



**HAL**  
open science

**Modulation des voies de réparation des cassures  
double-brin de l'ADN par ZEB1, un facteur de  
transcription impliqué dans l'EMT, dans le cancer du  
sein**

Mélanie Prodhomme

► **To cite this version:**

Mélanie Prodhomme. Modulation des voies de réparation des cassures double-brin de l'ADN par ZEB1, un facteur de transcription impliqué dans l'EMT, dans le cancer du sein. Cancer. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1205 . tel-03417081

**HAL Id: tel-03417081**

**<https://theses.hal.science/tel-03417081>**

Submitted on 5 Nov 2021

**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.



N° d'ordre NNT : 2020LYSE1205

**THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**  
opérée au sein de  
**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale N° 340**  
**(Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire)**

**Spécialité de doctorat** : Biologie cellulaire  
**Discipline** : Cancérologie

Soutenue publiquement le 06/11/2020, par :  
**Mélanie Prodhomme**

---

**Modulation des voies de réparation  
des cassures double-brin de l'ADN  
par ZEB1, un facteur de transcription  
impliqué dans l'EMT, dans le cancer du sein**

---

Devant le jury composé de :

Dantzer, Françoise  
Ginestier, Christophe  
Hoffmann, Jean-Sébastien  
Meurette, Olivier

DR CNRS, Unistra, BSC  
CR INSERM, AMU, CRCM  
DR INSERM, UT3, CRCT  
MCF-HDR, UCBL1, CRCL

Rapporteuse  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur

Moyret-Lalle, Caroline  
Tissier, Agnès

PR, UCBL1, CRCL  
CR INSERM, UCBL1, CRCL

Directrice de thèse  
Co-directrice de thèse





Thèse effectuée sous la direction du Dr Agnès TISSIER et du Pr Caroline MOYRET-LALLE

Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon  
UMR INSERM 1052 – CNRS 5286  
Equipe EMT et Plasticité de la Cellule Cancéreuse  
Centre Léon Bérard – 28 rue Laënnec  
69008 Lyon

Thèse financée par la Ligue Nationale Contre le Cancer





# Université Claude Bernard – LYON 1

Administrateur provisoire de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Jean-François MORNEX
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

## COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

## COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI



*A mes parents,  
A ma famille,  
A mon oncle, mon parrain ...*



## Remerciements

*« Merci d'être là. Merci d'être qui vous êtes. Merci d'être de bonnes personnes qui contribuent à créer un monde meilleur. Merci d'être vous et de faire de votre mieux chaque jour. Merci d'exister.*

*Aujourd'hui justement j'ai envie d'une part de vous dire merci mais aussi de vous faire avoir une réflexion...*

*Depuis combien de temps n'avez-vous pas dit merci ? Vraiment "merci".*

*Celui qui vient du fond du cœur. Le merci conscient. Pas le merci de politesse, parce que l'on sait que c'est ce que l'on doit dire quand on nous tend la main ou parce que l'on sait que c'est ce qu'il faut dire. Depuis combien de temps n'avez-vous pas dit "merci" en le pensant réellement avec le cœur ? Depuis combien de temps n'avez-vous pas dit "merci" parce que vous avez pris les choses pour acquises ? Peut-être que vous ne voyez pas tout ce qu'on vous donne, ce que vous avez devant les yeux, tous les cadeaux de la vie. Depuis combien de temps n'avez-vous pas pensé et ressenti "merci" ? Dans nos vies, on tient beaucoup de choses pour acquises. On a du mal à observer tous ces petits détails, on pense que l'on se suffit à nous-mêmes, que l'on est bien seul, que l'on n'a besoin de personne. On pense que c'est normal que l'on s'occupe de nous, de pouvoir s'habiller, de pouvoir manger, de pouvoir travailler, et même de sourire. On pense aussi que tout est gratuit. On en oublie souvent de dire merci...*

*Et aujourd'hui justement, j'ai envie de vous faire avoir cette réflexion : et si aujourd'hui vous disiez merci, un vrai merci, à tous ceux qui vous entourent et qui vous permettent d'avoir la vie que vous menez ? [...] »*

*Chloé Bloom*



## Remerciements

Cette thèse n'aurait pu être la même sans les personnes qui ont contribué scientifiquement à ce projet ainsi que celles qui m'ont soutenues tout au long de ces années. Je souhaite ici les remercier de tout mon cœur pour leurs implications.

Je souhaite remercier dans un premier temps le **Dr Françoise Dantzer**, le **Dr Christophe Ginestier**, le **Dr Jean-Sébastien Hoffmann** et le **Dr Olivier Meurette** pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et d'évaluer mon travail. Je remercie tout particulièrement le **Dr Françoise Dantzer** et le **Dr Christophe Ginestier** pour avoir accepté la lourde tâche de lire ce manuscrit en tant que rapporteurs.

Je remercie le **Dr Jean-Sébastien Hoffmann** et le **Dr David Bernard** pour m'avoir apporté leurs expertises, leurs conseils et leur bienveillance sur mon travail lors de mes différents comités de suivi de thèse. Un merci tout particulier pour le **Dr Jean-Sébastien Hoffmann** avec qui j'ai eu la chance de pouvoir collaborer. Merci de m'avoir accueillie dans ton laboratoire et de m'avoir permis d'apprendre de nouvelles techniques. Merci à ton équipe de m'avoir si gentiment reçu.

Je remercie tout naturellement le **Pr Alain Puisieux** pour m'avoir donnée l'opportunité de réaliser ma thèse dans son équipe. Merci de m'avoir fait confiance durant toutes ces années, de m'avoir apportée de nombreux conseils autant professionnels que personnels, d'avoir été là pour répondre à mes questions, et enfin de m'avoir aidée à devenir une meilleure scientifique.

Je remercie le **Pr Caroline Moyret-Lalle**, ma directrice de thèse. Merci pour ta confiance, ta disponibilité, tes conseils en tous genres. Merci pour tes idées, tes conseils qui font aussi que cette thèse est ce qu'elle est aujourd'hui. Merci pour ton soutien.

Je remercie particulièrement le **Dr Agnès Tissier**, ma co-directrice de thèse, mon encadrante, sans qui ce travail n'aurait tout simplement pas pu être réalisé. Merci pour tout. Merci pour ta disponibilité, tes conseils, tes idées, ta confiance. Merci d'avoir écouté mes idées, souvent bien farfelues et quelques fois fructueuses. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir supportée surtout dans ces moments-là. Merci de m'avoir confiée ce projet tout aussi ambitieux qu'intéressant. Tu as fait de moi quelqu'un de passionnée par ce domaine. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir laissé la liberté de développer ce projet et la liberté de tester mes hypothèses même les plus folles. Merci pour cette liberté qui m'a permis de développer de l'autonomie, du libre arbitre et de la réflexion qui j'en suis sûre me sera d'une grande aide pour l'avenir. Merci de m'avoir impliquée dans toutes les étapes du développement de ce projet, de sa conception théorique à sa réalisation pratique. Merci pour nos discussions scientifiques qui m'ont permis d'aborder ce projet sous divers angles. Merci pour nos discussions non scientifiques qui m'ont fait grandir et m'ont permis de rester optimiste. Merci pour tout ton soutien dans les bons moments mais surtout dans les difficiles. Merci pour ton aide tout au long de ces 4 années de thèses et même pendant mon stage de master. Merci pour ta patience, ton écoute, ta gentillesse. Merci d'avoir été là pour moi. Sans toi cette thèse ne serait absolument pas la même. Encore merci.

