descendants non irradiés de souris mâles irradiées ont confirmé ces observations et montré une augmentation de la fréquence de mutation ainsi que des cassures de l'ADN dans les tissus germinaux et somatiques des souris descendantes (Barber et al., 2006). Il a également été rapporté que dans la descendance de souris et de rats mâles irradiés l'instabilité transgénérationnelle affecte la fréquence des aberrations chromosomiques ainsi que des mutations au niveau des gènes codant pour les protéines (Shiraishi et al., 2002; Vorobtsova, 2000). Tels effets ont également été observés dans les populations humaines. Par exemple, l'analyse des familles irradiées à la suite de l'accident de la centrale nucléaire de Tchernobyl a révélé une augmentation significative d'aberration génétique non seulement chez les parents irradiés mais aussi chez leurs enfants nés après l'accident (Aghajanyan and Suskov, 2009). Bien que de nombreuses études aient fourni des preuves démontrant les effets d'irradiation paternelle sur la déstabilisation du génome des descendants, les mécanismes à l'origine de la GI transgénérationnelle restent mal compris. Un nombre croissant d'études ont démontré que les instabilités génétiques induites par IR favorisent l'accumulation de mutations et la formation de cancers. C'est pourquoi une meilleure compréhension de ces causes et mécanismes est un enjeu fondamental dans la radioprotection.

c) *Réponse cellulaire aux dommages radioinduits*

Alors que le rayonnement ionisant peut endommager les cellules par de nombreux mécanismes comme discuter ci-dessus, le mécanisme le plus important dans la destruction des cellules tumorales est le dommage à l'ADN. Il est maintenant bien établi que le stress génotoxique comme IR active les réponses précoces comme les points de contrôle du cycle cellulaire (*Checkpoints*) et les voies de réparation de l'ADN qui favorisent la survie cellulaire en éliminant les lésions génétiques (Mirzayans et al., 2013). Immédiatement après IR, différentes protéines sont activées pour détecter les lésions de l'ADN comme les cassures simple brin (SSB) et double brin (DSB) et ensuite déclencher la réponse aux dommages à

Introduction bibliographique

l'ADN (*DNA damage response = DDR*). Deux protéines kinases sont au centre de la mise en place de DDR : ATM (*ataxia telangiectasia, mutated*) et ATR (*ATM and Rad3 related*), qui contrôlent respectivement la réponse cellulaire aux DSB et SSB. ATM est recrutée dans les sites de DSB par le complexe Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) et phosphoryle la variante H2 de l'histone H2AX, permettant l'interaction des autres constituants DDR requis pour la réparation du DSB. ATR est majoritairement recrutée au niveau des SSB par les complexes de réplication-protéine A (RPA), et activée par association avec son cofacteur ATRIP. ATR et ATM phosphorylent et activent certains substrats communs qui interviennent dans la réparation de l'ADN tels que les kinases effectrices respectives Chk1 et Chk2. Ensemble, ces quatre protéines kinases déclenchent de multiples voies cellulaires aboutissant à un arrêt transitoire ou permanent du cycle cellulaire, à la réparation des lésions de l'ADN et / ou à la mort cellulaire (Jackson and Bartek, 2009) (Figure 20).

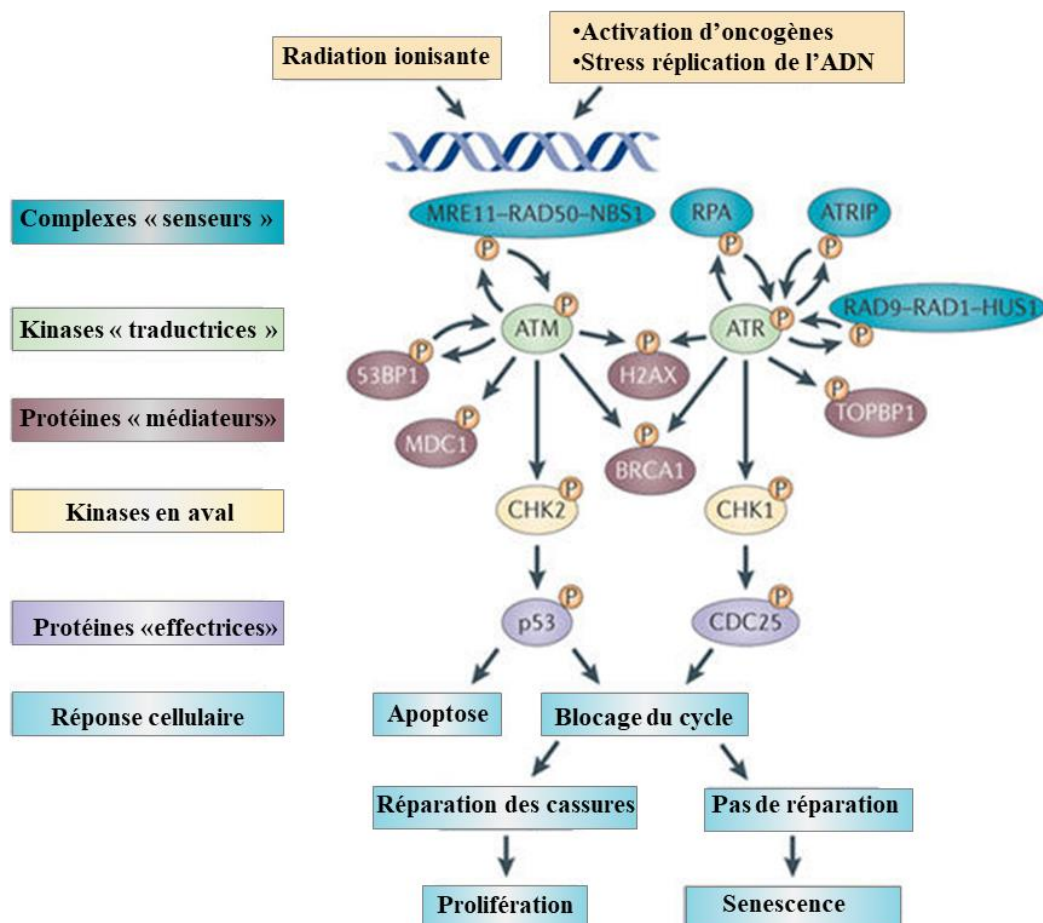


Figure 20. La réponse aux dommages à l'ADN.

(Modifié d'après (Sulli et al., 2012).

Une cible cruciale de la cascade ATM / ATR est la protéine suppresseur de tumeur p53. Dans les tissus normaux, le destin de la cellule irradiée est en grande partie déterminé par p53. Selon la phase du cycle cellulaire et le type ainsi que l'importance des dommages à l'ADN, p53 permet de réparer des dommages, ou d'activer des gènes impliqués dans la senescence et/ou l'apoptose immédiate p53-dépendante pour éliminer les cellules trop endommagées. Cependant, la fonction de p53 est inactivée ou compromise dans plus de 50% de tous les cancers qui perdent leur susceptibilité de l'apoptose immédiate (Levine, 1997). Dans ces cellules p53-mutées, les cellules irradiées incapables de réparer leurs cassures meurent par d'autres types de mort cellulaire, notamment l'apoptose p53-indépendante ou la catastrophe mitotique que je discuterai par la suite.

d) *Morts cellulaires radioinduites*

Quand les dommages à l'ADN causés par IR deviennent trop importants, les cellules normales ou cancéreuses peuvent entrer en senescence ou déclencher la mort cellulaire par différents mécanismes. La mort cellulaire dite « programmée » est une forme de mort cellulaire contrôlée par des voies de signalisation dont les trois principales formes sont l'apoptose, la nécroptose (la nécrose programmée) et l'autophagie. Les cellules peuvent aussi mourir par la catastrophe mitotique, ce qui est le cas dans la plupart de cellules cancéreuses (Figure 21).

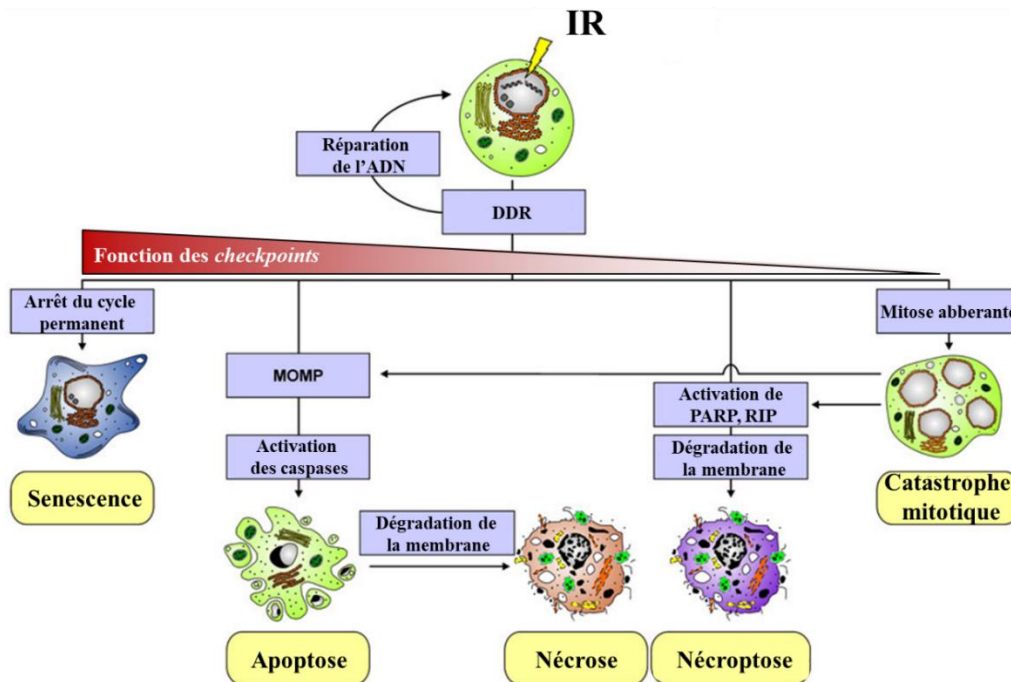


Figure 21. Principales modalités de mort cellulaire induite par les rayonnements ionisants.

(Modifié d'après (Lauber et al., 2012).

Introduction bibliographique

- Senescence

La sénescence est une condition de l'arrêt permanent en phase G1 du cycle cellulaire, où les cellules adoptent une morphologie élargie et aplatie, une granularité accrue, tout en restant métaboliquement active. La senescence se caractérise par une augmentation de l'expression des inhibiteurs de kinases cycline-dépendants, tels que p16^{INK4a}, p21^{Waf1} et p27^{Kip1}, et une coloration positive de la β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β -Gal). Elle est déclenchée par une variété de signaux intrinsèques et extrinsèques tel qu'IR, entraînant éventuellement la mort cellulaire principalement par apoptose (Gewirtz et al., 2008). Le phénotype des cellules sénescents est souvent appelé sénescence prématurée induite par le stress (SIPS) et les principaux acteurs de ce processus sont p53 et pRB. Il a été montré que la plupart des cellules normales et de nombreuses cellules tumorales ayant un p53 fonctionnel entrent en SIPS au lieu de l'apoptose suite à IR, même si des phénotypes sénescents ont également été rapportés en l'absence de p53 (Nardella et al., 2011). Ce processus empêche une prolifération incontrôlée en cas de dommages à l'ADN trop importants, et ainsi protégeant les cellules contre le développement d'un cancer (effet suppresseur de tumeur). Cependant, il a été démontré que les cellules sénescents peuvent sécréter des facteurs qui favorisent la croissance et la progression de tumeurs et qui peuvent modifier la réponse immunitaire (Kuilman and Peeper, 2009). De plus, il a été montré que dans certaines cellules tumorales, la senescence n'est pas vraiment irréversible et les cellules tumorales pourraient l'utiliser afin d'échapper à la cytotoxicité radio-induite. L'hypothèse est que les cellules tumorales sénescents sont dormantes et pourraient être réveillées par des stimuli externes, comme par exemple des facteurs sécrétés par le stroma tumoral, des mois ou des années après la radiothérapie (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007).

- Apoptose

L'apoptose ou la mort cellulaire programmée de type I, est une forme prédominante de la mort cellulaire induite par la radiation ionisante, notamment pour les cellules hématopoïétiques. L'apoptose est caractérisée par une série de changements morphologiques distincts, dont le rétrécissement cellulaire, la condensation de la chromatine, la fragmentation nucléaire et le bourgeonnement membranaire entraînant la formation de corps apoptotiques qui seront ingérés par des macrophages. Observée pour la première fois par Flemming en 1885, l'apoptose n'a été clairement identifiée qu'en 1972 par Kerr (Kerr et al., 1972). Cette mort cellulaire est naturellement mise en œuvre dans certaines fonctions physiologiques importantes pour l'organisme telles que l'embryogénèse et la différenciation. Ainsi l'apoptose contribue à l'homéostasie de l'organisme en détruisant les cellules défectueuses qui peuvent mettre en péril

Introduction bibliographique

l'intégrité de l'organisme. On peut distinguer deux formes d'apoptose déclenchée par deux mécanismes moléculaires différents : la voie intrinsèque ou mitochondriale, et la voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort (Elmore, 2007). IR induit principalement l'apoptose via la voie intrinsèque mais la voie apoptotique extrinsèque pourrait aussi intervenir selon la dose d'irradiation et le type cellulaire (Eriksson and Stigbrand, 2010). Dans le cas de l'apoptose intrinsèque, les événements initiaux impliquent la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (MOMP) et la libération de diverses protéines dont le cytochrome c dans le cytosol. Ce processus stimule ainsi la formation de l'apoptosome et l'activation des caspases initiatrices et effectrices qui déclenchent les étapes finales de l'apoptose et de la désintégration de la cellule (Taylor et al., 2008). Les protéines de la famille Bcl-2 (*lymphomes B-2*) sont des régulateurs clé de la perméabilisation mitochondriale et de la libération du cytochrome c et peuvent avoir une fonction pro- ou anti- apoptotique. Après IR, l'accumulation nucléaire de la protéine p53 active l'expression de membres de la famille Bcl-2 pro-apoptotiques, tels que Puma et Noxa et déclenche la voie apoptotique intrinsèque (Sengupta and Harris, 2005). De plus, les rayonnements ionisants peuvent augmenter la production de $O_2^{\cdot-}$ par les mitochondries déclenchant ainsi la libération du cytochrome c (Ogura et al., 2009).

Quant à la voie extrinsèque, l'apoptose peut être induite par l'interaction entre les récepteurs de mort, tels que CD95 ou les récepteurs TRAIL 1 et 2, et leurs ligands correspondants (Debatin and Krammer, 2004). L'activation des récepteurs de mort conduit au recrutement et à l'activation des pro-caspases-8 et -10, déclenchant la cascade des caspases entraînant l'apoptose. Il a été montré que l'expression de plusieurs composants de la voie extrinsèque est augmentée suite à IR et pourraient ainsi contribuer à l'induction de l'apoptose (Belka et al., 1998; Haupt et al., 2003). La protéine p53 joue un rôle essentiel dans la régulation de l'apoptose et peut contribuer à la fois à l'apoptose intrinsèque et à l'apoptose extrinsèque. Cependant, les cellules cancéreuses souvent déficientes en p53 sont résistantes à l'apoptose. Ainsi l'IR peut induire l'apoptose par des mécanismes indépendants de p53, comme par exemple l'induction des membres pro-apoptotiques de Bcl-2 par p63/p73, ou la stimulation de la signalisation des récepteurs de mort (Afshar et al., 2006; Wakatsuki et al., 2008).

- Autophagie

L'autophagie ou la mort programmée de type II est un processus d'auto-digestion des organelles dans les vésicules à double membrane appelées autophagosomes. Dans certaines cellules, une telle dégradation lysosomale peut être suivie d'une apoptose, mais les cellules survivantes recyclent les métabolites comme sources d'énergie (Chen and Karantza-Wadsworth, 2009). Les

gènes de la famille atg (*autophagy-related genes*) participent à chaque étape de l'autophagie et la voie PI3K/Akt/mTOR est connue pour être une régulatrice négative (Takeuchi et al., 2005). Dans de nombreuses tumeurs, la voie PI3K/Akt/mTOR est mutée donc consécutivement activée, ce qui rend les cellules cancéreuses résistantes à la mort par autophagie. La mort cellulaire par autophagie induite par IR a été rapportée dans des cellules cancéreuses du gliome, du sein et de la prostate (Paglin et al., 2001). Certaines études suggèrent que l'autophagie joue un rôle anti-tumoral alors que d'autres ont trouvé qu'elle contribue à la radiorésistance dans certains types de cancers (Ito et al., 2005; Zhuang et al., 2009). Ces effets contradictoires pourraient être dus au rôle critique de l'autophagie dans l'élimination des protéines et des organelles endommagées. Par conséquent, l'autophagie semble jouer un double rôle au cours de la cancérogenèse en fonction du contexte.

- Nécrose et Nécroptose

La nécrose a été longtemps considérée comme une forme de mort incontrôlée et passive contrairement à la mort programmée comme l'apoptose ou l'autophagie. Elle se caractérise par une vacuolisation nucléaire, une dénaturation des protéines et une dégradation aléatoire de l'ADN suivie d'une rupture des membranes cellulaires. La nécrose est beaucoup moins fréquente après un traitement par IR mais elle peut survenir surtout après des doses élevées d'IR (Rainaldi et al., 2003). De plus, une nécrose secondaire peut se produire lorsque les cellules apoptotiques ne sont pas phagocytées correctement par des cellules environnantes (Silva, 2010). La nécroptose ou la mort programmée de type III a été récemment identifiée. Elle est indépendante des caspases et contrôlée par les protéines kinases interagissant avec les récepteurs (RIP1/3) aboutissant à la production de ROS, la rupture de la membrane plasmique et la libération de contenu intracellulaire (Vandenabeele et al., 2010). Il a été montré que la nécroptose est un mécanisme novateur de la mort induite par IR de certains types de cellules cancéreuses endocrines, comme les cellules thyroïdiennes et les cellules de carcinome corticosurrénalien (Nehs et al., 2011). De plus, Necrostatin-1, un inhibiteur de la nécroptose peut réduire les dommages induits par irradiation chez les souris (Huang et al., 2016).

- Catastrophe mitotique

La catastrophe mitotique ou la mort cellulaire mitotique survient au cours d'une mitose aberrante et résulte de l'induction prématurée de la mitose avant l'achèvement des phases S et G2. Avec apoptose, elles ont été caractérisées comme les principales formes de mort cellulaire induite par IR dans les cellules cancéreuses (Kroemer et al., 2004). Morphologiquement, la

Introduction bibliographique

mort mitotique induit la formation des cellules géantes multinuclées, présentant plusieurs micronoyaux et vésicules (Erenpreisa et al., 2005). Ces cellules peuvent survivre pendant des jours, puis devenir sénescence ou mourir par apoptose ou nécrose retardée. Par exemple, les cellules cancéreuses mammaires irradiées meurent par apoptose retardée associée à une catastrophe mitotique après un arrêt de croissance (Vares et al., 2004). D'un point de vue moléculaire, la mort mitotique peut être due à des défauts de points de contrôle en phase G2 du cycle cellulaire : les cellules reprennent leur cycle alors que l'ADN reste endommagé (Castedo M et al., 2004). Ceci est particulièrement prévalent lorsque les points de contrôle de l'ADN contrôlés par p53 sont compromis. Par exemple, les modèles cellulaires déficients en protéines critiques pour le point de contrôle de phase G2 du cycle cellulaire, comme ATM, ATR, CHK1, CHK2 et p21, favorise la catastrophe mitotique suite aux différents traitements (Hirose et al., 2005; Vogel et al., 2007). De manière intéressante, le déficit en p53 qui est le cas dans beaucoup de cellules cancéreuses pourrait aussi favoriser la mort mitotique (Ianzini et al., 2006). D'autre part, les dommages à l'ADN peuvent aussi contribuer à l'accumulation de centrosomes en G2, ce qui empêchera la division cellulaire normale entraînant la catastrophe mitotique (Roninson et al., 2001; Löffler et al., 2006). Il a été proposé que la catastrophe mitotique pourrait agir comme un mécanisme onco-suppressif qui détecte l'échec mitotique et empêche la prolifération des cellules aneuploïdes précédant l'apoptose, la nécrose ou la sénescence (Vitale et al., 2011).

e) *Radiothérapie dans le cancer du sein*

La radiothérapie est systématiquement indiquée chez les patientes qui ont subi une chirurgie conservatrice de sein. Généralement une dose de 50 Gy est délivrée en 25 fractions de 2 Gy, 5 jours par semaine pendant 5 semaines. Ce fractionnement de dose permet d'obtenir un meilleur ratio efficacité anti-tumorale/tolérance des tissus sains (Fourquet et al., 2016). En cas de risque de récurrence élevé comme chez les patientes jeunes, une dose additionnelle de 10 à 16 Gy est délivrée dans le lit tumoral, appelée *boost*. Elle peut être faite par irradiation externe ou par curiethérapie (Guide ALD 30 « Cancer du sein »). Au cours de la radiothérapie externe, des rayons sont émis par une machine appelée accélérateur linéaire de particules, et le faisceau traverse la peau du patient pour atteindre la tumeur. Les deux rayonnements les plus souvent utilisés pour la radiothérapie externe sont les rayons X ou photons (dans 90 % des cas), et les électrons. La radiothérapie postopératoire joue un rôle important dans le contrôle local pour les cancers *in situ*, comme l'a montré une étude de méta-analyse réalisée sur 20 000 patientes avec un cancer du sein *in situ* ou infiltrant, où la radiothérapie permet de réduire significativement

le risque de récurrence locale et d'augmenter la survie globale (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 2000). Les bénéfices de la radiothérapie ne sont plus à démontrer mais son effet se limite à une partie assez faible de patientes traitées. En effet, plusieurs études ont montré que seules 25 % environ des rechutes locales sont évitées, soit un gain brut de 3 à 6 % selon les catégories traitées (Bartelink et al., 2001; Houghton et al., 2003). La variation dans la radiosensibilité tumorale et individuelle est une des causes principales du manque de bénéfice pour les patientes. Comment identifier les patientes qui peuvent réellement bénéficier de la radiothérapie? Il est nécessaire de développer un dépistage utilisant des bio-marquages qui permettent de prédire l'efficacité de la radiothérapie et de proposer les traitements les plus adaptés à chaque patiente.

2. La synucléine gamma (SNCG)

Les synucléines sont des petites protéines solubles exprimées principalement dans les tissus nerveux et dans certaines tumeurs. On distingue trois membres dans cette famille : l' α -synucléine, la β -synucléine et la γ -synucléine. Les synucléines sont caractérisées par une séquence de 5 ou 6 répétitions (KTKEGV) dans la région N-terminale et diffèrent considérablement au niveau de la région C-terminale responsable de leur spécificité de fonctions ([figure 22](#)). Les protéines synucléines α et β se trouvent majoritairement dans le tissu cérébral, où elles sont principalement observées dans les terminaisons présynaptiques. La protéine synucléine γ se trouve principalement dans le système nerveux périphérique et la rétine, mais son expression dans le cancer du sein est considérée comme un marqueur de la progression tumorale. Jusqu'à présent, les fonctions biologiques des synucléines n'ont pas été déterminées, mais leur implication dans les maladies neurodégénératives et le cancer suggèrent la possibilité de les utiliser comme cibles potentielles pour le diagnostic et le traitement de ces maladies (Ahmad et al., 2007; George, 2002).

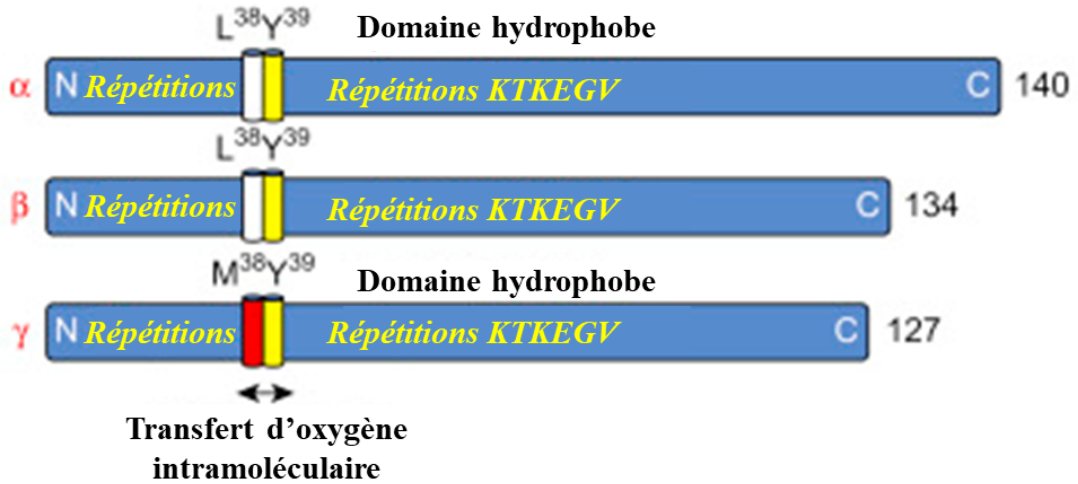


Figure 22. Schéma représentatif des synucléines α , β , et γ .

Les trois membres de la famille des synucléines contiennent dans la région N-terminale une série de répétitions avec une composition générale KTKEGV qui codent pour une hélice α amphiphile étendue. Les synucléines α et β ont une leucine (L) et une tyrosine (Y) en positions 38 et 39, tandis que la synucléine γ possède une méthionine (M) en position 38 à côté de la tyrosine, permettant le transfert d'oxygène intramoléculaire et augmente la probabilité à agréger (Nagy et al., 2009). (Modifié d'après (Surgucheva et al., 2012).

a) *Découverte et rôle dans le cancer du sein*

La γ -synucléine (SNCG) a d'abord été identifiée en tant que gène-1 spécifique du cancer du sein (*Breast Cancer Specific Gene 1 : BCSG1*) dans un criblage différentiel à haut débit pour trouver les marqueurs du cancer du sein (Ji et al., 1997). Ce nom lui a été attribué en raison de son expression abondante dans le cancer du sein infiltrant avancé, par rapport à son niveau presque indétectable dans les lésions mammaires normales ou bénignes. Un an plus tard, une autre étude a cloné un nouveau membre de la famille des synucléines qui possédait la même séquence que BCSG1. Ce gène a donc été renommé γ synucléine (Lavedan et al., 1998). Au niveau de sa structure, comme nous avons vu précédemment, SNCG partagent des séquences communes avec les deux autres synucléines au niveau de son extrémité N-terminale mais diverge complètement dans la région C-terminale (Buchman et al., 1998) et cette différence pourrait influencer sa localisation intracellulaire. En effet, il a été montré que l'extrémité C-terminale de SNCG confère une localisation cytosolique, tandis que celle de α -synucléine faciliterait une localisation nucléaire (Specht et al., 2005). Cependant, des preuves expérimentales montrent que SNCG peut avoir une localisation dynamique en fonction de l'activité de la cellule. Sa présence a été détectée dans la zone périnucléaire et il pouvait être transloquer dans le noyau en cas de stress (Surgucheva et al., 2006). Au laboratoire, nous avons

Introduction bibliographique

également observée une localisation nucléaire et cytoplasmique dans la lignée cellulaire du cancer du sein T47D (données non publiées).

L'expression de SNCG a été détectée dans de nombreux tissus normaux comme le système nerveux central (Ji et al., 1997) mais son ARNm est indétectable dans les structures embryonnaires néonatales et prosencéphales, suggérant une régulation de son expression par le développement (Buchman et al., 1998; Ninkina et al., 1998). Cette régulation au cours du développement pourrait expliquer son implication dans la formation du système nerveux mais son rôle biologique exact n'est pas élucidé à ce jour (Surguchov, 2015). En même temps, l'expression abondante de SNCG a été détectée dans plusieurs maladies humaines telles que le cancer, les maladies oculaires et neurodégénératives (Galvin et al., 2001; Surguchov et al., 2001a). Dans le cas de cancer du sein, il a été montré que l'expression de SNCG est corrélée au stade de la maladie ; on retrouve SNCG dans environ 15% des cancers du sein de faible grade (stades I/II) contre 80% des cancers du sein de haut grade (stades III/IV) (Wu et al., 2003). De plus, son expression est associée à un mauvais pronostic du cancer du sein (Wu et al., 2007). Plusieurs études ont montré que l'expression ectopique de SNCG dans des lignées cellulaires cancéreuses mammaires favorise la prolifération et l'invasion des cellules (Gupta et al., 2003; Jia et al., 1999; Liu et al., 2000). Par exemple, SNCG favorise l'activité des métalloprotéases matricielles (MMP), qui dégradent la matrice extracellulaire et facilitent la migration et l'invasion des cellules cancéreuses (Jia et al., 1999; Jiang et al., 2003). En revanche, l'inactivation de SNCG dans des cellules cancéreuses mammaires les sensibilise à l'apoptose induite par un stress du réticulum endoplasmique (Pan et al., 2002). De manière intéressante, SNCG a été détectée dans le sérum de patients atteints de cancer du pancréas, suggérant son rôle comme une protéine sécrétée (Li et al., 2004). En effet, SNCG est sécrétée par les cellules cancéreuses dans le milieu extracellulaire, favorisant l'invasion tumorale (Liu et al., 2014a).

Une expression élevée de SNCG a également été observée dans plusieurs autres types de cancers, tel que ceux de l'ovaire, du col de l'utérus, de la prostate, du côlon et du poumon (Ahmad et al., 2007; Liu et al., 2005). Une forte corrélation a été montrée entre l'expression de SNCG et la présence de métastases chez les patients, quel que soit le type de cancer (Liu et al., 2005). L'ensemble de ces résultats démontrent son implication dans les différentes étapes de développement tumoral et son utilisation comme biomarqueur pour la progression tumorale.

b) *Implication dans la résistance au traitement anti-tumoral*

Les anti-microtubules est une classe d'agents de chimiothérapie utilisée dans le traitement de plusieurs types de cancers tels que l'ovaire, le poumon et le sein (Dumontet and Jordan, 2010). Ils bloquent soit la dépolymérisation (taxanes), soit la polymérisation (alcaloïdes de la pervenche) de la tubuline. Le paclitaxel (Taxol®) fait partie de la famille des anti-microtubules et participe à la stabilisation des microtubules en favorisant leur polymérisation (Horwitz, 1994). Au cours des dernières décennies, le paclitaxel a été utilisé avec succès pour traiter différents cancers. Cependant, des cas de résistance au paclitaxel ont également été rapportés ce qui affecte son efficacité anti-tumorale (Perez et al., 1993).

La relation entre SNCG et la résistance au paclitaxel a été démontrée par plusieurs équipes (Singh et al., 2007; Zhou et al., 2006). Les auteurs ont rapporté que les lignées cellules cancéreuses mammaires SNCG-positives présentent une résistance plus importante au blocage en mitose induit par le paclitaxel par rapport à celles qui n'expriment pas SNCG. D'un point de vue moléculaire, le paclitaxel induit la stabilisation des microtubules et activent les points de contrôle du fuseau mitotique (*spindle assembly checkpoint = SAC*), ce qui entraîne l'arrêt des cellules en mitose sans entrer dans l'anaphase, menant à l'apoptose. Deux protéines clé sont critiques pour le fonctionnement de SAC : BUB1-3 (*budding uninhibited by benzimidazole*) et BubR1 (*budding uninhibited by benzimidazole-related 1*) (McGrogan et al., 2008). Il a été montré que SNCG interagit avec BubR1 empêchant ainsi l'activation de SAC permettant à la cellule de progresser dans le cycle cellulaire et d'échapper à l'apoptose. Ainsi SNCG confère une résistance aux drogues antimitotiques (Singh and Jia, 2008) (Figure 23). En revanche, l'effet inhibiteur de SNCG sur BubR1 est réduit par une surexpression ectopique de BubR1 dans les cellules cancéreuses du sein (Inaba et al., 2005). D'autres études ont suggéré que l'interaction entre BubR1 et CENP-E (*centromere-associated protein E*), un autre composant de SAC, est inhibée en présence de SNCG. Ces résultats suggèrent que la liaison de SNCG à BubR1 interfère avec son interaction avec CENP-E entraînant ainsi la défaillance de contrôle mitotique (Inaba et al., 2005). Certaines études suggèrent aussi que SNCG pourrait être une protéine associée au centrosome, participant à la modulation de la structure des microtubules (Surgucheva et al., 2003; Surguchov et al., 2001b).

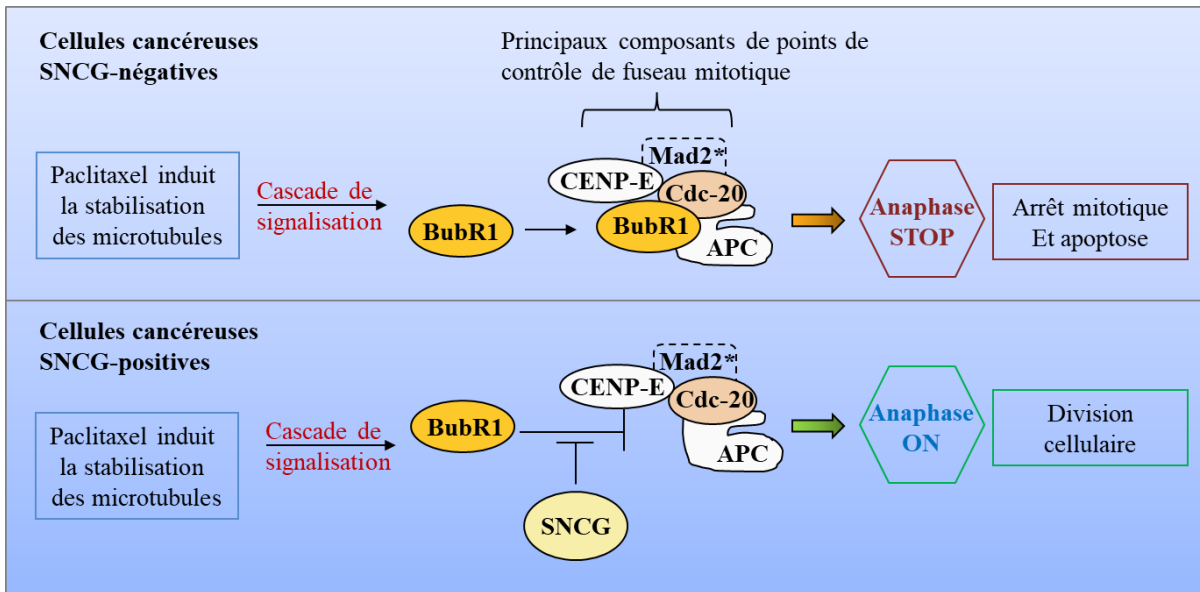


Figure 23. Mécanisme de résistance au paclitaxel induite par SNCG.

Le paclitaxel induit la stabilisation des microtubules inhibant leur attachement aux kinétochores pendant la mitose, ce qui active les points de contrôle du fuseau mitotique (SAC). Les kinétochores libres activent à leur tour la protéine Mad2 et Mad2 activé (Mad2*) agit de manière synergétique avec BubR1 afin d'inhiber l'activité du complexe Cdc20-APC. Ces cascades de signalisation provoquent un signal 'STOP' dans l'anaphase et les cellules entrent en arrêt mitotique, menant à l'apoptose. En revanche, quand SNCG est présente dans les cellules, elle s'associe à BubR1 et ainsi libère le complexe Cdc20-APC qui déclenche l'anaphase et la division cellulaire. (APC: anaphase promoting complex; CENP-E: Centromere-associated protein E; Mad: mitotic arrest deficient; Cdc-20: cell-division cycle protein 20.) (Modifié d'après Singh and Jia, 2008).

SNCG a également été décrite comme une molécule chaperonne du récepteur à l'estrogène ER- α dans un complexe multi-protéique contenant des protéines de choc thermique comme Hsp90 et Hsp70 (Jiang et al., 2003). Dans ce complexe, la liaison Hsp-ER- α permet une augmentation de l'affinité de l'ER- α avec son ligand ce qui favorise la croissance tumorale hormone-dépendante. De manière intéressante, une analyse rétrospective d'un essai clinique a démontré que seuls les patients avec un cancer du sein ER- α négatif bénéficiaient du traitement par paclitaxel (Dougherty et al., 2004). Plusieurs études ont aussi démontré que SNCG intervient dans les voies de signalisation de survie. Par exemple, la surexpression de SNCG dans les cellules cancéreuses induit une activation d'ERK1/2 (*extracellular signal-regulated protein kinases 1/2*) et une diminution de JNK1 (*c-Jun N-terminal kinase 1*), favorisant la survie cellulaire et inhibant l'apoptose à la suite des traitements de drogues antimitotiques, de l'irradiation UV et du choc thermique (Pan et al., 2002). Plus récemment, une étude a montré que l'expression de SNCG dans les cellules cancéreuses mammaires protège la fonctionnalité d'AKT et restaure la voie mTOR rendant les cellules tumorales résistantes au traitement (Liang et al., 2014). L'ensemble de ces résultats démontre qu'une expression aberrante de SNCG dans

Introduction bibliographique

les cellules cancéreuses mammaires joue un rôle important dans la résistance au paclitaxel via différents mécanismes.

Une étude récente a suggéré une implication potentielle de SNCG dans la résistance à l'irradiation. En analysant des données cliniques des patientes atteintes de cancer du sein et ayant subi une mastectomie suivie par une radiothérapie post-opératoire, les auteurs ont montré que seules les patientes dont les tumeurs n'exprimaient pas SNCG ont bénéficié de la radiothérapie (Min et al., 2016). Ceci suggère fortement le rôle de SNCG comme facteur prédictif de mauvaise réponse à la radiothérapie mais n'a jamais été démontré expérimentalement. Au laboratoire, nous avons observé une association entre l'expression de s-SHIP et celle de SNCG dans un contexte de cellules résistantes à différentes drogues et à l'irradiation. Nous nous sommes donc intéressés à déterminer si l'expression de SNCG dans des cellules cancéreuses mammaires augmentait leur résistance à l'irradiation, comme dans le cas de la résistance au paclitaxel. (Voir paragraphe 2)

Projet de recherche et résultats

Les CSC jouent un rôle clé dans la croissance tumorale, dans sa résistance potentielle aux traitements ainsi que lors des rechutes. Elles constituent ainsi des cibles prioritaires pour mettre sur pied des traitements plus efficaces. C'est pour cela qu'il nous faut apprendre à les identifier, à comprendre comment elles se renouvellent, se différencient, et résistent aux traitements. Cependant est exposé dans la littérature la complexité et la multiplicité des CSC mammaires. Il n'existe pas une population de CSC mammaire mais différentes ce qui implique non pas un marqueur unique mais des marqueurs divers. C'est pourquoi qu'il faut varier les approches expérimentales avec des marqueurs complémentaires notamment avec des marqueurs originaux non testé à ce jour comme s-SHIP.

Mon objectif de thèse est d'utiliser s-SHIP comme un marqueur de CSC mammaire afin de les isoler puis de les caractérisés avec différents tests fonctionnels. De façon à les analyser et mettre en évidence des mécanismes moléculaires impliqués dans toutes ses caractéristiques de CSC.

Au laboratoire, nous utilisons l'expression du promoteur du gène s-SHIP comme marqueur de cellules souches. La validité du promoteur s-SHIP comme marqueur de cellules souches normales mammaires ou prostatiques a bien été démontrée (Bai and Rohrschneider, 2010 ; Brocqueville et al., 2016). L'objectif de mon travail de thèse est de déterminer s'il peut aussi être un marqueur de cellules souches cancéreuses (CSC), ceci en combinant deux modèles de souris transgéniques (Tg):

- les souris **Tg 11.5kb-GFP** ou **s-SHIP-GFP** qui représentent un modèle d'étude des cellules souches mammaires et prostatiques ; dans ces souris, le promoteur de s-SHIP contrôle l'expression de la protéine fluorescente GFP, ce qui permet de marquer les cellules exprimant le promoteur, et ainsi de les isoler.
- les souris **Tg C3(1)-Tag** qui sont un modèle de tumorigénèse bien établi, dans lequel des tumeurs mammaires chez la femelle et prostatiques chez le mâle sont induites par l'antigène T du virus SV40. Ces souris récapitulent toutes les étapes de la carcinogénèse observées chez l'homme, aboutissant chez ces animaux à des tumeurs mammaires entre 4-6 mois et prostatiques en 10 mois environ.

En croisant ces 2 modèles de souris transgéniques, nous avons obtenu des souris bi-transgéniques (biTg) qui font l'objet de mon travail de thèse. Quand j'ai commencé ma thèse, l'objectif était d'étudier en parallèle les CSC mammaires et prostatiques puisque nous possédons un modèle murin qui développe des tumeurs dans les deux types d'épithélium

glandulaires. Du fait du temps de latence important pour le développement de tumeurs prostatiques et de bons résultats que j'ai obtenu avec les tumeurs mammaires, nous avons choisi de focaliser ma thèse sur l'étude des tumeurs mammaires uniquement. Dans ce contexte, le premier axe de ma thèse consiste à déterminer la présence de cellules GFP au sein des tumeurs mammaires, et si oui, à isoler ces cellules pour les caractériser. Mes travaux ont permis de mettre en évidence que les cellules tumorales s-SHIP/GFP⁺ possèdent les propriétés de CSC, dont la principale est la capacité de générer une tumeur identique après greffe à une souris receveuse. De plus, nous avons réalisé plusieurs analyses transcriptomiques en comparant les cellules GFP⁻ et GFP⁺ et celles-ci ont surtout révélé l'implication de DLK1, un ligand non canonique de la voie Notch, dans le maintien de la pluripotence. Ce travail sera présenté dans la première partie de cette thèse sous forme du manuscrit qui est en cours de soumission pour publication au journal *Stem Cell Reports*.

Dans la deuxième partie de ma thèse, je présenterais un travail réalisé en parallèle aux études *in vivo* et qui concerne une lignée que j'ai dérivée à partir d'une tumeur obtenue dans les souris biTg. Son analyse a permis de mettre en évidence l'association de s-SHIP avec la chimio et la radiorésistance et a abouti à la démonstration de l'implication de la synucléine gamma dans la radiorésistance. En effet, j'ai dérivé plusieurs lignées cellulaires dénommées MAM (pour mammary) à partir des tumeurs mammaires obtenues dans les souris biTg. Parmi ces lignées, la lignée MAM326 est une lignée de cellules épithéliales cancéreuses avec environ 10 % de cellules GFP⁺. Ces cellules GFP⁺ sont plus résistantes aux drogues et à l'irradiation. L'analyse transcriptomique de cette sous-population de la lignée MAM326 a mis en évidence des gènes potentiellement impliqués dans la résistance à SNCG. En utilisant différentes lignées cellulaires de cancer du sein, nous avons démontré que l'expression ectopique de SNCG induit une radiorésistance tandis que l'inhibition de SNCG par siRNA sensibilise les cellules à l'irradiation. Ce travail a été soumis dans le journal *Oncotarget* et est actuellement en révision.

A. L'expression du promoteur de s-SHIP est un marqueur de cellules souches cancéreuses mammaires

Présentation de l'article I

Dans cette partie il sera fait référence aux figures et tableaux de l'article I

Dans le but de déterminer si l'expression du promoteur de s-SHIP pouvait être un marqueur de CSC mammaires, nous avons établi le modèle de souris biTg C3(1) Tag X s-SHIP-GFP dans lequel les souris femelles développent des tumeurs mammaires, en suivant les étapes décrites pour le modèle C3(1) Tag. Ainsi nous avons décidé de travailler sur les stades avancés du développement tumoral (à partir de 4 mois) afin d'obtenir des tumeurs de taille suffisante pour obtenir un nombre important de cellules tumorales pour nos études *in vitro* et *in vivo*. Nous avons isolé et caractérisé les cellules s-SHIP/GFP⁺ à partir de ces tumeurs mammaires. Pour cela, nous avons analysé l'expression de certains marqueurs de surface utilisés dans l'isolement de CSC mammaires (CD29, CD49f, Epcam), comparé leur capacité de former des sphères *in vitro* et tumorigénicité *in vivo* aux cellules GFP⁻, déterminé les capacités de radiorésistance des cellules GFP⁺. Nous avons également réalisé plusieurs analyses transcriptomiques des cellules tumorales GFP⁺ vs GFP⁻ afin de mettre en évidence des gènes d'intérêt dans le contexte souche des cellules GFP⁺.

- **Des cellules s-SHIP/GFP⁺ sont présentes dans les tumeurs mammaires des souris biTg et elles expriment des marqueurs de surface caractéristique des CSC mammaires**

Les deux lignées de souris transgéniques (Tg) ont été croisées pour obtenir des souris biTg 11.5 kb-GFP x C3(1)-Tag. Nous avons observé des carcinomes mammaires (à 4-5 mois) confirmant les résultats présentés dans la littérature pour les souris C3(1)-Tag (Figure 1A). Dans ces tumeurs, il existe de rares cellules GFP⁺ qui représentent 1,03% ± 0,64% (n=10 tumeurs différentes) des cellules totales (Figure 1B). Le marquage en immunofluorescence montre que les cellules GFP⁺ expriment le marqueur de cellules basales K14 (Figure 1B). Après digestion enzymatique ménagée de la tumeur, et analyse par cytométrie en flux, nos résultats montrent que les cellules GFP⁺ sont négatives pour les marqueurs de lignage (CD31/CD45/Ter119) et

CD24⁺CD29⁺CD49f⁺, un phénotype décrit précédemment pour les CSC mammaires murines (Figure 1C-D) (Figure S1C).