Mes remerciements viennent ensuite à toute l'équipe. J'ai eu la chance de faire partie de cette grande famille, de rencontrer des personnes accueillantes et généreuses. Merci à **Freddie** et **Christelle** de m'avoir formée, aidée, conseillée. Merci à vous de m'avoir transmis avec patience et bonne humeur votre savoir. Merci d'avoir été présentes pour moi et d'avoir toujours trouvé le temps pour répondre à mes nombreuses questions. Merci pour votre contribution à ce projet. Mille mercis les filles. Merci à **Marie-ambre** et **Christiane** qui m'ont aidée à faire mes premiers pas au laboratoire avant de partir pour de nouvelles aventures. Merci à **Roxane** qui, en plus d'être une collègue hors-pair, a réalisé la plus grande partie des analyses bio-informatiques. Merci, sans toi, ce projet serait bien différent. Merci à **Maxime** qui m'a aidé dans le développement de certaines techniques telles que la CHIP, mais pas seulement, qui m'accompagne bien souvent dans mes délires, à ses dépens. Merci à **Maud** et **Hadrien** pour avoir été mes compagnons de thèse, mes co-thésards. Merci pour votre soutien, vos délires et vos fous rires. Merci à mes stagiaires tout au long de ces années qui ont participé à la réalisation de ce

## Remerciements

projet. Merci à vous. Enfin merci à l'ensemble de mes collègues : **Anne-pierre, Julie D., Rahma, Noémie, Samia, Francesca, Maria, Amélien, Pierre, Ingrid, Julie C., Laurent, Simon, Yaqi, Valentin, Sébastien, Marine, Lauriane, Milène, Gael, Arnaud.** Merci à vous tous pour tout, je n'ai pas assez de mots pour exprimer tout ma gratitude envers vous tous. Alors je vous dirai juste merci. Merci pour tout. Merci d'être vous.

Merci à tous ceux qui de près ou de loin ont participé à l'élaboration de ce projet. Je pense notamment à **Christophe Vanbelle, le Dr Janet Hall, le Dr Rick Wood, le Dr Valérie Bergoglio et le Dr Virginie Petrilli.** Par nos échanges et vos conseils ce projet est devenu ce qu'il est aujourd'hui. Merci.

Merci à la **Ligue Nationale Contre le Cancer** pour avoir accepté de financer mes travaux durant l'ensemble de ces 4 années de thèse. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée. Grâce à votre soutien, j'ai eu l'opportunité de réaliser ma thèse dans un formidable laboratoire et d'y mener mes travaux qui vont aboutir, prochainement je l'espère, sur un article publié dans *Cancer Research*.

Merci à mes amis. Merci à mes amis qui font partie de ma vie depuis de nombreuses années déjà bien avant cette aventure et merci à ceux qui sont arrivés pendant la thèse, des collègues pour la plupart, des amis chers aujourd'hui. Merci à vous chers amis, merci d'avoir toujours été là, merci de m'avoir entourée et chouchoutée, merci de m'avoir aidée à décompresser. Merci notamment à **Elodie, Mélissa et Charlotte** qui m'ont toujours soutenue, qui ont toujours été présentes pour moi. Merci pour tout, merci pour vos délires, vos fous rires, votre bonne humeur. Un merci tout particulier à **Elodie** qui a bien voulu relire ma thèse. Merci.

Enfin, je remercie ma famille à qui je dédie ma thèse. A mes parents pour leur amour, leur confiance et leur soutien inconditionnels et irremplaçables. Vous m'avez toujours écoutée et encouragée dans mes choix même si ces derniers pouvaient vous blesser. Merci de m'avoir permis de faire toutes ces années d'études. Merci d'avoir toujours été là pour moi peu importe la situation. Vous m'avez appris la valeur du travail, la rigueur et la persévérance. Vous m'avez forcé à croire en mes rêves et à tout faire pour y arriver. Je vous en remercie de tout mon cœur car sans vous je n'y serais jamais arrivée. Merci d'avoir cru en moi. Merci à ma sœur d'être aussi tolérante et bienveillante envers moi, je sais que ce n'est pas toujours facile. Merci d'avoir été présente, de m'avoir soutenue et d'avoir cru en moi. Merci à mes grands-parents de m'avoir soutenue et d'avoir cru en moi. Merci d'avoir été une oreille attentive. Merci de m'avoir encouragé à croire en mes rêves. Merci à ma famille, à mes oncles, mes cousines et cousin, à vous tous. Mes mots ne suffiront pas pour vous dire tout ce que j'ai sur le cœur et vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi. Alors je dirai juste merci, merci du fond du cœur. Je vous aime fort.

Merci à tous.

Mélanie

## Remerciements

*« Et enfin merci à vous, merci à nous, merci à moi. Merci à moi pour ce que je fais chaque jour, mes petites actions, mes plus petits gestes, qui contribuent à un monde meilleur. Merci pour l'amour que je donne au monde aussi. Merci pour les actions qui font que je contribue à quelque chose. Merci d'être qui je suis. Merci de recevoir, de donner, de sourire...*

*Merci d'avoir dit merci. On ne dit pas assez merci. Du moins quand on le dit on ne le pense pas toujours. On dit trop merci par politesse, parce qu'on doit, parce qu'on a appris que ne pas le dire c'était impoli. Et si pour une fois, on disait vraiment merci ? Merci le monde, merci tout le monde, puisqu'on a besoin de tout le monde et que sans les autres notre vie ne serait pas telle qu'elle est et je pense qu'on l'a trop oublié. Et puis merci la vie. Merci la vie de nous apporter des cadeaux, des cadeaux qui sont parfois mal emballés, des obstacles, des challenges... Merci la vie d'être aussi dure, aussi violente, aussi puissante, aussi intense... Je pense qu'il est vraiment temps de dire merci, un vrai merci, de ressentir « merci » [...]*

*Vous pouvez aussi vous dire merci, merci à vous, merci d'exister, merci de participer, merci d'être qui vous êtes, merci pour ce que vous faites.*

*Merci à vous, merci à nous. »*

*Chloé Bloom*



*Modulation des voies de réparation  
des cassures double-brin de l'ADN par ZEB1,  
un facteur de transcription impliqué dans l'EMT,  
dans le cancer du sein*

*« On lit ou on écrit de la poésie non pas parce que c'est joli. On lit et on écrit de la poésie parce que l'on fait partie de l'humanité, et que l'humanité est faite de passions. La médecine, le commerce, le droit, l'industrie sont de nobles poursuites, et sont nécessaires pour assurer la vie. Mais la poésie, la beauté, l'amour, l'aventure, c'est en fait pour cela qu'on vit. Pour citer Whitman : « Ô moi ! Ô la vie ! Tant de questions qui m'assaillent sans cesse, ces interminables cortèges d'incroyants, ces cités peuplées de sots. Qu'y a-t-il de bon en cela ? Ô moi ! Ô la vie ! ». Réponse : que tu es ici, que la vie existe, et l'identité. Que le prodigieux spectacle continue et que tu peux y apporter ta rime. Que le prodigieux spectacle continue et que tu peux y apporter ta rime... Quelle sera votre rime ? »*

*Robin Williams, Le Cercle des poètes disparus (1989), écrit par Tom Schulman*



## Résumé

Les cancers du sein constituent la première cause de mortalité par cancer chez la femme. En particulier un des sous-types de cancers du sein triples négatifs, les tumeurs *claudin-low* très agressives présentent l'expression de facteurs impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse. Ce mécanisme complexe de transdifférenciation cellulaire est contrôlé par des facteurs de transcription embryonnaires comme ZEB1.

Au sein de notre équipe, il a été montré que certaines tumeurs *claudin-low* ont évolué sur la base d'une faible instabilité génétique, probablement imputable à la réparation fautive de lésions de l'ADN apparues au cours du processus de progression tumorale.

Les résultats, obtenus au cours de ma thèse, montrent que les cellules *claudin-low* limitent l'utilisation d'une voie de réparation par jonction très mutagène, appelée TMEJ dépendante notamment du gène *POLQ* et de *PARP1*. En effet, les cellules *claudin-low*, exprimant très fortement ZEB1, présentent à l'inverse de très faible niveau d'expression de *POLQ* et une diminution de l'activité de PARylation, conduisant à une réduction de l'utilisation de la voie du TMEJ. Ainsi ce mécanisme original de régulation TMEJ met en évidence ZEB1 comme un acteur clé de la stabilité du génome lors de la progression du cancer, *via* sa répression de *POLQ*.