- **Les cellules tumorales s-SHIP/GFP⁺ ont un potentiel de formation de sphères *in vitro* et un potentiel tumorigène plus élevé que celui des cellules GFP-négatives**

Les cellules GFP⁺ isolées par cytométrie en flux (FACS) ont été analysées pour les caractéristiques fonctionnelles des CSC. Les cellules GFP⁺ possèdent une capacité de formation de « tumor-sphères » beaucoup plus élevée (>10 fois) comparée aux cellules GFP⁻ de la même tumeur (Figure 2A). Pour déterminer si les cellules GFP⁺ étaient capables de s'autorenouveler au sein des sphères générées, les sphères primaires ont été dissociées et ré-ensemencées dans les mêmes conditions. Nous avons observé que les sphères dérivées de cellules GFP⁺ sont capables de s'auto-renouveler sur au moins quatre générations (Figure 2B). Il est à noter que des cellules GFP⁺ persistent au sein des sphères au cours des différents passages (Figure S3A).

Après injection en voie sous-cutanée dans le flanc de souris immunodéprimées SCID (Figure 3A) et de souris immunocompétentes de souche FVB (Figure S3B), on observe la formation de tumeurs en 6 à 8 semaines. L'examen de ces tumeurs secondaires par cytométrie en flux et immunohistologie montre que l'hétérogénéité de la tumeur d'origine est bien reproduite et que l'on retrouve aussi une sous-population de cellules GFP⁺ qui reste rare. Un résultat important est que ces cellules tumorales GFP⁺ « secondaires » conservent un potentiel tumorigène plus élevé par rapport au reste de la tumeur (Table 3B).

- **Etude du rôle de DLK1 dans la régulation de propriétés souches *in vitro***

Afin de comparer l'expression génique entre les cellules GFP⁺ et les cellules GFP⁻, nous avons réalisé une analyse transcriptomique en collaboration avec la plateforme de Génomique de l'Université de Lille 2. L'ARN total des cellules tumorales triées Lin⁻ CD49f⁺ GFP⁻ et Lin⁻ CD49f⁺ GFP⁺ a été extrait à partir de tumeurs mammaires de 4 souris biTg différentes, et analysé par microarray sur puce à ADN Agilent 44K. Une liste de gènes différentiellement exprimés entre ces deux populations a été obtenue (Figure 4A-B) ; parmi ceux-ci, le gène DLK1 (delta like non-canonical Notch ligand 1) présente une diminution d'expression significative (Fc=4,5) dans les cellules GFP⁺. Ce résultat a été confirmé par RT-qPCR (Figure 4C). Dans la littérature, il a été montré que DLK pourrait agir comme un inhibiteur de la voie Notch *in vitro*

(Baladrón et al., 2005; Nueda et al., 2007, 2017). Etant donné le rôle important de la voie Notch dans la régulation des cellules souches, nous avons émis l'hypothèse que la diminution de DLK1, régulateur négatif de la voie Notch pourrait favoriser le phénotype « souche » des cellules tumorales mammaires. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons diminué l'expression de DLK1 par ARN interférence ; ainsi les cellules tumorales Lin⁻CD49f⁺GFP⁻ ont été triées par FACS et transfectées avec 3 ARN interférants spécifique de DLK1 (siDLK1) ou bien un ARN interférant contrôle non spécifique (siScramble) (Figure 4D). Puis les cellules transfectées ont été mises en culture en suspension pour tester leur potentiel de formation de sphères. Le résultat obtenu montre que l'inhibition de DLK1 dans les cellules GFP⁻ a permis une augmentation significative de leur potentiel sphere-forming par rapport aux cellules contrôles traitées avec le siScramble (Figure 4E).

- **Radiorésistance des cellules s-SHIP/GFP⁺ (données non présentées dans l'article I)**

La capacité à résister aux traitements de chimio- ou de radio-thérapies est une propriété fondamentale des CSC. Nous avons choisi de focaliser notre étude sur la radiorésistance car la mise au point des traitements par différentes chimiothérapies prendrait trop de temps pour le faire dans le cadre de ma thèse. Irradier les tumeurs mammaires primaires des souris biTg est difficile à réaliser sans entrainer des effets secondaires. C'est pour cela que nous avons choisi de comparer la radiorésistance de la sous-population de cellules GFP⁺ aux autres cellules au sein des tumeurs secondaires générées dans des souris receveuses SCID. 1000 cellules GFP⁺ triées à partir des tumeurs bi-Tg ont été injectées au niveau de la cuisse de souris SCID, ce qui permet d'éviter le reste du corps de la souris lors de l'irradiation. Une fois que la tumeur atteignait de taille suffisante (entre 5 et 10 mm de diamètre), les animaux étant irradiés sur une période de 5 jours sur une seule des tumeurs par 5 fois 3 Gy. Après 3 jours de repos, les tumeurs étaient prélevées et analysées par cytométrie en flux pour déterminer le pourcentage de cellules GFP⁺ (Figure 24). Si comme attendu, les cellules sont plus résistantes pour des CSC, leur proportion devrait augmenter dans les tumeurs traitées. Ces expériences ont été faites en collaboration avec la plateforme "Modèles Animaux" du SIRIC ONCOLille. Nous avons réalisé deux expériences différentes. Après irradiation, nous avons bien observé une diminution de la taille des tumeurs mais nous n'avons pas observé une augmentation significative du pourcentage de cellules GFP⁺ après irradiation (Figure 25). Ce résultat est difficilement interprétable car nous avons observé une variabilité très importante entre les tumeurs quant aux

pourcentages de cellules GFP⁺ : au sein d'un même groupe de tumeurs secondaires (irradiées ou non irradiées) on peut observer jusqu'à 15% de cellules GFP⁺ tandis dans certaines tumeurs le pourcentage est inférieur à 0,1%. Sur la base de cette expérience, je proposerais de tester plutôt la chimiorésistance directement dans les souris biTg avec de grands effectifs ; si les cellules GFP⁺ sont plus résistantes, on devrait observer une augmentation du pourcentage de cellules GFP⁺.

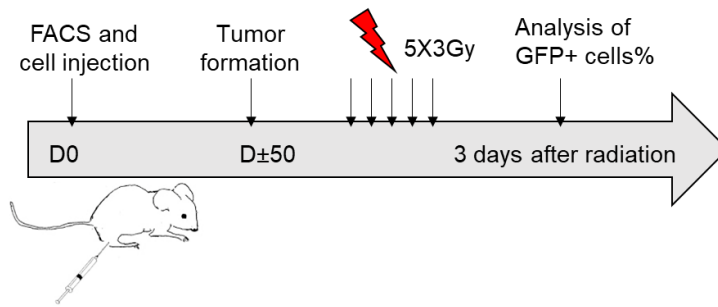


Figure 24. Le protocole expérimental pour tester la radiorésistance des cellules GFP⁺.

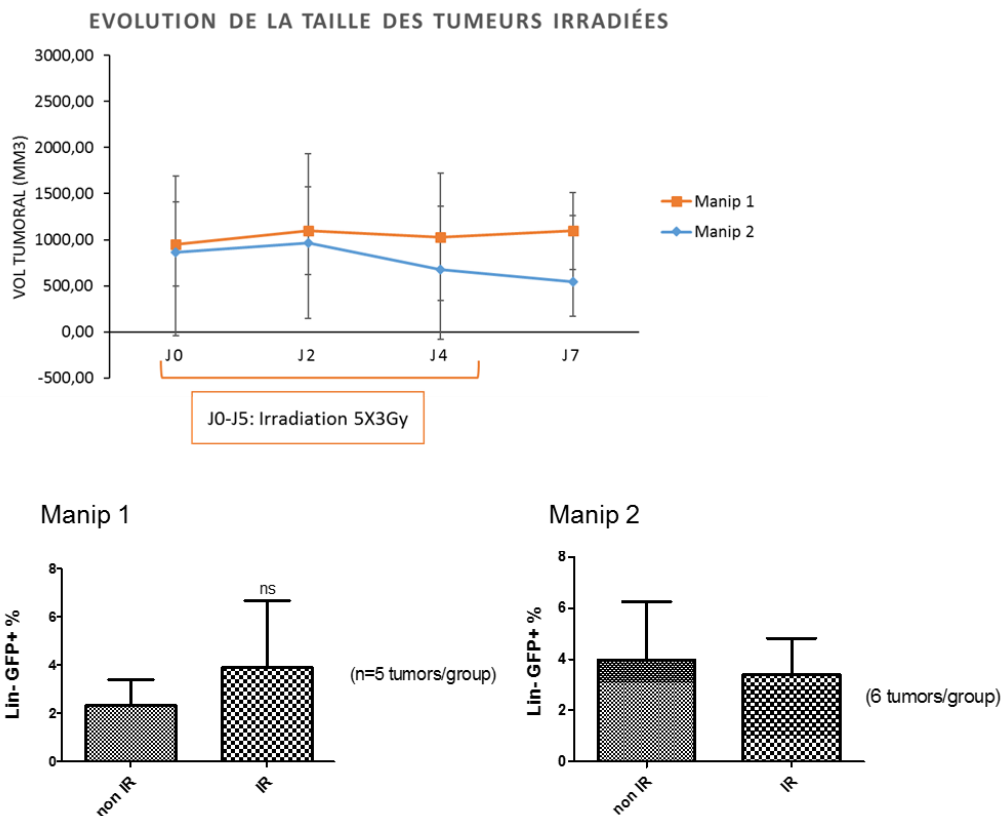


Figure 25. Analyse de pourcentage de cellules GFP⁺ dans les tumeurs après irradiation.

Les tumeurs ont été prélevées chez les souris irradiées (IR) et non irradiées (non IR) 3 jours après la dernière dose d'irradiation. Après digestion enzymatique et marquage avec différents anticorps, les suspensions cellulaires IR et non IR ont été analysées par cytométrie en flux le même jour. Le graphique du haut indique l'évolution de la taille des tumeurs irradiées. Celle du bas indique le pourcentage de cellules GFP⁺ dans les tumeurs irradiées et non irradiée

Article I

s-SHIP promoter expression identifies a putative cancer stem cell population in C3(1)/Tag murine mammary tumors

s-SHIP promoter expression identifies a putative cancer stem cell population in C3(1)/Tag murine mammary tumors

Lu Tian¹, Chann Lagadec², Eric Adriaenssens², Emmanuel Bouchaert³, H  l  ne Bauderlique-Le Roy⁴, Marie-Jos   Truong¹, Martin Figeac⁵, Xuefen LeBourhis², Roland P. Bourette¹

¹ University of Lille, CNRS, Institut Pasteur de Lille, UMR 8161-M3T-Mechanisms of Tumorigenesis and Targeted Therapies, SIRIC ONCOLille, F-59000 Lille, France

² University of Lille, Inserm U908 Cell Plasticity & Cancer, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France.

³ Oncovet-Clinical-Research (OCR), SIRIC ONCOLille, Parc Eurasant  , Loos, France.

⁴ Plateforme BICeL, Institut Pasteur de Lille, Lille, France

⁵ Functional and Structural Genomic Platform, Universit   de Lille, Lille, France.

* To whom correspondence may be addressed. E-mail: roland.bourette@ibl.cnrs.fr

Correspondence to:

Roland Bourette, Ph.D.

CNRS UMR8161, Institut de Biologie de Lille,

1 rue du Professeur Calmette, BP 447, 59021 Lille Cedex, France

phone: (33) 3 20 87 12 96 / Fax: (33) 3 20 87 10 19

E-mail: roland.bourette@ibl.cnrs.fr

Summary

Breast cancer is the most common cancer in women worldwide. The isolation and characterization of breast cancer stem cells (CSC) are crucial for understanding cancer biology and revealing potential therapeutic targets. One of the major issues in the study of CSC is the lack of reliable markers. We generated a bi-transgenic mouse model by crossing the C3(1)/SV40 T-antigen transgenic mouse model of breast cancer, and the Tg11.5kb-GFP transgenic mouse model where s-SHIP promoter specifically expressed GFP in embryonic and various tissue stem cells. Here we show that in mammary tumors of these bi-transgenic mice, s-SHIP promoter expression enriches a mammary CSC population showing higher self-renewal capacity *in vitro* and *in vivo*. Transcriptomic analysis revealed the implication of DLK1 in the regulation of sphere-forming potential *in vitro*. Our results demonstrate that s-SHIP promoter expression enable mammary cancer stem cells and unveil a role for Dlk1 as a negative regulator of the stemness of mammary CSC.

Introduction

Breast cancer is one of the leading causes of cancer-related death in women worldwide. It is a highly complex disease marked by genetic and clinical heterogeneity (Simpson et al., 2005). Breast cancer is broadly classified on the basis of clinical characteristics such as tumor size and grade, lymph node status, expression of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2). However, gene expression microarray studies have identified distinct molecular tumor classes that can better reflect the complex genetic alterations and the biological events occurred during tumor development (Network, 2012). Among these molecular subtypes, the basal-like subtype is characterized by an aggressive clinical outcome, high rate of distant metastases, bad prognosis and relatively high mortality (Banerjee et al., 2006). Unlike other subtypes, there is no targeted therapy available and although chemotherapy is often initially beneficial, many basal-like tumors have a high risk of relapse (Voduc et al., 2010).

Evidence for the existence of cancer stem cells (CSC) or tumor-initiating cells (TIC), was initially described in acute myeloid leukemia (Bonnet and Dick, 1997; Lapidot et al., 1994) and later emerged in solid tumors including breast cancer (Al-Hajj et al., 2003; Ginestier et al., 2007). Like their normal counterpart, the CSC are defined as a limited subpopulation of cancer cells with extensive self-renewal potential and have the ability to recreate the heterogeneity of the original tumor (Clarke et al., 2006). Strong evidence has suggested that they are responsible

for the recurrence, metastasis, and drug resistance of high-grade tumors (Peitzsch et al., 2017). A better understanding of breast cancer stem cells (BCSC) might, therefore, provide prognostic information for relapse and metastasis and lead to the development of new therapy for basal-like breast cancer.

To this end, we turned to mouse models since the study of cancer stem cells in humans is limited by the difficulty to obtain a renewable source of cells from primary patient biopsies. Genetically engineered mouse models (GEMM) have been extremely important in helping to elucidate the mechanisms of pathogenesis of human diseases including cancer. Numerous GEMM of breast cancer have been developed and characterized (Borowsky, 2011; Menezes et al., 2014). We used C3(1)/SV40 T-antigen transgenic mouse model (Tg C3(1)/Tag mice) which expresses SV40 T antigen under the regulatory control of the rat prostatic steroid binding protein C3(1) gene. In female mice, the transgene is expressed primarily in the mammary gland. Mice develop mammary hyperplasia by 3 months of age with subsequent development of mammary adenocarcinoma by 6 months of age (Maroulakou et al., 1994). Moreover, Using a cross-species genomics approach, it is shown that the vast majority (~ 90%) of C3(1)/Tag mammary tumors displayed characteristics of human basal-like breast cancer, making them a pertinent model for the study of basal-like tumors (Herschkowitz et al., 2007; Pfefferle et al., 2013).

The successful isolation of highly pure CSC population is crucial for the in-depth study of their biology and involvement in cancer. Different groups have identified CSC subpopulations in transgenic mouse models of mammary carcinogenesis using combinations cell surface markers, such as $\text{Lin}^- \text{CD29}^{\text{hi}} \text{CD24}^{\text{hi}}$ (Zhang et al., 2008), $\text{Thy1}^+ \text{CD24}^+$ (Cho et al., 2008), $\text{CD29}^{\text{hi}} \text{CD24}^{\text{med}}$ (Shafee et al., 2008), CD61 (Vaillant et al., 2008). However, most of the sorting schemes require multiparameter fluorescence-activated cell sorting (FACS), yield sometimes rather heterogeneous cell populations, and are unclear in their biological meaning (Medema, 2013). Due to the general lack of unique cell-surface markers, in particular, markers that allow in situ stem cell identification, the development of new markers to prospectively identify putative CSC is of the utmost importance for exploring their dynamics, function, and regulation. Stem cell-specific expression of s-SHIP (stem-SH2-containing 5'-Inositol Phosphatase) was initially identified in embryonic and hematopoietic stem cells (Tu et al., 2001). A transgenic mouse model (Tg 11.5kb-GFP or s-SHIP-GFP) was generated using the 11.5kb s-SHIP promoter that specifically expressed enhanced green fluorescent protein (GFP) in several stem cell populations during embryonic development, including the skin epidermis, hair follicles, mammary gland, and prostate (Rohrschneider et al., 2005). In the postnatal mammary gland,

previous experiments showed that s-SHIP/GFP labels puberty cap cells and pregnancy basal alveolar bud cells, and it has been demonstrated that these mammary GFP⁺ cells are activated tissue stem cells (Bai and Rohrschneider, 2010). We have also shown s-SHIP/GFP expressing prostatic epithelial cells represent a subset of neonatal basal epithelial cell population with stem cell properties (Brocqueville et al., 2016).

In the present study, we investigated the role of s-SHIP promoter expression as a marker of mammary cancer stem cells. We generated a bi-transgenic mouse model by crossing Tg 11.5kb-GFP mice with Tg C3(1)/Tag mice. We showed the presence of a rare population of GFP⁺ cells in mammary tumors of female bi-transgenic mice. The GFP⁺ mammary cancer cells are CD24⁺/CD49f⁺/CD29⁺ and are enriched for mammary sphere-forming activity *in vitro*, and can regenerate generated heterogeneous tumors that displayed properties similar to the primary tumor upon subsequent transplantation. Transcriptome analysis of GFP⁺ cells revealed the implication of DLK1 in the maintenance of stemness *in vitro*. These results demonstrate that s-SHIP promoter expression offers a valuable marker of for the isolation and characterization of mammary cancer stem cells.

Results

s-SHIP X C3(1) Tag bi-transgenic mice develop mammary tumors containing a rare s-SHIP/GFP subpopulation

In order to determine if s-SHIP promoter expression could also mark mammary cancer stem cells, we generated a bi-transgenic mouse model by crossing homozygous Tg 11.5kb-GFP mice with hemizygous Tg C3(1)/Tag mice. Mice genotyping was assessed by the presence of SV40 T antigen cDNA (data not shown). As expected, progressive mammary gland lesions were observed in female mice that carried the T Ag-containing transgene, from ductal hyperplasia to adenocarcinoma as shown by H&E staining (Figure 1A) (Figure S1A). All female mice developed multiple mammary tumors by 4-5 months of age. Moreover, the tumor development is not strictly time-dependent because tumor sizes are heterogeneous within the same mouse (data not shown). In these tumors, a rare population of GFP⁺ cells was detected by immunofluorescence on frozen sections (Figure 1B upper panel) and by flow cytometry after enzymatic digestion of tumors (Figure 1C). We observed a variation in the percentage of GFP⁺ cells (1.03% ± 0.64%, n=10) which is a reflection of heterogeneous GFP expression in different mice. Furthermore, our results indicated that the majority of GFP⁺ cells are negative for lineage

markers (Lin^+GFP^+ cells represent about $0.08\% \pm 0.08\%$ of total population, $n=5$). These results indicate that the 11.5-kb s-SHIP promoter drives GFP expression specifically in subpopulation of mammary tumor cells in the s-SHIP X C3(1) Tag bi-transgenic mice. To examine whether GFP^+ cells express s-SHIP, qRT-PCR was performed on sorted GFP^+ and GFP^- cells from three independent tumors. The results demonstrate that the s-SHIP promoter-driven GFP expression correlates with the endogenous s-SHIP mRNA expression (Figure S1B).

We then characterized these GFP^+ cells in more detail using cytokeratin 8 (K8) as a luminal marker and cytokeratin 14 (K14) and smooth muscle actin (SMA) as basal/myoepithelial markers. Four tumors from different bi-transgenic mice were studied. Very few tumor express K8 while all tumors displayed expression of K14. Tumor cells also showed a relatively low level of SMA. Coexpression of GFP and K14 was detected in some tumor cells (Figure 1B lower panel). We next examined the expression of surface markers historically associated with stem/progenitor cells in mammary gland. Previous studies using flow cytometry to isolate mouse mammary stem cells have shown the vast majority of these cells have a $\text{CD49}^{\text{hi}}\text{CD29}^{\text{hi}}\text{CD24}^+\text{Sca1}^-$ cell surface marker phenotype (Shackleton et al., 2006; Shehata et al., 2012; Sleeman et al., 2005; Stingl et al., 2006). For flow cytometry analysis, independent tumors were dissociated to single cell suspensions and stained for CD24, CD29, CD49f, and Epcam cell surface markers. Tumors displayed distinct FACS profiles showing heterogeneous expression for different markers but with an enrichment for $\text{CD24}^+\text{CD29}^+$ and $\text{CD24}^+\text{Epcam}^+$ cell subsets (Figure 1D) (Figure S1C). Interestingly, the vast majority of GFP^+ cells are located in $\text{Lin}^-\text{CD24}^+$ cell subset, and expressed CD29, CD49f, and Epcam cell surface markers. Moreover, GFP^+ showed a higher expression of CD24 and CD49f as compared to total tumor cells (Figure 1D) (Figure S1C).

s-SHIP/GFP⁺ tumor cells are enriched for sphere-forming and tumorigenic cells

To further characterize the GFP^+ cells, we used the integrin $\alpha 6/\text{CD49f}$ to separate GFP^+ epithelial cells ($\text{CD49f}^{\text{high}}$) from the few GFP^+ vascular smooth muscle cells ($\text{CD49f}^{\text{low}}$) as previously reported (Bai et Rohrschneider, 2010) (Figure S2A). To investigate the frequency of tumor-initiating cells in different sub-populations, cells were isolated by FACS and either cultured under serum-free suspension conditions to form tumor spheres, or subcutaneously injected into SCID mice. Since the majority of GFP^+ cells are located in the Lin^- compartment, we decided to compare four sorted cell populations: $\text{CD49f}^+\text{GFP}^+$ versus $\text{CD49f}^+\text{GFP}^-$, and $\text{Lin}^-\text{CD49f}^+\text{GFP}^+$ versus $\text{Lin}^-\text{CD49f}^+\text{GFP}^-$ (Figure S2B). Interestingly both populations of GFP^+ cells showed a higher sphere-forming potential (up to 20 fold higher) as compared to their

respective control GFP⁻ cell populations in seven independent tumors. The spheres derived from GFP⁺ cells were larger (Figure 2A). Self-renewal is a unique property of stem cells that distinguish them from committed or differentiated cells. To examine self-renewal property of GFP⁺ cells *in vitro*, primary spheres were dissociated into single cell suspensions and cells were plated in the same condition as for primary spheres. Secondary spheres derived from GFP⁺ subgroups as determined from three independent tumors were larger in size and more numerous as compared to secondary sphere derived from GFP⁻ subgroups (Figure 2B). Spheres initially derived from GFP⁺ cell subsets can be maintained through at least 4 passages (data not shown). Interestingly, we observed few GFP⁺ cells in the spheres at all passages (Figure S3A).

We next performed serial transplantation studies to evaluate tumorigenicity of GFP⁺ cells vs GFP⁻ cells and to determine whether GFP⁺ cells were able to self-renewal *in vivo* and recapitulate the heterogeneity found in the original tumors. When injected subcutaneously near the upper nipple lines of immunodeficient SCID mice, GFP⁺ cells displayed significantly higher tumorigenic potential as compared to GFP⁻ cells (Figure 3A). The calculated TIC frequency in the CD49⁺GFP⁻ cell population was of 1 in 2001 tumor cells whereas it was of 1 in 209 in the CD49⁺GFP⁺ cell population. Similar results were observed with Lin⁻ cells. Several studies showed that C3(1)/Tag mammary tumor cells and tumor-derived cell lines cannot be transplanted into wild-type FVB/N mice since they are rejected likely due to the expression of the SV40 viral T antigen (Aprelikova et al., 2016). However, we have successfully transplanted primary tumor cells into syngenic FVB mice but with a significantly lower engraftment rate as well as longer tumor formation period compared to SCID mice (one to three months). Nevertheless, Lin⁻GFP⁺CD49^{f+} cells were capable of generating more tumors in FVB mice than Lin⁻GFP⁻CD49^{f+} cells (Figure S3B). Flow cytometry analysis of secondary tumors generated by Lin⁻GFP⁺ cells injected into SCID mice showed that they contained different populations that were phenotypically similar to those of the original tumor (Figure 3B). Secondary transplantation experiments showed that both GFP⁺ and GFP⁻ cells from secondary tumors had tumor-forming capacities similar to those of the primary tumors. Moreover, GFP⁺ cells showed again a higher tumorigenic potential in secondary injections (Figure 3C). The calculated TIC frequency in the CD49⁺GFP⁻ cell population was of 1 in tumor cells whereas it was of 1 in in the CD49⁺GFP⁺ cell population. Both in primary and secondary cell injection, we observed a higher tumorigenic potential for Lin⁻CD49^{f+}GFP⁻ cells as compared to total CD49^{f+}GFP⁻ cells (Figure 3). This difference after lineage-positive cell depletion was not observed with CD49^{f+}GFP⁺ cells. This could be explained by the presence of Lineage positive cells that

diminished the frequency of epithelial tumor initiating cells but also may indicate a negative effect of these Lin⁺ cells on tumorigenicity. .

Microarray analysis revealed DLK1 as a regulator of stemness of GFP⁺ cells

To identify molecular differences between GFP⁺ and GFP⁻ cells, we decided to isolate Lin⁻CD49⁺GFP⁺ cells and Lin⁻CD49⁺GFP⁻ cells to generate probes for mouse microarrays (Agilent Technologies) (Figure 4A). For this analysis, subpopulations from four different tumors were collected by FACS, and total RNA was isolated from each of the subpopulations. The results showed that Lin⁻CD49⁺GFP⁺ and Lin⁻CD49⁺GFP⁻ subpopulations shared similar gene expression pattern (data not shown). This could be due to the highly homogeneous phenotype of C3 (1) Tag mammary tumors that mimic the human basal-like breast cancer (Herschkowitz et al., 2007; Pfefferle et al., 2013). Thus, both subpopulations were located in the basal compartment, which may explain their close gene expression profile. Nevertheless, microarray analysis revealed several genes whose expression differs significantly between the two subpopulations. We were particularly interested in the Delta-like 1 homolog (DLK1) gene that is significantly downregulated in Lin⁻CD49⁺GFP⁺ cells (fold change of 4.5): (Figure 4B). DLK1 is a single-spanning transmembrane protein in the epidermal growth factor (EGF)-like family, which includes NOTCH receptors and their ligands (Tanimizu et al., 2003). DLK1 is as a noncanonical Notch ligand, and has been shown to act as an inhibitor of Notch signaling *in vitro* (Baladrón et al., 2005; Nueda et al., 2007, 2017). We hypothesized that repression of DLK1 in Lin⁻CD49⁺GFP⁺ cells might favor their CSC phenotype. Difference in DLK1 expression between Lin⁻CD49⁺GFP⁻ and Lin⁻CD49⁺GFP⁺ subpopulations was first confirmed by qRT-PCR using total RNA isolated from four different tumors (Figure 4C). Similarly to microarray result, we observed a fold-change of 11 +/- 8. We thus performed mammary sphere assays using siDLK1 transfected Lin⁻CD49⁺GFP⁻ cells to determine their self-renewal potential *in vitro*. Lin⁻CD49⁺GFP⁻ cell subpopulation was transfected with siDLK1 or siScramble (siScr) and a down-regulation of DLK1 expression of about 70% was obtained (Figure 4D). Transfected cells were then cultured in serum-free tumor sphere medium under nonadherent conditions for 7 to 10 days. We observed a significant increase of the sphere-forming potential of siDLK1-treated cells, (1.2 % +/- 0.9%) as compared to siScr-treated cells (0.4 % +/- 0.4%) (Figure 4E). This result strongly suggested that Dlk1 played a role in the CSC phenotype of the mammary tumor cells of our biTg mice.

Discussion

Markers or tracking labels are frequently used for the identification of stem cells from both normal and cancerous tissues. For example, in mammary gland, cell surface markers like CD24 or CD29 or enzyme activity like ALDH have been used (Ginestier et al, 2007; Zhang et al., 2008). Using a transgenic mouse model expressing GFP from the stem-cell specific promoter, normal mouse stem cells have been identified in embryonic development (Rohrschneider et al., 2005), in postnatal mammary gland (Bai and Rohrschneider, 2010) and in neonatal prostate tissues (Brocqueville et al., 2016). We have also shown that s-SHIP-GFP promoter reporter tracks subset of human prostate RWPE-1 cells enriched in stem cell characteristics (Bauderlique-Le Roy et al., 2015). A previous study showed that s-SHIP/GFP expression has been detected in MMTV-Wnt1 mammary tumors (Bai and Rohrschneider, 2010), yet its usefulness in isolating mammary cancer stem cells remains to be determined. Interestingly, high s-SHIP expression was associated with murine claudin-low mammary tumors which are described as enriched for CSC signature (Herschkowitz et al., 2012). In this study, we used biTg 11.5-GFP X C(3)1 Tag mice to demonstrate that s-SHIP promoter expression enriched for a mammary CSC population. s-SHIP/GFP⁺ cancer cells showed a higher sphere-forming potential *in vitro* (Figure 2) and a higher tumorigenicity when transplanted into SCID and FVB recipient mice (Figure 3A) (Figure S3B). The few tumors that grew in the GFP⁻ fraction could have been due to the inability to eliminate GFP⁺ cells by cell sorting. Alternatively, there could have been a small population of tumor-initiating cells that did not express s-SHIP-GFP since both GFP⁻ and GFP⁺ cells are in the CD49f⁺ compartment. Moreover, upon subsequent transplantation, the GFP⁺ cells generated heterogeneous tumors that displayed properties similar to the primary tumor (Figure 3B). Our results indicated that s-SHIP/GFP⁺ cells do not express mature hematopoietic lineage markers (CD31/CD45/Ter119) and are enriched for surface markers that have been previously used in the isolation of mouse mammary stem cells such as CD24, CD29, CD49f and Epcam (Figure S1C) (Oakes et al., 2014; Visvader and Stingl, 2014). Altogether these results demonstrated that s-SHIP/GFP expression could be used as a consistent single parameter for the isolation of a mouse mammary CSC population.

The C3(1)Tag mammary tumors were associated with human basal-like breast cancer (Herschkowitz et al., 2007; Pfefferle et al., 2013). Bai and Rohrschneider have shown the presence of s-SHIP/GFP⁺ cells in Wnt1-induced mammary tumors but not in erb2-induced mammary tumors (Bai & Rohrschneider, 2010). Interestingly, Wnt1-induced mammary tumors consist of both luminal and myoepithelial cells (Li et al., 2003; Liu et al., 2004; Shackleton et

al., 2006) whereas ErbB2-induced tumors contain primarily luminal cells (Li et al., 2003; Stingl and Caldas, 2007). Since we have successfully detected s-SHIP/GFP⁺ cells in the C3(1)Tag tumors, this suggests that s-SHIP promoter expression may be restricted to basal cancer cells.

s-SHIP protein is a shorter isoform of SHIP1 (SH2-containing Inositol 5'-Phosphatase) protein that lacks the SH2 domain in its N-terminal region (Kavanaugh et al., 1996; Tu et al., 2001). While SHIP1 is predominantly expressed in hematopoietic tissues (Geier et al., 1997), s-SHIP was described for its specific expression in embryonic stem cells and primitive hematopoietic stem cells, but not in their more mature progeny (Despots et al., 2006; Tu et al., 2001). Subsequent studies have demonstrated the value of s-SHIP promoter in the isolation and analysis of activated mammary stem cells both at puberty and at early pregnancy (Bai and Rohrschneider, 2010; Huo and Macara, 2014; Kogata et al., 2013; Roarty et al., 2015). Yet the physiological role of s-SHIP protein remains unknown. Its ubiquitous homolog SHIP2 is crucial for maintaining the ER-negative breast cancer stem cells through activation of Akt and JNK (Fu et al., 2014). The SHIP specific inhibitor (SHIPi) (Brooks et al., 2015; Fuhler et al., 2011) or siRNA specific to s-SHIP should offer a valuable opportunity to address the function of s-SHIP in breast cancer stem cells and its role as a potential drug target.

We performed transcriptome analysis to compare the gene expression profile between Lin-CD49⁺ GFP⁺ and Lin-CD49⁺ GFP⁻ cells (Figure 4A). Several genes were differentially expressed including MUC1 whose overexpression has been associated with mammary gland tumorigenesis (Schroeder et al., 2004) and breast cancer stem cells (Engelmann et al., 2008). But the significant decrease of DLK1 in GFP⁺ cells has addressed our attention since this protein acts as a non-canonical ligand of the Notch signaling pathway which members have been implicated in maintenance of stem cell pool within mammary tumors (D'Souza et al., 2010; Boyle et al., 2017). DLK1 is expressed at a high frequency in various human tumors including breast carcinoma (Yanai et al., 2010). However, the role of DLK1 in cancer is not clear. It has been reported that DLK1 overexpression in gliomas promoted cell growth and migration, and hypoxia-induced DLK1 enhances the stemness and tumorigenicity of neuronal tumor cells (Kim et al., 2009). On the contrary, others suggest that DLK1 functions as a tumor suppressor since its overexpression markedly induced anoikis in DLK1-null renal cell carcinoma (RCC) cell lines and suppressed tumor growth in nude mice (Kawakami et al., 2006). Its soluble form has been shown to exert antitumor effect in human pancreatic cancer MIA PaCa-2 cells *in vitro* and *in vivo* (Lee et al., 2016). Several studies have demonstrated that DLK1 can act as an inhibitor of Notch signaling *in vitro* (Baladrón et al., 2005; Nueda et al., 2007, 2017). Notch

signaling is critical for stem cell function during development and participates in the survival and self-renewal of CSC (Pannuti et al., 2010). We then investigated the role of DLK1 in the regulation of self-renewal by down-regulating its expression in GFP⁺ cells (Figure 4D). We showed that the inhibition of DLK1 resulted in a significant increase of sphere-forming potential *in vitro* (Figure 4E). More experiments are now needed to determine the relationship between the inhibition of DLK1 and the regulation of breast cancer stem cells.

Increasing evidence now support the importance of CSC in the therapy resistance and recurrence of cancer. Thus, targeting CSC could be particularly interesting for efficient eradication of cancer cells (Reya et al., 2001). One limit of the strategy is that normal stem cells and CSC share many common characterizes including surface markers and signaling pathway thus altering mechanisms involved in CSC maintenance would probably affect the normal stem cells function. Therefore, elucidating molecular mechanisms that are specific to CSC can help developing therapeutic strategies with fewer side effects. Our bi-transgenic mice provide a unique opportunity for the study of normal and mammary cancer stem cells with a single marker in the same model and the investigation of potential therapeutic targets for breast cancer.

Experimental procedures

Mouse strains and genotyping

Mice were maintained in accordance with European, National regulations. All animal protocols were reviewed and approved by the Animal Protocol Review Committees of the Institut Pasteur de Lille (Lille, France). Tg11.5kb-GFP mice and TgC3(1) Tag mice have been previously described (rohrschneider et al 2005; Maroulakou et al., 1994). For genotyping of bi-transgenic mice, tail clips were digested in lysis buffer (KAPA Biosystems). Samples were diluted 1:10 and employed for PCR reactions to amplify Tag cDNA using the appropriate set of primers . Products of the amplification were analyzed by agarose gel electrophoresis.

Histology

Mammary tumors were fixed in 4% formaldehyde (ThermoFisher) at 4°C overnight, dehydrated in ethanol, and cleared in toluene. Dehydrated tumors were embedded in paraffin

and cut into 4µm sections. Tissue sections were dewaxed, rehydrated and stained with Hematoxylin and Eosin (Sigma). After staining, tissue sections were dehydrated and mounted with Eukitt® Quick-hardening mounting medium (Sigma). Images were acquired using bright field microscopy (Nikon).

Isolation of mammary tumor cells

Tumors were harvested from 4 to 6-month-old female bi-transgenic mice and minced using razor blades and digested using Mouse Tumor Dissociation Kit (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions. After digestion, cells were filtered through 40µm cell strainers and washed once with washing buffer (DMEM medium) (Gibco). Then, cells were suspended in Red Blood Cell Lysis Solution (Miltenyi Biotec) in order to eliminate red blood cells. Cells were washed with PBS buffer (no Tris buffer and protein free), and cells were suspended in diluted Zombie Violet® solution (1/100, Zombie Violet™ Fixable Viability Kit, BioLegend) and incubated at room temperature, in the dark, for 30minutes. Cells were washed once with complete medium (DMEM medium supplemented with 10% of bovine fetal serum (FBS) and 1X ZellShiled® (Minerva Biolabs). Then, cells were resuspended in complete medium before labeling with antibodies.

Flow cytometry, antibodies, and cell sorting

Single cells were preincubated with rat anti-mouse CD16/CD32 (mouse BD Fc block) antibody (1:50; BD Pharmingen) for 10 min at 4°C, stained with antibodies for 30 min at 4°C with agitation, washed and resuspended in complete medium before analysis. Antibodies used are as follows: APC rat anti-human/mouse CD49f (1:100; eBioscience), PE-Cy7 rat anti-mouse CD24 (1:100; Biolegend), APC Armenian hamster anti-mouse CD29 (1:100; eBioscience), Alexa Fluor 647 rat anti-mouse CD326 (1/100 BioLegend); and lineage markers PE rat anti-mouse CD31 (1:100; eBioscience), PE rat anti-mouse CD45 (1:100; BD Pharmingen), PE rat anti-mouse TER-119 (1:100; eBioscience). The stained specimens were then analyzed or sorted using FACSAria flow cytometer (BD Biosciences). Selection criteria that included side scatter and forward scatter profiles, depletion of zombie violet-positive cells and depletion of Lin-positive cells were used. Cells with appropriate GFP and CD49f status were then collected. After sorting, cells were washed with PBS and counted with trypan blue to exclude dead cells and determine cell numbers.

Tumor injection

SCID and FVB/NJ female mice (4–8 weeks of age) were sedated via inhalation of isoflurane (Baxter SAS, France). Sorted cells were suspended in 50µl of PBS, which was then mixed with 50µl of Growth Factor Reduced Matrigel (354230; BD Biosciences). The cell mixture was then injected subcutaneously into the flank of the mice using a 29G x 12.7 mm needle. Mice were observed weekly for 1–7 months for tumor formation. All tumorigenic cell frequencies were calculated using ELDA: Extreme Limiting Dilution Analysis (Hu, Y, and Smyth, GK 2009).

Tumorsphere formation

Single cell suspensions were plated at 2.5×10^4 cells/ml in serum-free DMEM/F12 medium, supplemented with 2% B27 (Invitrogen), 20 ng/ml FGF (Invitrogen), 20 ng/ml EGF, 4 µg/ml heparin (Sigma-Aldrich), 5 µg/ml insulin and 0.5µg/ml hydrocortisone (mam-medium) for 7-14 days on 96-well ultra-low attachment plate (Corning). Cells were fed every three days, and passaged using Trypsin/EDTA (Lonza). Numbers and sizes of the mammospheres were determined by phase contrast microscopy and fluorescence microscopy was used to detect GFP.

qRT-PCR analyses

Total RNA was extracted with the RNeasy Micro Kit (Qiagen). The reverse-transcription was performed using gene-specific primers with the QuantiTect Rev. Transcription kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Diluted cDNAs were transferred to 96-well PCR optical plates (Axygen). KAPA SYBR FAST qPCR kit (KAPA Biosystems) was used. qRT-PCR was performed using the Agilent Mx3000P detection system (Agilent Technologies). Relative mRNA levels were determined following normalization to the housekeeping genes ACTIN, HPRT, Rpl38, and analysis of the comparative threshold cycle ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) method. Primer sequences were as follows: s-SHIP forward, 5'-GTTCCCACTAGTTGTTGAACTTTACCTT-3'; s-SHIP reverse, 5'-CAACGTCCACTTTGAGATGCAT-3'; GFP forward, 5'-AAGGCTACGTCCAGGAGCGCA -3'; GFP reverse, 5'-TGCCGTCCTCGATGTTGTGGC -3'; ACTIN forward, 5'-GATCTGGCACCACCTTCT -3'; ACTIN reverse, 5'-GGGGTGTGAAGGTCTCAA -3'; HPRT forward, 5'-GAGAGCGTTGGGCTTACCTC -3'; HPRT reverse, 5'-ATCGCTAATCACGACGCTGG -3'; RPL38 forward, 5'-GGTTCTCATCGCTGTGCGG -3'; RPL38 reverse, 5'-TGACAGACTTGGCATCCTTCC -3'.

Immunofluorescence and antibodies

Tumors were fixed in 4% paraformaldehyde overnight and put into 30% sucrose overnight, embedded in O.C.T., frozen on dry ice, and cut into 5-mm sections. Tissue sections were permeabilized with 0.5% Triton X-100, blocked with 5% FBS, and then incubated sequentially with primary antibodies overnight at 4°C, and with secondary antibodies for 45 min at room temperature. Slides were washed three times with PBS after each antibody incubation, and sections were mounted in Prolong Gold (Invitrogen). Primary antibodies used for this study were Alexa Fluor 488-conjugated rabbit anti-GFP (1:800; Invitrogen), Alexa Fluor 594 phalloidin (1:100; MolecularProbes), mouse monoclonal Cy3-conjugated anti- α -SMA (1:400; Sigma), rabbit anti-mouse K14 (1:500; Covance), rabbit anti-mouse K5 (1:500; Covance), mouse anti-mouse K8 (1:500; Covance), rabbit polyclonal anti-Ki67 (1:1000; Abcam), rat anti-E-cad (1:1000; ThermoFisher). Fluorochrome-conjugated secondary antibodies included Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rat IgG, and Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-mouse IgG (all 1:1000; Molecular Probes). Sections were counterstained with DAPI (1 mg/mL; Sigma). Pictures were taken on an AxioImager Z1 Apotome (Carl Zeiss MicroImaging, Inc.)

Microarray analysis

Total RNA were prepared using the RNeasy micro-kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France) according to manufacturer's instructions, including the additional step of DNase treatment]. Total RNA yield and quality were further assessed on a NanoDrop ND-1000 and an Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Massy, France). One color whole Mouse (074809 slides) 60-mer oligonucleotides 8x60k microarrays (Agilent Technologies) were used to analyze gene expression. cRNA labeling, hybridization, and detection were carried out according to supplier's instructions (Agilent Technologies). For each microarray, Cyanine 3-labeled cRNA were synthesized with the low input QuickAmp labeling kit from 20ng of total RNA. RNA Spike-In were added to all tubes and used as positive controls of labeling and amplification steps. The labeled cRNA were purified and 600ng of each cRNA were then hybridized and washed following manufacturer's instructions. Microarrays were scanned and data extracted using Agilent Feature Extraction Software© (FE version 10.7.3.1). Statistical comparisons and filtering were achieved with the Genespring® software version GX14.5. (Agilent Technologies). After a 75 percentile normalization of raw data, non-expressed probes in all conditions were removed, followed by a paired t-test with a p-value cut-off at 0.01 and a fold change cut off at +/-2. Further investigations were carried out using Ingenuity Pathway Analysis© Software (Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com, Redwood City, CA, USA).

siRNA transfection

For knockdown analysis, dissociated and FACS-sorted Lin-GFP- cells from the bi-transgenic tumors (60,000/ well) were suspended into 24-well ultra-low attachment plates, and were transfected with ON-TARGET plus Non-targeting Pool as empty control and ON-TARGET plus Dlk1 siRNA (Dharmacon) respectively, by using Lipofectamin 2000 (Life Technology) for 30min in a final volume of 1 mL serum-free mammosphere medium. The transfected cells were then collected and washed once with mammospheres medium in order to remove transfection reagent and siRNA. Cells were counted and suspended in mammospheres medium (2000 / well) into 96-well ultra-low attachment plates. The sphere-forming potential was analyzed 7 days after culture. Downregulation of DLK1 mRNA was verified by RT-PCR 48h after transfection.

Statistical test

Data are expressed as mean values \pm standard deviation (s.d.) of at least 3 independent experiments. The statistical analysis was done by using Two-way ANOVA or Student's t-test with GraphPad Prism5 and p value < 0.05 was considered significant. For in vivo tumor-initiating potential, the results were analyzed by Extreme Limiting Dilution Analysis (ELDA) (Hu, Y, et Smyth, GK 2009).

Acknowledgments

We hereby thanks Shéhérazade Sebda for micro-arrays hybridization and Frédéric Leprêtre for GEO repository Assistance, both from the plateau de génomique fonctionnelle et structurale, Univ. Lille, CHRU-Lille.

Conflicts of interest

The authors declare no competing or financial interests that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Funding

This study was supported by CNRS and grants from the SIRIC ONCOLille (INCa-DGOS-Inserm 6041), and the Ligue Contre le Cancer (comité du Nord et comité du Pas de Calais). L.T was supported by fellowships from the Région Hauts-de-France and the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer.

Figure legends

Figure 1. s-SHIP/GFP expression is detected in the mammary tumors of s-SHIP X C3 (1) Tag bi-transgenic mice. (A) H&E staining of paraffin-embed sections of mammary tumors illustrating different stages of tumor development: a. ductal hyperplasia (scale bar = 50 μ m); b. ductal carcinoma in situ (scale bar = 50 μ m); c. infiltrative solid carcinoma (scale bar = 100 μ m); d. solid carcinoma (scale bar = 50 μ m). (B) Representative images (n=4) of immunostaining of phalloidin and K14 on frozen sections mammary tumors. scale bar, 50 μ m. (C) Representative flow cytometry analysis (n=5) of GFP expressed by dissociated mammary cancer cells isolated from a 5-month-old bi-transgenic mouse. (D) Representative flow cytometry analysis (n=3) of total Lin⁻ cells and Lin⁻GFP⁺ cells from tumors T1 and T2 were analyses for expression of different cell surface markers CD24, CD29, CD49f, and Epcam.