L'ensemble de ces travaux de thèse a permis en caractérisant le rôle de ZEB1 sur l'utilisation relative des voies de réparation de l'ADN d'exploiter cette modulation en terme thérapeutique pour le traitement ces tumeurs *claudin-low* actuellement résistantes aux chimiothérapies conventionnelles.



# *Modulation of DNA double-strand breaks repair pathways by ZEB1, an EMT transcription factor, in breast cancer*

## Abstract

Breast cancer is the leading cause of cancer death in women. Particularly one of the triple negative breast cancer subtypes, very aggressive *claudin-low* tumors exhibit the expression of factors involved in the epithelial to mesenchymal transition. This complex mechanism of cellular transdifferentiation is controlled by embryonic transcription factors such as ZEB1.

In our team, it has been shown that some *claudin-low* tumors have evolved on the basis of low genetic instability, probably attributed to faulty repair of DNA lesions that arose during the process of tumor progression.

The results, obtained during my thesis, show that *claudin-low* cells limit the use of a mutagenic junction repair pathway, called TMEJ, dependent in particular on the *POLQ* and *PARP1* genes. Indeed, *claudin-low* cells expressing very strongly ZEB1, conversely, exhibit a very low level of expression of *POLQ* and a decrease in PARylation activity, leading to a reduction in the use of the TMEJ pathway. Thus, this original mechanism of TMEJ regulation highlights ZEB1 as a key player in genome stability during cancer progression, *via* its repression of *POLQ*.

All of this thesis work enabled by characterizing the role of ZEB1 on the relative use of DNA repair pathways to exploit this modulation in therapeutic terms for the treatment of these *claudin-low* tumors currently resistant to conventional chemotherapy.



# Sommaire

<i>Préambule</i>	- 1 -
<i>Introduction</i>	- 3 -
Chapitre I : La transition épithélio-mésenchymateuse	- 5 -
I. La transition épithélio-mésenchymateuse : le passage d'une cellule épithéliale à une cellule mésenchymateuse	- 6 -
a. L'EMT, un processus de transdifférenciation cellulaire	- 6 -
b. L'EMT, un processus embryonnaire essentiel	- 8 -
II. Régulation de la transition épithélio-mésenchymateuse	- 12 -
a. Les voies de signalisation	- 12 -
b. Les facteurs de transcription de l'EMT	- 18 -
c. Régulation de l'EMT par les microARNs	- 25 -
III. La transition épithélio-mésenchymateuse est un processus à la fois physiologique et pathologique	- 29 -
a. Les EMT de type 1 : Développement embryonnaire et organogenèse	- 30 -
b. Les EMT de type 2	- 34 -
c. Les EMT de type 3	- 36 -
IV. La transition épithélio-mésenchymateuse est un acteur majeur de l'initiation tumoral	- 43 -
a. L'EMT et les cellules souches cancéreuses	- 43 -
b. L'EMT, cycle cellulaire et échappement à la sénescence	- 48 -
Chapitre II : Les cancers du sein	- 53 -
I. Classifications	- 54 -
a. Caractéristiques clinico-histo-pathologiques des cancers du sein	- 55 -
b. Les classifications moléculaires	- 60 -
II. Traitements	- 72 -
a. Les traitements conventionnels	- 73 -
b. Les thérapies ciblées	- 75 -
c. Conclusion	- 79 -

Chapitre III : Dommages à l'ADN et la réparation des cassures double-brin - 80 -

I.	Les dommages à l'ADN	- 81 -
a.	Nature des dommages	- 81 -
b.	Facteurs endogènes	- 83 -
II.	La réponse aux dommages	- 91 -
a.	Signalisation des dommages	- 91 -
b.	Mécanismes de réparation des dommages	- 95 -
III.	Les mécanismes de réparation des cassures double-brin	- 105 -
a.	La voie de recombinaison homologue (HR)	- 106 -
b.	La voie canonique de réparation par jonction d'extrémités non homologues (c-NHEJ)	- 109 -
c.	La voie de réparation par jonction d'extrémités médiée par l'ADN polymérase $\theta$ (TMEJ)	- 112 -
d.	La voie de réparation par l'hybridation de brins complémentaires (SSA)	- 117 -

Chapitre IV : Modulation des voies de réparations des dommages de l'ADN - 120 -

I.	Implication de l'EMT dans la régulation de la signalisation des dommages	- 120 -
II.	Modulation des voies de réparation des cassures double-brin par les acteurs de la réparation	- 122 -
III.	Modulation des voies de réparation des cassures double-brin par l'EMT	- 126 -

**Résultats** - 129 -

Préambule - 131 -

Chapitre I : ZEB1 réprime la voie mutagène du TMEJ - 133 -

I.	Introduction	- 133 -
II.	Résultats	- 133 -
a.	Modulation des voies de réparations de l'ADN en fonction de l'EMT	- 133 -
b.	ZEB1 réprime la voie mutagène de réparation par jonction d'extrémités médiée par POL $\theta$ dans les cancers du sein (Article en cours de soumission)	- 137 -
c.	Résultats complémentaires :	- 177 -
III.	Conclusion	- 192 -

Chapitre II : Sensibilisation des tumeurs <i>claudin-low</i> par l'inhibition de la voie canonique de jonction des extrémités non homologues	- 194 -
--	---------

I. Introduction	- 194 -
II. Résultats	- 196 -
a. Expressions différentielles des acteurs du c-NHEJ dans les lignées TNBC	- 196 -
b. Modification de l'activité de DNA-PKcs dans les cellules exprimant ZEB1	- 198 -
c. Sensibilisation des tumeurs ZEB1 positives à la chimiothérapie par l'inhibiteur de DNA-PKcs- 200 -	
III. Conclusion	- 202 -

***Discussion générale et perspectives*** - 203 -

Chapitre I : ZEB1 réprime la voie mutagène du TMEJ	- 205 -
--	---------

I. POL $\theta$ préserve l'intégrité du génome au prix d'une forte instabilité	- 205 -
II. ZEB1 module l'activité d'un second acteur du TMEJ : PARP1	- 209 -
a. La répression de <i>POLQ</i> par ZEB1 semble être responsable de la modulation de l'activité de PARylation	- 212 -
b. ZEB1 semble favoriser l'expression de PARG, régulant ainsi la PARylation	- 214 -

Chapitre II : Nouvelles approches thérapeutiques dans le traitement des tumeurs <i>claudin-low</i> TNBC	- 217 -
---	---------

***Matériels et méthodes*** - 221 -

***Références*** - 229 -



## Table des illustrations

Figure 1: La transition épithélio-mésenchymateuse.	- 6 -
Figure 2 : L'implantation embryonnaire	- 9 -
Figure 3 : la gastrulation	- 10 -
Figure 4 : La neurulation	- 11 -
Figure 5 : Les voies de signalisation de l'induction de l'EMT	- 13 -
Figure 6 : Rôles transcriptionnels des EMT-TFs	- 18 -
Figure 7 : Représentation schématique des gènes de la famille SNAI	- 20 -
Figure 8 : Représentation schématique des gènes de la famille TWIST	- 21 -
Figure 9 : Représentation schématique des gènes de la famille ZEB	- 22 -
Figure 10 : ZEB1 et ZEB2 agissent à la fois comme répresseur et activateur de la transcription	- 24 -
Figure 11 : Biogénèse et maturation des microARNs	- 26 -
Figure 12 : Classification des différentes EMT	- 29 -
Figure 13 : Développement post-natal de la glande mammaire	- 31 -
Figure 14: Organisation hiérarchique des cellules de la glande et leurs marqueurs membranaires spécifiques	- 32 -
Figure 15 : Les "Hallmarks of cancer"	- 38 -
Figure 16 : les différentes étapes du développement d'un carcinome	- 40 -
Figure 17: Les différents modèles théoriques de l'hétérogénéité tumorale	- 44 -
Figure 18: p53, gardien de l'identité tissulaire et cellulaire et capteur du stress cellulaire	- 49 -
Figure 19: Rôles des EMT-TFs dans le contrôle du cycle cellulaire lors d'un dommage à l'ADN	- 52 -
Figure 20: Les chiffres sur le cancer du sein	- 53 -
Figure 21: Diagnostic complexe et multidisciplinaire des cancers du sein	- 54 -
Figure 22: Evolution du cancer du sein ; différenciation entre carcinome in situ et carcinome invasif	- 57 -
Figure 23: Classification histopathologique des cancers du sein et leurs marquages histologiques	- 58 -
Figure 24: Classification des cancers du sein selon l'expression du récepteur à l'œstrogène (ER), du récepteur à la progestérone et de l'amplification du récepteur HER2	- 61 -
Figure 25 : Répartition des tumeurs immunohistochimiques selon la classification du PAM50	- 64 -
Figure 26: Représentation des 10 sous-types des clusters d'intégration (Intclusters) selon les profils d'altération du nombre de copie de gènes (CNA)	- 65 -
Figure 27 : Développement hiérarchique des cellules mammaires et le parallèle avec le développement des tumeurs mammaires	- 67 -
Figure 28 : Liens entre les tumeurs TNBC, les tumeurs basal-like et le phénotype BRCAness	- 70 -
Figure 29 : les dommages à l'ADN	- 83 -
Figure 30 : la chaîne respiratoire	- 84 -

Figure 31 : Représentation schématique du cycle cellulaire	- 88 -
Figure 32 : Organisation de la réponse aux dommages	- 92 -
Figure 33: Les voies de réparation des cassures double-brin	- 105 -
Figure 34: La voie de la recombinaison homologue (HR)	- 108 -
Figure 35 : La voie canonique de réparation par jonction d'extrémités non homologues (c-NHEJ)	- 111 -
Figure 36 : La voie de réparation par jonction d'extrémités médiée par l'ADN polymérase $\theta$ (TMEJ)	- 115 -
Figure 37: la voie de réparation « Single Strand Annealing » (SSA)	- 119 -
Figure 38 : Modulation des voies de réparation par les acteurs de la réparation de l'ADN	- 125 -
Figure 39 : Modulation des voies de réparation par les facteurs de l'EMT	- 127 -
Figure 40 : Expressions différentielles des acteurs des voies de réparation selon le score EMT	- 135 -
<b>Figure-Article 1: <i>POLQ</i> expression according to genomic instability in breast tumors</b>	<b>- 162 -</b>
<b>Figure-Article S1: PARP1 and LIG3 expression according to genomic instability in breast tumors</b>	<b>- 163 -</b>
<b>Figure-Article 2: ZEB1 positive tumors are usually <i>POLQ</i> negative</b>	<b>- 165 -</b>
<b>Figure-Article S2: <i>POLQ</i> and ZEB1 expressions are mostly mutually exclusive in tumors</b>	<b>- 166 -</b>
<b>Figure-Article 3: ZEB1 regulates <i>POLQ</i> expression</b>	<b>- 168 -</b>
<b>Figure-Article S3: ZEB1 regulates <i>POLQ</i> expression</b>	<b>- 169 -</b>
<b>Figure-Article 4: ZEB1 modulates TMEJ and ZEB1 mediates micronuclei formation by <i>POLQ</i> repression</b>	<b>- 173 -</b>
<b>Figure-Article S4: ZEB1 depletion increases TMEJ activity</b>	<b>- 174 -</b>
<b>Figure-Article 5: Model of potential implication of TMEJ modulation by ZEB1</b>	<b>- 176 -</b>
Figure 41 : Le variant A du polymorphisme c.-1060G>A empêche la fixation de ZEB1 sur le promoteur de POLQ	- 179 -
Figure 42 : La régulation de POLQ par ZEB1 est indépendante du cycle cellulaire	- 181 -
Figure 43 : La présence de POLQ et l'absence de ZEB1 génèrent de nombreux dommages à l'ADN endogènes	- 183 -
Figure 44: La perte de ZEB1 sensibilise les claudin-low aux inhibiteurs de PARP grâce à la réexpression de POLQ	- 186 -
Figure 45: Hypothèse pour la sensibilité aux PARPi observée chez les claudin-low surexprimant POLQ	- 188 -
Figure 46 : ZEB1 module l'activité de PARylation	- 191 -
Figure 47 : Expressions différentielles des acteurs du c-NHEJ selon l'expression des acteurs de l'EMT dans les TNBC	- 197 -
Figure 48 : ZEB1 favorise l'activité de DNA-PKcs et donc du c-NHEJ	- 199 -
Figure 49 : L'inhibiteur de DNA-PKcs sensibilise les tumeurs ZEB1 positives à la chimiothérapie	- 201 -
Figure 50 : Structure protéique de POL $\theta$	- 206 -
Figure 51 : Répartitions des acteurs de la réparation parmi les différents sous-types du cancer du sein	- 208 -
Figure 52: PARP1 et les régulateurs de la PARylation	- 211 -
Figure 53 : POLQ influence l'activité de PARylation indépendamment de ZEB1	- 214 -
Figure 54 : ZEB1 favorise l'expression de PARG afin de limiter l'activité de PARylation de PARP1	- 216 -

## Table des tableaux

Tableau 1: Comparaison des grades histo-pronostiques :	- 57 -
Tableau 2 : Gènes possiblement impliqués dans le phénotype BRCAness	- 71 -
Tableau 3 : Les ADN polymérases humaines	- 102 -



## Abréviations

### A

AEM : Agence européenne des médicaments  
ADNsb : ADN simple-brin  
AFSSAPS : Agence Française de Sécurité Sanitaires des Produits de Santé  
APC/C : *anaphase-promoting complex or cyclosome*  
ARTD : domaine protéinique ADP-ribosyltransférases  
ATR : kinase *Ataxia telangiectasia and Rad3 related*  
ATM : kinase *Ataxia-Telangiectasia Mutated*

### B

BARD1 : *BRCA1-associated RING domain protein 1*  
BER : réparation par excision de base (*Base Excision Repair*)  
bHLH : *basic Helix Loop Helix*  
BIR : Réplication induite par cassure (*break-induced replication*)

### C

CCIS : adénocarcinome canalaire *in situ*  
CDB(s) : cassure(s) double-brin  
C/EBP $\delta$  : *Ccaat / enhancer-binding protein  $\delta$* , codé par le gène CEBPD  
CID : domaine de recrutement du corépresseur CtBP  
CLIS : Carcinomes lobulaires au stade *in situ*  
c-NHEJ : La voie canonique de réparation par jonction d'extrémités non homologues (*canonical-Non Homologous End-Joining*)  
CHEK1 ou 2 : *Checkpoint Kinase 1 ou 2*  
CDK : *Cyclin Dependent Kinase*  
CNA : altérations du nombre de copie de gènes  
CNV : *copy number variation*  
CSB ou CSBs : cassure(s) simple-brin  
CSC(s) : cellule(s) souche(s) cancéreuse(s) (*cancer stem cell(s)*)  
CTC(s) : cellule(s) tumorale(s) circulante(s) (*circulating tumor cell(s)*)

### D

DB : *D-Box ou Destruction-box domain*  
DCIS : *Ductal Carcinoma In Situ*  
DDR : *DNA Damage Response*  
DNA-PKcs : *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit* ; codé par le gène PRKDC  
DSBR : Conversion génique (*double-strand break repair*)

## Abréviations

### E

EE : grade tumoral grade Elston et Ellis  
EGF : facteur de croissance épidermique  
EMT : transition épithelio-mésenchymateuse (*epithelial to mesenchymal transition*)  
EMT-TFs : facteurs de transcription de l'EMT (*EMT-transcription factors*)  
ER : récepteurs aux œstrogènes (*estrogen receptor*)  
ER $\alpha$  : récepteur aux œstrogènes  $\alpha$