Figure 2. s-SHIP/GFP⁺ cells have a higher *in vitro* self-renewal capacity. (A) Primary mammospheres from CD49f⁺GFP⁺, CD49f⁺GFP⁻, Lin⁻CD49f⁺GFP⁻ and Lin⁻CD49f⁺GFP⁺ cells sorted from bi-Tg mammary tumors were seeded by limited dilution and grown in suspension for 7 to 10 days. Data represent the mean \pm SEM. of seven independent experiments, *p* values was determined by Two-way ANOVA test ****p* < 0.001, ***p* < 0.01, **p* < 0.05. Representative pictures were taken from primary spheres of the sorted populations. (B) GFP⁺ or GFP⁻ sphere-derived cells were dissociated and replated at 200 cells per well in triplicate for secondary mammospheres formation. Data represent mean values \pm SEM. of three different experiments, *p* values were determined by Student's test **p* < 0.05. Representative pictures were taken after 7 to 10 days of culture.

Figure 3. s-SHIP/GFP⁺ cells are enriched for tumor-initiating potential *in vivo* and generate tumors that mimic the parental tumors. (A) Cells from at least four primary tumors were freshly digested and FACS sorted into four subpopulations. For cell sorting, an anti-CD49f was added to eliminate the smooth muscle cells (SMA) of blood vessels which are also green fluorescent. After FACS sorting, cells were washed with PBS and counted with trypan blue to exclude dead cells. Different subpopulations were then transplanted subcutaneously (s.c.) in 8-wk-old immunodeficient SCID female mice. Mice were monitored until tumors were observed or up to 7 months if no tumors were detected. Tumor-initiating cell frequency was generated by ELDA. (B) Subpopulation-derived tumors (secondary tumors) were excised for FACS

analysis of CD24, CD29, CD49f and Epcam expression between diameter(s) of 1 to 1.5 cm. Representative flow cytometry analysis of a primary tumor (parental) and its respective resulting tumors (secondary 1 and 2) from Lin⁻CD49f⁺GFP⁺ fraction. (C) Cells from at least four secondary tumors generated by Lin⁻CD49f⁺GFP⁺ fraction were freshly digested and FACS sorted into four subpopulations and injected in SCID mice as described before. Tumor-initiating cell frequency was generated by ELDA.

Figure 4. Gene expression analysis of Lin⁻CD49f⁺GFP⁻ versus Lin⁻CD49f⁺GFP⁺ cells reveals the role of DLK1 in the regulation of stemness *in vitro*. (A and B) Fifteen genes were selected from the master list of genes differentially regulated (at least two-fold with a *p* value < 0.05). For the heatmap, each column represents a probe; each row represents various subpopulation from biological replicates. The red color indicates high-level expression while blue indicates a low level of expression. (C) Real-time quantitative RT-qPCR confirm the downregulation of DLK expression in Lin⁻CD49f⁺GFP⁺ cells. Data represent means with SEM from four different tumors (T1 to 4). (D and E) Inhibition of DLK1 expression in Lin⁻CD49f⁺GFP⁻ cells with siRNA reduce their sphere-forming potential. siDLK1 or control siScramble (siScr) were introduced into the dissociated Lin⁻CD49f⁺GFP⁻ cells after being FACS-sorted from bi-Tg mammary tumors. (D) 48h after transfection, the level of DLK1 was determined by qPCR. Data represent mean values ± SEM. of four different experiments, *p* values were determined by Student's test ***p*<0.01. (E) siScr or siDLK transfected Lin⁻CD49f⁺GFP⁻ cells were plated under mammospheres conditions and spheres were counted after 7 to 10 days in culture. Data represent mean values ± SEM. of four different experiments, *p* values were determined by Student's test ****p*<0.001.

References

- Ahmad, M., Attoub, S., Singh, M.N., Martin, F.L., and El-Agnaf, O.M.A. (2007). γ -Synuclein and the progression of cancer. *FASEB J.* *21*, 3419–3430.
- 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.* *100*, 3983–3988.
- Aprelikova, O., Tomlinson, C.C., Hoenerhoff, M., Hixon, J.A., Durum, S.K., Qiu, T., He, S., Burkett, S., Liu, Z.-Y., Swanson, S.M., et al. (2016). Development and Preclinical Application of an Immunocompetent Transplant Model of Basal Breast Cancer with Lung, Liver and Brain Metastases. *PLoS ONE* *11*.
- Bae, S.H., Jang, W.I., and Park, H.C. (2017). Intensity-modulated radiotherapy for hepatocellular carcinoma: dosimetric and clinical results. *Oncotarget* *8*, 59965–59976.
- Bai, L., and Rohrschneider, L.R. (2010). s-SHIP promoter expression marks activated stem cells in developing mouse mammary tissue. *Genes Dev.* *24*, 1882–1892.
- Baladrón, V., Ruiz-Hidalgo, M.J., Nueda, M.L., Díaz-Guerra, M.J.M., García-Ramírez, J.J., Bonvini, E., Gubina, E., and Laborda, J. (2005). dlk acts as a negative regulator of Notch1 activation through interactions with specific EGF-like repeats. *Exp. Cell Res.* *303*, 343–359.
- Banerjee, S., Reis-Filho, J.S., Ashley, S., Steele, D., Ashworth, A., Lakhani, S.R., and Smith, I.E. (2006). Basal-like breast carcinomas: clinical outcome and response to chemotherapy. *J. Clin. Pathol.* *59*, 729–735.
- Bauderlique-Le Roy, H., Vennin, C., Brocqueville, G., Spruyt, N., Adriaenssens, E., and Bourette, R.P. (2015). Enrichment of Human Stem-Like Prostate Cells with s-SHIP Promoter Activity Uncovers a Role in Stemness for the Long Noncoding RNA H19. *Stem Cells Dev.* *24*, 1252–1262.
- Bendjennat, M., Boulaire, J., Jascur, T., Brickner, H., Barbier, V., Sarasin, A., Fotedar, A., and Fotedar, R. (2003). UV Irradiation Triggers Ubiquitin-Dependent Degradation of p21WAF1 to Promote DNA Repair. *Cell* *114*, 599–610.
- Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* *3*, 730.
- Borowsky, A.D. (2011). Choosing a Mouse Model: Experimental Biology in Context—The Utility and Limitations of Mouse Models of Breast Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*.
- Brocqueville, G., Chmelar, R.S., Bauderlique-Le Roy, H., Deruy, E., Tian, L., Vessella, R.L., Greenberg, N.M., Rohrschneider, L.R., and Bourette, R.P. (2016). s-SHIP expression identifies a subset of murine basal prostate cells as neonatal stem cells. *Oncotarget* *7*, 29228–29244.
- Brooks, R., Iyer, S., Akada, H., Neelam, S., Russo, C.M., Chisholm, J.D., and Kerr, W.G. (2015). Coordinate Expansion of Murine Hematopoietic and Mesenchymal Stem Cell

Compartments by SHIPi: Chemical Expansion of HSC and Their Niche. *STEM CELLS* 33, 848–858.

Bruening, W., Giasson, B.I., Klein-Szanto, A.J.P., Lee, V.M.-Y., Trojanowski, J.Q., and Godwin, A.K. (2000). Synucleins are expressed in the majority of breast and ovarian carcinomas and in preneoplastic lesions of the ovary. *Cancer* 88, 2154–2163.

Cazzalini, O., Scovassi, A.I., Savio, M., Stivala, L.A., and Prosperi, E. (2010). Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21CDKN1A in the DNA damage response. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 704, 12–20.

Chavez, K.J., Garimella, S.V., and Lipkowitz, S. (2010). Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Breast Dis.* 32, 35–48.

Chen, J., Jiao, L., Xu, C., Yu, Y., Zhang, Z., Chang, Z., Deng, Z., and Sun, Y. (2012). Neural protein gamma-synuclein interacting with androgen receptor promotes human prostate cancer progression. *BMC Cancer* 12, 593.

Cho, R.W., Wang, X., Diehn, M., Shedden, K., Chen, G.Y., Sherlock, G., Gurney, A., Lewicki, J., and Clarke, M.F. (2008). Isolation and Molecular Characterization of Cancer Stem Cells in MMTV-Wnt-1 Murine Breast Tumors. *STEM CELLS* 26, 364–371.

Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H.M., Jones, D.L., Visvader, J., Weissman, I.L., and Wahl, G.M. (2006). Cancer Stem Cells—Perspectives on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells. *Cancer Res.* 66, 9339–9344.

Clayton, D.F., and George, J.M. The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends Neurosci.* 21, 249–254.

Desponts, C., Hazen, A.L., Paraiso, K.H.T., and Kerr, W.G. (2006). SHIP deficiency enhances HSC proliferation and survival but compromises homing and repopulation. *Blood* 107, 4338–4345.

D'SOUZA, B., MELOTY-KAPPELLA, L., and WEINMASTER, G. (2010). Canonical and non-canonical Notch ligands. *Curr. Top. Dev. Biol.* 92, 73–129.

Engelmann, K., Shen, H., and Finn, O.J. (2008). MCF7 Side Population Cells with Characteristics of Cancer Stem/Progenitor Cells Express the Tumor Antigen MUC1. *Cancer Res.* 68, 2419–2426.

Fan, Y., Borowsky, A.D., and Weiss, R.H. (2003). An Antisense Oligodeoxynucleotide to p21Waf1/Cip1 Causes Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. *Mol. Cancer Ther.* 2, 773–782.

Fu, C.-H., Lin, R.-J., Yu, J., Chang, W.-W., Liao, G.-S., Chang, W.-Y., Tseng, L.-M., Tsai, Y.-F., Yu, J.-C., and Yu, A.L. (2014). A Novel Oncogenic Role of Inositol Phosphatase SHIP2 in ER-Negative Breast Cancer Stem Cells: Involvement of JNK/Vimentin Activation. *STEM CELLS* 32, 2048–2060.

Fuhler, G., and Brooks, R. (2012). [No Title]. *Mol. Med.* 18, 1.

Geier, S.J., Algate, P.A., Carlberg, K., Flowers, D., Friedman, C., Trask, B., and Rohrschneider, L.R. (1997). The Human SHIP Gene Is Differentially Expressed in Cell Lineages of the Bone Marrow and Blood. *Blood* 89, 1876–1885.

George, J.M. (2002). The synucleins. *Genome Biol.* 3, reviews3002.1-reviews3002.6.

Ginestier, C., Hur, M.H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Jacquemier, J., Viens, P., Kleer, C.G., Liu, S., et al. (2007). ALDH1 Is a Marker of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome. *Cell Stem Cell* 1, 555–567.

Guo, J., Shou, C., Meng, L., Jiang, B., Dong, B., Yao, L., Xie, Y., Zhang, J., Chen, Y., Budman, D.R., et al. (2007). Neuronal protein synuclein γ predicts poor clinical outcome in breast cancer. *Int. J. Cancer* 121, 1296–1305.

Gupta, A., Inaba, S., Wong, O.K., Fang, G., and Liu, J. (2003). Breast cancer-specific gene 1 interacts with the mitotic checkpoint kinase BubR1. *Oncogene* 22, 7593–7599.

HE, K., and WANG, P. (2015). Unregulated long non-coding RNA-AK058003 promotes the proliferation, invasion and metastasis of breast cancer by regulating the expression levels of the γ -synuclein gene. *Exp. Ther. Med.* 9, 1727–1732.

He, X., Zheng, Y., Zhang, Y., Gan, Y., Zhou, Y., Liang, H., Wu, D., Ge, W., Deng, J., and Xu, X. (2016). Long non-coding RNA AK058003, as a precursor of miR-15a, interacts with HuR to inhibit the expression of γ -synuclein in hepatocellular carcinoma cells. *Oncotarget* 8, 9451–9465.

Herschkowitz, J.I., Simin, K., Weigman, V.J., Mikaelian, I., Usary, J., Hu, Z., Rasmussen, K.E., Jones, L.P., Assefnia, S., Chandrasekharan, S., et al. (2007). Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.* 8, R76.

Herschkowitz, J.I., Zhao, W., Zhang, M., Usary, J., Murrow, G., Edwards, D., Knezevic, J., Greene, S.B., Darr, D., Troester, M.A., et al. (2012). Comparative oncogenomics identifies breast tumors enriched in functional tumor-initiating cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 2778–2783.

Hua, H., Xu, L., Wang, J., Jing, J., Luo, T., and Jiang, Y. (2009). Up-regulation of gamma-synuclein contributes to cancer cell survival under endoplasmic reticulum stress. *J. Pathol.* 217, 507–515.

Hunkele, A., Sultan, H., Ikalina, F.A., Liu, A.H., Nahar-Gohad, P., and Ko, J.L. (2016). Identification of gamma-synuclein as a new PCBP1-interacting protein. *Neurol. Res.* 38, 1064–1078.

Huo, Y., and Macara, I.G. (2014). The Par3-like polarity protein Par3L is essential for mammary stem cell maintenance. *Nat. Cell Biol.* 16, 526–534.

Jia, T., Liu, Y.E., Liu, J., and Shi, Y.E. (1999). Stimulation of Breast Cancer Invasion and Metastasis by Synuclein γ . *Cancer Res.* 59, 742–747.

- Jiang, Y., Liu, Y.E., Lu, A., Gupta, A., Goldberg, I.D., Liu, J., and Shi, Y.E. (2003). Stimulation of Estrogen Receptor Signaling by γ Synuclein. *Cancer Res.* *63*, 3899–3903.
- Kang, S.-M., Kim, M.-H., Song, K.-H., Jung, S.-Y., Ahn, J., Hwang, S.-G., Lee, J.-H., Lim, D.-S., and Song, J.-Y. (2015). Modulation of dendritic cell function by the radiation-mediated secretory protein γ -synuclein. *Cell Death Discov.* *1*, cddiscovery201511.
- Kavanaugh, W.M., Pot, D.A., Chin, S.M., Deuter-Reinhard, M., Jefferson, A.B., Norris, F.A., Masiarz, F.R., Cousens, L.S., Majerus, P.W., and Williams, L.T. (1996). Multiple forms of an inositol polyphosphate 5-phosphatase form signaling complexes with Shc and Grb2. *Curr. Biol.* *6*, 438–445.
- Kawakami, T., Chano, T., Minami, K., Okabe, H., Okada, Y., and Okamoto, K. (2006). Imprinted DLK1 is a putative tumor suppressor gene and inactivated by epimutation at the region upstream of GTL2 in human renal cell carcinoma. *Hum. Mol. Genet.* *15*, 821–830.
- Kim, Y., Lin, Q., Zelterman, D., and Yun, Z. (2009). Hypoxia-Regulated Delta-like 1 Homologue Enhances Cancer Cell Stemness and Tumorigenicity. *Cancer Res.* *69*, 9271–9280.
- Kogata, N., Zvelebil, M., and Howard, B.A. (2013). Neuregulin 3 and erbb signalling networks in embryonic mammary gland development. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* *18*, 149–154.
- Kralj, M., Husnjak, K., Körbler, T., and Pavelić, J. (2003). Endogenous p21^{WAF1/CIP1} status predicts the response of human tumor cells to wild-type p53 and p21^{WAF1/CIP1} overexpression. *Cancer Gene Ther.* *10*, 7700588.
- Lagadec, C., Vlashi, E., Della Donna, L., Dekmezian, C., and Pajonk, F. (2012). Radiation-Induced Reprogramming of Breast Cancer Cells. *STEM CELLS* *30*, 833–844.
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., and Dick, J.E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* *367*, 645.
- Lee, D., Yoon, S.H., Lee, H.J., Jo, K.W., Park, B.-C., Kim, I.S., Choi, Y., Lim, J.C., and Park, Y.W. (2016). Human soluble delta-like 1 homolog exerts antitumor effects in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *475*, 209–215.
- Li, Y., Welm, B., Podsypanina, K., Huang, S., Chamorro, M., Zhang, X., Rowlands, T., Egeblad, M., Cowin, P., Werb, Z., et al. (2003). Evidence that transgenes encoding components of the Wnt signaling pathway preferentially induce mammary cancers from progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 15853–15858.
- Liang, B., Wang, X.-J., Shen, P.-H., Li, X.-Y., Cheng, H.-W., Shan, Q., Guo, K.-Y., Cao, Y.-W., Fan, Q.-X., Zheng, R.-F., et al. (2013). Synuclein- γ suppression mediated by RNA interference inhibits the clonogenicity and invasiveness of MCF-7 cells. *Oncol. Lett.* *5*, 1347–1352.
- Liu, B.Y., McDermott, S.P., Khwaja, S.S., and Alexander, C.M. (2004a). The transforming activity of Wnt effectors correlates with their ability to induce the accumulation of mammary progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 4158–4163.

- Liu, C., Dong, B., Lu, A., Qu, L., Xing, X., Meng, L., Wu, J., Eric Shi, Y., and Shou, C. (2010). Synuclein gamma predicts poor clinical outcome in colon cancer with normal levels of carcinoembryonic antigen. *BMC Cancer* *10*, 359.
- Liu, C., Shi, B., Hao, C., Wang, Q., Lv, Q., Xing, N., Shou, J., Qu, L., Gao, Y., Qin, C., et al. (2016). Urine gamma-synuclein as a biomarker for the diagnosis of bladder cancer. *Oncotarget* *7*, 43432–43441.
- Liu, H., Liu, W., Wu, Y., Zhou, Y., Xue, R., Luo, C., Wang, L., Zhao, W., Jiang, J.-D., and Liu, J. (2005). Loss of Epigenetic Control of Synuclein- γ Gene as a Molecular Indicator of Metastasis in a Wide Range of Human Cancers. *Cancer Res.* *65*, 7635–7643.
- Liu, J., Spence, M.J., Zhang, Y.L., Jiang, Y., Liu, Y.E., and Shi, Y.E. (2000). Transcriptional suppression of synuclein γ (SNCG) expression in human breast cancer cells by the growth inhibitory cytokine oncostatin M. *Breast Cancer Res. Treat.* *62*, 99–107.
- Liu, Z.-M., Chen, G.G., Ng, E.K., Leung, W.-K., Sung, J.J., and Chung, S.S. (2004b). Upregulation of heme oxygenase-1 and p21 confers resistance to apoptosis in human gastric cancer cells. *Oncogene* *23*, 1207173.
- Ma, Z., Niu, J., Sun, E., Rong, X., Zhang, X., and Ju, Y. (2016). Gamma-synuclein binds to AKT and promotes cancer cell survival and proliferation. *Tumor Biol.* *37*, 14999–15005.
- Maroulakou, I.G., Anver, M., Garrett, L., and Green, J.E. (1994). Prostate and mammary adenocarcinoma in transgenic mice carrying a rat C3(1) simian virus 40 large tumor antigen fusion gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 11236–11240.
- Medema, J.P. (2013). Cancer stem cells: The challenges ahead. *Nat. Cell Biol.* *15*, 338–344.
- Mehta, M., Basalingappa, K., Griffith, J.N., Andrade, D., Babu, A., Amreddy, N., Muralidharan, R., Gorospe, M., Herman, T., Ding, W.-Q., et al. (2016). HuR silencing elicits oxidative stress and DNA damage and sensitizes human triple-negative breast cancer cells to radiotherapy. *Oncotarget* *7*, 64820–64835.
- Menezes, M.E., Das, S.K., Emdad, L., Windle, J.J., Wang, X.-Y., Sarkar, D., and Fisher, P.B. (2014). Genetically Engineered Mice as Experimental Tools to Dissect the Critical Events in Breast Cancer. *Adv. Cancer Res.* *121*, 331–382.
- Miao, S., Wu, K., Zhang, B., Weng, Z., Zhu, M., Lu, Y., Krishna, R., and Shi, Y.E. (2014). Synuclein γ Compromises Spindle Assembly Checkpoint and Renders Resistance to Antimicrotubule Drugs. *Mol. Cancer Ther.* *13*, 699–713.
- Min, L., Zhang, C., Ma, R., Li, X., Yuan, H., Li, Y., Chen, R., Liu, C., Guo, J., Qu, L., et al. (2016). Overexpression of synuclein- γ predicts lack of benefit from radiotherapy for breast cancer patients. *BMC Cancer* *16*.
- Mo, M., Xiao, Y., Huang, S., Cen, L., Chen, X., Zhang, L., Luo, Q., Li, S., Yang, X., Lin, X., et al. (2016). MicroRNA expressing profiles in A53T mutant alpha-synuclein transgenic mice and Parkinsonian. *Oncotarget* *8*, 15–28.
- Network, T.C.G.A. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* *490*, 61.

- Neve, R.M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F.L., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, J.-P., Tong, F., et al. (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* *10*, 515–527.
- Nueda, M.-L., Baladrón, V., Sánchez-Solana, B., Ballesteros, M.-Á., and Laborda, J. (2007). The EGF-like Protein dlk1 Inhibits Notch Signaling and Potentiates Adipogenesis of Mesenchymal Cells. *J. Mol. Biol.* *367*, 1281–1293.
- Nueda, M.-L., Naranjo, A.-I., Baladrón, V., and Laborda, J. (2017). Different expression levels of DLK1 inversely modulate the oncogenic potential of human MDA-MB-231 breast cancer cells through inhibition of NOTCH1 signaling. *FASEB J.* *31*, 3484–3496.
- Oakes, S.R., Gallego-Ortega, D., and Ormandy, C.J. (2014). The mammary cellular hierarchy and breast cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* *71*, 4301–4324.
- Pan, Z.-Z., Bruening, W., Giasson, B.I., Lee, V.M.-Y., and Godwin, A.K. (2002). γ -Synuclein Promotes Cancer Cell Survival and Inhibits Stress- and Chemotherapy Drug-induced Apoptosis by Modulating MAPK Pathways. *J. Biol. Chem.* *277*, 35050–35060.
- Pannuti, A., Foreman, K., Rizzo, P., Osipo, C., Golde, T., Osborne, B., and Miele, L. (2010). Targeting Cancer Stem Cells through Notch Signaling. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *16*, 3141–3152.
- Peitzsch, C., Tyutyunnykova, A., Pantel, K., and Dubrovskaya, A. (2017). Cancer stem cells: The root of tumor recurrence and metastases. *Semin. Cancer Biol.* *44*, 10–24.
- Pfefferle, A.D., Herschkowitz, J.I., Usary, J., Harrell, J.C., Spike, B.T., Adams, J.R., Torres-Arzuayus, M.I., Brown, M., Egan, S.E., Wahl, G.M., et al. (2013). Transcriptomic classification of genetically engineered mouse models of breast cancer identifies human subtype counterparts. *Genome Biol.* *14*, R125.
- Prat, A., Adamo, B., Cheang, M.C.U., Anders, C.K., Carey, L.A., and Perou, C.M. (2013). Molecular Characterization of Basal-Like and Non-Basal-Like Triple-Negative Breast Cancer. *The Oncologist* *18*, 123–133.
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* *414*, 105–111.
- Roarty, K., Shore, A.N., Creighton, C.J., and Rosen, J.M. (2015). Ror2 regulates branching, differentiation, and actin-cytoskeletal dynamics within the mammary epithelium. *J Cell Biol* *208*, 351–366.
- Rohrschneider, L.R., Custodio, J.M., Anderson, T.A., Miller, C.P., and Gu, H. (2005). The intron 5/6 promoter region of the ship1 gene regulates expression in stem/progenitor cells of the mouse embryo. *Dev. Biol.* *283*, 503–521.
- Schaal, K., Hirschfeld, M., Bronsert, P., Füllgraf, H., Jäger, M., Herde, B., Nöthling, C., Mayer, S., Erbes, T., and Stickeler, E. (2015). Alternative splicing of synuclein gamma in endometrial cancer: identification of a novel isoform. *Oncotarget* *6*, 22553–22563.

Schroeder, J.A., Masri, A.A., Adriance, M.C., Tessier, J.C., Kotlarczyk, K.L., Thompson, M.C., and Gendler, S.J. (2004). MUC1 overexpression results in mammary gland tumorigenesis and prolonged alveolar differentiation. *Oncogene* 23, 5739–5747.

Shackleton, M., Vaillant, F., Simpson, K.J., Stingl, J., Smyth, G.K., Asselin-Labat, M.-L., Wu, L., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2006). Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 439, 84–88.

Shafee, N., Smith, C.R., Wei, S., Kim, Y., Mills, G.B., Hortobagyi, G.N., Stanbridge, E.J., and Lee, E.Y.-H.P. (2008). Cancer Stem Cells Contribute to Cisplatin Resistance in Brca1/p53–Mediated Mouse Mammary Tumors. *Cancer Res.* 68, 3243–3250.

Shao, Y., Wang, B., Shi, D., Miao, S., Manivel, P., Krishna, R., Chen, Y., and Eric Shi, Y. (2014). Synuclein gamma protects HER2 and renders resistance to Hsp90 disruption. *Mol. Oncol.* 8, 1521–1531.

Shehata, M., Teschendorff, A., Sharp, G., Novcic, N., Russell, I.A., Avril, S., Prater, M., Eirew, P., Caldas, C., Watson, C.J., et al. (2012). Phenotypic and functional characterisation of the luminal cell hierarchy of the mammary gland. *Breast Cancer Res.* 14, R134.

Siddhartha Yerramilli, V., and Scarlata, S. (2016). The breast cancer susceptibility gene product (γ -synuclein) alters cell behavior through its interaction with phospholipase C β . *Cell. Signal.* 28, 91–99.

Simpson, P.T., Reis-Filho, J.S., Gale, T., and Lakhani, S.R. (2005). Molecular evolution of breast cancer. *J. Pathol.* 205, 248–254.

Singh, V.K., Zhou, Y., Marsh, J.A., Uversky, V.N., Forman-Kay, J.D., Liu, J., and Jia, Z. (2007). Synuclein- γ Targeting Peptide Inhibitor that Enhances Sensitivity of Breast Cancer Cells to Antimicrotubule Drugs. *Cancer Res.* 67, 626–633.

Sleeman, K.E., Kendrick, H., Ashworth, A., Isacke, C.M., and Smalley, M.J. (2005). CD24 staining of mouse mammary gland cells defines luminal epithelial, myoepithelial/basal and non-epithelial cells. *Breast Cancer Res.* 8, R7.

Stingl, J., and Caldas, C. (2007). Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nat. Rev. Cancer* 7, 791–799.

Stingl, J., Eirew, P., Ricketson, I., Shackleton, M., Vaillant, F., Choi, D., Li, H.I., and Eaves, C.J. (2006). Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature* 439, 993–997.

Strohl, A., Mori, K., Akers, S., Bshara, W., Buttin, B., Frederick, P.J., Helenowski, I.B., Morrison, C.D., Odunsi, K., Schink, J.C., et al. (2016). Synuclein- γ (SNCG) expression in ovarian cancer is associated with high-risk clinicopathologic disease. *J. Ovarian Res.* 9, 75.

Surguchev, A.A., and Surguchov, A. (2017). Synucleins and Gene Expression: Ramblers in a Crowd or Cops Regulating Traffic? *Front. Mol. Neurosci.* 10.

Surgucheva, I., and Surguchov, A. (2008). γ -Synuclein: Cell-Type-Specific Promoter Activity and Binding to Transcription Factors. *J. Mol. Neurosci.* 35, 267–271.

- Surgucheva, I.G., Sivak, J.M., Elizabeth Fini, M., Palazzo, R.E., and Surguchov, A.P. (2003). Effect of γ -synuclein overexpression on matrix metalloproteinases in retinoblastoma Y79 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* *410*, 167–176.
- Tanimizu, N., Nishikawa, M., Saito, H., Tsujimura, T., and Miyajima, A. (2003). Isolation of hepatoblasts based on the expression of Dlk/Pref-1. *J. Cell Sci.* *116*, 1775–1786.
- Tian, H., Wittmack, E.K., and Jorgensen, T.J. (2000). p21WAF1/CIP1 Antisense Therapy Radiosensitizes Human Colon Cancer by Converting Growth Arrest to Apoptosis. *Cancer Res.* *60*, 679–684.
- Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., and Jemal, A. Global cancer statistics, 2012. *CA. Cancer J. Clin.* *65*, 87–108.
- Tu, Z., Ninos, J.M., Ma, Z., Wang, J.-W., Lemos, M.P., Desponts, C., Ghansah, T., Howson, J.M., and Kerr, W.G. (2001). Embryonic and hematopoietic stem cells express a novel SH2-containing inositol 5'-phosphatase isoform that partners with the Grb2 adapter protein. *Blood* *98*, 2028–2038.
- Vaillant, F., Asselin-Labat, M.-L., Shackleton, M., Forrest, N.C., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2008). The Mammary Progenitor Marker CD61/ β 3 Integrin Identifies Cancer Stem Cells in Mouse Models of Mammary Tumorigenesis. *Cancer Res.* *68*, 7711–7717.
- Visvader, J.E. (2009). Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes Dev.* *23*, 2563–2577.
- Visvader, J.E., and Stingl, J. (2014). Mammary stem cells and the differentiation hierarchy: current status and perspectives. *Genes Dev.* *28*, 1143–1158.
- Voduc, K.D., Cheang, M.C.U., Tyldesley, S., Gelmon, K., Nielsen, T.O., and Kennecke, H. (2010). Breast Cancer Subtypes and the Risk of Local and Regional Relapse. *J. Clin. Oncol.* *28*, 1684–1691.
- Wang, Y., Liu, X., Zhang, H., Sun, L., Zhou, Y., Jin, H., Zhang, H., Zhang, H., Liu, J., Guo, H., et al. (2014). Hypoxia-Inducible lncRNA-AK058003 Promotes Gastric Cancer Metastasis by Targeting γ -Synuclein. *Neoplasia* *16*, 1094–1106.
- Weiss, R.H. (2003). p21Waf1/Cip1 as a therapeutic target in breast and other cancers. *Cancer Cell* *4*, 425–429.
- Wu, K., Weng, Z., Tao, Q., Lin, G., Wu, X., Qian, H., Zhang, Y., Ding, X., Jiang, Y., and Shi, Y.E. (2003). Stage-specific Expression of Breast Cancer-specific Gene γ -Synuclein. *Cancer Epidemiol. Prev. Biomark.* *12*, 920–925.
- Wu, K., Quan, Z., Weng, Z., Li, F., Zhang, Y., Yao, X., Chen, Y., Budman, D., Goldberg, I.D., and Shi, Y.E. (2007). Expression of neuronal protein synuclein gamma gene as a novel marker for breast cancer prognosis. *Breast Cancer Res. Treat.* *101*, 259–267.
- Yanai, H., Nakamura, K., Hijioka, S., Kamei, A., Ikari, T., Ishikawa, Y., Shinozaki, E., Mizunuma, N., Hatake, K., and Miyajima, A. (2010). Dlk-1, a cell surface antigen on foetal hepatic stem/progenitor cells, is expressed in hepatocellular, colon, pancreas and breast carcinomas at a high frequency. *J. Biochem. (Tokyo)* *148*, 85–92.

Zhang, H., Kouadio, A., Cartledge, D., and Godwin, A.K. (2011). Role of Gamma-synuclein in Microtubule Regulation. *Exp. Cell Res.* 317, 1330–1339.

Zhang, M., Behbod, F., Atkinson, R.L., Landis, M.D., Kittrell, F., Edwards, D., Medina, D., Tsimelzon, A., Hilsenbeck, S., Green, J.E., et al. (2008). Identification of Tumor-initiating Cells in a p53 Null Mouse Model of Breast Cancer. *Cancer Res.* 68, 4674–4682.

Zhou, Y., Inaba, S., and Liu, J. (2006). Inhibition of synuclein- γ expression increases the sensitivity of breast cancer cells to paclitaxel treatment. *Int. J. Oncol.* 29, 289–295.

(2000). Favourable and unfavourable effects on long-term survival of radiotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *The Lancet* 355, 1757–1770.

Figure 1

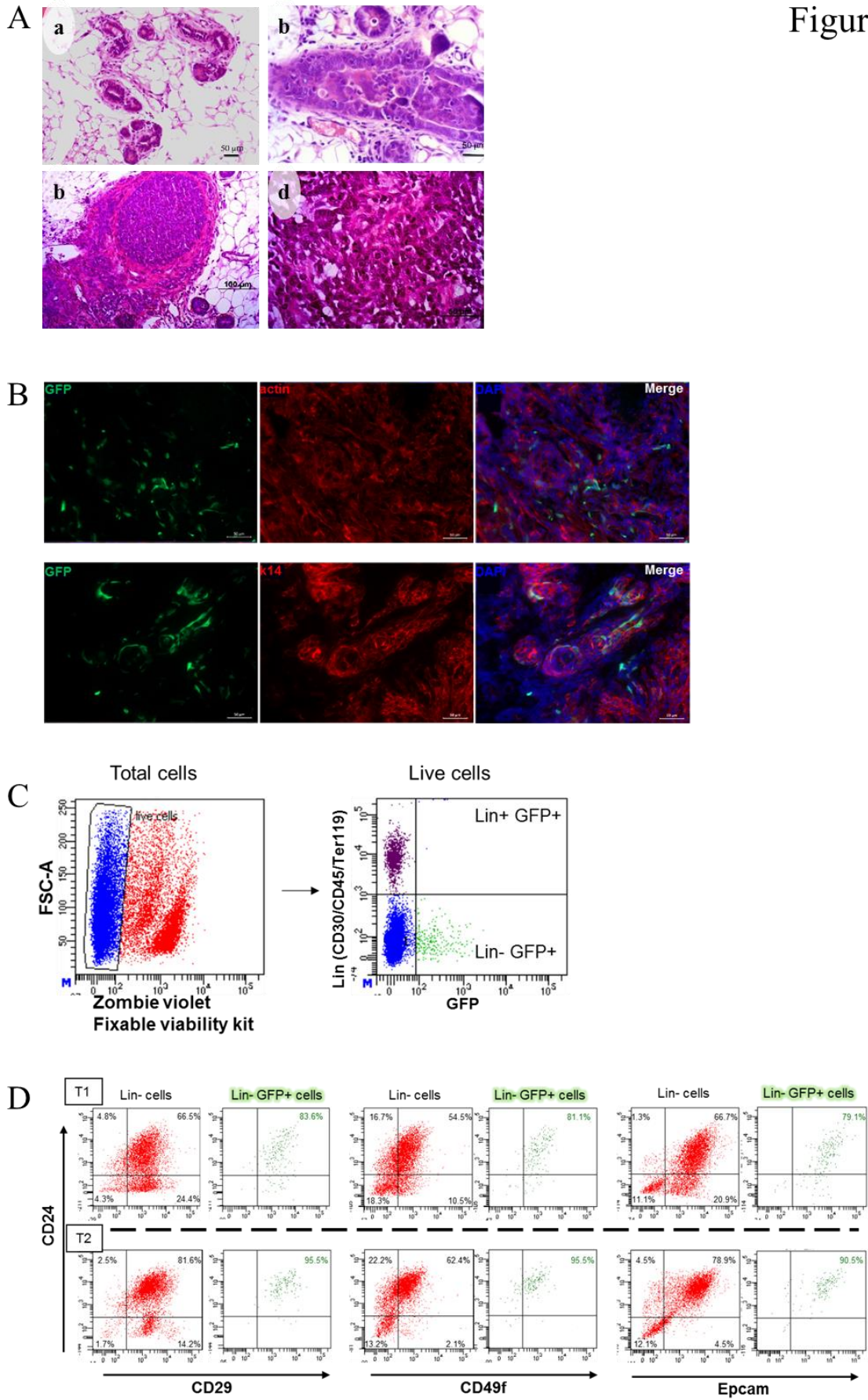


Figure 2

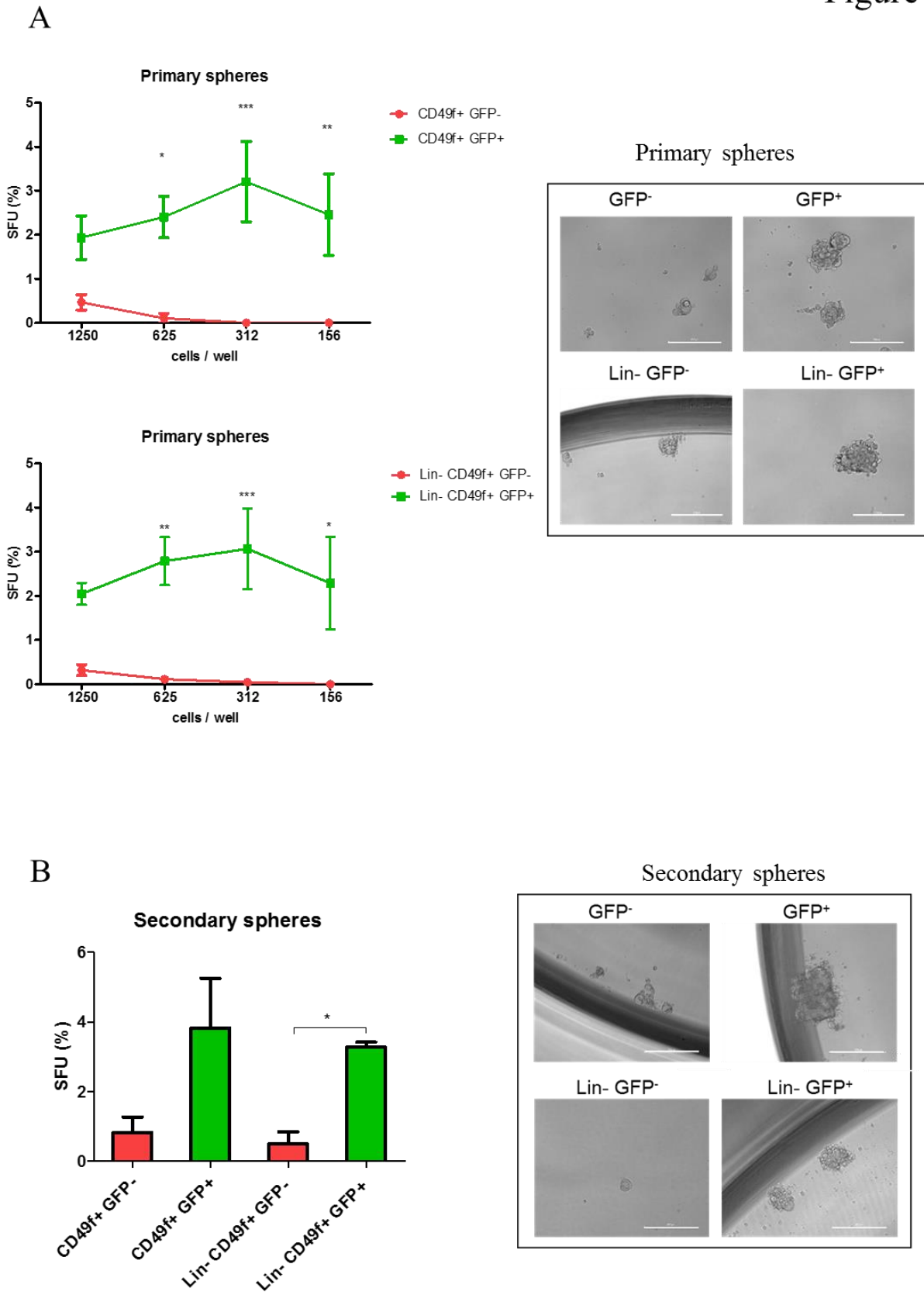


Figure 3

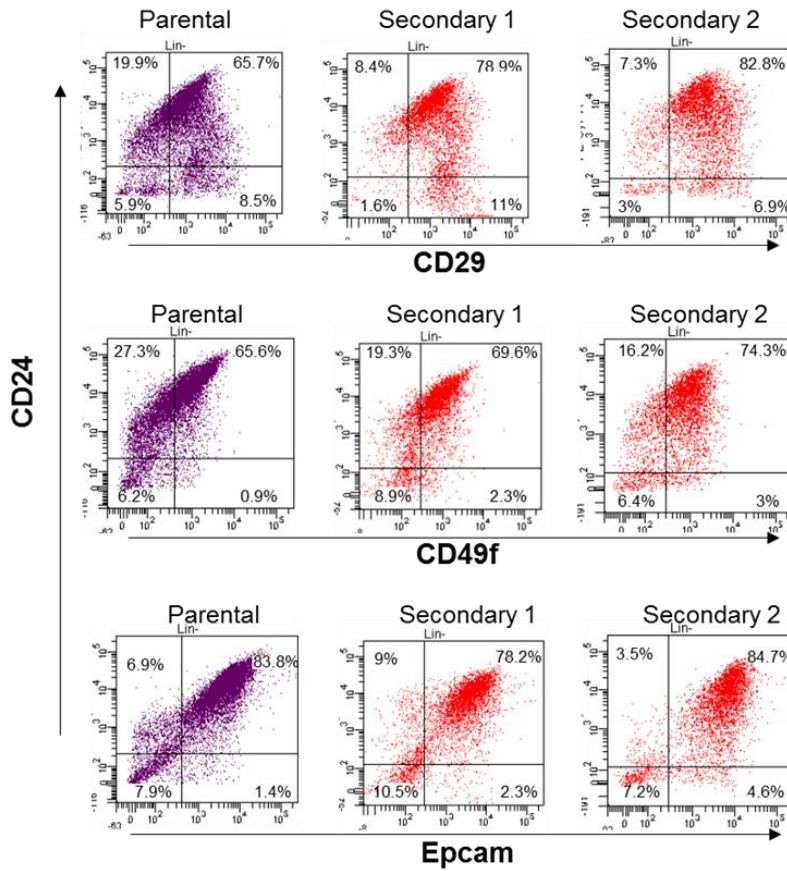
A Primary injection in SCID mice

| | 5000 | 1000 | 500 | 100 | 50 | Tumor initiating cell frequency (95% CI) |
|--|------|------|-----|-------|------|--|
| CD49f ⁺ GFP ⁻ | 5/6 | 2/5 | 2/5 | 1/14 | | 1/2001 (1/4184 - 1/957) |
| CD49f ⁺ GFP ⁺ | 6/6 | 5/5 | 4/5 | 10/14 | | 1/129 (1/249 - 1/67) |
| Lin ⁻ CD49f ⁺ GFP ⁻ | | 5/6 | | 3/22 | 1/17 | 1/638 (1/1257 - 1/324) |
| Lin ⁻ CD49f ⁺ GFP ⁺ | | 6/6 | | 10/22 | 9/17 | 1/118 (1/188 - 1/74) |

(P = 2.25e-09)

(P = 2.65e-05)

B



C Secondary injection in SCID mice

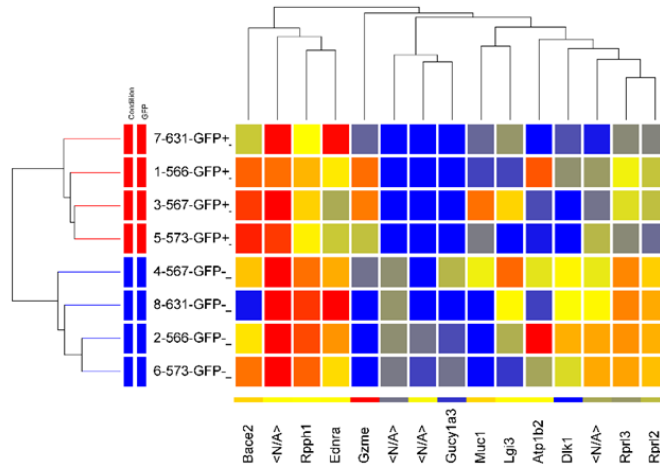
| | 3000 | 1000 | 100 | 50 | Tumor initiating cell frequency (95% CI) |
|--|-------|------|-------|-------|--|
| CD49f ⁺ GFP ⁻ | 6/10 | 0/10 | 0/8 | | 1/5155 (1/11326 - 1/2347) |
| CD49f ⁺ GFP ⁺ | 10/10 | 8/10 | 2/8 | | 1/541 (1/1042 - 1/281) |
| Lin ⁻ CD49f ⁺ GFP ⁻ | | 4/4 | 6/11 | 2/11 | 1/157 (1/311 - 1/80) |
| Lin ⁻ CD49f ⁺ GFP ⁺ | | 4/4 | 11/11 | 10/11 | 1/20 (1/40 - 1/10) |

(P = 2.69e-06)

(P = 5.32e-06)

Figure 4

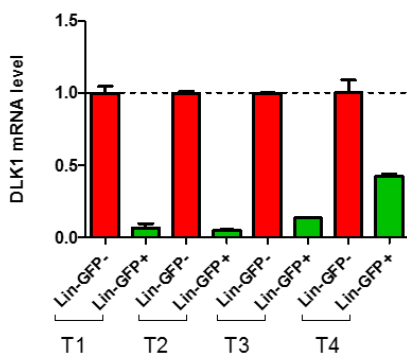
A



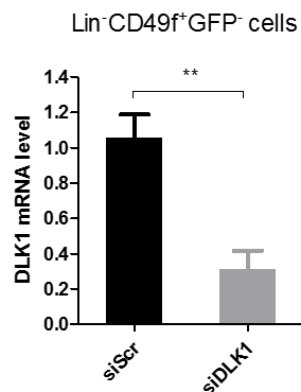
B

| GeneSymbol | Description | p | Regulation | FC (abs) |
|------------|---|------------|------------|-----------|
| Gzme | granzyme E | 0,00991789 | up | 29,83715 |
| Dlk1 | delta-like 1 homolog (Drosophila) | 0,00414383 | down | 4,5239267 |
| Gucy1a3 | guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3 | 0,00643437 | down | 4,0955086 |
| | Mus musculus cDNA clone IMAGE:40090117, [BC128469] | 0,00405105 | down | 3,5768538 |
| Rpri3 | ribonuclease P RNA-like 3 | 0,00658998 | down | 3,2771783 |
| | lincRNA.chr13:22110479-22116629 reverse strand | 0,00622081 | down | 3,1527982 |
| Rpri2 | ribonuclease P RNA-like 2 | 0,00696632 | down | 2,9873924 |
| Rpl7a | ribosomal protein L7A | 0,00653786 | down | 2,50248 |
| Rpph1 | ribonuclease P RNA component H1 | 0,00963502 | down | 2,4559698 |
| Bace2 | beta-site APP-cleaving enzyme 2 | 0,00738185 | up | 2,404046 |
| Muc1 | mucin 1, transmembrane | 0,00493007 | up | 2,170539 |
| Atp1b2 | ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 2 polypeptide | 0,00842456 | down | 2,1331136 |
| Ednra | endothelin receptor type A | 0,00942573 | down | 2,0767322 |
| | lincRNA.chr6:47687025-47728525 forward strand | 0,00465488 | down | 2,0415895 |
| Lgi3 | 10 days neonate medulla oblongata cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:B830040F02 product:leucine-rich repeat LGI family, member 3, full insert sequence. [AK163664] | 3,07E-06 | down | 2,016158 |

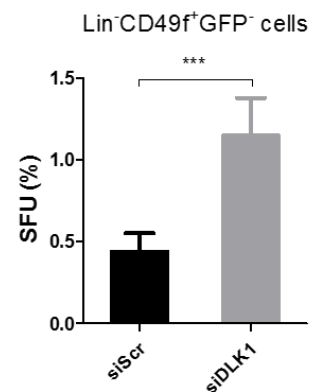
C



D



E



Supplemental figures

Supplementary figure 1

| N° Animal | Type | Pattern | Infiltration | Stroma | Necrosis | Mitotic index | Peritumoral emboli |
|-----------|-----------|--|--------------|--------|----------|---------------|--------------------|
| 688 | Carcinome | solid papillary with tubular carcinoma | 2 | 1 | 3 | 150 | 2 |
| 796 | Carcinome | solid papillary with tubular carcinoma | 2 | 1 | 2 | 40 | 0 |
| 877 | Carcinome | solid papillary with tubular carcinoma | 3 | 1 | 1 | 104 | 3 |
| 921 | Carcinome | solid papillary with tubular carcinoma | 1 | 2 | 2 | 161 | 0 |
| 687 | Carcinome | solid papillary with tubular carcinoma | 3 | 2 | 2 | 86 | 1 |
| 766 | Carcinome | tubulopapillary features | 1 | 1 | 3 | 20 | 0 |
| 951 | Carcinome | tubulopapillary features | 2 | 1 | 2 | 77 | 2 |
| 978 | Carcinome | tubulopapillary features | 2 | 1 | 2 | 45 | 3 |
| 765 | Carcinome | solide epithelial | 1 | 1 | 1 | 81 | 3 |
| 808 | Carcinome | solide epithelial | 3 | 2 | 1 | 138 | 2 |
| 673 | Carcinome | mixture of epithelial and spindle morphology | 1 | 1 | 3 | 158 | 1 |
| 885 | Carcinome | mixture of epithelial and spindle morphology | 1 | 2 | 1 | 77 | 1 |
| 959 | Carcinome | mixture of epithelial and spindle morphology | 2 | 3 | 0 | 116 | 1 |
| 977 | Carcinome | mixture of epithelial and spindle morphology | 1 | 3 | 3 | 38 | 3 |

Figure S1-A: Anapathological analyses of bi-Tg tumors from 4 to 6-month-old mice

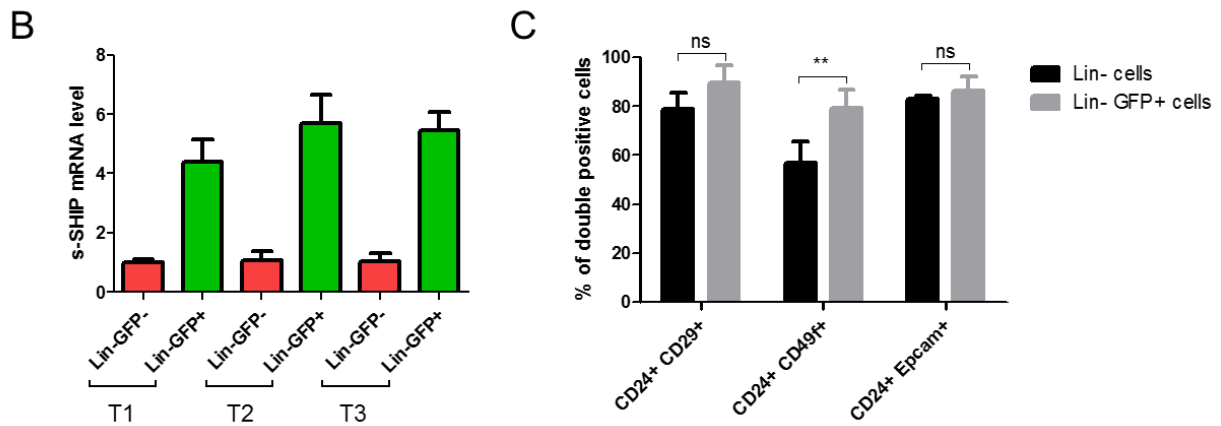


Figure S1-B et C: (B) Expression level of endogenous s-SHIP was assessed from three different tumors using qPCR; (B) Flow cytometry analysis of CD24, CD29, CD49f and Epcam expression in Lin- cells and Lin-GFP+ cells. Data represent the mean \pm SEM. of three independent tumors, p values was determined by Two-way ANOVA test $**p < 0.01$.