### F

FA : anémie de Fanconi  
FAAP24 : *FA Core Complex Associated Protein 24*  
FANCD2 : *Fanconi anemia group D2 protein*  
FDA : *Food and Drug Administration*  
FGA : Fraction du génome altéré (*Fraction of the Genome Altered*)  
FGF : facteur de croissance des fibroblastes (*Fibroblast Growth Factor*)  
FISH : hybridation *in situ* en fluorescence

### G

GG-NER : *Global Genomic Repair*  
GSK3 $\beta$  : *Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$*

### H

hESC(s) : cellule(s) souche(s) embryonnaire(s) humaine(s) (*human embryonic stem cell(s)*)  
HER ou HER/neu : *Receptor tyrosine-protein kinase /proto-oncogene neu*  
ERBB-2 : *human epidermal growth factor receptor 2*  
HD : homéo-domaine  
HDAC(s) : histone(s) désacétylase(s)  
HGF : facteur de croissance des hépatocytes (*Hepatocyte Growth Factor*)  
HIF1 $\alpha$  : facteur 1 $\alpha$  inductible par l'hypoxie (*Hypoxia-inducible factor 1-alpha*)  
HR : recombinaison homologue (*Homologous Recombination*)

### I

ICL : *Interstrand cross-Link*  
ICM : masse cellulaire interne (*Inner Cell Masse*)  
IDC : *Invasive Ductal Carcinoma*  
IHC : immunohistochimie  
IL : Interleukine tel que IL1 $\beta$  ou IL2

### J

JAK : *Janus kinase*

## Abréviations

### K

### L

LEF1 : *Lymphoid Enhancer binding Factor 1*

### M

MAPK ou MAPKinase(s) : *Mitogen-activated protein kinase(s)*

MAR : *mono(ADP-ribose)*

MARylation : *mono ADP-ribosylation*

MaSC(s) : cellule(s) souche(s) mammaire(s) (*Mammary Stem Cell(s)*)

MCM : protéines de maintien des mini-chromosomes (*Mini Chromosome Maintenance proteins*)

MEC : matrice extra-cellulaire

MEF : fibroblastes embryonnaires de souris (*Mouse Embryonic Fibroblast*)

MET : transition mésenchymo-épithéliale (*mesenchymal to epithelial transition*)

MFH : *histone fold protein complex*

miARN(s) : microARN(s)

MITF : *microphthalmia-associated transcription factor*

MMP : métalloprotéinases

MMR : voie de réparation des mésappariements (*MisMatch Repair*)

MRN : MRE11-RAD50-NBS1 complexe

MSRB3 : *Methionine Sulfoxide Reductase B3*

### N

NF-κB : facteur nucléaire κB

NES : domaine d'exclusion nucléaire

NER : réparation par excision de nucléotide (*nucleotid excision repair*)

NuRD : *nucleosome remodeling and deacetylase complex*

### O

8-oxoG : 8-Oxoguanine

OR : origine de réplication

ORC : complexe multiprotéique de reconnaissances des origines (*Origin Recognition Complex*)

### P

PAR : Poly(ADP-ribose)

PARP : Poly(ADP-ribose) polymérase

PARYlation : Poly ADP-ribosylation

PAXX : *P*Aralogue of *X*RCC4 and *X*LF

PCAF : *p300/CBP-associated factor*

PCNA : *Proliferating cell nuclear antigen*

PD1 : *Programmed cell death 1*

PD-L1 : *Programmed cell death 1 ligand 1*

POL : Polymérase

POLθ : ADN polymérase θ, codé par le gène *POLQ*

## Abréviations

PR : récepteur à la progestérone (*Progesterone Receptor*)

PI3K : Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase

## Q

## R

RB : rétinoblastome

RCS : espèces réactives de chlorure (*Reactive Chlorine Species*)

RISC : *RNA-induced silencing complex*

RNS : espèces réactives d'azote (*Reactive Nitrogen Species*)

ROS : espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*)

RPA : *Replication protein A*

RSR : voie de réponse à un stress répliatif (*Replication stress response*)

RSS : espèces réactives de soufre (*Reactive Sulfur Species*)

RTK : récepteurs au tyrosine kinases

## S

SBR : grade tumoral Scarff-Bloom et Richardson

SDSA : Modèle d'appariement dépendant de la synthèse d'ADN (*synthesis-dependent strand annealing*)

SID : domaine d'interaction avec les protéines Smads

SNAG : Snail/Gfi domaine

SSA : *Single Strand Annealing*

STAT3 : *Signal Transducers and Activators of Transcription 3*

## T

TβRI ou II : récepteur de type I ou II au TGFβ

TCF4 : *Transcription Factor 4*

TC-NER : *Transcription Coupled-NER*

TE : trophoctoderme

TGFβ : facteur de croissance transformant β

TIC(s) : cellule(s) initiateur(e) de la tumeur (*Tumor Initiating Cell(s)*)

TLS : la synthèse translésionnelle de l'ADN (*Translesion DNA synthesis*)

TMEJ : voie de réparation par jonction d'extrémités médiée par l'ADN polymérase θ

TNBC : tumeur du sein triple-négative (*Triple-Negative Breast Cancer*)

## U

## V

VEGF : facteur de croissance endothélial vasculaire (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

## Abréviations

### W

### X

XLF : *Cernunnos or XRCC4-like factor*

XRCC1 XRCC3, ou XRCC4: protéines *X-ray repair cross-complementing 1, 3 ou 4*

XRCC5 et XRCC6: gènes *X-ray repair cross-complementing 5 et 6* codant pour les protéines KU80 et KU70 respectivement

### Y

YAP : *Yes-associated protein*

### Z

ZEB1 : *Zinc finger E-box-binding homeobox 1*, aussi connu sous le nom : TCF8 (*Transcription Factor 8*)

ZnF : domaines à doigts de zinc



## Préambule

Les cancers du sein constituent la première cause de mortalité par cancer chez la femme dans notre pays. Une grande variété d'évènements génétiques est à l'origine du cancer du sein et explique la grande hétérogénéité de ses sous-types tumoraux. 20 % des cancers du sein sont définis comme des tumeurs triples négatives très agressives et sont divisés principalement en deux sous-types moléculaires : *basal-like* (85%) et *claudin-low* (15%). Ce dernier exprime les facteurs de transcription impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), notamment ZEB1. L'EMT est un processus intervenant majoritairement au cours du développement de l'embryon, permettant à la cellule de changer de morphologie et d'acquérir parmi d'autres des capacités de migration. Ce processus, peu présent chez l'adulte, est retrouvé impliqué dans des phases tardives de cancer particulièrement afin de promouvoir l'invasion métastatique. Notre équipe a démontré que certains facteurs associés à l'EMT étaient actifs lors des phases initiatrices du développement tumoral et notamment dans le sous-type *claudin-low* du cancer du sein agressif et résistant à la chimiothérapie. En plus de leurs expressions des facteurs de l'EMT, les tumeurs *claudin-low* sont caractérisées par une faible instabilité chromosomique. Le choix de la voie de réparation des dommages dans l'ADN créés lors de l'initiation tumorale est un élément crucial du maintien de la stabilité du génome. En effet, certaines voies permettent la prise en charge de ces dommages au prix de l'apparition de larges remaniements chromosomiques créant ainsi une forte instabilité génomique fréquemment observée lors de cancer. Compte tenu de la faible instabilité chromosomique des tumeurs *claudin-low*, nous avons émis l'hypothèse que l'EMT pourrait affecter l'expression des gènes de réparation d'ADN.