Supplementary figure 2

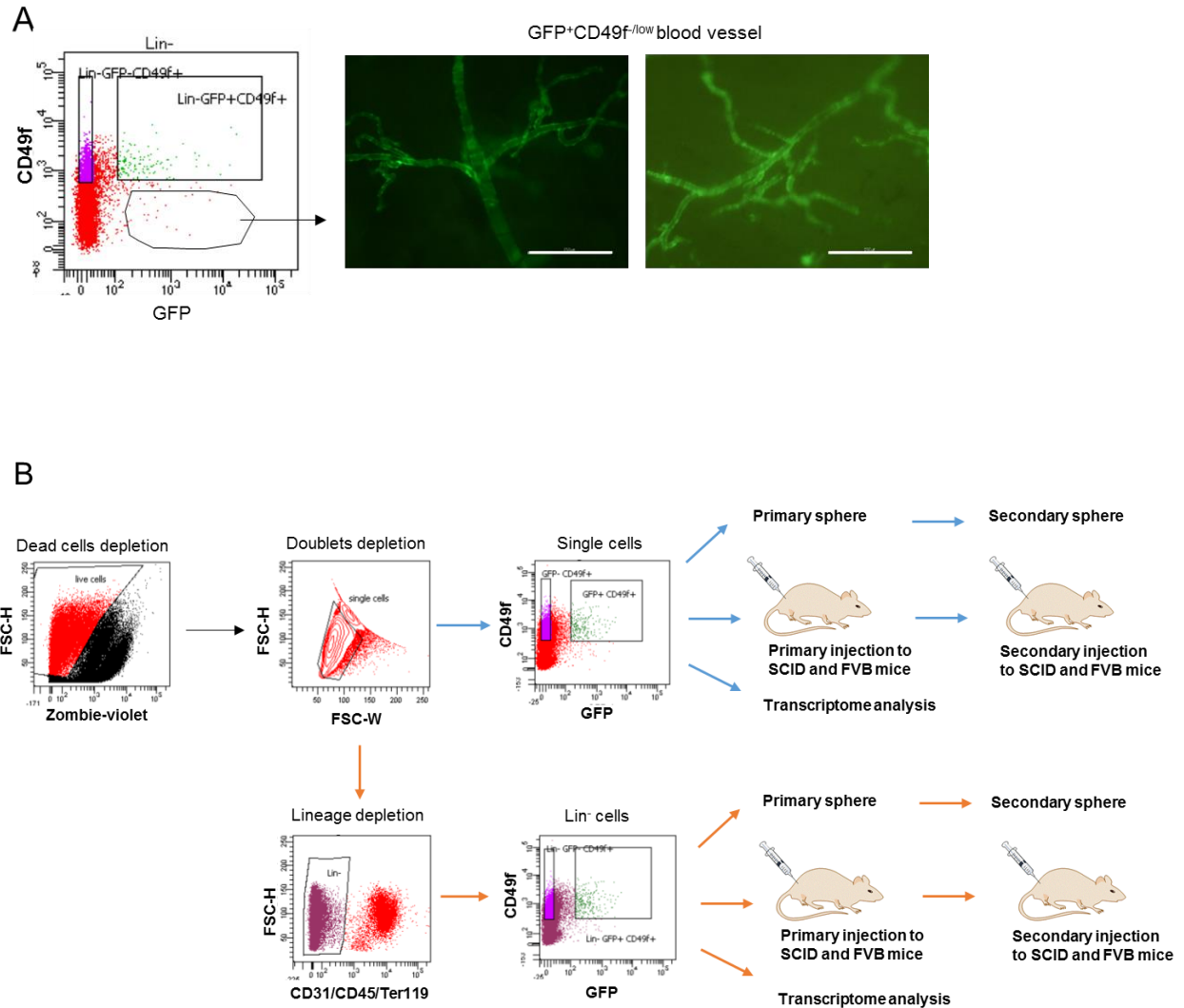


Figure S2: (A) Flow cytometry analysis showed a minor population of GFP+CD49^{low}/- as illustrated by two photos of blood vessels expression GFP, scale bar = 250µm; (B) Sorting strategy used in the study.

Supplementary figure 3

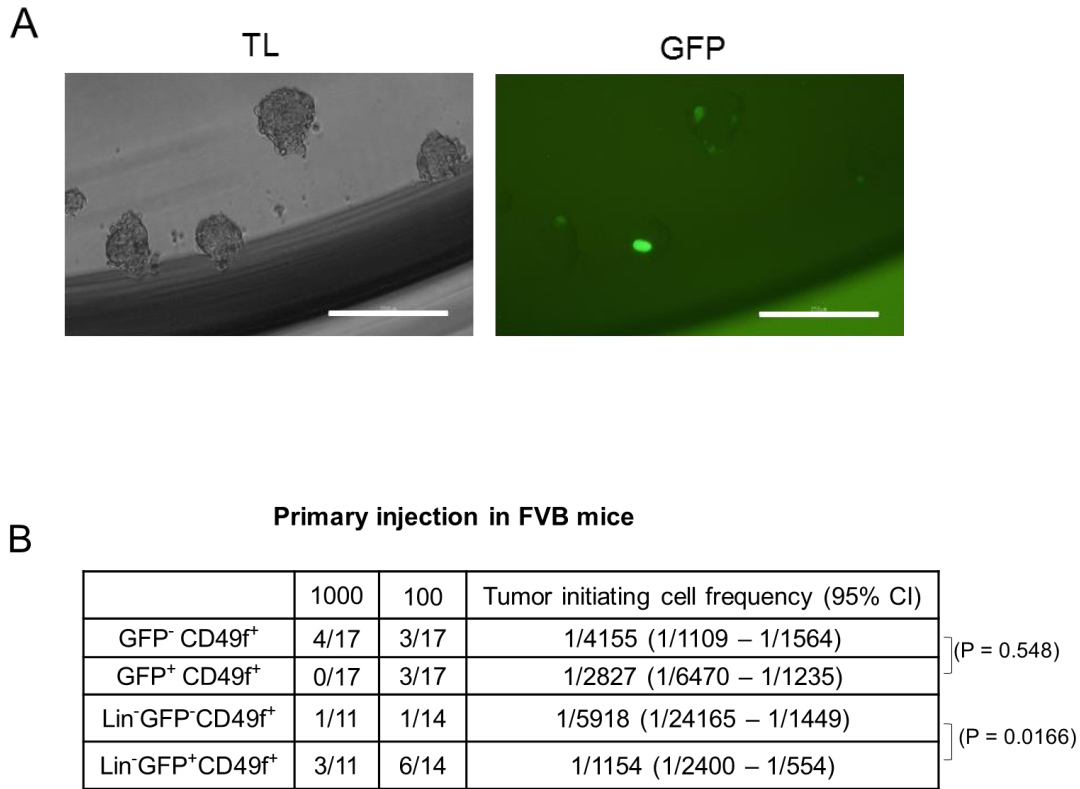


Figure S3: (A) Spheres derived from GFP⁺ cells can be maintained through at least four passages and GFP⁺ cells persist during sphere passaging (n=3 independent experiments). Representative photo of spheres from the 4th passage; scale bar = 250μm. (B) GFP⁺ and GFP⁻ cells isolated from bi-Tg tumors were sub-cutaneously injected into FVB mice. Mice were monitored until tumors were observed or up to 7 months if no tumors were detected

B. La synucléine gamma peut induire la radio-résistance dans des lignées cellulaires de cancer du sein

Etude de la lignée murine MAM326 a révélé le rôle de SNCG dans la résistance

Pendant ma thèse, j'ai dérivé plusieurs lignées cellulaires dénommées MAM (pour mammary) à partir des tumeurs prélevées chez ces souris biTg (Figure 26). De manière intéressante, ces lignées possèdent un pourcentage variable de cellules GFP⁺. J'ai choisi la lignée MAM326 (qui correspond à la souris #326) comme un modèle *in vitro* pour savoir si comme dans les souris bi-Tg, l'expression de s-SHIP/GFP permet d'identifier une sous-population de cellules tumorales qui présentent des propriétés de CSC. Afin de répondre à ces questions, j'ai comparé la sous-population GFP⁺ au reste de la lignée pour la prolifération, l'expression des marqueurs de surface, la capacité de formation de sphères, le potentiel tumorigène et la chimio- et radio-résistance.

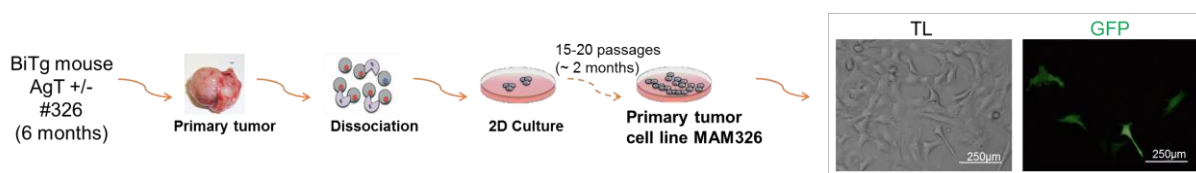


Figure 26. Etablissement de la lignée MAM326.

- La lignée MAM326 apparait comme homogène

La lignée MAM326 est une lignée de cellules épithéliales cancéreuses avec environ 10 % de cellules GFP⁺ (Figure 26). A l'exception de l'expression du promoteur de s-SHIP et donc de la GFP, la lignée apparait comme homogène, et toutes les cellules (GFP⁻ et GFP⁺) sont majoritairement en cycle (Ki-67⁺), prolifèrent de manière identique, et expriment les mêmes marqueurs de surface (CD24⁺/CD49f⁺/CD29⁺) (données non présentées). Les populations cellulaires GFP⁺ ou GFP⁻ sont capables de générer des sphères non-adhérentes (données non présentées) et sont tumorigènes après injection à des souris immunodéprimées SCID (Tableau 6). En revanche, lorsque les cellules sont injectées dans les souris syngéniques FVB qui sont immunocompétentes, le résultat obtenu montre clairement que ces cellules ne sont pas capables de générer des tumeurs dans cet environnement (Tableau 7).

| Cells injected | 50 000 | 10 000 | 5000 |
|------------------|--------|--------|------|
| GFP ⁻ | 4/4 | 3/3 | 3/3 |
| GFP ⁺ | 4/4 | 3/3 | 3/3 |

Tableau 6. Résultats d'injection dans les souris SCID.

Les cellules GFP⁺ et GFP⁻ de la lignée MAM326 sont triées par FACS et injectées dans 50% de matrigel : nombre de tumeurs observées / nombre d'injections. Délai moyen de la formation d'une tumeur palpable : 4 à 6 semaines.

| Cells injected | 800 000 | 100 000 | 5000 |
|------------------|---------|---------|------|
| GFP ⁻ | 0/2 | 0/10 | 0/2 |
| GFP ⁺ | 0/2 | 0/10 | 0/2 |

Tableau 7. Résultats d'injection dans les souris FVB.

Les cellules GFP⁺ et GFP⁻ de la lignée MAM326 sont triées par FACS et injectées dans 50% de matrigel : nombre de tumeurs observées / nombre d'injections. Les souris sont sacrifiées 6 à 8 mois après injection.

- *La sous-population de cellules GFP⁺ est plus résistante aux chimio- et radio-thérapies*

Lorsque la lignée MAM326 est traitée par différentes drogues ou irradiée (rayon X, DARPAC), on observe un enrichissement significatif en cellules GFP⁺ (Figure 27), ce qui suggère que l'expression de la GFP et donc de s-SHIP est associée à une résistance aux traitements. Les traitements anti-cancéreux induisent la mort cellulaire principalement par apoptose. J'ai donc testé si les cellules GFP⁺ étaient plus résistantes à l'apoptose. Pour cela, la lignée MAM326 a été traitée par différentes drogues pendant 72h et le pourcentage de cellules apoptotiques a été évalué après marquage par l'Annexine-V et l'iodure de propidium (IP), puis analysées par cytométrie en flux. Les résultats démontrent que les cellules GFP⁺ possèdent une plus grande résistance à l'apoptose induite par les drogues (Figure 28).

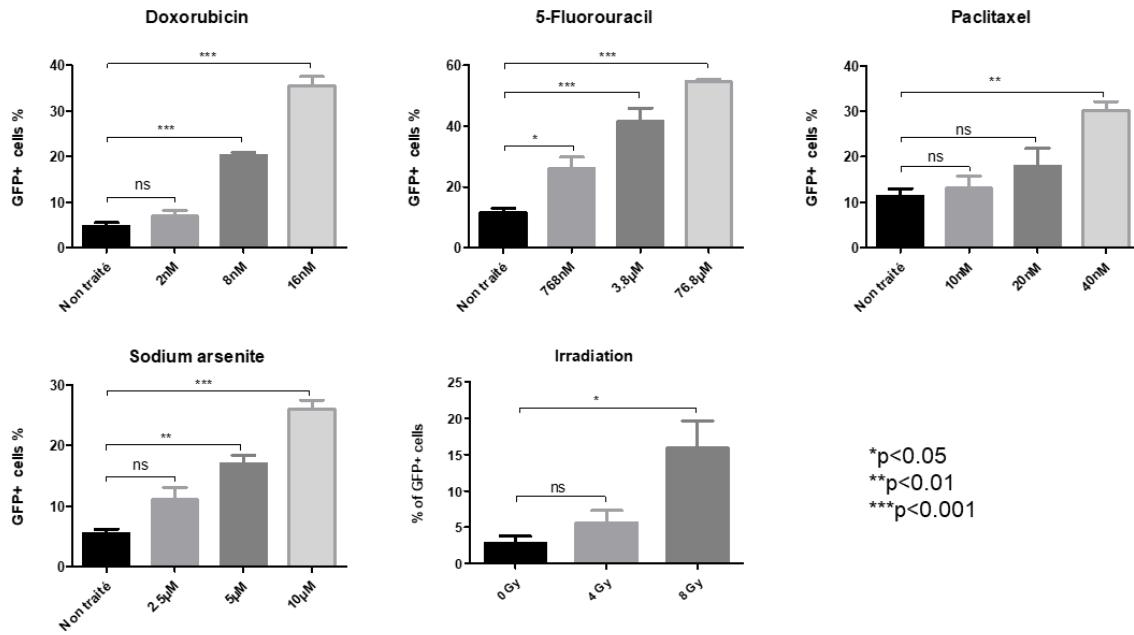


Figure 27. L'expression de s-SHIP/GFP est associée à une résistance aux drogues et à l'irradiation.

MAM326 a été traitée par différentes drogues pendant 72h ou irradiée (4 ou 8 Gy). Le pourcentage de cellules GFP+ est analysé par cytométrie en flux. (Test statistique : One-way ANOVA, n=3 expériences indépendantes)

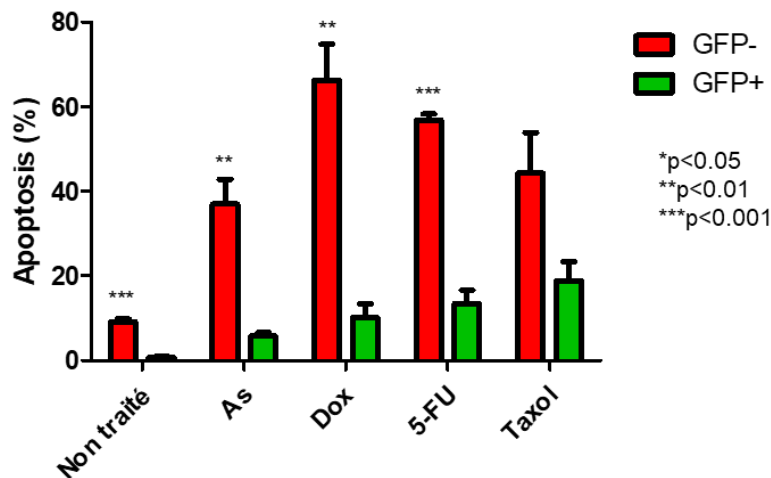


Figure 28. Les cellules GFP+ sont plus résistantes à l'apoptose induite par les traitements.

MAM326 a été traitée par doxorubicine (Dox, 32 nM), 5-fluorouracile (5-FU ; 3,8 µM), paclitaxel (Taxol, 40 nM) ou sodium arsenite (As 10µM) pendant 72h. Les cellules apoptotiques sont marquées par l'Annexine-V et l'iodure de propidium (IP), et analysées par cytométrie en flux. (Test statistique : test student, n=3 expériences indépendantes)

- *Mise en évidence des gènes impliqués dans la résistance*

Pour déterminer la signature moléculaire de cette résistance, une analyse transcriptomique globale par microarray a été réalisée en comparant la sous-population MAM326 GFP⁺ aux cellules MAM326 GFP⁻ (en collaboration avec la plateforme de Génomique de l'Université de Lille 2). Cette analyse a mis en évidence une vingtaine de gènes significativement surexprimés (de 4 à 16 fois) dans les cellules GFP⁺, et dont la nature et/ou la fonction est pertinente dans le contexte d'une résistance aux traitements anti-tumoraux comme SNCG; ainsi, plusieurs gènes sont impliqués dans le métabolisme des drogues et la détoxification tels que DCXR (Lee SK et al. 2013) et ALDH1L1 (Tableau 8). Ces résultats ont été confirmés par RT-qPCR ou par cytométrie en flux pour CD80 (données non présentées). Parmi ces gènes, nous avons choisi SNCG pour étudier son implication dans la radioresistance. Sa résistance au Taxol a été bien décrite dans le cancer du sein. Cependant son rôle dans la radioresistance a été suggéré mais jamais été démontré expérimentalement.

| Symbole du gène | Nom | Fc | Fonction | Résistance |
|-----------------|--|------|--|-----------------------|
| Ces2e | carboxylesterase 2E | 15,5 | Métabolisme des xénobiotiques | cancer colorectal |
| Cpz | carboxypeptidase Z | 11 | Régulation de la voie Wnt | |
| p21 | cyclin-dependent kinase inhibitor 1A | 7 | Régulation du cycle | cancer du sein |
| DCXR | dicarbonyl L-xylulose reductase | 6,9 | Détoxification | |
| SNCG | Gamma-synucléin | 6,5 | Marqueur de la progression tumorale | cancer du sein |
| CD80 (B7-1) | Cluster of Differentiation 80 | 6,2 | Régulation de l'activation des lymphocytes T | |
| ALDH1L1 | aldehyde dehydrogenase 1 family, member L1 | 5,7 | Catabolisme de l'éthanol | |
| Ephx1 | Epoxide hydrolase 1 | 5,2 | Détoxification | |
| MGMT | O-6-methylguanine-DNA methyltransferase | 4,3 | Réparation de l'ADN | glioblastome |
| Wnt9a | wingless-type MMTV integration site 9A | 4 | Régulation de la tumorigenèse et de l'embryogenèse | |
| GDF15 (MIC-1) | growth differentiation factor 15 | 3 | Membre de la famille TGFβ | cancer de la prostate |

Tableau 8. Exemples de gènes surexprimés dans les cellules GFP+

(False Discovery Rate < 0,01; expression brute > 100)

Présentation de l'article II

Dans cette partie il sera fait référence aux figures de l'article II

Afin de déterminer si l'expression de SNCG favorisait la résistance à l'irradiation, deux approches complémentaires ont été réalisées : le gain de fonction par expression ectopique et la perte de fonction par inhibition par l'ARN interférant (siARN). Nous avons d'abord évalué le niveau d'expression de SNCG dans différentes lignées cancéreuses mammaires humaines par RT-qPCR et western blot (figure 1A et B). Seulement deux lignées cellulaires de cancer du sein expriment un taux élevé de SNCG, ce sont T47D et MCF7. Elles sont toutes deux de type luminal et ont été utilisées pour les expériences de perte de fonction. De nombreuses lignées n'expriment pas SNCG. Nous avons choisi une lignée de type basal/claudin-low SUM159PT comme modèle d'étude des expériences de gain de fonction. Les lignées exprimant SNCG ont été transfectées par les siARN spécifiques inhibant l'expression de SNCG. La lignée SUM159PT a été transfectées par un vecteur d'expression d'une protéine de fusion SNCG-GFP ou un vecteur vide GFP comme contrôle. Les cellules transfectées ont été tout d'abord sélectionnées par l'antibiotique G418, puis enrichies par tri cellulaire sur la base de l'expression de la GFP.

Les effets de la surexpression ou de la diminution de l'expression de SNCG sur la résistance à l'irradiation ont ensuite été étudiés. Les tests de clonogénicité et d'apoptose ont été utilisés pour évaluer la survie des cellules après irradiation. D'une part, les résultats obtenus montrent que la diminution de l'expression de SNCG dans les cellules T47D et MCF7 induit une sensibilisation à l'irradiation (figure 2). D'autre part, la surexpression de SNCG dans les cellules SUM159PT entraîne une augmentation de la survie cellulaire ainsi qu'une diminution de l'apoptose après irradiation (figure 3). Dans la lignée SUM159PT, nous avons observé que la voie p53 est moins activée après irradiation quand SNCG est présente dans les cellules (figure 4A). De manière intéressante, l'expression de la protéine p21^{Waf1/Cip1}, une cible de p53, est augmentée dans les cellules exprimant SNCG par rapport aux cellules contrôles, avant et après irradiation (figure 4A et B). Dans la littérature, il a été montré que p21 peut jouer un rôle pro- ou anti-apoptotique dans les cellules cancéreuses suite aux dommages à l'ADN (Piccolo and Crispi, 2012). Notre résultat suggère que la radiorésistance induite par la surexpression de SNCG pourrait passer par la signalisation anti-apoptique via p21.

Nos résultats démontrent pour la première fois que l'expression de SNCG dans les cellules cancéreuses mammaires leur confère une meilleure résistance à l'irradiation. Ainsi, nos données soutiennent son potentiel en tant que biomarqueur prédictif pour l'efficacité de la radiothérapie. De plus, nous mettons en lumière l'interaction possible entre SNCG et p21 dans certaines cellules, ce qui pourrait contribuer à la radiorésistance des cellules cancéreuses du sein. Une expression abondante de SNCG a également été détectée dans d'autres types de cancer, corrélée à une résistance aux traitements (Strohl et al., 2016). Nos résultats présentent donc un intérêt dans l'évaluation de la radiorésistance des tumeurs mammaires mais aussi dans d'autres types de cancer.

Article II

Synuclein gamma expression enhances radiation resistance of breast cancer cells

Synuclein gamma expression enhances radiation resistance of breast cancer cells

Lu Tian¹, Yucui Zhao¹, Marie-José Truong¹, Chann Lagadec², Roland P. Bourette^{1,*}

¹ University of Lille, CNRS, Institut Pasteur de Lille, UMR 8161-M3T-Mechanisms of Tumorigenesis and Targeted Therapies, SIRIC ONCOLille, F-59000 Lille, France

² University of Lille, Inserm U908 Cell Plasticity & Cancer, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France.

*To whom correspondence may be addressed. E-mail: roland.bourette@ibl.cnrs.fr

Correspondence to:

Roland Bourette, Ph.D.

CNRS UMR8161, Institut de Biologie de Lille,

1 rue du Professeur Calmette, BP 447, 59021 Lille Cedex, France

phone: (33) 3 20 87 12 96 / Fax: (33) 3 20 87 10 19

E-mail: roland.bourette@ibl.cnrs.fr

ABSTRACT

Resistance to chemo- or radiotherapy is a major obstacle for the effective treatment of cancer. Synuclein-gamma (SNCG) is a small protein whose expression in cancer cells has been associated with poor prognosis and resistance to therapy. While reports on SNCG overexpression contributing to chemoresistance exist, limited information is available on the relationship between SNCG and radioresistance of cancer cells. In this study, we investigated the role of SNCG in radiation resistance in both estrogen receptor (ER)-positive and triple-negative breast cancer cells. siRNA mediated knockdown of SNCG (siSNCG) markedly reduced SNCG mRNA and protein levels compared to scrambled siRNA (siScr) treatment. Furthermore, siSNCG treatment sensitized ER-positive breast cancer cells (MCF7 and T47D) to ionizing radiation at 4 to 12 Gy compared to siScr treatment as evidenced by the significant increase of apoptotic cells and reduction in clonogenic cell survival in siSNCG treated cells compared to siScr treated cells. On the other hand, we established an *in vitro* model of SNCG ectopic expression by using a triple-negative breast cancer cell line (SUM159PT) to further investigate the mechanisms underlying the radioprotective effect of SNCG. We showed that overexpression of SNCG significantly decreased ionizing radiation-induced apoptosis of SUM159PT cells and increased the clonogenic cell survival after radiation treatment. At the molecular level, after irradiation, the p53 pathway was less activated when SNCG was present. Conversely, p21^{Waf1/Cip1} expression was upregulated in SNCG-overexpressing cells, which might explain some of SNCG biological effects. In conclusion, our data demonstrate for the first time a role of SNCG in the radioresistance of breast cancer cells.

INTRODUCTION

Breast cancer is the most frequently diagnosed cancer and one of the leading causes of cancer death in women worldwide. In 2012, the number of newly diagnosed cases in the world was estimated at 1.7 million, which represents 25% of all cancer cases in women [1]. Although dramatic advances have been made in the effectiveness of anti-cancer therapies, the death rate remains relatively high for breast cancer patients due to hard-to-treat metastatic and recurrent tumors. Radiation therapy is a useful cancer treatment strategy and is a highly cost-effective single-modality treatment. For in situ and infiltrating breast cancer, radiotherapy significantly reduces the risk of local recurrence and increases overall survival (2000). However, some patients do not show any benefit from this treatment due to individual variation in radiosensitivity. It is therefore necessary to develop new biomarkers that predict the effectiveness of radiotherapy.

Synuclein- γ (SNCG) is a member of the synuclein family which is a small, soluble, highly conserved group of neuronal proteins that have been implicated in both neurodegenerative diseases and cancer [3,4]. It was first named breast cancer-specific gene 1 (BCSG1) due to its highly specific expression in advanced stages of breast cancer compared to its undetectable level in normal or benign breast lesions [5,6]. Furthermore, abundant expression of SNCG has also been associated with several other types of cancer, including ovary, cervical, prostate, pancreatic, colon and lung [7–9]. In breast cancer, a series of functional studies have demonstrated that ectopic expression of SNCG in breast cancer cell lines promotes their proliferation as well as their ability to migrate and to metastasize [5,10,11]. At the same time, invalidation of SNCG in breast cancer cells sensitizes them to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis [12]. Moreover, the poor overall SNCG-related prognosis in breast cancer has also been reported by two independent studies [13,14].

Previous studies have shown that the expression of SNCG confers resistance to anti-microtubule drugs used in breast cancer treatment, such as nocodazole or taxol [15,16]. The reduced efficacy of these microtubules inhibitors is attributed to the SNCG-BubR1 interaction [11,15]. SNCG has been shown to interact with BubR1, a mitotic checkpoint kinase required for the prevention of cell mitotic divisions following severe cell damage or mutation [11]. The SNCG-BubR1 interaction can prevent the activation of SAC (spindle assembly checkpoint) caused by microtubules inhibitors, and as a result, allowing cancer cells to progress into the cell cycle and escape apoptosis. Nevertheless, the relationship between SNCG expression and radiotherapeutic efficacy remains to be elucidated. A recent study of breast cancer patients with indications for postoperative radiotherapy suggested that high SNCG expression is an indication of fewer radiotherapeutic benefits [17]. However, the role of SNCG in radiotherapy resistance and its mechanism still need to be validated.

Here we show the potential use of SNCG as a biomarker to predict the effectiveness of radiotherapy in breast cancer patients. We used various breast cancer cell lines that are either SNCG-positive or SNCG-negative as an *in vitro* working model to study the correlation between SNCG expression and responses of cancer cells to radiation. We demonstrated the inverse relationship between SNCG expression and sensitivity to radiation of breast cancer cells.

RESULTS

Expression of SNCG in human breast cancer cell lines

Previous reports have suggested that SNCG is abnormally expressed in breast tumors and cell lines derived from breast tumors. We profiled a panel of *in vitro* breast cancer cell lines as well as hTERT-HME1 human mammary epithelial cells for SNCG expression both at transcript and protein levels. These cell lines belong to distinct breast cancer subtypes: luminal (MCF7, BT-474, ZR-75-1, T47, SK-BR-3), basal A (HCC70, BT-20), and

basal B (SUM159PT, MDA-MB-231) [18,19]. As shown in Figure 1A, among the nine cell lines, five expressed SNCG transcripts with the highest expression in MCF7 and T47D luminal cells. Accordingly, when SNCG protein expression was investigated by using western blotting, the 15 kDa endogenous SNCG protein was observed only in T47D and MCF7 cells (Figure 1B). A barely detectable level of SNCG was also observed for the ZR-75-1 cells (Figure 1B). On the contrary, SNCG was not detected in two triple negative breast cancer cell lines, MDA-MB-231 and SUM159PT, neither in hTERT-HME1 cells (Figure 1). We confirmed that SNCG was expressed in T47D and MCF7 cells using immunofluorescence. As shown in Figure 1C, after staining with an SNCG specific antibody, cytoplasmic localization of SNCG was observed both in T47D and in MCF7 cells. Nuclear staining of SNCG was also observed in some T47D cells (Figure 1C, lower panel). In the same conditions, no fluorescence signals could be observed in MDA-MB-231 and SUM159PT cells (not shown).

Down-regulation of SNCG increases cancer cell radiosensitivity

Previous experiments have demonstrated that inhibition of SNCG expression in T47D cells reduced their resistance to drugs [15,20]. To determine whether the inhibition of SNCG expression could also decrease radioresistance of breast cancer cells, we delivered siRNA to knock down SNCG expression in T47D cells. As shown in Figure 2A (left panel), 48h after transfection, SNCG RNA level was repressed till 80% of the negative control, siScramble (Scr)-treated cells. Inhibition of SNCG was confirmed at the protein level by western blot (Figure 2A, right panel). When SNCG siRNA-treated T47D cells were irradiated (8 and 12 Gy), we observed a significant increase of apoptosis as compared to irradiated siScr-treated cells (Figure 2B). We next investigated the outcome of SNCG silencing on the radiosensitivity of MCF7 cells by assessing their clonogenic survival potential. Similarly to T47D cells, SNCG siSNCG-treated MCF7 cells exhibited a strong decrease in SNCG expression both at the RNA and the

protein levels (Figure 2C). The clonogenic assay revealed that with increasing radiation doses (0, 4, and 8 Gy), cell colony formation was reduced. In addition, the survival fractions at 4 and 8 Gy were reduced in siSNCG-treated MCF7 cells compared to siScr-treated MCF7 cells (Figure 2D). Altogether, these results demonstrated that inhibition of SNCG expression increased the sensitivity to radiation of both T47D and MCF7 cells.

Expression of SNCG enhances cancer cell radioresistance

To further evaluate the role of SNCG in the biological response of breast cancer cells to ionizing radiation, we analyzed the impact of SNCG ectopic expression in the triple-negative SUM159PT cells that do not express endogenous SNCG (Figure 1). SNCG was introduced by transfection as a fusion with the GFP protein and transfected cells were successively sorted three times by FACS on GFP expression to create a stable SUM-SNCG-GFP cell population (Figure 3A). Sorted positive SUM-SNCG-GFP cells expressed a high level of SNCG-GFP transcript compared to SUM-CTL-GFP cells (Figure 3B, left panel). The fusion protein was detected at the expected size of 45 kDa by western blotting using anti-SNCG antibody only in SUM-SNCG-GFP cells (Figure 3B, right panel). We first verified that SNCG-GFP fusion protein was functional in SUM159PT cells by showing a decreased sensitivity to Taxol treatment of SUM-SNCG-GFP cells compared to SUM-CTL-GFP cells (data not shown). After a 12 Gy-radiation treatment, the apoptosis of the SUM-SNCG-GFP cells was significantly decreased compared to the SUM-CTL-GFP cells (Figure 3C). Considering the clonogenic efficiency after irradiation, we observed an improved overall survival at different dose levels in the SUM-SNCG-GFP cells compared to control SUM-CTL-GFP cells (Figure 3D). Altogether, these results demonstrated that ectopic expression of SNCG rendered SUM159PT cells more resistant to radiation.

Expression of SNCG attenuates p53 signaling and increases p21^{Waf/Cip1} expression in SUM159PT cells

Genotoxic stress like radiation triggers a series of post-translational modifications on p53 that contribute to its stabilization, nuclear accumulation and biochemical activation. We then compared the phosphorylation status of serine 15 of activated p53 in irradiated SUM-SNCG-GFP and SUM-CTL-GFP cells. We observed that radiation treatments induced phosphorylation of p53 to a lesser extent in the SUM-SNCG-GFP cells compared to SUM-CTL-GFP cells (Figure 4A, upper panel). No significant difference was observed for the expression of total p53 (Figure 4A, middle panel). We then examined the expression of p21^{Waf/Cip1}, a p53-inducible protein that plays an important role in cell cycle, DNA repair, and apoptosis. We observed that the increasing radiation dose induced dose-dependent degradation of p21 in both cell populations. Interestingly, we also observed a strong increase of p21 expression in SUM-SNCG-GFP cells compared to SUM-CTL-GFP cells, in the absence of radiation treatment (Figure 4A, lower panel). To determine if this higher p21 protein expression was associated with an increase of p21 transcript, we performed a qRT-PCR analysis. As shown in Figure 4B, a slight but significant increase of p21 mRNA expression was observed in SUM-SNCG-GFP cells compared to SUM-CTL-GFP cells. These results suggested that when SNCG was expressed in these cells, activation of p53 pathway was less sustained which might explained that these cells were less susceptible to apoptosis compared to SUM-CTL-GFP cells. On the other hand, these results suggested that p21 expression might be regulated by SNCG in these cells.

DISCUSSION

Synuclein family members (α , β and γ) have been extensively studied since their discovery thirty years ago due to their involvement in human pathology, mainly Parkinson's

disease and cancer [21,22]. Thus, synuclein- γ (SNCG) abnormal expression has been described in a wide range of human cancer such as endometrial [23], bladder (Liu et al., 2016), prostate [25], ovarian [26], gastric [27], liver [28], lung [29], and colon [30].

SNCG has been described as playing a role in regulating resistance to chemotherapeutic agents in breast cancers, but whether SNCG modulates radiosensitivity of breast cancer cells is not known. It has been reported that SNCG expression was upregulated in irradiated human breast cancer cells and this tumor cells-secreted SNCG may contribute to immune suppressive effects [31]. However, whether this radiation-induced expression of SNCG might be implicated in the protection of the tumor cells themselves remains to be determined. Recently, expression of the RNA-binding protein HuR has been shown to upregulate SNCG expression in hepatocellular carcinoma [28]. Meanwhile, HuR expression has been shown to be associated with radioresistance of triple-negative breast cancer cells [32]. Taken together, these studies suggest a potential link between HuR/SNCG interaction and radioresistance of breast cancer cell. Here we have investigated whether modulating the level of SNCG expression could affect the radiosensitivity of breast cancer cells. We first assessed SNCG expression in various breast cancer cells and found that SNCG mRNA as well as protein were highly expressed in two luminal cell lines, T47D and MCF7. SNCG expression in T47D cells has been described by several groups and T47D is a prominent cellular model for SNCG studies in breast cancer [7,33,34]. Considering SNCG expression in MCF7 cells, both none expression [15,35] or expression [7,36,37] have been documented by different groups. We further tested the effects of silencing SNCG on radiosensitization of these two cell lines and observed that both T47D and MCF7 cells were radiosensitized upon down-regulation of endogenous SNCG expression. Therefore, we evaluated the effect of ectopic SNCG expression in a triple-negative breast cancer (TNBC) cell line, SUM159PT [18]. TNBC do not express estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and do not have HER-2/Neu amplification; given the lack of

validated molecular targets and the poor outcome in patient with TNBC, there is a clear need for a greater understanding of TNBC [38]. We have previously used SUM159PT cells for a study of ionizing radiation effects on TNBC physiology [39]. Here we have ectopically expressed SNCG in SUM159PT and we demonstrated that SNCG expression increased their resistance to radiation. Altogether, our experiment of gain- or loss-of-function strongly suggested that SNCG is able to modulate the response of breast cancer cells to ionizing radiations.

Interestingly, Min and collaborators have recently shown that overexpression of SNCG predicts lack of benefit from radiotherapy for breast cancer patients [17]. Thus, our results are in complete agreement with this study and reinforce the idea that SNCG expression may serve as a potential biomarker to identify breast cancer patients who are less likely to benefit from radiotherapy. Relationship between SNCG expression and radiotherapy stratified survival was described in two other types of cancer, glioblastoma and lung cancer [17]. SNCG expression has been reported in several other human cancer [23,25–27], including hepatocellular carcinoma (HCC) [28]. Since new radiotherapy techniques have expanded the indication of radiotherapy for the treatment of HCC [40], it would be of interest to determine the potential effect of SNCG in these cells.

SNCG is classified as an unstructured protein and has several potential binding partners. It is hypothesized that SNCG affects the mRNA levels of several regulatory proteins but in ways that are difficult to predict [41]. Thus, SNCG binds and mediates AP-1 activity [42,43], activates Jun Kinase 1 (JNK1) [12], activates Estrogen Receptor (ER- α) transcription [44], interacts with androgen receptor (AR) [25], with HER2 [35], with AKT [29], with phospholipase C β 2 [41], with PolyC binding protein 1 (PCBP1) [45]. The molecular mechanisms of how SNCG favors radioresistance remain to be determined and further research is required to unveil those mechanisms. Importantly, it has been proposed that the role of synuclein family proteins

may change in response to stress or changing environmental conditions, like regulating gene expression [22]. In our study, we showed that enforced SNCG expression was able to activate p21^{Waf1/Cip1} transcription and to increase p21 protein expression in SUM159PT cells. Several reports have shown that p21 has other functions than cyclin-dependent kinases inhibition, especially in the DNA damage response [46]. It could play an important role in keeping cells alive after DNA damage and p53 pathway activation, in order to ensure correct DNA repair [47]. Cells lacking p21 or treated with p21 antisense display enhanced sensitivity toward apoptosis induced by DNA-damaging agents [48,49], whereas tumors expressing high levels of p21 are prone to be resistant to DNA-damaging agents [50,51]. Thus, p21 could limit effectiveness of chemo- and radio-therapies and it appears then as a therapeutic target in breast and other cancers [52]. Our data suggest that p21 could be implicated in SNCG pathway in some breast cancer cells and to play a role in chemo and radioresistance induced by SNCG expression. Further studies are warranted to test this model.

In conclusion, our study demonstrated for the first time that SNCG confers radioresistance to breast cancer cells. Our data support its potential as a biomarker that predict the effectiveness of radiotherapy. Moreover, we shed light on the possible interaction between SNCG and p21, which may contribute to the radioresistance of breast cancer cells. It is now critically important to determine the exact role of SNCG in radioresistance in breast cancer and other types of cancer.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

All cell lines used in this study were originally obtained from the American Type Culture Collection. MCF7 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco) supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS, Gibco) and Zell Shield (Minerva Biolabs, Biovalley). T47D cells were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 10% FBS and Zell Shield. SUM159PT (hereby named SUM) cells were cultured in Ham's F12 Nutrient Mixture (Gibco) supplemented with 5% FBS, hydrocortisone (1µg/ml) (Sigma-Aldrich), insulin (5µg/ml) (Sigma-Aldrich) and Zell Shield. All cell cultures were maintained at 37°C in a humidified incubator in an atmosphere of 5% CO₂ – 95% air.

Plasmids and siRNA transfections

To establish stable cell lines expressing SNCG, SUM cells were transfected with a pCMV6-SNCG-GFP plasmid DNA (Origene, RG204173) or with the corresponding empty vector pCMV6-A-GFP plasmid DNA (Origene, PS100010) as a control. Briefly, one day before transfection, 2×10⁵ SUM cells/well were plated in a 6-well plate. Cells were transfected with 1.5 µg/well of the recombinant plasmid or the empty plasmid as control, respectively, using jetPRIME® (Polyplus) according to the manufacturer's transfection protocol. Fresh growth medium was replaced after 24 h of transfection. Between 5 and 7 days after transfection, GFP-positive SUM cells were successively sorted three times by using a FACSAria II cell sorter (BD Biosciences) to a purity of >85%, and analyzed.