Au cours de ce travail de thèse, j'ai montré que ZEB1, acteur de l'EMT, possède un rôle essentiel dans la régulation des voies de réparations des cassures double-brin de l'ADN. Après une introduction qui permettra de mieux comprendre les différents axes de ma thèse, j'aborderai le rôle de ZEB1 dans le contrôle de l'utilisation de la voie la plus infidèle, appelée la voie de réparation par jonction d'extrémités médiée par l'ADN polymérase  $\theta$  (TMEJ), en bloquant l'expression du gène *POLQ* (codant pour POL $\theta$ ) en faveur de voies plus fidèles. Dans un second temps, j'ai étudié l'impact de ZEB1 sur l'activité de PARP1, autre acteur de la voie du TMEJ. Enfin, ces résultats permettent de proposer de nouvelles approches thérapeutiques. La perte d'expression de ZEB1 sensibilise les cellules *claudin-low*, initialement résistantes, aux inhibiteurs de PARP1. D'autre part, puisqu'aujourd'hui il est difficile de cibler directement ZEB1 en clinique, j'ai mis en évidence que le traitement par une chimiothérapie conventionnelle, lorsqu'il est combiné à un inhibiteur d'une voie plus fidèle, le c-NHEJ, augmente la sensibilité au traitement de ces cellules *claudin-low*.

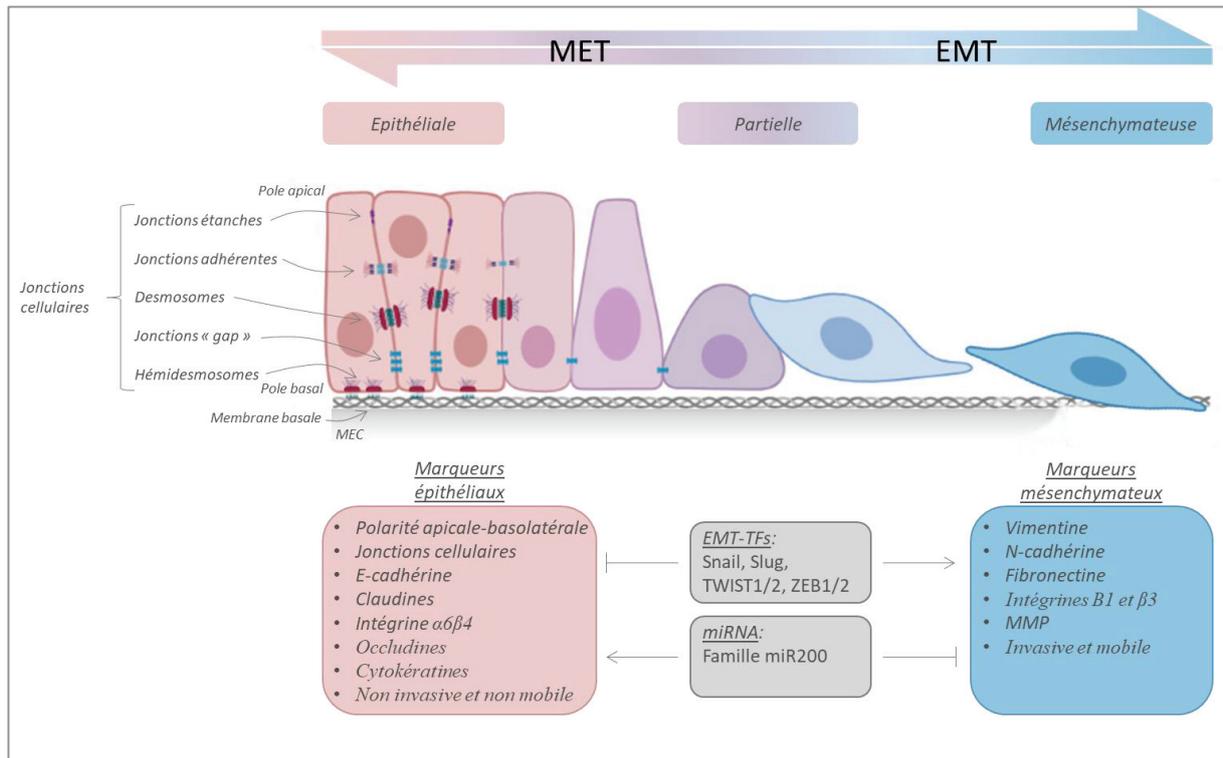
L'ensemble de ces travaux a donc permis en caractérisant le rôle de ZEB1 sur l'utilisation relative des voies de réparation de l'ADN de proposer d'exploiter cette modulation en terme thérapeutique pour le traitement ces tumeurs du sein résistantes à la chimiothérapie.

# *Introduction*



## Chapitre I : La transition épithélio-mésenchymateuse

La biologie humaine, comme tant d'autres domaines, nécessite de nombreux processus ayant des propriétés d'adaptabilité ou de plasticité pour leurs bons déroulements. Nos cellules n'échappent pas à la règle, et de nombreux processus requièrent une certaine plasticité pour leur fonctionnement. Une cellule épithéliale peut alors modifier ses caractéristiques intrinsèques pour lui permettre de réaliser les processus indispensables au bon fonctionnement cellulaire, tissulaire et de l'organisme. L'un de ces mécanismes est nommé la transition épithélio-mésenchymateuse ou EMT. L'EMT est un processus biologique de transdifférenciation cellulaire transitoire et réversible qui consiste en un changement d'état cellulaire conduisant parfois à une dé-différenciation, grâce à l'acquisition de propriétés semblables à celles des cellules souches (Figure 1). Une cellule épithéliale différenciée, jointive et polarisée devient alors, par une succession d'étapes, une cellule mésenchymateuse, dissociée et mobile et parfois plus indifférenciée (Thiery and Sleeman 2006). L'EMT révèle la plasticité des cellules épithéliales, où, dans les cas les plus extrêmes, une décomposition presque totale de toutes les structures moléculaires typiques de la cellule épithéliale est observée. Dans ce chapitre, les différents contextes physiologiques et pathologiques qui impliquent la conversion d'une cellule épithéliale en une cellule mésenchymateuse seront détaillés ainsi que les aspects moléculaires et cellulaires associés à l'EMT.



**Figure 1: La transition épithélio-mésenchymateuse.**

Représentation schématique de la transition épithélio-mésenchymateuse. À gauche, les cellules épithéliales sont bien organisées et les marqueurs, telles que les protéines impliquées dans les jonctions cellulaires, associées à ce phénotype sont exprimées (en rose). Au centre, les changements structuraux progressifs sont illustrés. Entre autres, il y a un changement au niveau de la forme des cellules, une perte de l'adhérence entre les cellules et un détachement des cellules par rapport à leur membrane basale. À droite, les cellules mésenchymateuses sont représentées et les marqueurs associés à ce phénotype, telles que les protéines impliquées dans l'invasion et la migration cellulaire, sont exprimées (en bleu).

## I. La transition épithélio-mésenchymateuse : le passage d'une cellule épithéliale à une cellule mésenchymateuse

### a. L'EMT, un processus de transdifférenciation cellulaire

Les cellules épithéliales et mésenchymateuses diffèrent par diverses caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques. Les cellules épithéliales forment des couches de cellules qui sont reliées entre-elles par des structures membranaires spécialisées, telles que les jonctions serrées, les jonctions adhérentes, les desmosomes, les jonctions communicantes ou lacunaires dites jonction « gap » et enfin les hémidesmosomes. Une autre de leurs caractéristiques est leur polarisation apico-basale, qui se manifeste par une distribution et une organisation spécifique et localisée de molécules d'adhésion, telles que les cadhérines et intégrines, ainsi que des jonctions cellules-cellules créant ainsi une ceinture latérale. De plus, la présence d'une lame basale, structure protéique séparant le tissu

épithélial du stroma environnant, renforce l'orientation des cellules épithéliales. Cette polarité induit une organisation du cytosquelette qui facilite les échanges intracellulaires nécessaires à cette structure apicale-basolatérale. Ces caractéristiques limitent donc le déplacement des cellules épithéliales qui peuvent néanmoins s'éloigner de leurs voisines les plus proches sans pour autant se détacher et s'éloigner de la couche épithéliale.

A l'inverse des cellules épithéliales, les cellules mésenchymateuses ne forment pas une couche cellulaire organisée comme les cellules épithéliales et à l'instar de celles-ci, elles ne sont pas considérées comme un tissu à part entière mais plutôt comme un tissu de soutien qui permet notamment les échanges entre le tissu épithélial et les vaisseaux sanguins par exemple. Au sein de la cellule, elles n'ont ni cette orientation apico-basale, ni aucune forme de polarité. Leur cytosquelette est par conséquent lui aussi très différent. *In vitro*, alors que les cellules épithéliales ont besoin d'une adhérence les unes avec les autres pour se développer, les cellules mésenchymateuses possèdent une morphologie en forme de fuseau ressemblant à un fibroblaste et ont la capacité d'être mobile. Cette transition, bien plus complexe qu'une simple modification phénotypique, se caractérise notamment par une reprogrammation massive de processus très différents les uns des autres impliqués à la fois dans l'architecture même de la cellule mais aussi dans les processus comportementaux les plus basiques tels que la survie cellulaire, le métabolisme et même la réparation de l'ADN. Ces modifications se font, entre autres, par la modification directe de programmes transcriptionnels avec l'activation ou l'inhibition de l'expression de marqueurs spécifiques. En effet, l'expression de certains marqueurs épithéliaux tels que la E-cadhérine nécessaire aux jonctions intercellulaires, est inhibée en faveur de l'activation de facteurs mésenchymateux comme la Vimentine (Dongre and Weinberg 2019; Iwano et al. 2002; Nieto 2009; Rowton et al. 2013; Thiery et al. 2009).

Cependant, cette transition est un processus réversible qui peut être inversé par le processus suivant : la transition mésenchymo-épithéliale (MET). La plasticité cellulaire est une caractéristique essentielle à la cellule pour que celle-ci puisse s'adapter aux différentes pressions internes et externes. L'EMT et la MET sont alors des processus indispensables. Selon le type de pression de sélection exercé sur la cellule, l'EMT peut être totale et est nécessaire pour obtenir un phénotype mésenchymateux et invasif complet. Mais l'EMT peut être aussi partielle. Un large spectre de phénotypes intermédiaires, appelés états métastables, caractérisés par la co-expression de marqueurs épithéliaux et mésenchymateux, sont présents et peuvent avoir un impact important sur le devenir de la cellule, du tissu environnant et de l'organisme.

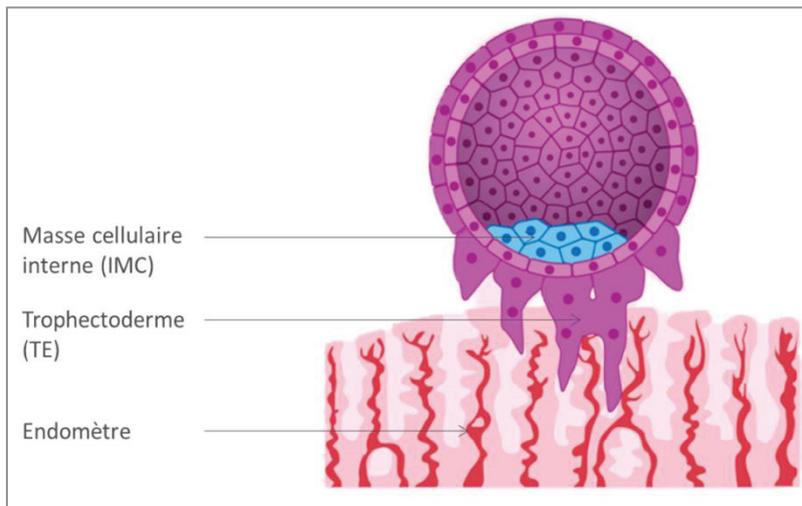
## b. L'EMT, un processus embryonnaire essentiel

L'EMT a été initialement découverte pour son rôle fondamental dans le développement embryonnaire. Durant celui-ci, l'organisation tridimensionnelle de nombreux organes nécessite, dès les premières étapes, la migration coordonnée d'ensembles cellulaires qui répond à des stimuli extracellulaires biologiques, chimiques ou physiques. Cette migration cellulaire est due notamment à la mise en place du processus d'EMT.

### 1. L'implantation embryonnaire

La première EMT se produit très tôt dans le développement embryonnaire. De récentes découvertes permettent de proposer qu'une EMT partielle arrive dès le stade embryonnaire à huit cellules. En effet, rapidement après la fécondation, se met en place, au stade blastocyste, une première séparation cellulaire. Le trophoctoderme (TE), premier tissu extra-embryonnaire, se différencie de la masse cellulaire interne (ICM) qui contient les cellules pluripotentes de l'épiblaste, le futur embryon (Figure 2). La différenciation de l'ICM et du TE est initiée à la fin du stade à huit cellules lorsque les blastomères individuels élargissent leurs zones de contact cellule-cellule dans un processus appelé compactage et commencent à assembler des complexes jonctionnels dans une couche épithéliale polarisée. La séparation de l'ICM et du TE semble donc impliquer une régulation dynamique de la E-cadhérine (Bessonard, Mesnard, and Constam 2015; T. Chen et al. 2017). Les cellules de l'ICM expriment plus fortement les marqueurs épithéliaux tel que l'E-cadhérine alors que les cellules du TE nécessitent une augmentation de l'expression des marqueurs mésenchymateux. En effet, cette EMT favorise l'implantation de l'embryon en rendant les cellules du TE plus invasives (Bell and Watson 2009; R. H. Kim et al. 2018; Ng, Zhu, and Leung 2012; Yamakoshi et al. 2012). Des expériences d'implantation

réalisées chez le bovin montrent clairement la nécessité de SNAIL et ZEB2 dans un premier temps puis de SLUG, ZEB1 et TWIST1/2 dans la formation du trophoctoderme (Yamakoshi et al. 2012).



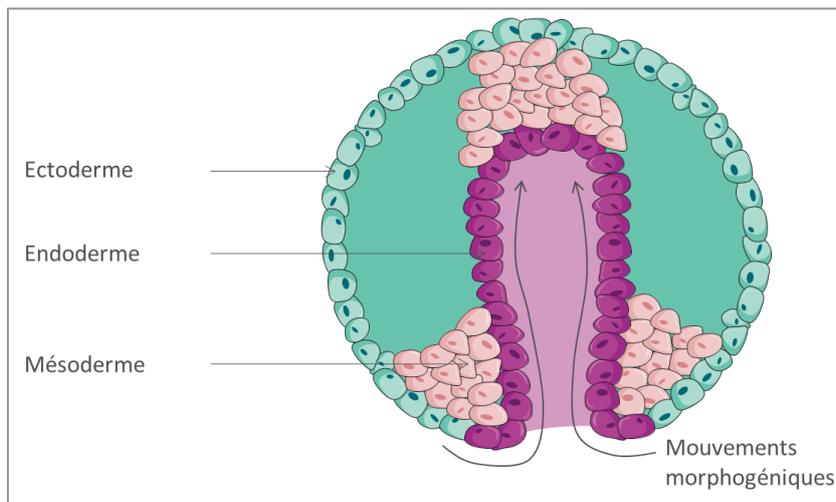
**Figure 2 : L'implantation embryonnaire**

Le blastocyste débute son adhésion à la paroi utérine entre le 6<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> jour. Les cellules trophoblastiques du pôle embryonnaire, le trophoctoderme (TE), se différencient et prolifèrent pour former le syncytiotrophoblaste invasif qui envahit alors l'endomètre. L'embryon est formé par les cellules de la masse cellulaire interne (IMC). L'IMC se différencie, à 8 jour, en deux types cellulaires l'hypoblaste et l'épiblaste. Une cavité amniotique apparaît dans l'épiblaste. Le TE poursuit, quant à lui, son activité lytique invasive au sein du tissu maternel.