For siRNA, T47D and MCF7 cells were transfected with SNCG siRNA and control siScramble (siSrc) constructs (Origene, SR304497) using jetPRIME® (Polyplus) according to the manufacturer's transfection protocol. Total RNA and proteins were extracted 48 h after transfection for analysis. For irradiation experiments, cells were irradiated 48 hours after transfection.

RNA isolation and quantitative RT-PCR

RNA extraction and quantitative PCR were performed as previously described (Bauderlique-Le Roy et al., 2015). Briefly, total RNA was isolated using the RNeasy Plus Extraction kit (Qiagen). Reverse transcription (RT) was performed using QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen) on 1 µg of RNA, according to the manufacturer's protocol. Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) was achieved on Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies) using KAPA SYBR® Fast Universal qPCR kit (Kapa Biosystems). The thermal cycling program was 95°C for 20 sec, 60°C for 30 sec and 72°C for 30 sec during 40 cycles. Experiments were performed in duplicate, and the comparative threshold cycle method was used for the calculation of amplification fold ($2^{-\Delta\Delta CT}$ method). Primer sequences are presented in table 1.

Table 1: oligonucleotide primer sequence used in qPCR

| Gene | Primer sequence |
|---------------|-------------------------|
| RPLP0 Forward | GTGATGTGCAGCTGATCAAGACT |
| RPLP0 Reverse | GATGACCAGCCCAAAGGAGA |
| SNCG Forward | GGTCATGTATGTGGGAGCC |
| SNCG Reverse | CACTTCCTCTTTCTCTTTGG |
| P21 Forward | ACCATGTGGACCTGTCACTGT |
| P21 Reverse | TTAGGGCTTCCTCTTGGAGAA |

Western blot analysis and antibodies

Cells were harvested and lysed on ice with a lysis buffer (20 mM HEPES pH7.4, 142 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 5% glycerol, 1% NP40 and 0.1% SDS) supplemented with freshly added protease and phosphatase inhibitors (#P8340 and #P5726, respectively, Sigma). Cells then were disrupted by centrifugation 10 min at 10,000 g at 4°C. The protein

concentrations of the supernatant were quantified by bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Pierce®, ThermoFisher). Total proteins (30-40 µg) were separated on a NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Gel (ThermoFisher) and electrophoretically transferred onto PolyVinylidene fluoride (PVDF) membranes (Merck Millipore). Membranes were blocked at room temperature in a blocking buffer (0.2% casein in PBS) and probed with indicated primary antibodies overnight at 4°C. Membranes were washed with PBS-0.5% Tween for 30 min and incubated with secondary antibodies conjugated with Horse Radish Peroxydase (HRP) for 1 hour. Protein-antibody complexes were visualized by chemiluminescence with the SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate (Thermo scientific), using a LAS-3000 imaging system (Fujifilm, Tokyo, Japan) or X-ray films (CL-Xposure TM Film, Thermo scientific). Primary antibodies were SNCG (Abcam, ab55424, 1:1000), β-actin (Santa-Cruz, sc-47778, 1:200), phosphor-p53 (Ser15) (Cell Signaling, #9284, 1:1000), p53 (Cell Signaling, #2524, 1:1000), p21 Waf1/Cip1 (Cell Signaling, #2947, 1:1000).

Immunofluorescence staining

Cells were cytocentrifuged on glass slides, air-dried, washed with PBS and fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 15 min at room temperature (RT). After washing with PBS, cells were permeabilized with 0.5% Triton X100 in PBS, washed with PBS and non-specific binding was blocked by 5% FBS in PBS for 45 min at RT. Cells were incubated with or without SNCG antibodies (Santa-Cruz, sc135676, 1:100) for 45 min at RT in blocking buffer. Cells were washed and incubated with secondary antibody Alexa Fluor 594 F(ab')₂ fragment of goat anti-rabbit (Life Technologies A11072, 1:1000), counterstained with DAPI nuclear stain and mounted in Prolong Gold (Invitrogen). Optical sectioning images were taken using AxioImager Z1-Apotome (Zeiss, Germany). ZEN software (Zeiss) were used for microscope image analysis.

Cell irradiation treatment

Cells were seeded in 6-well plates at a density of 10^5 /well and grown overnight and irradiated with a dose rate of 1 Gy/min, with graded doses (4-12 Gy). A Darpac 2000 X-ray unit (Gulmay Medical Ltd, Shepperton, UK), operated at 80 kV, 8 mA, using 2.3 mm Al filtration was used for irradiation.

Apoptosis detection

APC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI (Biolegend) was used as a method to measure radiation-induced cytotoxicity. The assay was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, 72h after irradiation, cells were harvested and washed twice with cold Cell Staining Buffer (Biolegend), resuspended in Annexin V and Propidium Iodide (PI) staining solution and then analyzed immediately by flow cytometry (BD FACS Canto II).

Clonogenic assay

For irradiation experiments, cells were seeded in 6-well plates at a density of 10^5 cells per well and grown overnight. After irradiation, cells were harvested the next day using trypsinization, counted and a specific number of cells (100, 500 and 1000 cells) was plated in 6-well plates in triplicate for clonogenic assay. After 10 to 12 days, the medium was removed and cells were rinsed with PBS. Colonies were fixed with 4% PFA solution for 10 min at room temperature and were stained with 1% crystal violet solution in water. Plates were rinsed with water and left for drying at room temperature. Colonies (≥ 50 cells) were counted on the following day and survival fraction was calculated as the ratio of the plating efficiency of the treated cells to that of control cells.

Statistical analysis

Data are expressed as mean values \pm standard deviation of at least 3 independent experiments. The statistical analysis was done by using Student's *t*-test and the *p* value < 0.05 was considered significant.

AUTHORS CONTRIBUTIONS

Lu Tian : conception and design, collection and assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing

Yucui Zhao : collection and assembly of data, data analysis

Marie-José Truong : collection and assembly of data, data analysis

Chann Lagadec : collection and assembly of data, data analysis, provision of study material, manuscript writing

Roland P. Bourette : conception and design, financial support, provision of study material, data analysis and interpretation, manuscript writing

ACKNOWLEDGMENTS

We thank H el ene Bauderlique-Le Roy from the flow cytometry platform of the BioImaging Center of Lille (BICeL), B er enice Leclercq, Alexandra Mougel and J erome Vicogne for their help and for valuable discussions, Marie-Christine Bouchez for her assistance, Christine Bal Mahieu and Samuel and Meignan (Centre Oscar Lambret, Lille) for their help with the cell irradiation.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no competing or financial interests that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

FUNDING

This study was supported by CNRS and grants from the SIRIC ONCOLille (INCa-DGOS-Inserm 6041), and the Ligue contre le Cancer (comité du Nord et comité du Pas de Calais). Y.Z. was supported by a fellowship from the University of Lille 2. L.T was supported by fellowships from the Région Hauts-de-France and the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer.

REFERENCES

- Ahmad, M., Attoub, S., Singh, M.N., Martin, F.L., and El-Agnaf, O.M.A. (2007). γ -Synuclein and the progression of cancer. *FASEB J.* *21*, 3419–3430.
- 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.* *100*, 3983–3988.
- Aprelikova, O., Tomlinson, C.C., Hoenerhoff, M., Hixon, J.A., Durum, S.K., Qiu, T., He, S., Burkett, S., Liu, Z.-Y., Swanson, S.M., et al. (2016). Development and Preclinical Application of an Immunocompetent Transplant Model of Basal Breast Cancer with Lung, Liver and Brain Metastases. *PLoS ONE* *11*.
- Bae, S.H., Jang, W.I., and Park, H.C. (2017). Intensity-modulated radiotherapy for hepatocellular carcinoma: dosimetric and clinical results. *Oncotarget* *8*, 59965–59976.
- Bai, L., and Rohrschneider, L.R. (2010). s-SHIP promoter expression marks activated stem cells in developing mouse mammary tissue. *Genes Dev.* *24*, 1882–1892.
- Baladrón, V., Ruiz-Hidalgo, M.J., Nueda, M.L., Díaz-Guerra, M.J.M., García-Ramírez, J.J., Bonvini, E., Gubina, E., and Laborda, J. (2005). dlk acts as a negative regulator of Notch1 activation through interactions with specific EGF-like repeats. *Exp. Cell Res.* *303*, 343–359.
- Banerjee, S., Reis-Filho, J.S., Ashley, S., Steele, D., Ashworth, A., Lakhani, S.R., and Smith, I.E. (2006). Basal-like breast carcinomas: clinical outcome and response to chemotherapy. *J. Clin. Pathol.* *59*, 729–735.
- Bauderlique-Le Roy, H., Vennin, C., Brocqueville, G., Spruyt, N., Adriaenssens, E., and Bourette, R.P. (2015). Enrichment of Human Stem-Like Prostate Cells with s-SHIP Promoter

- Activity Uncovers a Role in Stemness for the Long Noncoding RNA H19. *Stem Cells Dev.* *24*, 1252–1262.
- Bendjennat, M., Boulaire, J., Jascur, T., Brickner, H., Barbier, V., Sarasin, A., Fotedar, A., and Fotedar, R. (2003). UV Irradiation Triggers Ubiquitin-Dependent Degradation of p21 WAF1 to Promote DNA Repair. *Cell* *114*, 599–610.
- Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* *3*, 730.
- Borowsky, A.D. (2011). Choosing a Mouse Model: Experimental Biology in Context—The Utility and Limitations of Mouse Models of Breast Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*.
- Brocqueville, G., Chmelar, R.S., Bauderlique-Le Roy, H., Deruy, E., Tian, L., Vessella, R.L., Greenberg, N.M., Rohrschneider, L.R., and Bourette, R.P. (2016). s-SHIP expression identifies a subset of murine basal prostate cells as neonatal stem cells. *Oncotarget* *7*, 29228–29244.
- Brooks, R., Iyer, S., Akada, H., Neelam, S., Russo, C.M., Chisholm, J.D., and Kerr, W.G. (2015). Coordinate Expansion of Murine Hematopoietic and Mesenchymal Stem Cell Compartments by SHIPi: Chemical Expansion of HSC and Their Niche. *STEM CELLS* *33*, 848–858.
- Bruening, W., Giasson, B.I., Klein-Szanto, A.J.P., Lee, V.M.-Y., Trojanowski, J.Q., and Godwin, A.K. (2000). Synucleins are expressed in the majority of breast and ovarian carcinomas and in preneoplastic lesions of the ovary. *Cancer* *88*, 2154–2163.
- Cazzalini, O., Scovassi, A.I., Savio, M., Stivala, L.A., and Prosperi, E. (2010). Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21CDKN1A in the DNA damage response. *Mutat. Res. Mutat. Res.* *704*, 12–20.
- Chavez, K.J., Garimella, S.V., and Lipkowitz, S. (2010). Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Breast Dis.* *32*, 35–48.
- Chen, J., Jiao, L., Xu, C., Yu, Y., Zhang, Z., Chang, Z., Deng, Z., and Sun, Y. (2012). Neural protein gamma-synuclein interacting with androgen receptor promotes human prostate cancer progression. *BMC Cancer* *12*, 593.
- Cho, R.W., Wang, X., Diehn, M., Shedden, K., Chen, G.Y., Sherlock, G., Gurney, A., Lewicki, J., and Clarke, M.F. (2008). Isolation and Molecular Characterization of Cancer Stem Cells in MMTV-Wnt-1 Murine Breast Tumors. *STEM CELLS* *26*, 364–371.
- Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H.M., Jones, D.L., Visvader, J., Weissman, I.L., and Wahl, G.M. (2006). Cancer Stem Cells—Perspectives on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells. *Cancer Res.* *66*, 9339–9344.
- Clayton, D.F., and George, J.M. The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends Neurosci.* *21*, 249–254.

Despots, C., Hazen, A.L., Paraiso, K.H.T., and Kerr, W.G. (2006). SHIP deficiency enhances HSC proliferation and survival but compromises homing and repopulation. *Blood* 107, 4338–4345.

D'SOUZA, B., MELOTY-KAPPELLA, L., and WEINMASTER, G. (2010). Canonical and non-canonical Notch ligands. *Curr. Top. Dev. Biol.* 92, 73–129.

Engelmann, K., Shen, H., and Finn, O.J. (2008). MCF7 Side Population Cells with Characteristics of Cancer Stem/Progenitor Cells Express the Tumor Antigen MUC1. *Cancer Res.* 68, 2419–2426.

Fan, Y., Borowsky, A.D., and Weiss, R.H. (2003). An Antisense Oligodeoxynucleotide to p21Waf1/Cip1 Causes Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. *Mol. Cancer Ther.* 2, 773–782.

Fu, C.-H., Lin, R.-J., Yu, J., Chang, W.-W., Liao, G.-S., Chang, W.-Y., Tseng, L.-M., Tsai, Y.-F., Yu, J.-C., and Yu, A.L. (2014). A Novel Oncogenic Role of Inositol Phosphatase SHIP2 in ER-Negative Breast Cancer Stem Cells: Involvement of JNK/Vimentin Activation. *STEM CELLS* 32, 2048–2060.

Fuhler, G., and Brooks, R. (2012). [No Title]. *Mol. Med.* 18, 1.

Geier, S.J., Algate, P.A., Carlberg, K., Flowers, D., Friedman, C., Trask, B., and Rohrschneider, L.R. (1997). The Human SHIP Gene Is Differentially Expressed in Cell Lineages of the Bone Marrow and Blood. *Blood* 89, 1876–1885.

George, J.M. (2002). The synucleins. *Genome Biol.* 3, reviews3002.1-reviews3002.6.

Ginestier, C., Hur, M.H., Charafé-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Jacquemier, J., Viens, P., Kleer, C.G., Liu, S., et al. (2007). ALDH1 Is a Marker of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome. *Cell Stem Cell* 1, 555–567.

Guo, J., Shou, C., Meng, L., Jiang, B., Dong, B., Yao, L., Xie, Y., Zhang, J., Chen, Y., Budman, D.R., et al. (2007). Neuronal protein synuclein γ predicts poor clinical outcome in breast cancer. *Int. J. Cancer* 121, 1296–1305.

Gupta, A., Inaba, S., Wong, O.K., Fang, G., and Liu, J. (2003). Breast cancer-specific gene 1 interacts with the mitotic checkpoint kinase BubR1. *Oncogene* 22, 7593–7599.

HE, K., and WANG, P. (2015). Unregulated long non-coding RNA-AK058003 promotes the proliferation, invasion and metastasis of breast cancer by regulating the expression levels of the γ -synuclein gene. *Exp. Ther. Med.* 9, 1727–1732.

He, X., Zheng, Y., Zhang, Y., Gan, Y., Zhou, Y., Liang, H., Wu, D., Ge, W., Deng, J., and Xu, X. (2016). Long non-coding RNA AK058003, as a precursor of miR-15a, interacts with HuR to inhibit the expression of γ -synuclein in hepatocellular carcinoma cells. *Oncotarget* 8, 9451–9465.

Herschkowitz, J.I., Simin, K., Weigman, V.J., Mikaelian, I., Usary, J., Hu, Z., Rasmussen, K.E., Jones, L.P., Assefnia, S., Chandrasekharan, S., et al. (2007). Identification of conserved gene

expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.* 8, R76.

Herschkowitz, J.I., Zhao, W., Zhang, M., Usary, J., Murrow, G., Edwards, D., Knezevic, J., Greene, S.B., Darr, D., Troester, M.A., et al. (2012). Comparative oncogenomics identifies breast tumors enriched in functional tumor-initiating cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 2778–2783.

Hua, H., Xu, L., Wang, J., Jing, J., Luo, T., and Jiang, Y. (2009). Up-regulation of gamma-synuclein contributes to cancer cell survival under endoplasmic reticulum stress. *J. Pathol.* 217, 507–515.

Hunkele, A., Sultan, H., Ikalina, F.A., Liu, A.H., Nahar-Gohad, P., and Ko, J.L. (2016). Identification of gamma-synuclein as a new PCBP1-interacting protein. *Neurol. Res.* 38, 1064–1078.

Huo, Y., and Macara, I.G. (2014). The Par3-like polarity protein Par3L is essential for mammary stem cell maintenance. *Nat. Cell Biol.* 16, 526–534.

Jia, T., Liu, Y.E., Liu, J., and Shi, Y.E. (1999). Stimulation of Breast Cancer Invasion and Metastasis by Synuclein γ . *Cancer Res.* 59, 742–747.

Jiang, Y., Liu, Y.E., Lu, A., Gupta, A., Goldberg, I.D., Liu, J., and Shi, Y.E. (2003). Stimulation of Estrogen Receptor Signaling by γ Synuclein. *Cancer Res.* 63, 3899–3903.

Kang, S.-M., Kim, M.-H., Song, K.-H., Jung, S.-Y., Ahn, J., Hwang, S.-G., Lee, J.-H., Lim, D.-S., and Song, J.-Y. (2015). Modulation of dendritic cell function by the radiation-mediated secretory protein γ -synuclein. *Cell Death Discov.* 1, cddiscovery201511.

Kavanaugh, W.M., Pot, D.A., Chin, S.M., Deuter-Reinhard, M., Jefferson, A.B., Norris, F.A., Masiarz, F.R., Cousens, L.S., Majerus, P.W., and Williams, L.T. (1996). Multiple forms of an inositol polyphosphate 5-phosphatase form signaling complexes with Shc and Grb2. *Curr. Biol.* 6, 438–445.

Kawakami, T., Chano, T., Minami, K., Okabe, H., Okada, Y., and Okamoto, K. (2006). Imprinted DLK1 is a putative tumor suppressor gene and inactivated by epimutation at the region upstream of GTL2 in human renal cell carcinoma. *Hum. Mol. Genet.* 15, 821–830.

Kim, Y., Lin, Q., Zeltermann, D., and Yun, Z. (2009). Hypoxia-Regulated Delta-like 1 Homologue Enhances Cancer Cell Stemness and Tumorigenicity. *Cancer Res.* 69, 9271–9280.

Kogata, N., Zvelebil, M., and Howard, B.A. (2013). Neuregulin 3 and erbb signalling networks in embryonic mammary gland development. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 18, 149–154.

Kralj, M., Husnjak, K., Körbler, T., and Pavelić, J. (2003). Endogenous p21^{WAF1/CIP1} status predicts the response of human tumor cells to wild-type p53 and p21^{WAF1/CIP1} overexpression. *Cancer Gene Ther.* 10, 7700588.

Lagadec, C., Vlashi, E., Della Donna, L., Dekmezian, C., and Pajonk, F. (2012). Radiation-Induced Reprogramming of Breast Cancer Cells. *STEM CELLS* 30, 833–844.

- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., and Dick, J.E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* *367*, 645.
- Lee, D., Yoon, S.H., Lee, H.J., Jo, K.W., Park, B.-C., Kim, I.S., Choi, Y., Lim, J.C., and Park, Y.W. (2016). Human soluble delta-like 1 homolog exerts antitumor effects in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *475*, 209–215.
- Li, Y., Welm, B., Podsypanina, K., Huang, S., Chamorro, M., Zhang, X., Rowlands, T., Egeblad, M., Cowin, P., Werb, Z., et al. (2003). Evidence that transgenes encoding components of the Wnt signaling pathway preferentially induce mammary cancers from progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 15853–15858.
- Liang, B., Wang, X.-J., Shen, P.-H., Li, X.-Y., Cheng, H.-W., Shan, Q., Guo, K.-Y., Cao, Y.-W., Fan, Q.-X., Zheng, R.-F., et al. (2013). Synuclein- γ suppression mediated by RNA interference inhibits the clonogenicity and invasiveness of MCF-7 cells. *Oncol. Lett.* *5*, 1347–1352.
- Liu, B.Y., McDermott, S.P., Khwaja, S.S., and Alexander, C.M. (2004a). The transforming activity of Wnt effectors correlates with their ability to induce the accumulation of mammary progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 4158–4163.
- Liu, C., Dong, B., Lu, A., Qu, L., Xing, X., Meng, L., Wu, J., Eric Shi, Y., and Shou, C. (2010). Synuclein gamma predicts poor clinical outcome in colon cancer with normal levels of carcinoembryonic antigen. *BMC Cancer* *10*, 359.
- Liu, C., Shi, B., Hao, C., Wang, Q., Lv, Q., Xing, N., Shou, J., Qu, L., Gao, Y., Qin, C., et al. (2016). Urine gamma-synuclein as a biomarker for the diagnosis of bladder cancer. *Oncotarget* *7*, 43432–43441.
- Liu, H., Liu, W., Wu, Y., Zhou, Y., Xue, R., Luo, C., Wang, L., Zhao, W., Jiang, J.-D., and Liu, J. (2005). Loss of Epigenetic Control of Synuclein- γ Gene as a Molecular Indicator of Metastasis in a Wide Range of Human Cancers. *Cancer Res.* *65*, 7635–7643.
- Liu, J., Spence, M.J., Zhang, Y.L., Jiang, Y., Liu, Y.E., and Shi, Y.E. (2000). Transcriptional suppression of synuclein γ (SNCG) expression in human breast cancer cells by the growth inhibitory cytokine oncostatin M. *Breast Cancer Res. Treat.* *62*, 99–107.
- Liu, Z.-M., Chen, G.G., Ng, E.K., Leung, W.-K., Sung, J.J., and Chung, S.S. (2004b). Upregulation of heme oxygenase-1 and p21 confers resistance to apoptosis in human gastric cancer cells. *Oncogene* *23*, 1207173.
- Ma, Z., Niu, J., Sun, E., Rong, X., Zhang, X., and Ju, Y. (2016). Gamma-synuclein binds to AKT and promotes cancer cell survival and proliferation. *Tumor Biol.* *37*, 14999–15005.
- Maroulakou, I.G., Anver, M., Garrett, L., and Green, J.E. (1994). Prostate and mammary adenocarcinoma in transgenic mice carrying a rat C3(1) simian virus 40 large tumor antigen fusion gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 11236–11240.
- Medema, J.P. (2013). Cancer stem cells: The challenges ahead. *Nat. Cell Biol.* *15*, 338–344.

- Mehta, M., Basalingappa, K., Griffith, J.N., Andrade, D., Babu, A., Amreddy, N., Muralidharan, R., Gorospe, M., Herman, T., Ding, W.-Q., et al. (2016). HuR silencing elicits oxidative stress and DNA damage and sensitizes human triple-negative breast cancer cells to radiotherapy. *Oncotarget* 7, 64820–64835.
- Menezes, M.E., Das, S.K., Emdad, L., Windle, J.J., Wang, X.-Y., Sarkar, D., and Fisher, P.B. (2014). Genetically Engineered Mice as Experimental Tools to Dissect the Critical Events in Breast Cancer. *Adv. Cancer Res.* 121, 331–382.
- Miao, S., Wu, K., Zhang, B., Weng, Z., Zhu, M., Lu, Y., Krishna, R., and Shi, Y.E. (2014). Synuclein γ Compromises Spindle Assembly Checkpoint and Renders Resistance to Antimicrotubule Drugs. *Mol. Cancer Ther.* 13, 699–713.
- Min, L., Zhang, C., Ma, R., Li, X., Yuan, H., Li, Y., Chen, R., Liu, C., Guo, J., Qu, L., et al. (2016). Overexpression of synuclein- γ predicts lack of benefit from radiotherapy for breast cancer patients. *BMC Cancer* 16.
- Mo, M., Xiao, Y., Huang, S., Cen, L., Chen, X., Zhang, L., Luo, Q., Li, S., Yang, X., Lin, X., et al. (2016). MicroRNA expressing profiles in A53T mutant alpha-synuclein transgenic mice and Parkinsonian. *Oncotarget* 8, 15–28.
- Network, T.C.G.A. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 490, 61.
- Neve, R.M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F.L., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, J.-P., Tong, F., et al. (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 10, 515–527.
- Nueda, M.-L., Baladrón, V., Sánchez-Solana, B., Ballesteros, M.-Á., and Laborda, J. (2007). The EGF-like Protein dlk1 Inhibits Notch Signaling and Potentiates Adipogenesis of Mesenchymal Cells. *J. Mol. Biol.* 367, 1281–1293.
- Nueda, M.-L., Naranjo, A.-I., Baladrón, V., and Laborda, J. (2017). Different expression levels of DLK1 inversely modulate the oncogenic potential of human MDA-MB-231 breast cancer cells through inhibition of NOTCH1 signaling. *FASEB J.* 31, 3484–3496.
- Oakes, S.R., Gallego-Ortega, D., and Ormandy, C.J. (2014). The mammary cellular hierarchy and breast cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 4301–4324.
- Pan, Z.-Z., Bruening, W., Giasson, B.I., Lee, V.M.-Y., and Godwin, A.K. (2002). γ -Synuclein Promotes Cancer Cell Survival and Inhibits Stress- and Chemotherapy Drug-induced Apoptosis by Modulating MAPK Pathways. *J. Biol. Chem.* 277, 35050–35060.
- Pannuti, A., Foreman, K., Rizzo, P., Osipo, C., Golde, T., Osborne, B., and Miele, L. (2010). Targeting Cancer Stem Cells through Notch Signaling. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 16, 3141–3152.
- Peitzsch, C., Tyutyunnykova, A., Pantel, K., and Dubrovskaya, A. (2017). Cancer stem cells: The root of tumor recurrence and metastases. *Semin. Cancer Biol.* 44, 10–24.
- Pfefferle, A.D., Herschkowitz, J.I., Usary, J., Harrell, J.C., Spike, B.T., Adams, J.R., Torres-Arzayus, M.I., Brown, M., Egan, S.E., Wahl, G.M., et al. (2013). Transcriptomic classification

of genetically engineered mouse models of breast cancer identifies human subtype counterparts. *Genome Biol.* *14*, R125.

Prat, A., Adamo, B., Cheang, M.C.U., Anders, C.K., Carey, L.A., and Perou, C.M. (2013). Molecular Characterization of Basal-Like and Non-Basal-Like Triple-Negative Breast Cancer. *The Oncologist* *18*, 123–133.

Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* *414*, 105–111.

Roarty, K., Shore, A.N., Creighton, C.J., and Rosen, J.M. (2015). Ror2 regulates branching, differentiation, and actin-cytoskeletal dynamics within the mammary epithelium. *J Cell Biol* *208*, 351–366.

Rohrschneider, L.R., Custodio, J.M., Anderson, T.A., Miller, C.P., and Gu, H. (2005). The intron 5/6 promoter region of the *ship1* gene regulates expression in stem/progenitor cells of the mouse embryo. *Dev. Biol.* *283*, 503–521.

Schaal, K., Hirschfeld, M., Bronsert, P., Füllgraf, H., Jäger, M., Herde, B., Nöthling, C., Mayer, S., Erbes, T., and Stickeler, E. (2015). Alternative splicing of synuclein gamma in endometrial cancer: identification of a novel isoform. *Oncotarget* *6*, 22553–22563.

Schroeder, J.A., Masri, A.A., Adriance, M.C., Tessier, J.C., Kotlarczyk, K.L., Thompson, M.C., and Gendler, S.J. (2004). MUC1 overexpression results in mammary gland tumorigenesis and prolonged alveolar differentiation. *Oncogene* *23*, 5739–5747.

Shackleton, M., Vaillant, F., Simpson, K.J., Stingl, J., Smyth, G.K., Asselin-Labat, M.-L., Wu, L., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2006). Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* *439*, 84–88.

Shafee, N., Smith, C.R., Wei, S., Kim, Y., Mills, G.B., Hortobagyi, G.N., Stanbridge, E.J., and Lee, E.Y.-H.P. (2008). Cancer Stem Cells Contribute to Cisplatin Resistance in *Brca1/p53*-Mediated Mouse Mammary Tumors. *Cancer Res.* *68*, 3243–3250.

Shao, Y., Wang, B., Shi, D., Miao, S., Manivel, P., Krishna, R., Chen, Y., and Eric Shi, Y. (2014). Synuclein gamma protects HER2 and renders resistance to Hsp90 disruption. *Mol. Oncol.* *8*, 1521–1531.

Shehata, M., Teschendorff, A., Sharp, G., Novcic, N., Russell, I.A., Avril, S., Prater, M., Eirew, P., Caldas, C., Watson, C.J., et al. (2012). Phenotypic and functional characterisation of the luminal cell hierarchy of the mammary gland. *Breast Cancer Res.* *14*, R134.

Siddhartha Yerramilli, V., and Scarlata, S. (2016). The breast cancer susceptibility gene product (γ -synuclein) alters cell behavior through its interaction with phospholipase C β . *Cell. Signal.* *28*, 91–99.

Simpson, P.T., Reis-Filho, J.S., Gale, T., and Lakhani, S.R. (2005). Molecular evolution of breast cancer. *J. Pathol.* *205*, 248–254.

Singh, V.K., Zhou, Y., Marsh, J.A., Uversky, V.N., Forman-Kay, J.D., Liu, J., and Jia, Z. (2007). Synuclein- γ Targeting Peptide Inhibitor that Enhances Sensitivity of Breast Cancer Cells to Antimicrotubule Drugs. *Cancer Res.* *67*, 626–633.

Sleeman, K.E., Kendrick, H., Ashworth, A., Isacke, C.M., and Smalley, M.J. (2005). CD24 staining of mouse mammary gland cells defines luminal epithelial, myoepithelial/basal and non-epithelial cells. *Breast Cancer Res.* 8, R7.

Stingl, J., and Caldas, C. (2007). Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nat. Rev. Cancer* 7, 791–799.

Stingl, J., Eirew, P., Ricketson, I., Shackleton, M., Vaillant, F., Choi, D., Li, H.I., and Eaves, C.J. (2006). Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature* 439, 993–997.

Strohl, A., Mori, K., Akers, S., Bshara, W., Buttin, B., Frederick, P.J., Helenowski, I.B., Morrison, C.D., Odunsi, K., Schink, J.C., et al. (2016). Synuclein- γ (SNCG) expression in ovarian cancer is associated with high-risk clinicopathologic disease. *J. Ovarian Res.* 9, 75.

Surguchev, A.A., and Surguchov, A. (2017). Synucleins and Gene Expression: Ramblers in a Crowd or Cops Regulating Traffic? *Front. Mol. Neurosci.* 10.

Surgucheva, I., and Surguchov, A. (2008). γ -Synuclein: Cell-Type-Specific Promoter Activity and Binding to Transcription Factors. *J. Mol. Neurosci.* 35, 267–271.

Surgucheva, I.G., Sivak, J.M., Elizabeth Fini, M., Palazzo, R.E., and Surguchov, A.P. (2003). Effect of γ -synuclein overexpression on matrix metalloproteinases in retinoblastoma Y79 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 410, 167–176.

Tanimizu, N., Nishikawa, M., Saito, H., Tsujimura, T., and Miyajima, A. (2003). Isolation of hepatoblasts based on the expression of Dlk/Pref-1. *J. Cell Sci.* 116, 1775–1786.

Tian, H., Wittmack, E.K., and Jorgensen, T.J. (2000). p21WAF1/CIP1 Antisense Therapy Radiosensitizes Human Colon Cancer by Converting Growth Arrest to Apoptosis. *Cancer Res.* 60, 679–684.

Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., and Jemal, A. Global cancer statistics, 2012. *CA. Cancer J. Clin.* 65, 87–108.

Tu, Z., Ninos, J.M., Ma, Z., Wang, J.-W., Lemos, M.P., Desponts, C., Ghansah, T., Howson, J.M., and Kerr, W.G. (2001). Embryonic and hematopoietic stem cells express a novel SH2-containing inositol 5'-phosphatase isoform that partners with the Grb2 adapter protein. *Blood* 98, 2028–2038.

Vaillant, F., Asselin-Labat, M.-L., Shackleton, M., Forrest, N.C., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2008). The Mammary Progenitor Marker CD61/ β 3 Integrin Identifies Cancer Stem Cells in Mouse Models of Mammary Tumorigenesis. *Cancer Res.* 68, 7711–7717.

Visvader, J.E. (2009). Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes Dev.* 23, 2563–2577.

Visvader, J.E., and Stingl, J. (2014). Mammary stem cells and the differentiation hierarchy: current status and perspectives. *Genes Dev.* 28, 1143–1158.

Voduc, K.D., Cheang, M.C.U., Tyldesley, S., Gelmon, K., Nielsen, T.O., and Kennecke, H. (2010). Breast Cancer Subtypes and the Risk of Local and Regional Relapse. *J. Clin. Oncol.* 28, 1684–1691.

Wang, Y., Liu, X., Zhang, H., Sun, L., Zhou, Y., Jin, H., Zhang, H., Zhang, H., Liu, J., Guo, H., et al. (2014). Hypoxia-Inducible lncRNA-AK058003 Promotes Gastric Cancer Metastasis by Targeting γ -Synuclein. *Neoplasia* 16, 1094–1106.

Weiss, R.H. (2003). p21Waf1/Cip1 as a therapeutic target in breast and other cancers. *Cancer Cell* 4, 425–429.

Wu, K., Weng, Z., Tao, Q., Lin, G., Wu, X., Qian, H., Zhang, Y., Ding, X., Jiang, Y., and Shi, Y.E. (2003). Stage-specific Expression of Breast Cancer-specific Gene γ -Synuclein. *Cancer Epidemiol. Prev. Biomark.* 12, 920–925.

Wu, K., Quan, Z., Weng, Z., Li, F., Zhang, Y., Yao, X., Chen, Y., Budman, D., Goldberg, I.D., and Shi, Y.E. (2007). Expression of neuronal protein synuclein gamma gene as a novel marker for breast cancer prognosis. *Breast Cancer Res. Treat.* 101, 259–267.

Yanai, H., Nakamura, K., Hijioka, S., Kamei, A., Ikari, T., Ishikawa, Y., Shinozaki, E., Mizunuma, N., Hatake, K., and Miyajima, A. (2010). Dlk-1, a cell surface antigen on foetal hepatic stem/progenitor cells, is expressed in hepatocellular, colon, pancreas and breast carcinomas at a high frequency. *J. Biochem. (Tokyo)* 148, 85–92.

Zhang, H., Kouadio, A., Cartledge, D., and Godwin, A.K. (2011). Role of Gamma-synuclein in Microtubule Regulation. *Exp. Cell Res.* 317, 1330–1339.

Zhang, M., Behbod, F., Atkinson, R.L., Landis, M.D., Kittrell, F., Edwards, D., Medina, D., Tsimelzon, A., Hilsenbeck, S., Green, J.E., et al. (2008). Identification of Tumor-initiating Cells in a p53 Null Mouse Model of Breast Cancer. *Cancer Res.* 68, 4674–4682.

Zhou, Y., Inaba, S., and Liu, J. (2006). Inhibition of synuclein- γ expression increases the sensitivity of breast cancer cells to paclitaxel treatment. *Int. J. Oncol.* 29, 289–295.

(2000). Favourable and unfavourable effects on long-term survival of radiotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *The Lancet* 355, 1757–1770.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Expression of SNCG in breast cancer cell lines. (A) Expression was analyzed by qRT-PCR using total RNA from different breast cancer cell lines. Levels of SNCG expression were normalized to those of RPLP0 internal control. Graph shows fold enrichment over normal immortalized breast epithelial hTERT-HME1 cells. Data represent the mean (\pm standard deviation, SD) of three independent experiments. (B) Representative immunoblot analysis

(n=3) was performed on whole cell lysate for SNCG expression using anti β -actin antibody as a loading control. (C) Representative photograph (n=3) of immunofluorescence analysis of SNCG protein expression (red) in MCF7 and T47D cells. Cells were counterstained with DAPI nuclear stain (blue); scale = 20 μ m.

Figure 2. Inhibition of SNCG expression increases breast cancer cell radiosensitivity. (A) siSNCG-treated T47D cells showed reduced RNA (left panel) and protein (right panel) expression compared to siScramble (siScr)-treated cells. Relative expression of SNCG mRNA (left panel) was assessed by qRT-PCR analysis (normalized against RPLP0). Data represent mean values \pm standard error of the mean of three independent experiments. Representative immunoblot analysis (n=3) (right panel) was performed on whole cell lysate for SNCG expression using anti β -actin antibody as a loading control. (B) siSNCG-treated T47D cells showed increased apoptosis after radiation treatment (8 and 12 Gy) compared to siScramble (siScr)-treated cells. Flow cytometry analysis was done to detect apoptotic and necrotic cells. Histogram shows the percentage of apoptotic cells 72 hours after irradiation (left panel). Data represent mean values \pm standard error of the mean of four independent experiments. *P* values were determined by Student's test $**P < 0.01$; ns = not significant. Representative cytometry analysis data (n=4) showing the percentage of Annexin-V and Propidium Iodide (PI) staining of T47D cells irradiated or not at a dose of 8 or 12 Gy (right panel). (C) siSNCG-treated MCF7 cells showed reduced RNA (left panel) and protein (right panel) expression compared to siScramble (siScr)-treated cells. Relative expression of SNCG mRNA (left panel) was assessed by qRT-PCR analysis (normalized against RPLP0). Data represent mean values \pm standard error of the mean of three independent experiments. Representative immunoblot analysis (n=3) (right panel) was performed on whole cell lysate for SNCG expression using anti β -actin antibody as a loading control. (D) siSNCG-treated MCF7 cells showed decreased clonogenic potential after

radiation treatment (4 and 8 Gy) compared to siScramble (siScr)-treated cells. Clonogenic cell survival assay was performed and curves show the percentage of survival after irradiation (left panel). Data represent mean values \pm standard error of the mean of three independent experiments, each done in triplicate. Representative pictures (n=3) of 2-week-old colonies after fixation and crystal violet staining were shown (right panel).

Figure 3. Ectopic expression in SUM159PT cells increases their resistance to ionizing radiation. (A) SUM159PT cells were transfected either with pCMV6-SNCG-GFP or pCMV6-A-GFP vector as a control (CTL) and GFP-positive cells were enriched by FACS. Representative photographs of SUM-CTL-GFP (left panels) and SUM-SNCG-GFP (right panels) cells expressing GFP (green) and stained with DAPI nuclear stain (blue); scale = 10 μ m. (B) SNCG expression was analyzed by qRT-PCR using total RNA from SUM-CTL-GFP and SUM-SNCG-GFP (left panels). Levels of SNCG expression were normalized to those of RPLP0 internal control. Graph shows fold enrichment over SUM-CTL-GFP cells. Data represent mean values \pm standard error of the mean of three independent experiments. Representative immunoblot analysis (n=3) was performed on whole cell lysate for SNCG-GFP fusion protein expression using anti β -actin antibody as a loading control (right panel). (C) SUM-SNCG-GFP cells showed decreased apoptosis after radiation treatment (12 Gy) compared to SUM-CTL-GFP cells. Flow cytometry was done to detect apoptotic and necrotic cells. Histogram shows the percentage of apoptotic cells 72 hours after irradiation (left panel). Data represent mean values \pm standard error of the mean of four independent experiments. *P* values were determined by Student's test **P* < 0.05; ns = not significant. Representative FACS analysis data (n=4) showing the percentage of Annexin-V and Propidium Iodide (PI) staining of SUM-CTL-GFP and SUM-SNCG-GFP cells irradiated or not at a dose of 12 Gy (right panel). (D) SUM-SNCG-GFP cells showed overall increased clonogenic potential after radiation

treatment (4, 8, and 12 Gy) compared to SUM-CTL-GFP cells. Clonogenic cell survival assay was performed and curves show the percentage of survival after irradiation (left panel). Data represent mean values \pm standard error of the mean of three independent experiments, each done in triplicate. Representative pictures (n=3) of 2-week-old colonies after fixation and crystal violet staining were shown(right panel).

Figure 4. SNCG expression attenuates p53 pathway activation and increases p21 expression in SUM159PT cells. (A) Representative pictures (n=3) of immunoblotting of phospho-p53 (Ser15), total-p53, p21, and β -actin on whole cell lysates of SUM-CTL-GFP and SUM-SNCG-GFP cells irradiated or not at a dose of 4, 8, and 12 Gy. Cells were lysed 24 hours after irradiation. (B) p21 Waf1/Cip1 expression was analyzed by qRT-PCR using total RNA from SUM-CTL-GFP and SUM-SNCG-GFP. Levels of p21 expression were normalized to those of RPLP0 internal control. Graph shows fold enrichment over SUM-CTL-GFP cells. Data represent mean values \pm standard error of the mean of three independent experiments.

Figure 1

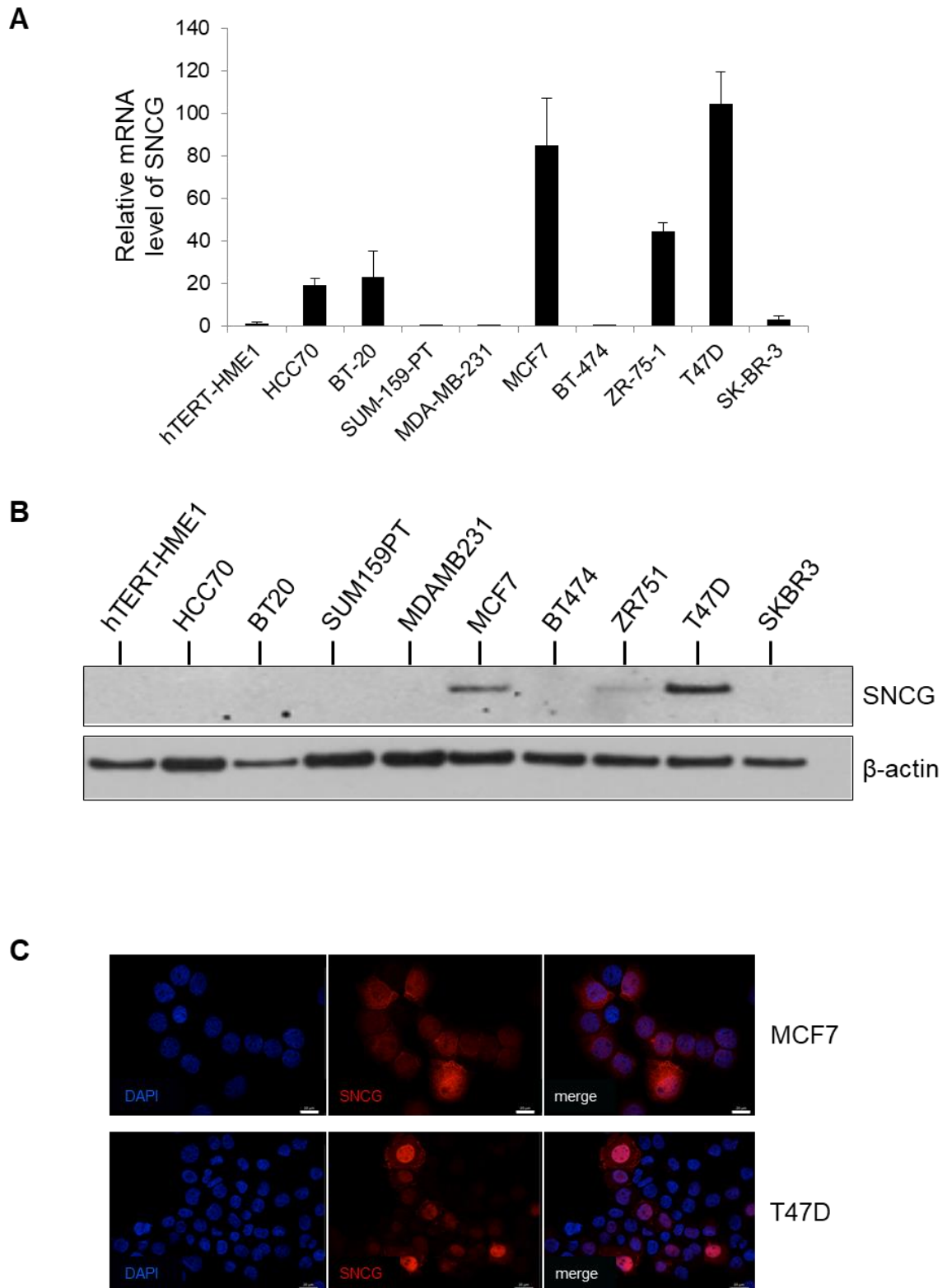


Figure 2

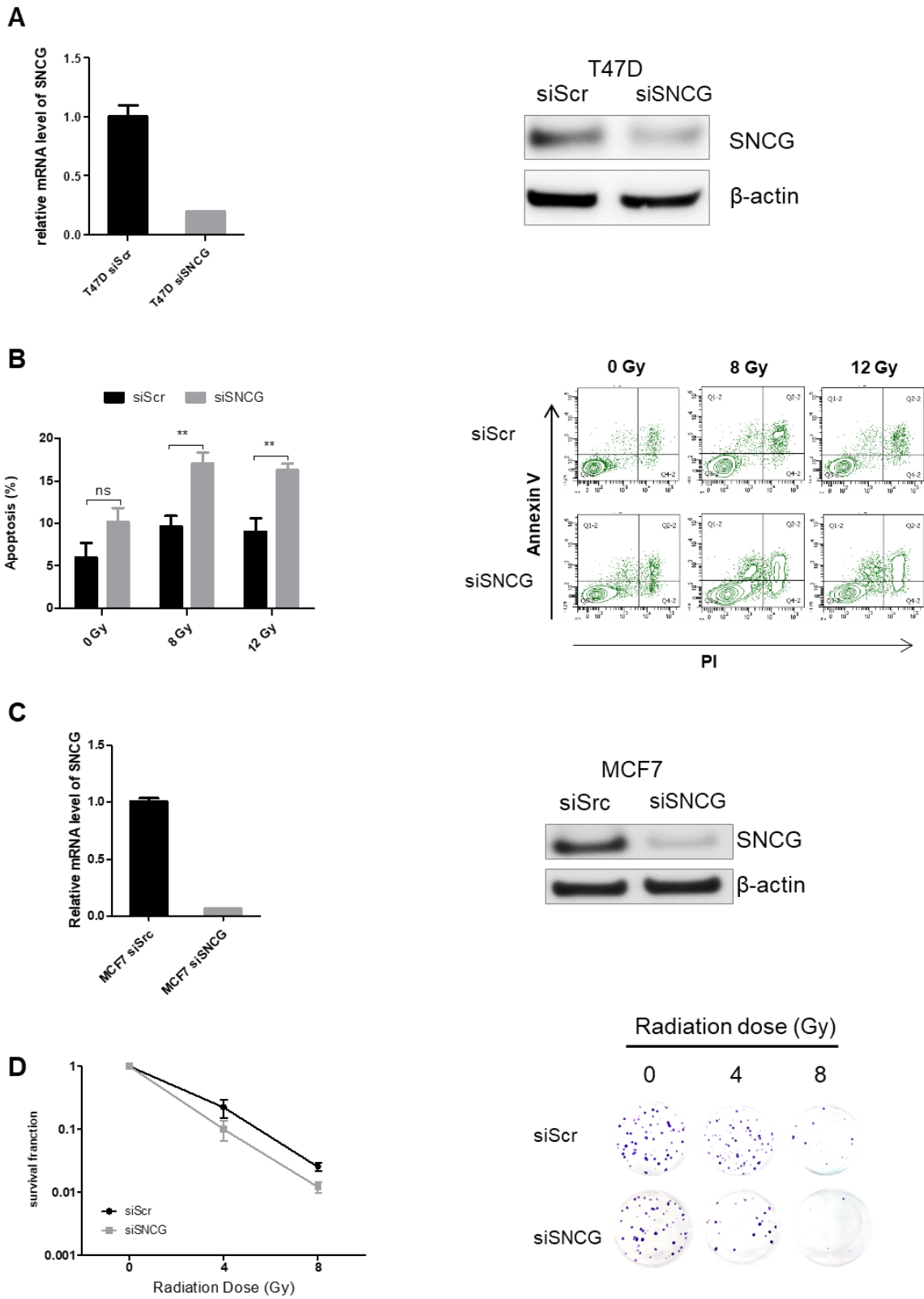


Figure 3

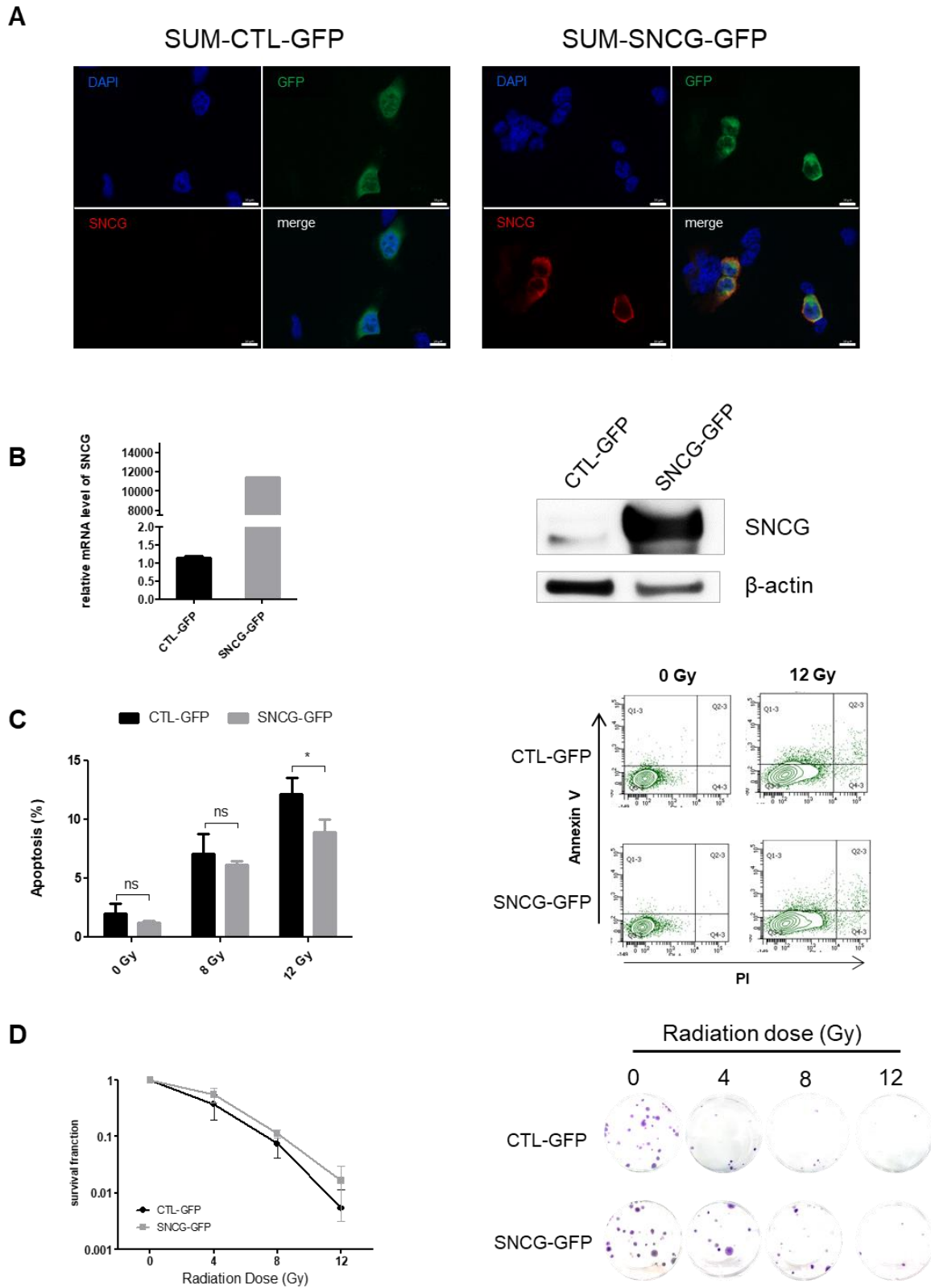
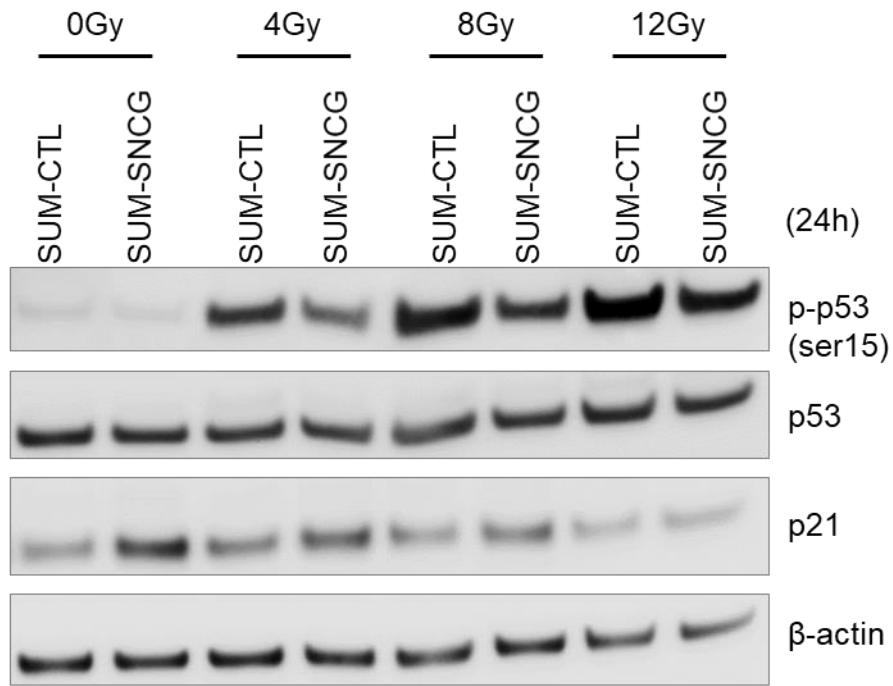
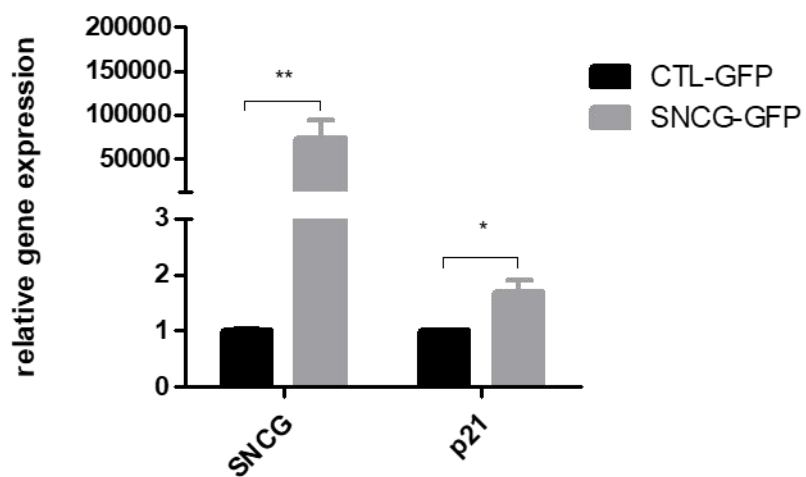


Figure 4

A



B



| |
|---------------------------|
| Résultats complémentaires |
|---------------------------|

L'article II est actuellement en révision pour une publication dans la revue Oncotarget. Nous avons obtenu de nouveaux résultats renforçant ceux qui ont été présentés dans l'article, mettant surtout en lumière l'implication de p21 dans la radiorésistance.

- *Expression de SNCG dans un panel de lignées cellulaires mammaires humaines*

Suite à la demande d'un des deux reviewers, nous avons re-déterminé l'expression de SNCG dans les lignées cellulaires mammaires normales et cancéreuses en ajoutant deux nouvelles lignées : MDA-MB 468 et MDA-MB 453 qui correspondent aux sous-types basal A et luminal respectivement (Tableau 9). Le résultat de western blot montre une concordance avec notre premier résultat et nous n'avons pas détecté l'expression de SNCG dans les deux nouvelles lignées (Figure 29).

| Lignée | ER | PR | HER2 | Type histologique | Sous-type |
|------------|----|----|---|---------------------------------|-------------------------|
| hTERT-HME1 | - | - | | Cellules normales immortalisées | Normal |
| HCC70 | - | - | | Carcinome canalaire infiltrant | Basal A |
| BT-20 | - | - | | Carcinome canalaire infiltrant | Basal A |
| MDA-MB-468 | - | - | | Adénocarcinome métastatique | Basal A |
| SUM-159-PT | - | - | | Carcinome anaplasique | Basal B/ Cladin-low |
| MDA-MB-231 | - | - | | Adénocarcinome métastatique | Basal B/ Claudin-low |
| MCF7 | + | + | | Adénocarcinome | Luminal |
| T47D | + | + | | Carcinome canalaire infiltrant | Luminal |
| BT-474 | + | + | + | Carcinome canalaire infiltrant | Luminal |
| ZR-75-1 | + | - | | Carcinome canalaire infiltrant | Luminal |
| SK-BR-3 | - | - | + | Adénocarcinome | Luminal |
| MDA-MB 453 | - | - | + (ErbB2 amplifié mais pas surexprimé) | Carcinome métastatique | Luminal |

Tableau 9. Caractéristiques des lignées cellulaires mammaires humaines utilisées dans cette étude (d'après (Kao et al., 2009; Neve et al., 2006; Prat et al., 2010).

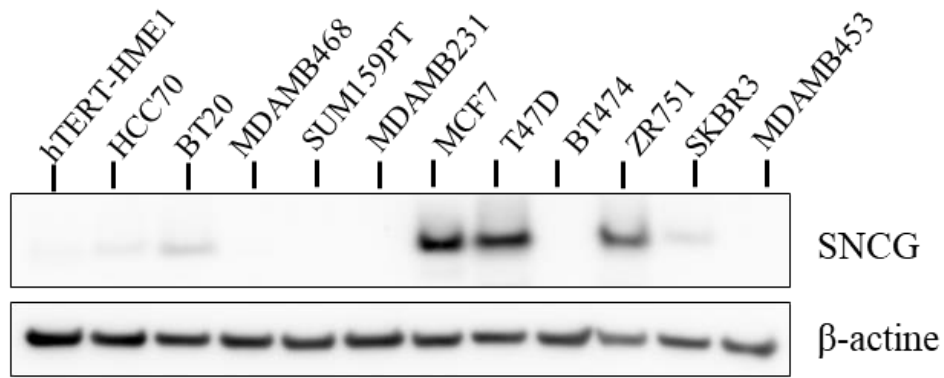


Figure 29: Analyse de l'expression de SNCG au niveau protéique par western blot.

Membrane représentative de deux expériences indépendantes.

- *L'inhibition de SNCG induit plus de sénescence dans la lignée MCF7 après irradiation*

Nos résultats dans l'article II démontrent que l'inhibition de SNCG dans les cellules MCF7 induit une diminution de clonogénicité après irradiation. Nous avons donc examiné si cela est dû à une augmentation de la mort cellulaire dans les cellules transfectées avec siSNCG. Nous n'avons pas observé de différence significative entre les deux populations (données non présentées). Ce résultat est en accord avec des études précédentes montrant que la lignée MCF7 est résistante à l'apoptose induite par irradiation malgré un p53 fonctionnel (Essmann et al., 2004). Par contre, il a été montré que l'irradiation induit surtout la sénescence dans les cellules MCF7 (Gewirtz et al., 2008; Karimi-Busheri et al., 2010). Nous avons donc évalué l'effet de l'inhibition de SNCG sur la sénescence induite par irradiation. Pour cela les cellules MCF7 ont été transfectées avec un siSNCG ou un siScramble, et 48h après transfection les cellules sont irradiées à différentes doses. Le nombre de cellules sénescents a été évalué par le marquage β -galactosidase (un marqueur de cellules sénescents) 72 heures après irradiation. Notre résultat montre que les cellules transfectées par siSNCG présentent plus de marquage par β -galactosidase que les cellules contrôles (Figure 30). Cette augmentation de sénescence pourrait expliquer la diminution de clonogénicité observée chez les cellules MCF7 siSNCG.

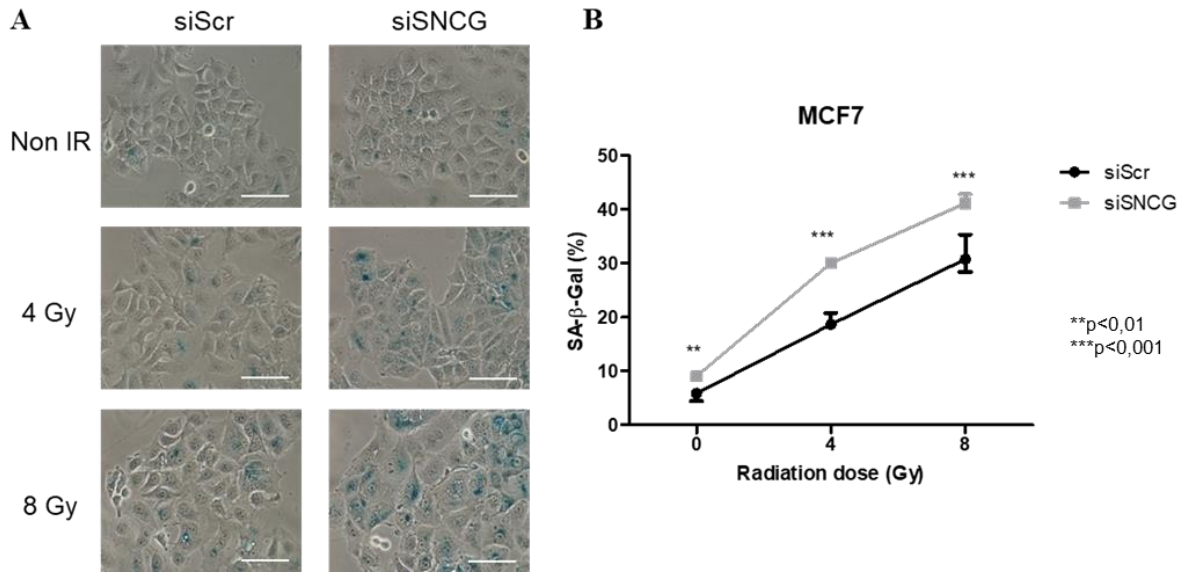


Figure 30: Inhibition de SNCG favorise la senescence induite par IR dans la lignée MCF7.

(A) Les photos représentatives de cellules marquées par β -Gal. Echelle = 100 μ m; (B) Le pourcentage de cellules positives pour le marquage β -Gal est calculé à partir de trois expériences indépendantes. Pour chaque condition, 12 photos ont été prises dans des champs aléatoires et au moins 500 cellules ont été comptées. (Test statistique : two-way ANOVA).

- *L'inhibition de p21 sensibilise les cellules SUM159PT à l'apoptose induite par l'irradiation*

Dans l'article II, nous avons mis en lumière une augmentation de l'expression de p21 dans les cellules SUM159PT exprimant SNCG, suggérant une implication de p21 dans la radiorésistance induite par SNCG. Afin de vérifier le rôle de p21 dans la radiorésistance dans notre système de cellules SUM159PT, nous avons inhibé l'expression de p21 par ARN interférant (sip21) et évalué son effet sur l'apoptose induite par irradiation. Nos résultats montrent que la diminution de p21 est associée à une plus forte apoptose quel que soit le niveau d'expression de SNCG dans les cellules (figure 31). Cet effet pro-apoptotique de sip21 semble être plus important dans les cellules exprimant SNCG (SUM-SNCG) notamment à la dose de 12 Gy; mais ceci n'est pas significativement différent par rapport aux cellules sans SNCG (SUM-CTL). Ces résultats démontrent que l'inhibition de p21 sensibilise les cellules SUM159PT à l'apoptose par irradiation, ce qui montre que p21 est bien impliqué dans la radiorésistance des cellules SUM159PT. Donc cela renforce notre hypothèse du rôle de p21 dans la radiorésistance favorisée par l'expression ectopique de SNCG.

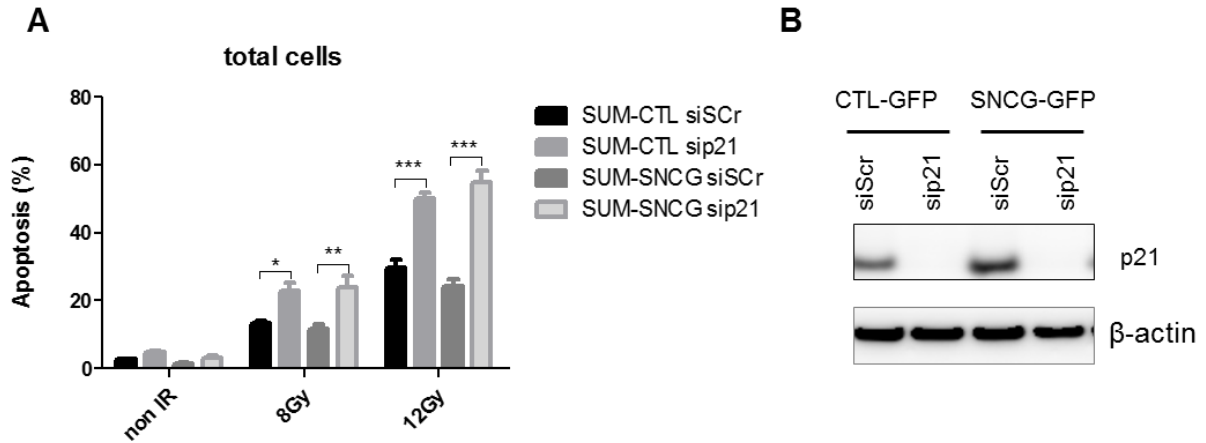


Figure 31: Inhibition de p21 favorise l'apoptose induite par IR dans la lignée SUM159PT.

(A) Les cellules ont été transféctées par un vecteur vide siScr ou un sip21, 48h après transfection, les cellules sont irradiées à différentes doses et l'apoptose est analysée 96h après irradiation en utilisant le marquage par l'annexine-V et IP; (B) La membrane western blot représentative montre que le sip21 inhibe efficacement l'expression de p21 (Test statistique : two-way ANOVA).

Discussion et perspectives

De grands progrès ont été faits dans la compréhension et la lutte contre le cancer. Cependant, l'un des problèmes majeurs reste la rechute des patients après traitement. Les tumeurs sont hétérogènes et chaque type cellulaire de la tumeur ou de son microenvironnement joue un rôle ; mais il est clair à présent que les CSC représentent l'un des moteurs essentiels de la récurrence et de progression tumorale. Une meilleure connaissance de la nature des CSC, des mécanismes régulant leur auto-renouvellement, leur plasticité, et leur résistance permettra de développer des thérapies ciblées innovantes, ce qui devrait aboutir à une amélioration significative de la survie des patients. L'un des approches essentielles à cette connaissance des CSC consiste à isoler ces CSC en utilisant des marqueurs spécifiques. Les travaux réalisés au cours de ma thèse ont permis de mettre en évidence l'intérêt du promoteur de s-SHIP dans l'isolement et la caractérisation de CSC mammaires chez la souris. C'est une première étape qui a permis de répondre à la question principale qui était posée, et qui amènent à poser de nouvelles questions et à ouvrir plusieurs perspectives pour l'avenir.

Le promoteur de s-SHIP : un marqueur de CS mammaires normales

La validité du marqueur s-SHIP comme marqueur de cellules souches normales a été démontrée dans le cas des cellules embryonnaires (Rohrschneider et al., 2005), de la glande mammaire (Bai and Rohrschneider, 2010) et prostatique (Brocqueville et al., 2016). Dans le cas de glande mammaire normale, les cellules s-SHIP/GFP⁺ représentent une sous-population de cellules basales présentes à deux stades du développement mammaire : à la puberté, ce sont les « *cap cells* » qui sont à l'extrémité du TEB (*terminal end bud*), et lorsque les souris sont gravides au niveau des bourgeons alvéolaires en croissance au début de la gestation. La transplantation orthotopique des cellules GFP⁺ de ces deux stades a permis de générer une glande mammaire fonctionnelle (Bai and Rohrschneider, 2010). Les « *cap cells* » ont été considérées comme un réservoir de cellules souches mammaires (MaSCs) bipotentes car différentes observations suggèrent qu'elles donnent naissance aux cellules myoépithéliales et contribuent au lignage luminal (Srinivasan et al., 2003; Williams and Daniel, 1983). Ces données renforcent le rôle de promoteur de s-SHIP comme marqueur de MaSCs. Cependant, comme décrit dans l'introduction, l'utilisation de la transplantation orthotopique a fait débat dans les études des cellules souches et les expériences de *lineage tracing* montrent des résultats

contradictoires sur les « *cap cells* », suggérant que les cellules dans le corps du TEB pourraient être les cellules souches mammaires (Rios et al., 2014; Van Keymeulen et al., 2011), tandis que les *cap cells* ne seraient que des cellules souches ou progéniteurs limités au lignage basal, ce qui semble mettre en cause la validité de s-SHIP en tant que marqueur de MaSCs bipotentes (Paine and Lewis, 2017). Néanmoins, il est intéressant de noter que les cellules s-SHIP/GFP⁺ présentent un niveau élevé de l'expression des gènes de la voie Wnt (Roarty et al., 2015) ainsi que l'expression de Par3L (Huo and Macara, 2014). L'activation de la voie Wnt est considérée comme une des caractéristiques des cellules souches dans de nombreux tissus dont la glande mammaire (Yu et al., 2016). La protéine Par3L est un régulateur de polarité cellulaire essentiel au maintien de l'auto-renouvellement des cellules souches mammaires (Santoro et al., 2016). De plus, un nombre croissant d'études proposent que le compartiment MaSCs est hétérogène, comprenant des MaSCs foetales, des MaSCs quiescentes à cycle lent, et des MaSCs actives possédant une capacité de générer une glande mammaire fonctionnelle (Visvader and Stingl, 2014). Le fait que les cellules s-SHIP/GFP⁺ soient observées uniquement pendant la puberté et la gestation suggèrent qu'elles sont des MaSCs activées présentes dans la glande mammaire en développement. L'expérience essentielle pour régler cette question de bipotence des cellules s-SHIP/GFP⁺ serait de réaliser une expérience de *lineage tracing* qui permettra de visualiser la descendance (basale et/ou luminale) des cellules s-SHIP/GFP⁺. Pour cela, il sera nécessaire de créer une nouvelle lignée de souris transgéniques dans laquelle le promoteur de s-SHIP contrôlerait par exemple l'expression d'une recombinaison inductible de type Cre-ER. En croisant ces souris avec des souris de lineage tracing de type ROSA26, on pourra déterminer la descendance des cellules s-SHIP/GFP⁺ à la puberté et lors de la gestation selon le moment où l'inducteur de la recombinaison Cre sera injecté à la souris (Rios et al., 2014).

Le promoteur de s-SHIP : un marqueur de CS mammaires cancéreuses

Précédemment à ma thèse, l'intérêt du promoteur de s-SHIP comme marqueur de CSC n'avait pas été exploré. Seule l'équipe du Dr. Rohrschneider avait décrit la présence de cellules GFP⁺ dans des tumeurs mammaires de souris biTg 11.5kb-GFP x MMTV-Wnt1. A l'inverse, dans des tumeurs mammaires de souris biTg 11.5kb-GFP x MMTV-ErbB2/neu/HER2, ils n'avaient pas détecté de cellules GFP⁺ (Bai and Rohrschneider., 2010). Comme les tumeurs MMTV-Wnt1 sont d'un phénotype mixte basale et luminale alors que les tumeurs MMTV-ErbB2 sont de phénotype luminal, ce résultat renforçait l'idée de l'association entre expression de s-SHIP et cellules myoépithéliales/basales (Bai and Rohrschneider., 2010). Suite à ces

observations, nous avons choisi le modèle de souris Tg C3(1)Tag comme modèle d'étude car il présente deux intérêts majeurs pour le laboratoire: d'une part, ces souris développent des tumeurs mammaires chez les femelles et prostatiques, chez le mâle, ce qui nous donnait l'opportunité d'étudier ces deux types de cancers au sein de la même lignée ; et d'autre part, les tumeurs mammaires correspondent au sous-type basal-like chez l'homme. En croisant les souris C3(1)Tag avec les souris s-SHIP-GFP, nous avons détecté les cellules GFP⁺ dans les tumeurs mammaires et les tests fonctionnels *in vitro* et *in vivo* démontrent que la population de cellules GFP⁺ est enrichie en CSC. Ce résultat a permis de répondre à la question principale posée au début de ma thèse.

Cependant, le modèle de souris Tg C3(1)Tag présente des limites dont la principale est la présence de l'antigène T qui est à l'origine de l'échec des greffes lors de l'injection de cellules tumorales dans les souris syngéniques immunocompétentes (Aprelikova et al., 2016). Ainsi nous avons eu des difficultés à obtenir des tumeurs lorsque les cellules tumorales étaient injectées à des souris syngéniques FVB ; même si nous avons pu montrer une meilleure tumorigénicité pour les cellules Lin⁻CD49f⁺GFP⁺ par rapport aux cellules Lin⁻CD49f⁺GFP⁻ (article I, figure S3B), les résultats n'ont pas été satisfaisants puisque l'on observe une meilleure prise de greffe à 100 cellules qu'à 1000 cellules injectées (article I, figure S3B). Ceci nous a conduit à travailler avec des souris receveuses immunodéprimées SCID, ce qui a pu introduire certains biais dans nos résultats puisque dans leur environnement « naturel » des tumeurs primaires C3(1)Tag, il existe de nombreuses cellules immunitaires présentes au sein de la tumeur (nos résultats non présentés) (Park et al., 2015). Pour éviter ce problème, il serait intéressant de poursuivre ce projet en utilisant un autre modèle de tumorigénèse mammaire tels que les souris transgéniques MMTV-Wnt1 ou p53-null qui développent des tumeurs de différents sous-types (basal-Like, luminal, claudin-low) (Herschkowitz et al., 2007). Ceci permettrait de travailler dans un environnement immunocompétent lors des tests de tumorigénicité. De plus, cela apporterait de nouvelles informations sur la relation entre expression de s-SHIP et sous-type de tumeur, Enfin, cela permettrait de déterminer si notre résultat obtenu dans les souris C3(1) Tag peut être transposable à d'autres types de tumeurs avec une origine différente et/ou un sous-type différent.

Il faut souligner que dans l'étude des CSC mammaires, de nombreux marqueurs ont été proposés, parmi lesquels les principaux sont CD24, CD44, ALDH, side population, ESA, CD133. Certains marqueurs sont plus étudiés dans la littérature mais il semble évident aujourd'hui qu'un seul phénotype ne suffit pas pour identifier les CSC et que plusieurs

populations de CSC peuvent coexister au sein d'une tumeur. Est-ce que cellules s-SHIP/GFP⁺ expriment un autre marqueur de CSC comme ALDH ? Nous avons abordé cette question en utilisant le kit AldeRed ALDH Detection Assay (MERCK) sur notre lignée cellulaire MAM326 dérivée d'une tumeur mammaire qui possèdent une sous-population s-SHIP/GFP⁺. Ces lignées ne montrent pas d'activité d'ALDH. En revanche, nous avons détecté une augmentation significative de s-SHIP endogène dans la lignée humaine SUM159PT enrichie en ALDH1A1 (collaboration avec Chann Lagadec, Inserm U908). Ces données restent préliminaires et nécessitent d'être approfondies.

Origine, métastases et niche des CSC s-SHIP/GFP⁺

Plusieurs questions intéressantes n'ont pas pu être traitées durant ma thèse, mais maintenant que le système est en place, il serait possible de les aborder. Pour mes travaux de thèse, nous avons choisi d'utiliser les tumeurs au stade avancé (à partir de 4 mois) afin d'obtenir assez de matériels biologiques pour les études *in vitro* et *in vivo*. Il serait maintenant intéressant d'étudier à quel moment les cellules GFP⁺ apparaissent au cours du développement tumoral. On sait que dans le développement normal de la glande mammaire des souris Tg11.5kb-GFP, il n'y a pas de cellules GFP⁺ après la puberté (sauf si la souris devient gestante). On pourrait suivre dès les premiers stades du développement tumoral à 8 semaines par FACS la présence de cellules GFP⁺ et également leur phénotype (différents marqueurs de surface). Cela pourrait également apporter des informations sur l'origine des cellules GFP⁺ : apparaissent-elles tardivement dans le compartiment des cellules basales, impliquant des possibles mécanismes de reprogrammation ou bien est-ce qu'elles sont présentes dès les premiers stades d'hyperplasie à 8-10 semaines et se maintiennent tout au long du développement tumoral ? Une étude sur coupe pourrait être réalisée aussi. Un des aspects qui n'a pas été abordé dans ma thèse est le microenvironnement des cellules GFP⁺ au sein de la tumeur ; l'expression de la GFP permet une étude *in situ* et on peut envisager des études d'immunofluorescences pour analyser les cellules de la niche des cellules GFP⁺. Enfin, il a été décrit dans la littérature que les souris C3(1) Tag développent des métastases pulmonaires dans 10-20 % des cas. Il serait très intéressant de rechercher la présence ou non de cellules GFP⁺ dans ces métastases.

Rôle de la phosphatase s-SHIP : potentielle cible thérapeutique ?

Le rôle physiologique de s-SHIP est peu connu et n'a pas été abordé lors de ma thèse. Son expression restreinte aux cellules souches embryonnaires et hématopoïétiques suggère un rôle spécifique lié à son activité phosphatase qui régule la voie PI3K (Tu et al., 2001) (Despont et al., 2006). Quel est son rôle dans la nature de CSC ? Est-ce que son expression est nécessaire pour la survie, l'auto-renouvellement et la résistance des CSC ? On peut envisager l'utilisation des inhibiteurs de SHIP1 (Brooks et al., 2015; Fuhler and Brooks, 2012) ou des siARN pour tester le rôle de s-SHIP dans la nature de CSC; mais la difficulté se situe au niveau du choix d'un modèle cellulaire pertinent dans le contexte de cancer du sein. La plupart des lignées cellulaires humaines de cancer du sein présentent un faible niveau de s-SHIP endogène (données obtenues au laboratoire). Comme première approche, nous pourrions tester l'effet de siRNA dans le système des tumeur-sphères que j'ai mis en place notamment dans l'étude du rôle de DLK1.

Pertinence des gènes associés aux propriétés souches

Notre analyse transcriptomique a comparé les cellules $\text{Lin}^- \text{CD49f}^+ \text{GFP}^-$ et $\text{Lin}^- \text{CD49f}^+ \text{GFP}^+$. Nous avons rencontré plusieurs problèmes à cause de la faible quantité d'ARN isolé ce qui nous a obligé à utiliser des ARN dont la qualité n'était pas la meilleure possible. Nous avons ainsi obtenu une liste de gènes différentiellement exprimés et dont la fonction et/ou l'expression nous semblaient pertinentes dans le contexte de cellules souches, comme la protéine MUC1 (Mucin-1), CD59a, et DLK1. La surexpression aberrante de MUC1 glycosylé a été observée dans la plupart des cancers de tissus épithéliaux comme le poumon et la glande mammaire (Nath and Mukherjee, 2014). MUC1 est surexprimée dans les cellules GFP^+ (Fc=2,2) et une étude récente a montré son implication dans les CSC du sein : la sous-unité C-terminale de MUC1 favorise l'activité de Bmi1 en induisant sa transcription et bloquant sont inhibiteur miR200C dans le cancer du sein, suggérant un rôle de MUC1 dans le maintien de CSC (Hiraki et al., 2017). CD59a (surexprimé de 1,9 fois dans les cellules GFP^+) est un isoforme de CD59 qui joue un rôle crucial dans le système du complément de l'immunité innée et contribue à la résistance des cellules tumorales aux anticorps anticancéreux (Hu et al., 2011; Macor et al., 2015). De façon intéressante, il a été montré récemment que Sox2 augmente l'expression de CD59, ce qui permet aux CSC d'échapper à la surveillance du complément (Chen et al., 2016).

Discussion et perspectives

Enfin, nous nous sommes intéressés à la protéine DLK1 dont l'expression est significativement diminuée dans les cellules GFP⁺ (Fc=4,5) et cette diminution a été confirmée par RT-qPCR sur quatre tumeurs indépendantes. DLK1 qui est aussi connu sous le nom de Pref-1 (*pre-adipocyte factor-1*) fait partie de la famille des facteurs de croissance épidermiques (Smas and Sul, 1993). Il intervient dans plusieurs processus développementaux comme l'adipogenèse et son expression aberrante a été détectée dans de nombreux cancers dont le cancer du sein (Falix et al., 2012). Il a été montré que DLK joue un rôle crucial dans le maintien de CSC neuronales et que son inhibition induit la différenciation des CSC (Begum et al., 2012; Kim et al., 2009); mais son rôle dans les CSC mammaires n'est pas clair. DLK1 a été décrit comme un ligand non canonique de la voie Notch qui pourrait inhiber l'activité de Notch1 *in vitro* (Baladrón et al., 2005; Nueda et al., 2007, 2017). Etant donné le rôle essentiel de la voie Notch dans le maintien de cellules souches, notre hypothèse était que la diminution de DLK1 pourrait favoriser le phénotype de cellules souches dans notre modèle. Nous avons d'abord vérifié cette hypothèse par inhibition de l'expression de DLK1 *in vitro* sur les cellules GFP⁻ triées à partir des tumeurs bi-Tg. Ces cellules ont été transfectées avec un siDLK ou siScramble comme contrôle et ont été cultivées en condition de sphère. Nos résultats montrent que l'inhibition transitoire de DLK1 augmente significativement la capacité des cellules GFP⁻ à former des sphères *in vitro*. Afin de tester notre hypothèse *in vivo*, nous avons réalisé des expériences préliminaires en injectant les cellules GFP⁻ transfectées avec siScramble ou siDLK dans les souris SCID pour comparer leur capacité de générer des tumeurs. Malheureusement, ces expériences *in vivo* n'ont pas montré un avantage pour les cellules siDLK. Plusieurs explications sont possibles comme la validité (la durée de vie) des siARN *in vivo*. Pour poursuivre cette approche, on peut envisager d'injecter les cellules GFP⁻ transfectées avec un shDLK1 permettant une inhibition stable de DLK1. Une étude récente a montré que l'expression différentielle de DLK1 pourrait moduler la prolifération et l'invasion de la lignée MDA-MB-231 via une régulation de Notch1 (Nueda et al., 2017). Nous envisageons donc de surexprimer DLK1 dans notre lignée modèle SUM159PT pour déterminer ses effets, notamment sa tumorigénicité et la formation de sphères.

Comme décrit précédemment, la dernière analyse transcriptomique a révélé plusieurs gènes intéressants mais elle pose plusieurs questions notamment par rapport au faible nombre de gènes dérégulés lorsque nous la comparons avec notre précédente étude transcriptomique sur les cellules souches prostatiques (Brocqueville et al., 2016). Même s'il s'agit de deux types cellulaires différents (cellule prostatique normale versus cellule cancéreuse mammaire), cette

différence nous mène à nous interroger sur la pertinence de cette technique dans le cadre de ma thèse. La faible quantité/qualité d'ARN pourrait expliquer en partie le résultat non optimal. Nous avons également observé une hétérogénéité importante au niveau du profil d'expression génique des quatre tumeurs utilisées pour l'analyse, ce qui pourrait masquer l'expression de certains gènes intéressants. Pour régler cette question, il serait intéressant de refaire une analyse mais cette fois par séquençage haut débit (RNAseq) qui demande moins de matériel biologique et permet de mettre en évidence un plus large spectre de gènes dérégulés ainsi que des mutations à faible pourcentage. Enfin, l'un des aspects que nous n'avons pas pu traiter et qui mériterait une étude concerne l'expression des miRNA dont on sait qu'il joue un rôle dans la régulation des CSC (Shimono et al., 2015).

Intérêt de s-SHIP dans le diagnostic et le traitement du cancer du sein

Il est difficile de déterminer l'expression de s-SHIP dans les tumeurs humaines car s-SHIP est une forme courte de SHIP1 et donc ils possèdent la même séquence nucléotique. Comme SHIP1 est présent en abondance dans les cellules hématopoïétiques et immunitaires qui infiltrent les tumeurs, il n'est pas possible de faire la différence entre la présence potentielle de CSC s-SHIP⁺ et des macrophages par exemple. Seul un séquençage permettrait de mettre en évidence la région SSR de 44 nucléotides qui n'est présente qu'au début du transcrit s-SHIP (Tu et al., 2001). Une des approches est également de tester la construction 11.5kb-GFP dans des lignées humaines pour tenter d'isoler une population s-SHIP/GFP⁺ et de l'analyser. Cela a été fait avec les cellules de prostate RWPE-1 qui ne sont pas des cellules cancéreuses. Nos premiers essais avec la lignée SUM159PT ont été décevants car on perd rapidement les cellules GFP⁺ après transfection et tri cellulaire. De plus, le promoteur 11.5kb est d'origine murine et il serait préférable d'utiliser le promoteur humain qui reste à cloner. La question de poursuivre cette approche reste posée actuellement.

Même si l'utilisation directe de s-SHIP comme marqueur de CSC dans les tumeurs humaines semblent difficile à présent, nos études ont permis de dévoiler et valider des molécules d'intérêt : comme SNCG et son rôle dans la radiorésistance et DLK1 comme régulateur de la nature CSC et dont le rôle exact requiert d'autres études. On peut donc envisager que si l'on continue ce travail, notamment avec d'autres modèles animaux, et d'autres approches technologiques, on pourra dévoiler des gènes d'intérêt pour le diagnostic et/ou le traitement du cancer du sein.

Références bibliographiques

Abel, E.V., Kim, E.J., Wu, J., Hynes, M., Bednar, F., Proctor, E., Wang, L., Dziubinski, M.L., and Simeone, D.M. (2014). The Notch pathway is important in maintaining the cancer stem cell population in pancreatic cancer. *PLoS One* 9, e91983.

Adams, S., Diamond, J.R., Hamilton, E.P., Pohlmann, P.R., Tolaney, S.M., Molinero, L., He, X., Waterkamp, D., Funke, R.P., and Powderly, J.D. (2016). Phase Ib trial of atezolizumab in combination with nab-paclitaxel in patients with metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC). *J. Clin. Oncol.* 34, 1009–1009.

Afshar, G., Jelluma, N., Yang, X., Basila, D., Arvold, N.D., Karlsson, A., Yount, G.L., Dansen, T.B., Koller, E., and Haas-Kogan, D.A. (2006). Radiation-induced caspase-8 mediates p53-independent apoptosis in glioma cells. *Cancer Res.* 66, 4223–4232.

Aghajanyan, A., and Suskov, I. (2009). Transgenerational genomic instability in children of irradiated parents as a result of the Chernobyl Nuclear Accident. *Mutat. Res.* 671, 52–57.

Ahmad, M., Attoub, S., Singh, M.N., Martin, F.L., and El-Agnaf, O.M.A. (2007). γ -Synuclein and the progression of cancer. *FASEB J.* 21, 3419–3430.

Ahuja, D., Sáenz-Robles, M.T., and Pipas, J.M. (2005). SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. *Oncogene* 24, 7729–7745.

Ailles, L.E., and Weissman, I.L. (2007). Cancer stem cells in solid tumors. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 460–466.

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.* 100, 3983–3988.

Allan, J.M., and Travis, L.B. (2005). Mechanisms of therapy-related carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 5, 943–955.

Allenspach, E.J., Maillard, I., Aster, J.C., and Pear, W.S. (2002). Notch signaling in cancer. *Cancer Biol. Ther.* 1, 466–476.

van Amerongen, R., Bowman, A.N., and Nusse, R. (2012). Developmental stage and time dictate the fate of Wnt/ β -catenin-responsive stem cells in the mammary gland. *Cell Stem Cell* 11, 387–400.

Aprelikova, O., Tomlinson, C.C., Hoenerhoff, M., Hixon, J.A., Durum, S.K., Qiu, T., He, S., Burkett, S., Liu, Z.-Y., Swanson, S.M., et al. (2016). Development and Preclinical Application of an Immunocompetent Transplant Model of Basal Breast Cancer with Lung, Liver and Brain Metastases. *PLoS ONE* 11.

Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., and Lake, R.J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284, 770–776.

Asangani, I.A., Rasheed, S. a. K., Nikolova, D.A., Leupold, J.H., Colburn, N.H., Post, S., and Allgayer, H. (2008). MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor

Références bibliographiques

suppressor *Pdcd4* and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* 27, 2128–2136.

Asselin-Labat, M.-L., Sutherland, K.D., Barker, H., Thomas, R., Shackleton, M., Forrest, N.C., Hartley, L., Robb, L., Grosveld, F.G., van der Wees, J., et al. (2007). *Gata-3* is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation. *Nat. Cell Biol.* 9, 201–209.

Azzam, E.I., de Toledo, S.M., and Little, J.B. (2004). Stress signaling from irradiated to non-irradiated cells. *Curr. Cancer Drug Targets* 4, 53–64.

Azzam, E.I., Jay-Gerin, J.-P., and Pain, D. (2012). Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett.* 327, 48–60.

Bai, L., and Rohrschneider, L.R. (2010). *s-SHIP* promoter expression marks activated stem cells in developing mouse mammary tissue. *Genes Dev.* 24, 1882–1892.

Baladrón, V., Ruiz-Hidalgo, M.J., Nueda, M.L., Díaz-Guerra, M.J.M., García-Ramírez, J.J., Bonvini, E., Gubina, E., and Laborda, J. (2005). *dlk* acts as a negative regulator of Notch1 activation through interactions with specific EGF-like repeats. *Exp. Cell Res.* 303, 343–359.

Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D., and Rich, J.N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444, 756–760.

Barber, R.C., Hickenbotham, P., Hatch, T., Kelly, D., Topchiy, N., Almeida, G.M., Jones, G.D.D., Johnson, G.E., Parry, J.M., Rothkamm, K., et al. (2006). Radiation-induced transgenerational alterations in genome stability and DNA damage. *Oncogene* 25, 7336–7342.

Bartelink, H., Horiot, J.-C., Poortmans, P., Struikmans, H., Van den Bogaert, W., Barillot, I., Fourquet, A., Borger, J., Jager, J., Hoogenraad, W., et al. (2001). Recurrence Rates after Treatment of Breast Cancer with Standard Radiotherapy with or without Additional Radiation. *N. Engl. J. Med.* 345, 1378–1387.

Basse, C., and Arock, M. (2015). The increasing roles of epigenetics in breast cancer: Implications for pathogenicity, biomarkers, prevention and treatment. *Int. J. Cancer* 137, 2785–2794.

Battle, E., and Clevers, H. (2017). Cancer stem cells revisited. *Nat. Med.* 23, 1124–1134.

Bauderlique-Le Roy, H., Vennin, C., Brocqueville, G., Spruyt, N., Adriaenssens, E., and Bourette, R.P. (2015). Enrichment of Human Stem-Like Prostate Cells with *s-SHIP* Promoter Activity Uncovers a Role in Stemness for the Long Noncoding RNA H19. *Stem Cells Dev.* 24, 1252–1262.

Baum, C.M., Weissman, I.L., Tsukamoto, A.S., Buckle, A.M., and Peault, B. (1992). Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 2804–2808.

Beça, F.F. de, 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.

Références bibliographiques

- Begum, A., Kim, Y., Lin, Q., and Yun, Z. (2012). DLK1, delta-like 1 homolog (*Drosophila*), regulates tumor cell differentiation in vivo. *Cancer Lett.* 318, 26–33.
- Belka, C., Marini, P., Budach, W., Schulze-Osthoff, K., Lang, F., Gulbins, E., and Bamberg, M. (1998). Radiation-induced apoptosis in human lymphocytes and lymphoma cells critically relies on the up-regulation of CD95/Fas/APO-1 ligand. *Radiat. Res.* 149, 588–595.
- Bertolini, G., Roz, L., Perego, P., Tortoreto, M., Fontanella, E., Gatti, L., Pratesi, G., Fabbri, A., Andriani, F., Tinelli, S., et al. (2009). Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 16281–16286.
- Bertout, J.A., Majmundar, A.J., Gordan, J.D., Lam, J.C., Ditsworth, D., Keith, B., Brown, E.J., Nathanson, K.L., and Simon, M.C. (2009). HIF2alpha inhibition promotes p53 pathway activity, tumor cell death, and radiation responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 14391–14396.
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., and Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ. J.* 5, 9.
- Bjerkvig, R., Tysnes, B.B., Aboody, K.S., Najbauer, J., and Terzis, A.J.A. (2005). Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nat. Rev. Cancer* 5, 899–904.
- Bleau, A.-M., Hambarzumyan, D., Ozawa, T., Fomchenko, E.I., Huse, J.T., Brennan, C.W., and Holland, E.C. (2009). PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells. *Cell Stem Cell* 4, 226–235.
- Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* 3, 730.
- Bonnomet, A., Syne, L., Brysse, A., Feyereisen, E., Thompson, E.W., Noël, A., Foidart, J.-M., Birembaut, P., Polette, M., and Gilles, C. (2012). A dynamic in vivo model of epithelial-to-mesenchymal transitions in circulating tumor cells and metastases of breast cancer. *Oncogene* 31, 3741–3753.
- Brabletz, T., Jung, A., Spaderna, S., Hlubek, F., and Kirchner, T. (2005). Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 5, 744–749.
- Briscoe, J., and Théron, P.P. (2013). The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 416–429.
- Brocqueville, G., Chmelar, R.S., Bauderlique-Le Roy, H., Deruy, E., Tian, L., Vessella, R.L., Greenberg, N.M., Rohrschneider, L.R., and Bourette, R.P. (2016). s-SHIP expression identifies a subset of murine basal prostate cells as neonatal stem cells. *Oncotarget* 7, 29228–29244.
- Brooks, R., Iyer, S., Akada, H., Neelam, S., Russo, C.M., Chisholm, J.D., and Kerr, W.G. (2015). Coordinate Expansion of Murine Hematopoietic and Mesenchymal Stem Cell Compartments by SHIPi: Chemical Expansion of HSC and Their Niche. *STEM CELLS* 33, 848–858.

Références bibliographiques

- Buchman, V.L., Hunter, H.J., Pinõn, L.G., Thompson, J., Privalova, E.M., Ninkina, N.N., and Davies, A.M. (1998). Persyn, a member of the synuclein family, has a distinct pattern of expression in the developing nervous system. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *18*, 9335–9341.
- Burk, U., Schubert, J., Wellner, U., Schmalhofer, O., Vincan, E., Spaderna, S., and Brabletz, T. (2008). A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep.* *9*, 582–589.
- Byler, S., Goldgar, S., Heerboth, S., Leary, M., Housman, G., Moulton, K., and Sarkar, S. (2014). Genetic and epigenetic aspects of breast cancer progression and therapy. *Anticancer Res.* *34*, 1071–1077.
- Cabarcas, S.M., Mathews, L.A., and Farrar, W.L. (2011). The cancer stem cell niche--there goes the neighborhood? *Int. J. Cancer* *129*, 2315–2327.
- Campisi, J., and d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 729–740.
- Cariati, M., Naderi, A., Brown, J.P., Smalley, M.J., Pinder, S.E., Caldas, C., and Purushotham, A.D. (2008). Alpha-6 integrin is necessary for the tumorigenicity of a stem cell-like subpopulation within the MCF7 breast cancer cell line. *Int. J. Cancer* *122*, 298–304.
- Casazza, A., Di Conza, G., Wenes, M., Finisguerra, V., Deschoemaeker, S., and Mazzone, M. (2014). Tumor stroma: a complexity dictated by the hypoxic tumor microenvironment. *Oncogene* *33*, 1743–1754.
- Celià-Terrassa, T., Meca-Cortés, O., Mateo, F., Martínez de Paz, A., Rubio, N., Arnal-Estapé, A., Ell, B.J., Bermudo, R., Díaz, A., Guerra-Rebollo, M., et al. (2012). Epithelial-mesenchymal transition can suppress major attributes of human epithelial tumor-initiating cells. *J. Clin. Invest.* *122*, 1849–1868.
- Chaffer, C.L., Brueckmann, I., Scheel, C., Kaestli, A.J., Wiggins, P.A., Rodrigues, L.O., Brooks, M., Reinhardt, F., Su, Y., Polyak, K., et al. (2011). Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 7950–7955.
- Chanmee, T., Ontong, P., Konno, K., and Itano, N. (2014). Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers* *6*, 1670–1690.
- 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.
- Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., Bertucci, F., Cabaud, O., Wicinski, J., Finetti, P., Josselin, E., Adelaide, J., Nguyen, T.-T., Monville, F., et al. (2013). ALDH1-positive cancer stem cells predict engraftment of primary breast tumors and are governed by a common stem cell program. *Cancer Res.* *73*, 7290–7300.
- Chaturvedi, P., Gilkes, D.M., Wong, C.C.L., Kshitiz, Luo, W., Zhang, H., Wei, H., Takano, N., Schito, L., Levchenko, A., et al. (2013). Hypoxia-inducible factor-dependent breast cancer-

Références bibliographiques

- mesenchymal stem cell bidirectional signaling promotes metastasis. *J. Clin. Invest.* *123*, 189–205.
- Chen, N., and Karantza-Wadsworth, V. (2009). Role and regulation of autophagy in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* *1793*, 1516–1523.
- Chen, B., Dodge, M.E., Tang, W., Lu, J., Ma, Z., Fan, C.-W., Wei, S., Hao, W., Kilgore, J., Williams, N.S., et al. (2009). Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. *Nat. Chem. Biol.* *5*, 100–107.
- Chen, J., Ding, P., Li, L., Gu, H., Zhang, X., Zhang, L., Wang, N., Gan, L., Wang, Q., Zhang, W., et al. (2016). CD59 Regulation by SOX2 Is Required for Epithelial Cancer Stem Cells to Evade Complement Surveillance. *Stem Cell Rep.* *8*, 140–151.
- Chen, K., Huang, Y., and Chen, J. (2013). Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. *Acta Pharmacol. Sin.* *34*, 732–740.
- Cheung, A.M.S., Wan, T.S.K., Leung, J.C.K., Chan, L.Y.Y., Huang, H., Kwong, Y.L., Liang, R., and Leung, A.Y.H. (2007). Aldehyde dehydrogenase activity in leukemic blasts defines a subgroup of acute myeloid leukemia with adverse prognosis and superior NOD/SCID engrafting potential. *Leukemia* *21*, 1423–1430.
- Chikazawa, N., Tanaka, H., Tasaka, T., Nakamura, M., Tanaka, M., Onishi, H., and Katano, M. (2010). Inhibition of Wnt signaling pathway decreases chemotherapy-resistant side-population colon cancer cells. *Anticancer Res.* *30*, 2041–2048.
- Cho, R.W., Wang, X., Diehn, M., Shedden, K., Chen, G.Y., Sherlock, G., Gurney, A., Lewicki, J., and Clarke, M.F. (2008). Isolation and Molecular Characterization of Cancer Stem Cells in MMTV-Wnt-1 Murine Breast Tumors. *STEM CELLS* *26*, 364–371.
- Clarke, M.F., and Fuller, M. (2006). Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell* *124*, 1111–1115.
- Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H.M., Jones, D.L., Visvader, J., Weissman, I.L., and Wahl, G.M. (2006). Cancer Stem Cells—Perspectives on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells. *Cancer Res.* *66*, 9339–9344.
- Clement, V., Sanchez, P., de Tribolet, N., Radovanovic, I., and Ruiz i Altaba, A. (2007). HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. *Curr. Biol. CB* *17*, 165–172.
- Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* *127*, 469–480.
- Clevers, H. (2011). The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat. Med.* *17*, 313–319.
- Collins, A.T., Berry, P.A., Hyde, C., Stower, M.J., and Maitland, N.J. (2005). Prospective Identification of Tumorigenic Prostate Cancer Stem Cells. *Cancer Res.* *65*, 10946–10951.
- Connell, P.P., and Hellman, S. (2009). Advances in radiotherapy and implications for the next century: a historical perspective. *Cancer Res.* *69*, 383–392.

Références bibliographiques

- Connolly, R.M., Nguyen, N.K., and Sukumar, S. (2013). Molecular pathways: current role and future directions of the retinoic acid pathway in cancer prevention and treatment. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *19*, 1651–1659.
- Corti, S., Locatelli, F., Papadimitriou, D., Donadoni, C., Salani, S., Del Bo, R., Strazzer, S., Bresolin, N., and Comi, G.P. (2006). Identification of a primitive brain-derived neural stem cell population based on aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells Dayt. Ohio* *24*, 975–985.
- Cotsarelis, G., Sun, T.T., and Lavker, R.M. (1990). Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* *61*, 1329–1337.
- Cottu, P., Marangoni, E., Assayag, F., de Cremoux, P., Vincent-Salomon, A., Guyader, C., de Plater, L., Elbaz, C., Karboul, N., Fontaine, J.J., et al. (2012). Modeling of response to endocrine therapy in a panel of human luminal breast cancer xenografts. *Breast Cancer Res. Treat.* *133*, 595–606.
- Cozzio, A., Passegué, E., Ayton, P.M., Karsunky, H., Cleary, M.L., and Weissman, I.L. (2003). Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. *Genes Dev.* *17*, 3029–3035.
- Creighton, C.J., Li, X., Landis, M., Dixon, J.M., Neumeister, V.M., Sjolund, A., Rimm, D.L., Wong, H., Rodriguez, A., Herschkowitz, J.I., et al. (2009). Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 13820–13825.
- Crocker, A.K., and Allan, A.L. (2012). Inhibition of aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity reduces chemotherapy and radiation resistance of stem-like ALDH^{hi}CD44⁺ human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* *133*, 75–87.
- Crocker, A.K., Goodale, D., Chu, J., Postenka, C., Hedley, B.D., Hess, D.A., and Allan, A.L. (2009). High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. *J. Cell. Mol. Med.* *13*, 2236–2252.
- Crowder, S.W., Balikov, D.A., Hwang, Y.-S., and Sung, H.-J. (2014). Cancer Stem Cells under Hypoxia as a Chemoresistance Factor in Breast and Brain. *Curr. Pathobiol. Rep.* *2*, 33–40.
- Cuiffo, B.G., and Karnoub, A.E. (2012). Mesenchymal stem cells in tumor development: emerging roles and concepts. *Cell Adhes. Migr.* *6*, 220–230.
- Dalerba, P., Cho, R.W., and Clarke, M.F. (2007). Cancer stem cells: models and concepts. *Annu. Rev. Med.* *58*, 267–284.
- Dave, B., Mittal, V., Tan, N.M., and Chang, J.C. (2012). Epithelial-mesenchymal transition, cancer stem cells and treatment resistance. *Breast Cancer Res. BCR* *14*, 202.
- Dean, M., Fojo, T., and Bates, S. (2005). Tumour stem cells and drug resistance. *Nat. Rev. Cancer* *5*, 275–284.
- Debatin, K.-M., and Krammer, P.H. (2004). Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene* *23*, 2950–2966.

Références bibliographiques

- DeRose, Y.S., Wang, G., Lin, Y.-C., Bernard, P.S., Buys, S.S., Ebbert, M.T.W., 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.
- Desouky, O., Ding, N., and Zhou, G. (2015). Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* *8*, 247–254.
- Despots, C., Ninos, J.M., and Kerr, W.G. (2006). s-SHIP associates with receptor complexes essential for pluripotent stem cell growth and survival. *Stem Cells Dev.* *15*, 641–646.
- Dick, J.E. (2008). Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* *112*, 4793–4807.
- Diehn, M., Cho, R.W., Lobo, N.A., Kalisky, T., Dorie, M.J., Kulp, A.N., Qian, D., Lam, J.S., Ailles, L.E., Wong, M., et al. (2009). Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* *458*, 780–783.
- Dobrolecki, L.E., Airhart, S.D., Alferez, D.G., Aparicio, S., Behbod, F., Bentires-Alj, M., Briskin, C., Bult, C.J., Cai, S., Clarke, R.B., et al. (2016). Patient-derived xenograft (PDX) models in basic and translational breast cancer research. *Cancer Metastasis Rev.* *35*, 547–573.
- Dong, C., Yuan, T., Wu, Y., Wang, Y., Fan, T.W.M., Miriyala, S., Lin, Y., Yao, J., Shi, J., Kang, T., et al. (2013). Loss of FBP1 by Snail-mediated repression provides metabolic advantages in basal-like breast cancer. *Cancer Cell* *23*, 316–331.
- Dontu, G., Al-Hajj, M., Abdallah, W.M., Clarke, M.F., and Wicha, M.S. (2003a). Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif.* *36 Suppl 1*, 59–72.
- Dontu, G., Abdallah, W.M., Foley, J.M., Jackson, K.W., Clarke, M.F., Kawamura, M.J., and Wicha, M.S. (2003b). In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev.* *17*, 1253–1270.
- Dontu, G., Jackson, K.W., McNicholas, E., Kawamura, M.J., Abdallah, W.M., and Wicha, M.S. (2004). Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells. *Breast Cancer Res. BCR* *6*, R605-615.
- Dougherty, M.K., Schumaker, L.M., Jordan, V.C., Welshons, W.V., Curran, E.M., Ellis, M.J., and El-Ashry, D. (2004). Estrogen receptor expression and sensitivity to paclitaxel in breast cancer. *Cancer Biol. Ther.* *3*, 460–467.
- Dowsett, M., Cuzick, J., Ingle, J., Coates, A., Forbes, J., Bliss, J., Buyse, M., Baum, M., Buzdar, A., Colleoni, M., et al. (2010). Meta-analysis of breast cancer outcomes in adjuvant trials of aromatase inhibitors versus tamoxifen. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *28*, 509–518.
- Drake, J.M., Strohbehn, G., Bair, T.B., Moreland, J.G., and Henry, M.D. (2009). ZEB1 enhances transendothelial migration and represses the epithelial phenotype of prostate cancer cells. *Mol. Biol. Cell* *20*, 2207–2217.
- D’SOUZA, B., MELOTY-KAPPELLA, L., and WEINMASTER, G. (2010). Canonical and non-canonical Notch ligands. *Curr. Top. Dev. Biol.* *92*, 73–129.

Références bibliographiques

- Dubrova, Y.E. (2003). Radiation-induced transgenerational instability. *Oncogene* 22, 7087–7093.
- Duffell, D., Hinz, R., and Nelson, E. (1964). Neoplasms in Hamsters Induced by Simian Virus 40. *Am. J. Pathol.* 45, 59–73.
- Dumontet, C., and Jordan, M.A. (2010). Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 790–803.
- Durante, M., and Loeffler, J.S. (2010). Charged particles in radiation oncology. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 7, 37–43.
- Eirew, P., Stingl, J., Raouf, A., Turashvili, G., Aparicio, S., Emerman, J.T., and Eaves, C.J. (2008). A method for quantifying normal human mammary epithelial stem cells with in vivo regenerative ability. *Nat. Med.* 14, 1384–1389.
- Eirew, P., Kannan, N., Knapp, D.J.H.F., Vaillant, F., Emerman, J.T., Lindeman, G.J., Visvader, J.E., and Eaves, C.J. (2012). Aldehyde dehydrogenase activity is a biomarker of primitive normal human mammary luminal cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 30, 344–348.
- El Helou, R., Pinna, G., Cabaud, O., Wicinski, J., Bhajun, R., Guyon, L., Rioualen, C., Finetti, P., Gros, A., Mari, B., et al. (2017). miR-600 Acts as a Bimodal Switch that Regulates Breast Cancer Stem Cell Fate through WNT Signaling. *Cell Rep.* 18, 2256–2268.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516.
- Erenpreisa, J., Kalejs, M., and Cragg, M.S. (2005). Mitotic catastrophe and endomitosis in tumour cells: an evolutionary key to a molecular solution. *Cell Biol. Int.* 29, 1012–1018.
- Eriksson, D., and Stigbrand, T. (2010). Radiation-induced cell death mechanisms. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 31, 363–372.
- van Es, J.H., van Gijn, M.E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., Robine, S., Winton, D.J., Radtke, F., et al. (2005). Notch/ γ -secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* 435, 959–963.
- Esquela-Kerscher, A., and Slack, F.J. (2006). Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 259–269.
- Essmann, F., Engels, I.H., Totzke, G., Schulze-Osthoff, K., and Jänicke, R.U. (2004). Apoptosis Resistance of MCF-7 Breast Carcinoma Cells to Ionizing Radiation Is Independent of p53 and Cell Cycle Control but Caused by the Lack of Caspase-3 and a Caffeine-Inhibitable Event. *Cancer Res.* 64, 7065–7072.
- Falix, F.A., Aronson, D.C., Lamers, W.H., and Gaemers, I.C. (2012). Possible roles of DLK1 in the Notch pathway during development and disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1822, 988–995.
- Fang, D., Nguyen, T.K., Leishear, K., Finko, R., Kulp, A.N., Hotz, S., Van Belle, P.A., Xu, X., Elder, D.E., and Herlyn, M. (2005). A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res.* 65, 9328–9337.

Références bibliographiques

- Faraldo, M.M., Teulière, J., Deugnier, M.-A., Hosseraye, I.T.-D.L., Thiery, J.P., and Glukhova, M.A. (2005). Myoepithelial Cells in the Control of Mammary Development and Tumorigenesis: Data From Genetically Modified Mice. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* *10*, 211–219.
- Farrugia, M.K., Sharma, S.B., Lin, C.-C., McLaughlin, S.L., Vanderbilt, D.B., Ammer, A.G., Salkeni, M.A., Stoilov, P., Agazie, Y.M., Creighton, C.J., et al. (2015). Regulation of anti-apoptotic signaling by Kruppel-like factors 4 and 5 mediates lapatinib resistance in breast cancer. *Cell Death Dis.* *6*, e1699.
- Ferraro, F., Celso, C.L., and Scadden, D. (2010). ADULT STEM CELLS AND THEIR NICHES. *Adv. Exp. Med. Biol.* *695*, 155–168.
- Fillmore, C.M., and Kuperwasser, C. (2008). Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res.* *10*, R25.
- Fleming, J.M., Miller, T.C., Meyer, M.J., Ginsburg, E., and Vonderhaar, B.K. (2010). Local regulation of human breast xenograft models. *J. Cell. Physiol.* *224*, 795–806.
- Fourquet, A., Krhili, S.-L., Campana, F., Chilles, A., and Kirova, Y.-M. (2016). Irradiation normofractionnée des cancers du sein. Indications et bénéfices. </data/revues/12783218/unassign/S1278321816303717/>.
- Fu, C.-H., Lin, R.-J., Yu, J., Chang, W.-W., Liao, G.-S., Chang, W.-Y., Tseng, L.-M., Tsai, Y.-F., Yu, J.-C., and Yu, A.L. (2014). A Novel Oncogenic Role of Inositol Phosphatase SHIP2 in ER-Negative Breast Cancer Stem Cells: Involvement of JNK/Vimentin Activation. *STEM CELLS* *32*, 2048–2060.
- Fuhler, G., and Brooks, R. (2012). [No Title]. *Mol. Med.* *18*, 1.
- Fung, A.S., Lee, C., Yu, M., and Tannock, I.F. (2015). The effect of chemotherapeutic agents on tumor vasculature in subcutaneous and orthotopic human tumor xenografts. *BMC Cancer* *15*, 112.
- Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., De Vitis, S., Fiocco, R., Foroni, C., Dimeco, F., and Vescovi, A. (2004). Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* *64*, 7011–7021.
- Galvin, J.E., Lee, V.M., and Trojanowski, J.Q. (2001). Synucleinopathies: clinical and pathological implications. *Arch. Neurol.* *58*, 186–190.
- Gammon, L., Biddle, A., Heywood, H.K., Johannessen, A.C., and Mackenzie, I.C. (2013). Subsets of cancer stem cells differ intrinsically in their patterns of oxygen metabolism. *PloS One* *8*, e62493.
- Gao, M.-Q., Choi, Y.-P., Kang, S., Youn, J.H., and Cho, N.-H. (2010). CD24+ cells from hierarchically organized ovarian cancer are enriched in cancer stem cells. *Oncogene* *29*, 2672–2680.
- George, J.M. (2002). The synucleins. *Genome Biol.* *3*, reviews3002.1-reviews3002.6.

Références bibliographiques

- Gewirtz, D.A., Holt, S.E., and Elmore, L.W. (2008). Accelerated senescence: An emerging role in tumor cell response to chemotherapy and radiation. *Biochem. Pharmacol.* 76, 947–957.
- Ghisolfi, L., Keates, A.C., Hu, X., Lee, D., and Li, C.J. (2012). Ionizing radiation induces stemness in cancer cells. *PloS One* 7, e43628.
- Ginestier, C., Hur, M.H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Jacquemier, J., Viens, P., Kleer, C.G., Liu, S., et al. (2007). ALDH1 Is a Marker of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome. *Cell Stem Cell* 1, 555–567.
- Ginestier, C., Monville, F., Wicinski, J., Cabaud, O., Cervera, N., Josselin, E., Finetti, P., Guille, A., Larderet, G., Viens, P., et al. (2012). Mevalonate metabolism regulates Basal breast cancer stem cells and is a potential therapeutic target. *Stem Cells Dayt. Ohio* 30, 1327–1337.
- Golebiewska, A., Brons, N.H.C., Bjerkvig, R., and Niclou, S.P. (2011). Critical Appraisal of the Side Population Assay in Stem Cell and Cancer Stem Cell Research. *Cell Stem Cell* 8, 136–147.
- Gong, C., Yao, Y., Wang, Y., Liu, B., Wu, W., Chen, J., Su, F., Yao, H., and Song, E. (2011). Up-regulation of miR-21 mediates resistance to trastuzumab therapy for breast cancer. *J. Biol. Chem.* 286, 19127–19137.
- Goodell, M.A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A.S., and Mulligan, R.C. (1996). Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J. Exp. Med.* 183, 1797–1806.
- Green, J.E., Shibata, M.A., Yoshidome, K., Liu, M.L., Jorcyk, C., Anver, M.R., Wigginton, J., Wiltrout, R., Shibata, E., Kaczmarczyk, S., et al. (2000). The C3(1)/SV40 T-antigen transgenic mouse model of mammary cancer: ductal epithelial cell targeting with multistage progression to carcinoma. *Oncogene* 19, 1020–1027.
- Gupta, A., Inaba, S., Wong, O.K., Fang, G., and Liu, J. (2003). Breast cancer-specific gene 1 interacts with the mitotic checkpoint kinase BubR1. *Oncogene* 22, 7593–7599.
- Hahn, H., Wicking, C., Zaphiropoulos, P.G., Gailani, M.R., Shanley, S., Chidambaram, A., Vorechovsky, I., Holmberg, E., Unden, A.B., Gillies, S., et al. (1996). Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* 85, 841–851.
- Hamam, R., Hamam, D., Alsaleh, K.A., Kassem, M., Zaher, W., Alfayez, M., Aldahmash, A., and Alajez, N.M. (2017). Circulating microRNAs in breast cancer: novel diagnostic and prognostic biomarkers. *Cell Death Dis.* 8, e3045.
- Hanahan, D., and Coussens, L.M. (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 21, 309–322.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.
- Haque, A., Banik, N.L., and Ray, S.K. (2007). Emerging role of combination of all-trans retinoic acid and interferon-gamma as chemoimmunotherapy in the management of human glioblastoma. *Neurochem. Res.* 32, 2203–2209.

Références bibliographiques

- Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z., and Haupt, Y. (2003). Apoptosis - the p53 network. *J. Cell Sci.* *116*, 4077–4085.
- Heddleston, J.M., Li, Z., McLendon, R.E., Hjelmeland, A.B., and Rich, J.N. (2009). The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle Georget. Tex* *8*, 3274–3284.
- Helczynska, K., Kronblad, A., Jögi, A., Nilsson, E., Beckman, S., Landberg, G., and Pählman, S. (2003). Hypoxia promotes a dedifferentiated phenotype in ductal breast carcinoma in situ. *Cancer Res.* *63*, 1441–1444.
- Hens, J.R., and Wysolmerski, J.J. (2005). Key stages of mammary gland development: molecular mechanisms involved in the formation of the embryonic mammary gland. *Breast Cancer Res. BCR* *7*, 220–224.
- Hermann, P.C., Huber, S.L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J.W., Guba, M., Bruns, C.J., and Heeschen, C. (2007). Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* *1*, 313–323.
- Herschkowitz, J.I., Simin, K., Weigman, V.J., Mikaelian, I., Usary, J., Hu, Z., Rasmussen, K.E., Jones, L.P., Assefnia, S., Chandrasekharan, S., et al. (2007). Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.* *8*, R76.
- Herschkowitz, J.I., Zhao, W., Zhang, M., Usary, J., Murrow, G., Edwards, D., Knezevic, J., Greene, S.B., Darr, D., Troester, M.A., et al. (2012). Comparative oncogenomics identifies breast tumors enriched in functional tumor-initiating cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 2778–2783.
- Hess, D.A., Meyerrose, T.E., Wirthlin, L., Craft, T.P., Herrbrich, P.E., Creer, M.H., and Nolte, J.A. (2004). Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity. *Blood* *104*, 1648–1655.
- Hiraki, M., Maeda, T., Bouillez, A., Alam, M., Tagde, A., Hinohara, K., Suzuki, Y., Markert, T., Miyo, M., Komura, K., et al. (2017). MUC1-C activates BMI1 in human cancer cells. *Oncogene* *36*, 2791–2801.
- Hirose, Y., Katayama, M., Mirzoeva, O.K., Berger, M.S., and Pieper, R.O. (2005). Akt activation suppresses Chk2-mediated, methylating agent-induced G2 arrest and protects from temozolomide-induced mitotic catastrophe and cellular senescence. *Cancer Res.* *65*, 4861–4869.
- Holen, I., Speirs, V., Morrissey, B., and Blyth, K. (2017). In vivo models in breast cancer research: progress, challenges and future directions. *Dis. Model. Mech.* *10*, 359–371.
- Honeth, G., Bendahl, P.-O., Ringnér, M., Saal, L.H., Gruvberger-Saal, S.K., Lövgren, K., Grabau, D., Fernö, M., Borg, Å., and Hegardt, C. (2008). The CD44+/CD24-phenotype is enriched in basal-like breast tumors. *Breast Cancer Res.* *10*.
- Horwitz, S.B. (1994). Taxol (paclitaxel): mechanisms of action. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* *5 Suppl 6*, S3-6.

Références bibliographiques

- Houghton, J., George, W.D., Cuzick, J., Duggan, C., Fentiman, I.S., Spittle, M., UK Coordinating Committee on Cancer Research, Ductal Carcinoma in situ Working Party, and DCIS trialists in the UK, Australia, and New Zealand (2003). Radiotherapy and tamoxifen in women with completely excised ductal carcinoma in situ of the breast in the UK, Australia, and New Zealand: randomised controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* 362, 95–102.
- Hu, T., Zhou, R., Zhao, Y., and Wu, G. (2016). Integrin $\alpha 6$ /Akt/Erk signaling is essential for human breast cancer resistance to radiotherapy. *Sci. Rep.* 6, srep33376.
- Hu, W., Ge, X., You, T., Xu, T., Zhang, J., Wu, G., Peng, Z., Chorev, M., Aktas, B.H., Halperin, J.A., et al. (2011). Human CD59 inhibitor sensitizes rituximab-resistant lymphoma cells to complement-mediated cytotoxicity. *Cancer Res.* 71, 2298–2307.
- Huang, C., Park, C.C., Hilsenbeck, S.G., Ward, R., Rimawi, M.F., Wang, Y.-C., Shou, J., Bissell, M.J., Osborne, C.K., and Schiff, R. (2011). $\beta 1$ integrin mediates an alternative survival pathway in breast cancer cells resistant to lapatinib. *Breast Cancer Res. BCR* 13, R84.
- Huang, E.H., Hynes, M.J., Zhang, T., Ginestier, C., Dontu, G., Appelman, H., Fields, J.Z., Wicha, M.S., and Boman, B.M. (2009). Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res.* 69, 3382–3389.
- Huang, H.-E., Chin, S.-F., Ginestier, C., Bardou, V.-J., Adélaïde, J., Iyer, N.G., Garcia, M.J., Pole, J.C., Callagy, G.M., Hewitt, S.M., et al. (2004). A recurrent chromosome breakpoint in breast cancer at the NRG1/neuregulin 1/heregulin gene. *Cancer Res.* 64, 6840–6844.
- Huang, T., Alvarez, A., Hu, B., and Cheng, S.-Y. (2013). Noncoding RNAs in cancer and cancer stem cells. *Chin. J. Cancer* 32, 582–593.
- Huang, Z., Epperly, M., Watkins, S.C., Greenberger, J.S., Kagan, V.E., and Bayır, H. (2016). Necrostatin-1 rescues mice from lethal irradiation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1862, 850–856.
- Huntly, B.J.P., Shigematsu, H., Deguchi, K., Lee, B.H., Mizuno, S., Duclos, N., Rowan, R., Amaral, S., Curley, D., Williams, I.R., et al. (2004). MOZ-TIF2, but not BCR-ABL, confers properties of leukemic stem cells to committed murine hematopoietic progenitors. *Cancer Cell* 6, 587–596.
- Huo, Y., and Macara, I.G. (2014). The Par3-like polarity protein Par3L is essential for mammary stem cell maintenance. *Nat. Cell Biol.* 16, 526–534.
- Hüsemann, Y., Geigl, J.B., Schubert, F., Musiani, P., Meyer, M., Burghart, E., Forni, G., Eils, R., Fehm, T., Riethmüller, G., et al. (2008). Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* 13, 58–68.
- Hwang-Versluis, W.W., Kuo, W.-H., Chang, P.-H., Pan, C.-C., Wang, H.-H., Tsai, S.-T., Jeng, Y.-M., Shew, J.-Y., Kung, J.T., Chen, C.-H., et al. (2009). Multiple lineages of human breast cancer stem/progenitor cells identified by profiling with stem cell markers. *PLoS One* 4, e8377.
- Ianzini, F., Bertoldo, A., Kosmacek, E.A., Phillips, S.L., and Mackey, M.A. (2006). Lack of p53 function promotes radiation-induced mitotic catastrophe in mouse embryonic fibroblast cells. *Cancer Cell Int.* 6, 11.

Références bibliographiques

- Inaba, S., Li, C., Shi, Y.E., Song, D.-Q., Jiang, J.-D., and Liu, J. (2005). Synuclein Gamma Inhibits the Mitotic Checkpoint Function and Promotes Chromosomal Instability of Breast Cancer Cells. *Breast Cancer Res. Treat.* *94*, 25–35.
- Incassati, A., Chandramouli, A., Eelkema, R., and Cowin, P. (2010). Key signaling nodes in mammary gland development and cancer: β -catenin. *Breast Cancer Res. BCR* *12*, 213.
- Inman, J.L., Robertson, C., Mott, J.D., and Bissell, M.J. (2015). Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment. *Development* *142*, 1028–1042.
- Iorio, M.V., Ferracin, M., Liu, C.-G., Veronese, A., Spizzo, R., Sabbioni, S., Magri, E., Pedriali, M., Fabbri, M., Campiglio, M., et al. (2005). MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* *65*, 7065–7070.
- Ito, H., Daido, S., Kanzawa, T., Kondo, S., and Kondo, Y. (2005). Radiation-induced autophagy is associated with LC3 and its inhibition sensitizes malignant glioma cells. *Int. J. Oncol.* *26*, 1401–1410.
- Jackson, S.P., and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* *461*, 1071–1078.
- Jang, G.-B., Kim, J.-Y., Cho, S.-D., Park, K.-S., Jung, J.-Y., Lee, H.-Y., Hong, I.-S., and Nam, J.-S. (2015). Blockade of Wnt/ β -catenin signaling suppresses breast cancer metastasis by inhibiting CSC-like phenotype. *Sci. Rep.* *5*, 12465.
- Jensen, K.B., and Watt, F.M. (2006). Single-cell expression profiling of human epidermal stem and transit-amplifying cells: *Lrig1* is a regulator of stem cell quiescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 11958–11963.
- Ji, H., Liu, Y.E., Jia, T., Wang, M., Liu, J., Xiao, G., Joseph, B.K., Rosen, C., and Shi, Y.E. (1997). Identification of a Breast Cancer-specific Gene, *BCSG1*, by Direct Differential cDNA Sequencing. *Cancer Res.* *57*, 759–764.
- Jia, H., Truica, C.I., Wang, B., Wang, Y., Ren, X., Harvey, H.A., Song, J., and Yang, J.-M. (2017). Immunotherapy for triple-negative breast cancer: Existing challenges and exciting prospects. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* *32*, 1–15.
- Jia, T., Liu, Y.E., Liu, J., and Shi, Y.E. (1999). Stimulation of Breast Cancer Invasion and Metastasis by Synuclein γ . *Cancer Res.* *59*, 742–747.
- Jiang, L., Li, J., and Song, L. (2009). Bmi-1, stem cells and cancer. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* *41*, 527–534.
- Jiang, Y., Liu, Y.E., Lu, A., Gupta, A., Goldberg, I.D., Liu, J., and Shi, Y.E. (2003). Stimulation of Estrogen Receptor Signaling by γ Synuclein. *Cancer Res.* *63*, 3899–3903.
- Kadesch, T. (2000). Notch Signaling: A Dance of Proteins Changing Partners. *Exp. Cell Res.* *260*, 1–8.
- Kadhim, M.A., Macdonald, D.A., Goodhead, D.T., Lorimore, S.A., Marsden, S.J., and Wright, E.G. (1992). Transmission of chromosomal instability after plutonium alpha-particle irradiation. *Nature* *355*, 738–740.

Références bibliographiques

- Kang, J.H., Krause, S., Tobin, H., Mammoto, A., Kanapathipillai, M., and Ingber, D.E. (2012). A combined micromagnetic-microfluidic device for rapid capture and culture of rare circulating tumor cells. *Lab. Chip* 12, 2175–2181.
- Kao, J., Salari, K., Bocanegra, M., Choi, Y.-L., Girard, L., Gandhi, J., Kwei, K.A., Hernandez-Boussard, T., Wang, P., Gazdar, A.F., et al. (2009). Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. *PLoS One* 4, e6146.
- Karimi-Busheri, F., Rasouli-Nia, A., Mackey, J.R., and Weinfeld, M. (2010). Senescence evasion by MCF-7 human breast tumor-initiating cells. *Breast Cancer Res. BCR* 12, R31.
- Kast, R.E. (2008). Potential for all-trans retinoic acid (tretinoin) to enhance interferon-alpha treatment response in chronic myelogenous leukemia, melanoma, myeloma and renal cell carcinoma. *Cancer Biol. Ther.* 7, 1515–1519.
- Kavanaugh, W.M., Pot, D.A., Chin, S.M., Deuter-Reinhard, M., Jefferson, A.B., Norris, F.A., Masiarz, F.R., Cousens, L.S., Majerus, P.W., and Williams, L.T. (1996). Multiple forms of an inositol polyphosphate 5-phosphatase form signaling complexes with Shc and Grb2. *Curr. Biol.* 6, 438–445.
- Keith, B., and Simon, M.C. (2007). Hypoxia-Inducible Factors, Stem Cells, and Cancer. *Cell* 129, 465–472.
- Keller, P.J., Arendt, L.M., Skibinski, A., Logvinenko, T., Klebba, I., Dong, S., Smith, A.E., Prat, A., Perou, C.M., Gilmore, H., et al. (2012). Defining the cellular precursors to human breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 2772–2777.
- Kelly, P.N., Dakic, A., Adams, J.M., Nutt, S.L., and Strasser, A. (2007). Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells. *Science* 317, 337.
- Kerr, W.G. (2008). A role for SHIP in stem cell biology and transplantation. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 3, 99–106.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239–257.
- Kim, C.F.B., Jackson, E.L., Woolfenden, A.E., Lawrence, S., Babar, I., Vogel, S., Crowley, D., Bronson, R.T., and Jacks, T. (2005). Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 121, 823–835.
- Kim, Y., Lin, Q., Zelterman, D., and Yun, Z. (2009). Hypoxia-Regulated Delta-like 1 Homologue Enhances Cancer Cell Stemness and Tumorigenicity. *Cancer Res.* 69, 9271–9280.
- Kitamura, T., Qian, B.-Z., and Pollard, J.W. (2015). Immune cell promotion of metastasis. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 73–86.
- Kleffel, S., and Schatton, T. (2013). Tumor dormancy and cancer stem cells: two sides of the same coin? *Adv. Exp. Med. Biol.* 734, 145–179.
- Kogata, N., Zvelebil, M., and Howard, B.A. (2013). Neuregulin 3 and erbb signalling networks in embryonic mammary gland development. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 18, 149–154.

Références bibliographiques

- Kreso, A., O'Brien, C.A., van Galen, P., Gan, O.I., Notta, F., Brown, A.M.K., Ng, K., Ma, J., Wienholds, E., Dunant, C., et al. (2013). Variable clonal repopulation dynamics influence chemotherapy response in colorectal cancer. *Science* 339, 543–548.
- Kroemer, G., Perfettini, J.-L., Andreau, K., Castedo, M., Medema, R., and Roumier, T. (2004). Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* 23, 2825.
- Kuilman, T., and Peeper, D.S. (2009). Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat. Rev. Cancer* 9, 81–94.
- Kume, T. (2009). Novel insights into the differential functions of Notch ligands in vascular formation. *J. Angiogenesis Res.* 1, 8.
- Kuperwasser, C., Chavarria, T., Wu, M., Magrane, G., Gray, J.W., Carey, L., Richardson, A., and Weinberg, R.A. (2004). Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4966–4971.
- Kurrey, N.K., Jalgaonkar, S.P., Joglekar, A.V., Ghanate, A.D., Chaskar, P.D., Doiphode, R.Y., and Bapat, S.A. (2009). Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 27, 2059–2068.
- Lagadec, C., Vlashi, E., Della Donna, L., Dekmezian, C., and Pajonk, F. (2012). Radiation-Induced Reprogramming of Breast Cancer Cells. *STEM CELLS* 30, 833–844.
- Lauber, K., Ernst, A., Orth, M., Herrmann, M., and Belka, C. (2012). Dying cell clearance and its impact on the outcome of tumor radiotherapy. *Front. Oncol.* 2.
- Lavedan, C., Leroy, E., Dehejia, A., Buchholtz, S., Dutra, A., Nussbaum, R.L., and Polymeropoulos, M.H. (1998). Identification, localization and characterization of the human gamma-synuclein gene. *Hum. Genet.* 103, 106–112.
- Lee, E.Y.H.P., and Muller, W.J. (2010). *Oncogenes and Tumor Suppressor Genes*. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2.
- Leszczynska, K.B., Foskolou, I.P., Abraham, A.G., Anbalagan, S., Tellier, C., Haider, S., Span, P.N., O'Neill, E.E., Buffa, F.M., and Hammond, E.M. (2015). Hypoxia-induced p53 modulates both apoptosis and radiosensitivity via AKT. *J. Clin. Invest.* 125, 2385–2398.
- Levine, A.J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323–331.
- Levitt, N.C., and Hickson, I.D. (2002). Caretaker tumour suppressor genes that defend genome integrity. *Trends Mol. Med.* 8, 179–186.
- Li, Z., and Rich, J.N. (2010). Hypoxia and hypoxia inducible factors in cancer stem cell maintenance. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 345, 21–30.
- Li, H., Zhu, L., Xu, L., Qin, K., Liu, C., Yu, Y., Su, D., Wu, K., and Sheng, Y. (2017). Long noncoding RNA linc00617 exhibits oncogenic activity in breast cancer. *Mol. Carcinog.* 56, 3–17.

Références bibliographiques

- Li, H.-J., Reinhardt, F., Herschman, H.R., and Weinberg, R.A. (2012). Cancer-stimulated mesenchymal stem cells create a carcinoma stem cell niche via prostaglandin E2 signaling. *Cancer Discov.* 2, 840–855.
- Li, P., Zhou, C., Xu, L., and Xiao, H. (2013). Hypoxia enhances stemness of cancer stem cells in glioblastoma: an in vitro study. *Int. J. Med. Sci.* 10, 399–407.
- Li, X., Lewis, M.T., Huang, J., Gutierrez, C., Osborne, C.K., Wu, M.-F., Hilsenbeck, S.G., Pavlick, A., Zhang, X., Chamness, G.C., et al. (2008). Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 100, 672–679.
- Li, Z., Sclabas, G.M., Peng, B., Hess, K.R., Abbruzzese, J.L., Evans, D.B., and Chiao, P.J. (2004). Overexpression of synuclein-gamma in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 101, 58–65.
- Li, Z., Bao, S., Wu, Q., Wang, H., Eyler, C., Sathornsumetee, S., Shi, Q., Cao, Y., Lathia, J., McLendon, R.E., et al. (2009). Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell* 15, 501–513.
- Liang, W., Miao, S., Zhang, B., He, S., Shou, C., Manivel, P., Krishna, R., Chen, Y., and Shi, Y.E. (2014). Synuclein γ protects Akt and mTOR and renders tumor resistance to Hsp90 disruption. *Oncogene* 34, onc2014126.
- Lim, E., Vaillant, F., Wu, D., Forrest, N.C., Pal, B., Hart, A.H., Asselin-Labat, M.-L., Gyorki, D.E., Ward, T., Partanen, A., et al. (2009). Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat. Med.* 15, 907–913.
- Lin, H. (2002). The stem-cell niche theory: lessons from flies. *Nat. Rev. Genet.* 3, 931–940.
- Lindvall, C., Evans, N.C., Zylstra, C.R., Li, Y., Alexander, C.M., and Williams, B.O. (2006). The Wnt signaling receptor Lrp5 is required for mammary ductal stem cell activity and Wnt1-induced tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* 281, 35081–35087.
- Little, J.B. (2006). Cellular radiation effects and the bystander response. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 597, 113–118.
- Liu, C., Qu, L., Lian, S., Tian, Z., Zhao, C., Meng, L., and Shou, C. (2014a). Unconventional secretion of synuclein- γ promotes tumor cell invasion. *FEBS J.* 281, 5159–5171.
- Liu, H., Liu, W., Wu, Y., Zhou, Y., Xue, R., Luo, C., Wang, L., Zhao, W., Jiang, J.-D., and Liu, J. (2005). Loss of Epigenetic Control of Synuclein- γ Gene as a Molecular Indicator of Metastasis in a Wide Range of Human Cancers. *Cancer Res.* 65, 7635–7643.
- Liu, J., Spence, M.J., Zhang, Y.L., Jiang, Y., Liu, Y.E., and Shi, Y.E. (2000). Transcriptional suppression of synuclein γ (SNCG) expression in human breast cancer cells by the growth inhibitory cytokine oncostatin M. *Breast Cancer Res. Treat.* 62, 99–107.
- Liu, J., Pan, S., Hsieh, M.H., Ng, N., Sun, F., Wang, T., Kasibhatla, S., Schuller, A.G., Li, A.G., Cheng, D., et al. (2013). Targeting Wnt-driven cancer through the inhibition of Porcupine by LGK974. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 20224–20229.

Références bibliographiques

- Liu, M.L., Von Lintig, F.C., Liyanage, M., Shibata, M.A., Jorcyk, C.L., Ried, T., Boss, G.R., and Green, J.E. (1998). Amplification of Ki-ras and elevation of MAP kinase activity during mammary tumor progression in C3(1)/SV40 Tag transgenic mice. *Oncogene* *17*, 2403–2411.
- Liu, M.L., Shibata, M.A., Von Lintig, F.C., Wang, W., Cassenaer, S., Boss, G.R., and Green, J.E. (2001). Haploid loss of Ki-ras delays mammary tumor progression in C3 (1)/SV40 Tag transgenic mice. *Oncogene* *20*, 2044–2049.
- Liu, S., Dontu, G., Mantle, I.D., Patel, S., Ahn, N., Jackson, K.W., Suri, P., and Wicha, M.S. (2006). Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res.* *66*, 6063–6071.
- Liu, S., Ginestier, C., Ou, S.J., Clouthier, S.G., Patel, S.H., Monville, F., Korkaya, H., Heath, A., Dutcher, J., Klier, C.G., et al. (2011). Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks. *Cancer Res.* *71*, 614–624.
- Liu, S., Cong, Y., Wang, D., Sun, Y., Deng, L., Liu, Y., Martin-Trevino, R., Shang, L., McDermott, S.P., Landis, M.D., et al. (2014b). Breast Cancer Stem Cells Transition between Epithelial and Mesenchymal States Reflective of their Normal Counterparts. *Stem Cell Rep.* *2*, 78–91.
- Lloyd-Lewis, B., Harris, O.B., Watson, C.J., and Davis, F.M. (2017). Mammary Stem Cells: Premise, Properties, and Perspectives. *Trends Cell Biol.* *27*, 556–567.
- Loaiza-Bonilla, A., Gore, S.D., and Carraway, H.E. (2010). Novel approaches for myelodysplastic syndromes: beyond hypomethylating agents. *Curr. Opin. Hematol.* *17*, 104–109.
- Löffler, H., Lukas, J., Bartek, J., and Krämer, A. (2006). Structure meets function--centrosomes, genome maintenance and the DNA damage response. *Exp. Cell Res.* *312*, 2633–2640.
- Lorimore, S.A., Kadhim, M.A., Pocock, D.A., Papworth, D., Stevens, D.L., Goodhead, D.T., and Wright, E.G. (1998). Chromosomal instability in the descendants of unirradiated surviving cells after alpha-particle irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 5730–5733.
- Louie, E., Nik, S., Chen, J.-S., Schmidt, M., Song, B., Pacson, C., Chen, X.F., Park, S., Ju, J., and Chen, E.I. (2010). Identification of a stem-like cell population by exposing metastatic breast cancer cell lines to repetitive cycles of hypoxia and reoxygenation. *Breast Cancer Res. BCR* *12*, R94.
- Lu, J., Ye, X., Fan, F., Xia, L., Bhattacharya, R., Bellister, S., Tozzi, F., Sceusi, E., Zhou, Y., Tachibana, I., et al. (2013). Endothelial cells promote the colorectal cancer stem cell phenotype through a soluble form of Jagged-1. *Cancer Cell* *23*, 171–185.
- Lu, P., Weaver, V.M., and Werb, Z. (2012). The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J. Cell Biol.* *196*, 395–406.
- van der Lugt, N.M., Domen, J., Linders, K., van Roon, M., Robanus-Maandag, E., te Riele, H., van der Valk, M., Deschamps, J., Sofroniew, M., and van Lohuizen, M. (1994). Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the bmi-1 proto-oncogene. *Genes Dev.* *8*, 757–769.

Références bibliographiques

- Lustberg, M.B., and Ramaswamy, B. (2011). Epigenetic Therapy in Breast Cancer. *Curr. Breast Cancer Rep.* 3, 34–43.
- Ma, S., Lee, T.K., Zheng, B.-J., Chan, K.W., and Guan, X.-Y. (2008). CD133+ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway. *Oncogene* 27, 1749–1758.
- Ma, X., Holt, D., Kundu, N., Reader, J., Goloubeva, O., Take, Y., and Fulton, A.M. (2013). A prostaglandin E (PGE) receptor EP4 antagonist protects natural killer cells from PGE2-mediated immunosuppression and inhibits breast cancer metastasis. *Oncoimmunology* 2, e22647.
- MacDonald, B.T., Tamai, K., and He, X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell* 17, 9–26.
- Macor, P., Secco, E., Mezzaroba, N., Zorzet, S., Durigutto, P., Gaiotto, T., De Maso, L., Biffi, S., Garrovo, C., Capolla, S., et al. (2015). Bispecific antibodies targeting tumor-associated antigens and neutralizing complement regulators increase the efficacy of antibody-based immunotherapy in mice. *Leukemia* 29, 406–414.
- Madjd, Z., Mehrjerdi, A.Z., Sharifi, A.M., Molanaei, S., Shahzadi, S.Z., and Asadi-Lari, M. (2009). CD44+ cancer cells express higher levels of the anti-apoptotic protein Bcl-2 in breast tumours. *Cancer Immun.* 9, 4.
- Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., et al. (2008). The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell* 133, 704–715.
- Marjanovic, N.D., Weinberg, R.A., and Chaffer, C.L. (2013). Cell plasticity and heterogeneity in cancer. *Clin. Chem.* 59, 168–179.
- Maroulakou, I.G., Anver, M., Garrett, L., and Green, J.E. (1994). Prostate and mammary adenocarcinoma in transgenic mice carrying a rat C3(1) simian virus 40 large tumor antigen fusion gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 11236–11240.
- Matsui, W.H. (2016). Cancer stem cell signaling pathways. *Medicine (Baltimore)* 95, S8–S19.
- Mattiske, S., Suetani, R.J., Neilsen, P.M., and Callen, D.F. (2012). The oncogenic role of miR-155 in breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 21, 1236–1243.
- McGrogan, B.T., Gilmartin, B., Carney, D.N., and McCann, A. (2008). Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1785, 96–132.
- Medina, D. (2010). *Of Mice and Women: A Short History of Mouse Mammary Cancer Research with an Emphasis on the Paradigms Inspired by the Transplantation Method.* Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2.
- Medina, D., Kittrell, F.S., Shepard, A., Stephens, L.C., Jiang, C., Lu, J., Allred, D.C., McCarthy, M., and Ullrich, R.L. (2002). Biological and genetic properties of the p53 null preneoplastic mammary epithelium. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 16, 881–883.

Références bibliographiques

- Melchor, L., and Benítez, J. (2008). An integrative hypothesis about the origin and development of sporadic and familial breast cancer subtypes. *Carcinogenesis* 29, 1475–1482.
- Menezes, M.E., Das, S.K., Emdad, L., Windle, J.J., Wang, X.-Y., Sarkar, D., and Fisher, P.B. (2014). Genetically Engineered Mice as Experimental Tools to Dissect the Critical Events in Breast Cancer. *Adv. Cancer Res.* 121, 331–382.
- Merchant, A.A., and Matsui, W. (2010). Targeting Hedgehog--a cancer stem cell pathway. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 16, 3130–3140.
- Mesa, K.R., Rompolas, P., and Greco, V. (2015). The Dynamic Duo: Niche/Stem Cell Interdependency. *Stem Cell Rep.* 4, 961–966.
- Min, L., Zhang, C., Ma, R., Li, X., Yuan, H., Li, Y., Chen, R., Liu, C., Guo, J., Qu, L., et al. (2016). Overexpression of synuclein- γ predicts lack of benefit from radiotherapy for breast cancer patients. *BMC Cancer* 16.
- Mirzayans, R., Andrais, B., Scott, A., Wang, Y.W., and Murray, D. (2013). Ionizing radiation-induced responses in human cells with differing TP53 status. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 22409–22435.
- Molofsky, A.V., He, S., Bydon, M., Morrison, S.J., and Pardal, R. (2005). Bmi-1 promotes neural stem cell self-renewal and neural development but not mouse growth and survival by repressing the p16Ink4a and p19Arf senescence pathways. *Genes Dev.* 19, 1432–1437.
- Molyneux, G., Geyer, F.C., Magnay, F.-A., McCarthy, A., Kendrick, H., Natrajan, R., MacKay, A., Grigoriadis, A., Tutt, A., Ashworth, A., et al. (2010). BRCA1 Basal-like Breast Cancers Originate from Luminal Epithelial Progenitors and Not from Basal Stem Cells. *Cell Stem Cell* 7, 403–417.
- Morel, A.-P., Lièvre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S., and Puisieux, A. (2008). Generation of Breast Cancer Stem Cells through Epithelial-Mesenchymal Transition. *PLoS ONE* 3, e2888.
- Morgan, W.F., and Sowa, M.B. (2005). Effects of ionizing radiation in nonirradiated cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 14127–14128.
- Morrison, S.J., and Kimble, J. (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 441, 1068–1074.
- Morrison, S.J., and Weissman, I.L. (1994). The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* 1, 661–673.
- Nagasawa, H., and Little, J.B. (1992). Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles. *Cancer Res.* 52, 6394–6396.
- Nagy, P., Kettle, A.J., and Winterbourn, C.C. (2009). Superoxide-mediated Formation of Tyrosine Hydroperoxides and Methionine Sulfoxide in Peptides through Radical Addition and Intramolecular Oxygen Transfer. *J. Biol. Chem.* 284, 14723–14733.
- Nardella, C., Clohessy, J.G., Alimonti, A., and Pandolfi, P.P. (2011). Pro-senescence therapy for cancer treatment. *Nat. Rev. Cancer* 11, 503–511.

Références bibliographiques

- Nath, S., and Mukherjee, P. (2014). MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends Mol. Med.* 20, 332–342.
- Nebbioso, A., Carafa, V., Benedetti, R., and Altucci, L. (2012). Trials with “epigenetic” drugs: an update. *Mol. Oncol.* 6, 657–682.
- Nehs, M.A., Lin, C.-I., Kozono, D.E., Whang, E.E., Cho, N.L., Zhu, K., Moalem, J., Moore, F.D., and Ruan, D.T. (2011). Necroptosis is a novel mechanism of radiation-induced cell death in anaplastic thyroid and adrenocortical cancers. *Surgery* 150, 1032–1039.
- Network, T.C.G.A. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 490, 61.
- Neve, R.M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F.L., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, J.-P., Tong, F., et al. (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 10, 515–527.
- Nicolas, M., Wolfer, A., Raj, K., Kummer, J.A., Mill, P., van Noort, M., Hui, C., Clevers, H., Dotto, G.P., and Radtke, F. (2003). Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat. Genet.* 33, 416–421.
- Nieto, M.A. (2011). The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 347–376.
- Ninkina, N.N., Alimova-Kost, M.V., Paterson, J.W., Delaney, L., Cohen, B.B., Imreh, S., Gnuchev, N.V., Davies, A.M., and Buchman, V.L. (1998). Organization, expression and polymorphism of the human persyn gene. *Hum. Mol. Genet.* 7, 1417–1424.
- Notta, F., Mullighan, C.G., Wang, J.C.Y., Poepl, A., Doulatov, S., Phillips, L.A., Ma, J., Minden, M.D., Downing, J.R., and Dick, J.E. (2011). Evolution of human BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia-initiating cells. *Nature* 469, 362–367.
- Nowell, P.C. (1976). The Clonal Evolution of Tumor Cell Populations. *Science* 194, 23–28.
- Nueda, M.-L., Baladrón, V., Sánchez-Solana, B., Ballesteros, M.-Á., and Laborda, J. (2007). The EGF-like Protein dlk1 Inhibits Notch Signaling and Potentiates Adipogenesis of Mesenchymal Cells. *J. Mol. Biol.* 367, 1281–1293.
- Nueda, M.-L., Naranjo, A.-I., Baladrón, V., and Laborda, J. (2017). Different expression levels of DLK1 inversely modulate the oncogenic potential of human MDA-MB-231 breast cancer cells through inhibition of NOTCH1 signaling. *FASEB J.* 31, 3484–3496.
- Ocaña, O.H., Córcoles, R., Fabra, A., Moreno-Bueno, G., Acloque, H., Vega, S., Barrallo-Gimeno, A., Cano, A., and Nieto, M.A. (2012). Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1. *Cancer Cell* 22, 709–724.
- Ogura, A., Oowada, S., Kon, Y., Hirayama, A., Yasui, H., Meike, S., Kobayashi, S., Kuwabara, M., and Inanami, O. (2009). Redox regulation in radiation-induced cytochrome c release from mitochondria of human lung carcinoma A549 cells. *Cancer Lett.* 277, 64–71.

Références bibliographiques

- Ohi, Y., Umekita, Y., Yoshioka, T., Souda, M., Rai, Y., Sagara, Y., Sagara, Y., Sagara, Y., and Tanimoto, A. (2011). Aldehyde dehydrogenase 1 expression predicts poor prognosis in triple-negative breast cancer. *Histopathology* 59, 776–780.
- Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H., and Nakauchi, H. (1996). Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 273, 242–245.
- Osborne, C., Wilson, P., and Tripathy, D. (2004). Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer: Potential Diagnostic and Therapeutic Applications. *The Oncologist* 9, 361–377.
- Ota, I., Li, X.-Y., Hu, Y., and Weiss, S.J. (2009). Induction of a MT1-MMP and MT2-MMP-dependent basement membrane transmigration program in cancer cells by Snail1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 20318–20323.
- Paglin, S., Hollister, T., Delohery, T., Hackett, N., McMahon, M., Spiccas, E., Domingo, D., and Yahalom, J. (2001). A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res.* 61, 439–444.
- Paine, I.S., and Lewis, M.T. (2017). The Terminal End Bud: the Little Engine that Could. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 22, 93–108.
- Pan, Z.-Z., Bruening, W., Giasson, B.I., Lee, V.M.-Y., and Godwin, A.K. (2002). γ -Synuclein Promotes Cancer Cell Survival and Inhibits Stress- and Chemotherapy Drug-induced Apoptosis by Modulating MAPK Pathways. *J. Biol. Chem.* 277, 35050–35060.
- Papagiannakopoulos, T., Shapiro, A., and Kosik, K.S. (2008). MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells. *Cancer Res.* 68, 8164–8172.
- Paranjape, A.N., Balaji, S.A., Mandal, T., Krushik, E.V., Nagaraj, P., Mukherjee, G., and Rangarajan, A. (2014). Bmi1 regulates self-renewal and epithelial to mesenchymal transition in breast cancer cells through Nanog. *BMC Cancer* 14, 785.
- Park, I., Qian, D., Kiel, M., Becker, M.W., Pihalja, M., Weissman, I.L., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* 423, 302–305.
- Park, J.-H., Rasch, M.G., Qiu, J., Lund, I.K., and Egeblad, M. (2015). Presence of Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins Correlates With Tumor-Promoting Effects of Matrix Metalloproteinase 9 in Breast Cancer. *Neoplasia* 17, 421–433.
- Park, S.Y., Lee, H.E., Li, H., Shipitsin, M., Gelman, R., and Polyak, K. (2010). Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 16, 876–887.
- Pasquali, D., Rossi, V., Bellastella, G., Bellastella, A., and Sinisi, A.A. (2006). Natural and synthetic retinoids in prostate cancer. *Curr. Pharm. Des.* 12, 1923–1929.
- Pastrana, E., Silva-Vargas, V., and Doetsch, F. (2011). Eyes Wide Open: A Critical Review of Sphere-Formation as an Assay for Stem Cells. *Cell Stem Cell* 8, 486–498.

Références bibliographiques

- Patrawala, L., Calhoun, T., Schneider-Broussard, R., Zhou, J., Claypool, K., and Tang, D.G. (2005). Side Population Is Enriched in Tumorigenic, Stem-Like Cancer Cells, whereas ABCG2⁺ and ABCG2⁻ Cancer Cells Are Similarly Tumorigenic. *Cancer Res.* *65*, 6207–6219.
- Pattabiraman, D.R., and Weinberg, R.A. (2014). Tackling the cancer stem cells — what challenges do they pose? *Nat. Rev. Drug Discov.* *13*, 497–512.
- Paula, A.D.C., and Lopes, C. (2017). Implications of Different Cancer Stem Cell Phenotypes in Breast Cancer. *Anticancer Res.* *37*, 2173–2183.
- Peacock, C.D., Wang, Q., Gesell, G.S., Corcoran-Schwartz, I.M., Jones, E., Kim, J., Devereux, W.L., Rhodes, J.T., Huff, C.A., Beachy, P.A., et al. (2007). Hedgehog signaling maintains a tumor stem cell compartment in multiple myeloma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 4048–4053.
- Pece, S., Tosoni, D., Confalonieri, S., Mazzarol, G., Vecchi, M., Ronzoni, S., Bernard, L., Viale, G., Pelicci, P.G., and Di Fiore, P.P. (2010). Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content. *Cell* *140*, 62–73.
- Peitzsch, C., Tyutyunnykova, A., Pantel, K., and Dubrovskaya, A. (2017). Cancer stem cells: The root of tumor recurrence and metastases. *Semin. Cancer Biol.* *44*, 10–24.
- Perez, R.P., Hamilton, T.C., Ozols, R.F., and Young, R.C. (1993). Mechanisms and modulation of resistance to chemotherapy in ovarian cancer. *Cancer* *71*, 1571–1580.
- Perou, C.M. (2011). Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *The Oncologist* *16 Suppl 1*, 61–70.
- Perou, C.M., Sørli, T., Eisen, M.B., Rijn, M. van de, Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslén, L.A., et al. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* *406*, 747.
- Pesesse, X., Deleu, S., De Smedt, F., Drayer, L., and Erneux, C. (1997). Identification of a second SH2-domain-containing protein closely related to the phosphatidylinositol polyphosphate 5-phosphatase SHIP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *239*, 697–700.
- Pfefferle, A.D., Herschkowitz, J.I., Usary, J., Harrell, J.C., Spike, B.T., Adams, J.R., Torres-Arzayus, M.I., Brown, M., Egan, S.E., Wahl, G.M., et al. (2013). Transcriptomic classification of genetically engineered mouse models of breast cancer identifies human subtype counterparts. *Genome Biol.* *14*, R125.
- Phillips, T.M., McBride, W.H., and Pajonk, F. (2006). The response of CD24(-/low)/CD44⁺ breast cancer-initiating cells to radiation. *J. Natl. Cancer Inst.* *98*, 1777–1785.
- Piccolo, M.T., and Crispi, S. (2012). The Dual Role Played by p21 May Influence the Apoptotic or Anti-Apoptotic Fate in Cancer. *J. Cancer Res. Updat.* *1*, 189–202.
- Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H., and Clevers, H. (2003). Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev.* *17*, 1709–1713.
- Plaks, V., Kong, N., and Werb, Z. (2015). The Cancer Stem Cell Niche: How Essential Is the Niche in Regulating Stemness of Tumor Cells? *Cell Stem Cell* *16*, 225–238.

Références bibliographiques

- Polyak, K. (2007). Breast cancer: origins and evolution. *J. Clin. Invest.* *117*, 3155–3163.
- Ponti, D., Costa, A., Zaffaroni, N., Pratesi, G., Petrangolini, G., Coradini, D., Pilotti, S., Pierotti, M.A., and Daidone, M.G. (2005). Isolation and In vitro Propagation of Tumorigenic Breast Cancer Cells with Stem/Progenitor Cell Properties. *Cancer Res.* *65*, 5506–5511.
- Ponting, C.P., Oliver, P.L., and Reik, W. (2009). Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell* *136*, 629–641.
- Prat, A., Parker, J.S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J.I., He, X., and Perou, C.M. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* *12*, R68.
- Proia, T.A., Keller, P.J., Gupta, P.B., Klebba, I., Jones, A.D., Sedic, M., Gilmore, H., Tung, N., Naber, S.P., and Schnitt, S. (2011). Genetic Predisposition Directs Breast Cancer Phenotype by Dictating Progenitor Cell Fate. *Elsevier Open Arch.*
- Quintana, E., Shackleton, M., Sabel, M.S., Fullen, D.R., Johnson, T.M., and Morrison, S.J. (2008). Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* *456*, 593–598.
- Radisky, D.C., Hirai, Y., and Bissell, M.J. (2003). Delivering the message: epimorphin and mammary epithelial morphogenesis. *Trends Cell Biol.* *13*, 426–434.
- Rainaldi, G., Ferrante, A., Indovina, P.L., and Santini, M.T. (2003). Induction of apoptosis or necrosis by ionizing radiation is dose-dependent in MG-63 osteosarcoma multicellular spheroids. *Anticancer Res.* *23*, 2505–2518.
- Rakha, E.A., Reis-Filho, J.S., and Ellis, I.O. (2008). Basal-Like Breast Cancer: A Critical Review. *J. Clin. Oncol.* *26*, 2568–2581.
- Rebucci, M., and Michiels, C. (2013). Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. *Biochem. Pharmacol.* *85*, 1219–1226.
- Reya, T., and Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* *434*, 843–850.
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* *414*, 105–111.
- Reya, T., Duncan, A.W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D.C., Willert, K., Hintz, L., Nusse, R., and Weissman, I.L. (2003). A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* *423*, 409–414.
- Rhim, A.D., Mirek, E.T., Aiello, N.M., Maitra, A., Bailey, J.M., McAllister, F., Reichert, M., Beatty, G.L., Rustgi, A.K., Vonderheide, R.H., et al. (2012). EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell* *148*, 349–361.
- Ricardo, S., Vieira, A.F., Gerhard, R., Leitão, D., Pinto, R., Cameselle-Teijeiro, J.F., Milanezi, F., Schmitt, F., and Paredes, J. (2011). Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *J. Clin. Pathol.* *64*, 937–946.

Références bibliographiques

- Richert, M.M., Schwertfeger, K.L., Ryder, J.W., and Anderson, S.M. (2000). An Atlas of Mouse Mammary Gland Development. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 5, 227–241.
- Rios, A.C., Fu, N.Y., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2014). In situ identification of bipotent stem cells in the mammary gland. *Nature* 506, 322–327.
- Roarty, K., Shore, A.N., Creighton, C.J., and Rosen, J.M. (2015). Ror2 regulates branching, differentiation, and actin-cytoskeletal dynamics within the mammary epithelium. *J Cell Biol* 208, 351–366.
- Roberts, P.J., Usary, J.E., Darr, D.B., Dillon, P.M., Pfefferle, A.D., Whittle, M.C., Duncan, J.S., Johnson, S.M., Combest, A.J., Jin, J., et al. (2012). Combined PI3K/mTOR and MEK inhibition provides broad antitumor activity in faithful murine cancer models. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 18, 5290–5303.
- Roesch, A., Fukunaga-Kalabis, M., Schmidt, E.C., Zabierowski, S.E., Brafford, P.A., Vultur, A., Basu, D., Gimotty, P., Vogt, T., and Herlyn, M. (2010). A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell* 141, 583–594.
- Rohrschneider, L.R., Fuller, J.F., Wolf, I., Liu, Y., and Lucas, D.M. (2000). Structure, function, and biology of SHIP proteins. *Genes Dev.* 14, 505–520.
- Rohrschneider, L.R., Custodio, J.M., Anderson, T.A., Miller, C.P., and Gu, H. (2005). The intron 5/6 promoter region of the ship1 gene regulates expression in stem/progenitor cells of the mouse embryo. *Dev. Biol.* 283, 503–521.
- Roninson, I.B., Broude, E.V., and Chang, B.D. (2001). If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* 4, 303–313.
- Russo, J.E., and Hilton, J. (1988). Characterization of cytosolic aldehyde dehydrogenase from cyclophosphamide resistant L1210 cells. *Cancer Res.* 48, 2963–2968.
- Rycaj, K., and Tang, D.G. (2015). Cell-of-Origin of Cancer versus Cancer Stem Cells: Assays and Interpretations. *Cancer Res.* 75, 4003–4011.
- Rygaard, J., and Povlsen, C.O. (1969). Heterotransplantation of a human malignant tumour to “Nude” mice. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 77, 758–760.
- Santoro, A., Vlachou, T., Carminati, M., Pelicci, P.G., and Mapelli, M. (2016). Molecular mechanisms of asymmetric divisions in mammary stem cells. *EMBO Rep.* 17, 1700–1720.
- Sarrió, D., Rodríguez-Pinilla, S.M., Hardisson, D., Cano, A., Moreno-Bueno, G., and Palacios, J. (2008). Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res.* 68, 989–997.
- Sarry, J.-E., Murphy, K., Perry, R., Sanchez, P.V., Secreto, A., Keefer, C., Swider, C.R., Strzelecki, A.-C., Cavelier, C., Récher, C., et al. (2011). Human acute myelogenous leukemia stem cells are rare and heterogeneous when assayed in NOD/SCID/IL2R γ c-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 121, 384–395.

Références bibliographiques

- Schepers, A.G., Snippert, H.J., Stange, D.E., van den Born, M., van Es, J.H., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2012). Lineage tracing reveals Lgr5+ stem cell activity in mouse intestinal adenomas. *Science* 337, 730–735.
- Schmitt, F., Ricardo, S., Vieira, A.F., Dionísio, M.R., and Paredes, J. (2012). Cancer stem cell markers in breast neoplasias: their relevance and distribution in distinct molecular subtypes. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* 460, 545–553.
- Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4, 7–25.
- Schrader, J., Gordon-Walker, T.T., Aucott, R.L., van Deemter, M., Quaas, A., Walsh, S., Benten, D., Forbes, S.J., Wells, R.G., and Iredale, J.P. (2011). Matrix stiffness modulates proliferation, chemotherapeutic response, and dormancy in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 53, 1192–1205.
- Seaberg, R.M., and van der Kooy, D. (2003). Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. *Trends Neurosci.* 26, 125–131.
- Sengupta, S., and Harris, C.C. (2005). p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 44–55.
- Seymour, C.B., and Mothersill, C. (2004). Radiation-induced bystander effects — implications for cancer. *Nat. Rev. Cancer* 4, 158–164.
- Shackleton, M., Vaillant, F., Simpson, K.J., Stingl, J., Smyth, G.K., Asselin-Labat, M.-L., Wu, L., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2006). Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 439, 84–88.
- Shehata, M., Teschendorff, A., Sharp, G., Novcic, N., Russell, I.A., Avril, S., Prater, M., Eirew, P., Caldas, C., Watson, C.J., et al. (2012). Phenotypic and functional characterisation of the luminal cell hierarchy of the mammary gland. *Breast Cancer Res.* 14, R134.
- Shibata, M.A., Liu, M.L., Knudson, M.C., Shibata, E., Yoshidome, K., Bandey, T., Korsmeyer, S.J., and Green, J.E. (1999). Haploid loss of bax leads to accelerated mammary tumor development in C3(1)/SV40-TAg transgenic mice: reduction in protective apoptotic response at the preneoplastic stage. *EMBO J.* 18, 2692–2701.
- Shibata, M.A., Yoshidome, K., Shibata, E., Jorcyk, C.L., and Green, J.E. (2001). Suppression of mammary carcinoma growth in vitro and in vivo by inducible expression of the Cdk inhibitor p21. *Cancer Gene Ther.* 8, 23–35.
- Shimono, Y., Mukohyama, J., Nakamura, S., and Minami, H. (2015). MicroRNA Regulation of Human Breast Cancer Stem Cells. *J. Clin. Med.* 5, 2.
- Shipitsin, M., Campbell, L.L., Argani, P., Weremowicz, S., Bloushtain-Qimron, N., Yao, J., Nikolskaya, T., Serebryiskaya, T., Beroukhim, R., Hu, M., et al. (2007). Molecular Definition of Breast Tumor Heterogeneity. *Cancer Cell* 11, 259–273.
- Shiraishi, K., Shimura, T., Taga, M., Uematsu, N., Gondo, Y., Ohtaki, M., Kominami, R., and Niwa, O. (2002). Persistent induction of somatic reversions of the pink-eyed unstable mutation in F1 mice born to fathers irradiated at the spermatozoa stage. *Radiat. Res.* 157, 661–667.

Références bibliographiques

- Silva, M.T. (2010). Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program. *FEBS Lett.* 584, 4491–4499.
- Simpson, P.T., Reis-Filho, J.S., Gale, T., and Lakhani, S.R. (2005). Molecular evolution of breast cancer. *J. Pathol.* 205, 248–254.
- Singh, A., and Settleman, J. (2010). EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 29, 4741–4751.
- Singh, V.K., and Jia, Z. (2008). Targeting synuclein-gamma to counteract drug resistance in cancer. *Expert Opin. Ther. Targets* 12, 59–68.
- Singh, A., Wu, H., Zhang, P., Happel, C., Ma, J., and Biswal, S. (2010). Expression of ABCG2 (BCRP) is regulated by Nrf2 in cancer cells that confers side population and chemoresistance phenotype. *Mol. Cancer Ther.* 9, 2365–2376.
- Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P.B. (2003). Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors. *Cancer Res.* 63, 5821–5828.
- Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., and Dirks, P.B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396–401.
- Singh, V.K., Zhou, Y., Marsh, J.A., Uversky, V.N., Forman-Kay, J.D., Liu, J., and Jia, Z. (2007). Synuclein- γ Targeting Peptide Inhibitor that Enhances Sensitivity of Breast Cancer Cells to Antimicrotubule Drugs. *Cancer Res.* 67, 626–633.
- Sládek, N.E., Kollander, R., Sreerama, L., and Kiang, D.T. (2002). Cellular levels of aldehyde dehydrogenases (ALDH1A1 and ALDH3A1) as predictors of therapeutic responses to cyclophosphamide-based chemotherapy of breast cancer: a retrospective study. Rational individualization of oxazaphosphorine-based cancer chemotherapeutic regimens. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 49, 309–321.
- Sleeman, K.E., Kendrick, H., Ashworth, A., Isacke, C.M., and Smalley, M.J. (2005). CD24 staining of mouse mammary gland cells defines luminal epithelial, myoepithelial/basal and non-epithelial cells. *Breast Cancer Res.* 8, R7.
- Sly, L.M., Rauh, M.J., Kalesnikoff, J., Büchse, T., and Krystal, G. (2003). SHIP, SHIP2, and PTEN activities are regulated in vivo by modulation of their protein levels: SHIP is up-regulated in macrophages and mast cells by lipopolysaccharide. *Exp. Hematol.* 31, 1170–1181.
- Smas, C.M., and Sul, H.S. (1993). Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell* 73, 725–734.
- Song, W., Hwang, Y., Youngblood, V.M., Cook, R.S., Balko, J.M., Chen, J., and Brantley-Sieders, D.M. (2017). Targeting EphA2 impairs cell cycle progression and growth of basal-like/triple-negative breast cancers. *Oncogene* 36, 5620–5630.
- Sørli, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., et al. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas

Références bibliographiques

- distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 10869–10874.
- Sørbye, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J.S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., et al. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 8418–8423.
- Spangrude, G.J., Heimfeld, S., and Weissman, I.L. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241, 58–62.
- Specht, C.G., Tigaret, C.M., Rast, G.F., Thalhammer, A., Rudhard, Y., and Schoepfer, R. (2005). Subcellular localisation of recombinant alpha- and gamma-synuclein. *Mol. Cell. Neurosci.* 28, 326–334.
- Srinivasan, K., Strickland, P., Valdes, A., Shin, G.C., and Hinck, L. (2003). Netrin-1/neogenin interaction stabilizes multipotent progenitor cap cells during mammary gland morphogenesis. *Dev. Cell* 4, 371–382.
- Stewart, T.A., Pattengale, P.K., and Leder, P. (1984). Spontaneous mammary adenocarcinomas in transgenic mice that carry and express MTV/myc fusion genes. *Cell* 38, 627–637.
- Stingl, J., Eaves, C.J., Kuusk, U., and Emerman, J.T. (1998). Phenotypic and functional characterization in vitro of a multipotent epithelial cell present in the normal adult human breast. *Differentiation* 63, 201–213.
- Stingl, J., Eirew, P., Ricketson, I., Shackleton, M., Vaillant, F., Choi, D., Li, H.I., and Eaves, C.J. (2006). Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature* 439, 993–997.
- Strohl, A., Mori, K., Akers, S., Bshara, W., Buttin, B., Frederick, P.J., Helenowski, I.B., Morrison, C.D., Odunsi, K., Schink, J.C., et al. (2016). Synuclein- γ (SNCG) expression in ovarian cancer is associated with high-risk clinicopathologic disease. *J. Ovarian Res.* 9, 75.
- Stuelten, C.H., Mertins, S.D., Busch, J.I., Gowens, M., Scudiero, D.A., Burkett, M.W., Hite, K.M., Alley, M., Hollingshead, M., Shoemaker, R.H., et al. (2010). Complex display of putative tumor stem cell markers in the NCI60 tumor cell line panel. *Stem Cells Dayt. Ohio* 28, 649–660.
- Sulli, G., Di Micco, R., and d’Adda di Fagagna, F. (2012). Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 12, 709–720.
- Sun, Y.-F., Xu, Y., Yang, X.-R., Guo, W., Zhang, X., Qiu, S.-J., Shi, R.-Y., Hu, B., Zhou, J., and Fan, J. (2013). Circulating stem cell-like epithelial cell adhesion molecule-positive tumor cells indicate poor prognosis of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Hepatol. Baltim. Md* 57, 1458–1468.
- Surgucheva, I., McMahon, B., and Surguchov, A. (2006). gamma-synuclein has a dynamic intracellular localization. *Cell Motil. Cytoskeleton* 63, 447–458.
- Surgucheva, I., Sharov, V.S., and Surguchov, A. (2012). γ -Synuclein: Seeding of α -Synuclein Aggregation and Transmission between Cells. *Biochemistry (Mosc.)* 51, 4743–4754.

Références bibliographiques

- Surgucheva, I.G., Sivak, J.M., Elizabeth Fini, M., Palazzo, R.E., and Surguchov, A.P. (2003). Effect of γ -synuclein overexpression on matrix metalloproteinases in retinoblastoma Y79 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* *410*, 167–176.
- Surguchov, A. (2015). Intracellular Dynamics of Synucleins: “Here, There and Everywhere.” *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* *320*, 103–169.
- Surguchov, A., McMahan, B., Masliah, E., and Surgucheva, I. (2001a). Synucleins in ocular tissues. *J. Neurosci. Res.* *65*, 68–77.
- Surguchov, A., Palazzo, R.E., and Surgucheva, I. (2001b). Gamma synuclein: subcellular localization in neuronal and non-neuronal cells and effect on signal transduction. *Cell Motil. Cytoskeleton* *49*, 218–228.
- Takahashi, R., Miyazaki, H., Takeshita, F., Yamamoto, Y., Minoura, K., Ono, M., Kodaira, M., Tamura, K., Mori, M., and Ochiya, T. (2015). Loss of microRNA-27b contributes to breast cancer stem cell generation by activating ENPP1. *Nat. Commun.* *6*, 7318.
- Takebe, N., Harris, P.J., Warren, R.Q., and Ivy, S.P. (2011). Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *8*, 97–106.
- Takeuchi, H., Kondo, Y., Fujiwara, K., Kanzawa, T., Aoki, H., Mills, G.B., and Kondo, S. (2005). Synergistic augmentation of rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells by phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B inhibitors. *Cancer Res.* *65*, 3336–3346.
- 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. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *15*, 4234–4241.
- Tang, D.G. (2012). Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. *Cell Res.* *22*, 457–472.
- Tanos, T., and Briskin, C. (2008). What signals operate in the mammary niche? *Breast Dis.* *29*, 69–82.
- Taylor, R.C., Cullen, S.P., and Martin, S.J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 231–241.
- Tentler, J.J., Tan, A.C., Weekes, C.D., Jimeno, A., Leong, S., Pitts, T.M., Arcaroli, J.J., Messersmith, W.A., and Eckhardt, S.G. (2012). Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *9*, 338–350.
- Thiery, J.P. (2003). Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr. Opin. Cell Biol.* *15*, 740–746.
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y.J., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* *139*, 871–890.

Références bibliographiques

- Trejo, C.L., Luna, G., Dravis, C., Spike, B.T., and Wahl, G.M. (2017). Lgr5 is a marker for fetal mammary stem cells, but is not essential for stem cell activity or tumorigenesis. *NPJ Breast Cancer* 3, 16.
- Troester, M.A., Herschkowitz, J.I., Oh, D.S., He, X., Hoadley, K.A., Barbier, C.S., and Perou, C.M. (2006). Gene expression patterns associated with p53 status in breast cancer. *BMC Cancer* 6, 276.
- Tsai, J.H., Donaher, J.L., Murphy, D.A., Chau, S., and Yang, J. (2012). Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer Cell* 22, 725–736.
- Tu, Z., Ninos, J.M., Ma, Z., Wang, J.-W., Lemos, M.P., Despons, C., Ghansah, T., Howson, J.M., and Kerr, W.G. (2001). Embryonic and hematopoietic stem cells express a novel SH2–containing inositol 5'-phosphatase isoform that partners with the Grb2 adapter protein. *Blood* 98, 2028–2038.
- Tung, N., Garber, J.E., Hacker, M.R., Torous, V., Freeman, G.J., Poles, E., Rodig, S., Alexander, B., Lee, L., Collins, L.C., et al. (2016). Prevalence and predictors of androgen receptor and programmed death-ligand 1 in BRCA1-associated and sporadic triple-negative breast cancer. *NPJ Breast Cancer* 2, 16002.
- Ucar, D., Cogle, C.R., Zucali, J.R., Ostmark, B., Scott, E.W., Zori, R., Gray, B.A., and Moreb, J.S. (2009). Aldehyde dehydrogenase activity as a functional marker for lung cancer. *Chem. Biol. Interact.* 178, 48–55.
- Ullah, I., Subbarao, R.B., and Rho, G.J. (2015). Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci. Rep.* 35.
- Usary, J., Zhao, W., Darr, D., Roberts, P.J., Liu, M., Balletta, L., Karginova, O., Jordan, J., Combest, A., Bridges, A., et al. (2013). Predicting Drug Responsiveness in Human Cancers Using Genetically Engineered Mice. *Am. Assoc. Cancer Res.* 19, 4889–4899.
- Usary, J., Darr, D.B., Pfefferle, A., and Perou, C.M. (2016). Genetically Engineered Mouse Models of Distinct Breast Cancer Subtypes. *Curr. Protoc. Pharmacol.* Editor. Board SJ Enna Ed.--Chief A1 72, 14.38.1-14.38.11.
- Vaillant, F., Asselin-Labat, M.-L., Shackleton, M., Forrest, N.C., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2008). The Mammary Progenitor Marker CD61/ β 3 Integrin Identifies Cancer Stem Cells in Mouse Models of Mammary Tumorigenesis. *Cancer Res.* 68, 7711–7717.
- Van Keymeulen, A., Rocha, A.S., Ousset, M., Beck, B., Bouvencourt, G., Rock, J., Sharma, N., Dekoninck, S., and Blanpain, C. (2011). Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance. *Nature* 479, 189–193.
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., and Kroemer, G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 700–714.
- Vares, G., Ory, K., Lectard, B., Levalois, C., Altmeyer-Morel, S., Chevillard, S., and Lebeau, J. (2004). Progesterone prevents radiation-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene* 23, 4603–4613.

Références bibliographiques

- Vassilopoulos, A., Wang, R.-H., Petrovas, C., Ambrozak, D., Koup, R., and Deng, C.-X. (2008). Identification and characterization of cancer initiating cells from BRCA1 related mammary tumors using markers for normal mammary stem cells. *Int. J. Biol. Sci.* 133–142.
- Vega, S., Morales, A.V., Ocaña, O.H., Valdés, F., Fabregat, I., and Nieto, M.A. (2004). Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev.* 18, 1131–1143.
- Veltmaat, J.M., Mailleux, A.A., Thiery, J.P., and Bellusci, S. (2003). Mouse embryonic mammaryogenesis as a model for the molecular regulation of pattern formation. *Differ. Res. Biol. Divers.* 71, 1–17.
- Vennin, C., Spruyt, N., Dahmani, F., Julien, S., Bertucci, F., Finetti, P., Chassat, T., Bourette, R.P., Le Bourhis, X., and Adriaenssens, E. (2015). H19 non coding RNA-derived miR-675 enhances tumorigenesis and metastasis of breast cancer cells by downregulating c-Cbl and Cbl-b. *Oncotarget* 6, 29209–29223.
- Vera-Ramirez, L., Sanchez-Rovira, P., Ramirez-Tortosa, M.C., Ramirez-Tortosa, C.L., Granados-Principal, S., Lorente, J.A., and Quiles, J.L. (2011). Free radicals in breast carcinogenesis, breast cancer progression and cancer stem cells. Biological bases to develop oxidative-based therapies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 80, 347–368.
- de Visser, K.E., Ciampricotti, M., Michalak, E.M., Tan, D.W.-M., Speksnijder, E.N., Hau, C.-S., Clevers, H., Barker, N., and Jonkers, J. (2012). Developmental stage-specific contribution of LGR5(+) cells to basal and luminal epithelial lineages in the postnatal mammary gland. *J. Pathol.* 228, 300–309.
- Visvader, J.E. (2009). Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes Dev.* 23, 2563–2577.
- Visvader, J.E. (2011). Cells of origin in cancer. *Nature* 469, 314–322.
- Visvader, J.E., and Stingl, J. (2014). Mammary stem cells and the differentiation hierarchy: current status and perspectives. *Genes Dev.* 28, 1143–1158.
- Vitale, I., Galluzzi, L., Castedo, M., and Kroemer, G. (2011). Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 385–392.
- Vogel, C., Hager, C., and Bastians, H. (2007). Mechanisms of mitotic cell death induced by chemotherapy-mediated G2 checkpoint abrogation. *Cancer Res.* 67, 339–345.
- Vonderheide, R.H., Domchek, S.M., and Clark, A.S. (2017). Immunotherapy for Breast Cancer: What Are We Missing? *Clin. Cancer Res.* 23, 2640–2646.
- Vorobtsova, I.E. (2000). Irradiation of male rats increases the chromosomal sensitivity of progeny to genotoxic agents. *Mutagenesis* 15, 33–38.
- Wakatsuki, M., Ohno, T., Iwakawa, M., Ishikawa, H., Noda, S., Ohta, T., Kato, S., Tsujii, H., Imai, T., and Nakano, T. (2008). p73 protein expression correlates with radiation-induced apoptosis in the lack of p53 response to radiation therapy for cervical cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 70, 1189–1194.

Références bibliographiques

- Wang, H.-J., Guo, Y.-Q., Tan, G., Dong, L., Cheng, L., Li, K.-J., Wang, Z.-Y., and Luo, H.-F. (2013). miR-125b regulates side population in breast cancer and confers a chemoresistant phenotype. *J. Cell. Biochem.* *114*, 2248–2257.
- Wei, J., Wu, A., Kong, L.-Y., Wang, Y., Fuller, G., Fokt, I., Melillo, G., Priebe, W., and Heimberger, A.B. (2011). Hypoxia potentiates glioma-mediated immunosuppression. *PloS One* *6*, e16195.
- Whittle, J.R., Lewis, M.T., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2015). Patient-derived xenograft models of breast cancer and their predictive power. *Breast Cancer Res. BCR* *17*, 17.
- Williams, J.M., and Daniel, C.W. (1983). Mammary ductal elongation: differentiation of myoepithelium and basal lamina during branching morphogenesis. *Dev. Biol.* *97*, 274–290.
- Wong, G.S., and Rustgi, A.K. (2013). Matricellular proteins: priming the tumour microenvironment for cancer development and metastasis. *Br. J. Cancer* *108*, 755–761.
- Wouters, B.G., and Koritzinsky, M. (2008). Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *8*, 851–864.
- Wright, M.H., Calcagno, A.M., Salcido, C.D., Carlson, M.D., Ambudkar, S.V., and Varticovski, L. (2008). Brca1 breast tumors contain distinct CD44+/CD24- and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics. *Breast Cancer Res. BCR* *10*, R10.
- Wu, K., Weng, Z., Tao, Q., Lin, G., Wu, X., Qian, H., Zhang, Y., Ding, X., Jiang, Y., and Shi, Y.E. (2003). Stage-specific Expression of Breast Cancer-specific Gene γ -Synuclein. *Cancer Epidemiol. Prev. Biomark.* *12*, 920–925.
- Wu, K., Quan, Z., Weng, Z., Li, F., Zhang, Y., Yao, X., Chen, Y., Budman, D., Goldberg, I.D., and Shi, Y.E. (2007). Expression of neuronal protein synuclein gamma gene as a novel marker for breast cancer prognosis. *Breast Cancer Res. Treat.* *101*, 259–267.
- Yang, M.-H., Hsu, D.S.-S., Wang, H.-W., Wang, H.-J., Lan, H.-Y., Yang, W.-H., Huang, C.-H., Kao, S.-Y., Tzeng, C.-H., Tai, S.-K., et al. (2010). Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Cell Biol.* *12*, 982–992.
- Ye, J., Wu, D., Wu, P., Chen, Z., and Huang, J. (2014). The cancer stem cell niche: cross talk between cancer stem cells and their microenvironment. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* *35*, 3945–3951.
- Yin, H., and Glass, J. (2011). The phenotypic radiation resistance of CD44+/CD24(-or low) breast cancer cells is mediated through the enhanced activation of ATM signaling. *PloS One* *6*, e24080.
- Yu, C.-C., Lo, W.-L., Chen, Y.-W., Huang, P.-I., Hsu, H.-S., Tseng, L.-M., Hung, S.-C., Kao, S.-Y., Chang, C.-J., and Chiou, S.H. (2011). Bmi-1 Regulates Snail Expression and Promotes Metastasis Ability in Head and Neck Squamous Cancer-Derived ALDH1 Positive Cells. *J. Oncol.* *2011*.
- Yu, F., Yao, H., Zhu, P., Zhang, X., Pan, Q., Gong, C., Huang, Y., Hu, X., Su, F., Lieberman, J., et al. (2007). let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell* *131*, 1109–1123.

Références bibliographiques

Yu, Q.C., Verheyen, E.M., and Zeng, Y.A. (2016). Mammary Development and Breast Cancer: A Wnt Perspective. *Cancers* 8.

Zawistowski, J.S., Nakamura, K., Parker, J.S., Granger, D.A., Golitz, B.T., and Johnson, G.L. (2013). MicroRNA 9-3p targets $\beta 1$ integrin to sensitize claudin-low breast cancer cells to MEK inhibition. *Mol. Cell. Biol.* 33, 2260–2274.

Zhang, H., Chen, Z., Wang, X., Huang, Z., He, Z., and Chen, Y. (2013). Long non-coding RNA: a new player in cancer. *J. Hematol. Oncol.* 6, 37.

Zhou, B.-B.S., Zhang, H., Damelin, M., Geles, K.G., Grindley, J.C., and Dirks, P.B. (2009). Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 806–823.

Zhou, Y., Inaba, S., and Liu, J. (2006). Inhibition of synuclein- γ expression increases the sensitivity of breast cancer cells to paclitaxel treatment. *Int. J. Oncol.* 29, 289–295.

Zhuang, W., Qin, Z., and Liang, Z. (2009). The role of autophagy in sensitizing malignant glioma cells to radiation therapy. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 41, 341–351.

Les cancers en France - Edition 2014 - V5.pdf.

Annexe I