## 2. La gastrulation

Le second cycle EMT-MET survient à la gastrulation, seconde étape du développement après la succession de division cellulaire conduisant à la formation de la blastula. Cette EMT induit de puissants mouvements morphogéniques permettant ainsi la mise en place des trois feuillets embryonnaires. Les mouvements morphogéniques correspondent à des mouvements cellulaires modifiant la forme, la taille et la structure des cellules, des tissus, des organes et des organismes. Lors de cette étape, des cellules de l'embryon forment une structure interne appelée épiblaste (IMC se sépare en 2 pour donner l'épiblaste et l'hypoblaste), ou ectoderme primitif, constitué d'une seule et unique couche cellulaire épithéliale. A partir de cette couche, un renflement appelé ligne primitive se forme dans laquelle les cellules se multiplient. La blastula subit alors une invagination, une portion des cellules de surface de la sphère envahit l'intérieur de la cavité par délamination. Le processus de délamination consiste au détachement par perte de l'expression de la E-cadhérine et à la migration d'une population de cellules mésenchymateuses au sein d'un épithélium auparavant homogène. Ce mécanisme est l'une des caractéristiques fondamentales de l'EMT. Le devenir de ces cellules varie selon leur engagement dans l'EMT, total ou partiel. En effet, les cellules moins engagées correspondant aux cellules demeurant à l'extérieur forment l'ectoderme tandis que celle à l'intérieur forment ainsi l'endoderme (Figure 3). Les cellules à l'intérieur de la sphère se divisent ensuite de nouveau par des niveaux d'EMT différents en deux feuillets de cellules : le mésoderme pour les cellules en EMT partielle et les plus engagées forment l'endoderme final (Kalluri and Weinberg 2009; J. Lim and Thiery 2012;

Thiery et al. 2009). A ce stade deux structures distinctes sont observées : l'embryon, constitué des 3 feuillets et le sac vitellin fournissant des éléments nutritifs en attendant la mise en place d'un système circulatoire fonctionnel. Toutes les cellules de ces 3 couches ont le même matériel génétique, mais certaines expriment certains gènes plutôt que d'autres en fonction des contraintes environnementales afin de développer les organes. L'endoderme, la couche la plus intérieure, aboutira à la formation entre autres des intestins, des poumons et du foie. Le mésoderme, la couche mitoyenne, donnera naissance aux reins, aux organes reproducteurs, aux os, aux muscles et au système vasculaire. Et l'ectoderme, la couche extérieure, sera à l'origine à la fois de l'épiderme et de tout le système nerveux central et périphérique.



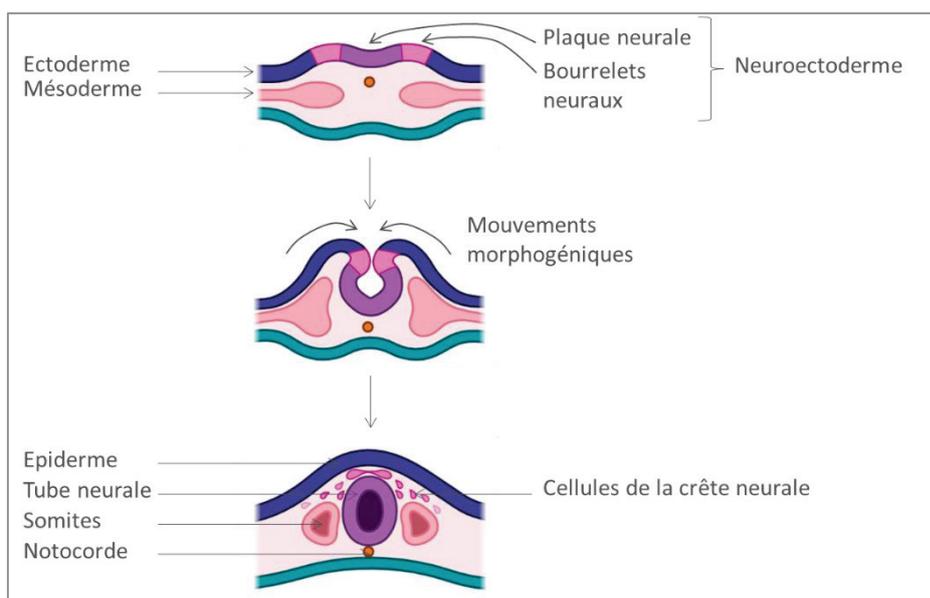
**Figure 3 : la gastrulation**

La gastrulation correspond à la mise en place de trois feuillets. Les mouvements morphogéniques induisent des déplacements cellulaires et conduisent à une invagination et à une délamination. Ces processus forment finalement les trois grands tissus : l'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme.

### 3. La neurulation

La gastrulation est suivie de la neurulation. La neurulation est l'étape embryonnaire permettant le passage de la forme gastrula à la forme neurula. L'embryon se différencie et commence à prendre une polarité avec la création d'une région antérieure et d'une région postérieure caudale. La formation du tube neural est un événement embryologique crucial qui conduit à la formation du système nerveux central. Ce processus se déroule en 2 étapes distinctes : la neurulation primaire et la neurulation secondaire. Dans un premier temps, au cours de la neurulation primaire, l'ectoderme forme une structure appelée la plaque neurale, en réponse aux signaux envoyés par le mésoderme (Figure 4). Les lisières de la plaque neurale, ou bourrelets neuraux, convergent au niveau de la ligne dorsale, se courbent et fusionnent pour former le tube neural, précurseur du système nerveux central. La soudure commence dans la région dorsale et progresse rapidement vers la région postérieure et plus lentement vers la région céphalique où subsiste de manière transitoire une ouverture appelée neuropore antérieur. La soudure des bourrelets neuraux conduit à la formation du tube neural qui s'internalise

sous l'épiderme dorsal. Le tube neural est alors régionalisé, *i.e.* la région céphalique antérieure renflée et vésiculaire à l'origine du cerveau se distingue de la région médullaire dorsale tubulaire à l'origine de la moelle épinière et délimite ainsi les futures régions de la tête et du tronc. Parallèlement et dès la fin de la gastrulation, la crête neurale commence à se former entre l'épiderme et le tube neural. Les cellules de la crête neurale, population transitoire, alors situées dans le haut du tube, subissent une EMT et délaminent du neuroépithélium. Encore une fois une perte de l'E-cadhérine est observée (Dady, Blavet, and Duband 2012; Rogers, Saxena, and Bronner 2013), des jonctions cellulaires, un changement de morphologie et le gain d'expression de facteurs pro-mésenchymateux tel que l'expression des EMT-TFs mais aussi de métalloprotéinases (MMP), protéines leur permettant d'envahir la matrice extracellulaire et de se déplacer afin de rejoindre leurs sites de destination (Duband 2010). Ces cellules assurent le lien entre les cellules neurales et non neurales formant ainsi une structure transitoire. Elles migrent alors vers les zones plus internes de l'embryon et se différencient en divers types cellulaires en fonction de leur localisation dans l'embryon et des signaux qu'elles reçoivent. Initialement considérée comme des cellules souches multipotentes, leurs potentialités de différenciation se restreignent au fur et à mesure de leurs déplacements et de leurs développements (Bronner and LeDouarin 2012; J. Lim and Thiery 2012; Sauka-Spengler and Bronner-Fraser 2008; Simões-Costa and Bronner 2013; Strobl-Mazzulla and Bronner 2012b, 2012a). La neurulation secondaire, quant à elle, concerne uniquement le développement de la partie terminale de la future moelle épinière. Avec la formation du tube neural, la neurulation marque le début de l'organogenèse. Le développement de l'embryon s'accélère alors avec l'apparition de nombreuses autres ébauches d'organes au cours du stade suivant : le bourgeon caudal (Ray and Niswander 2016).



**Figure 4 : La neurulation**

La neurulation est l'étape embryonnaire permettant le passage de la forme gastrula à la forme neurula. Les mouvements morphogéniques permettent, dans un premier temps, la formation du tube neurale, des cellules de la crête neurale et l'épiderme à partir de l'ectoderme. Le mésoderme, quant à lui, forme les somites.

## II. Régulation de la transition épithélio-mésenchymateuse

La grande majorité des tissus et organes adultes résultent d'une série de transformation de cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses, à travers l'EMT en étroite collaboration avec le processus inverse (MET). Ces cycles EMT-MET permettent, notamment au cours du développement embryonnaire, l'obtention de types cellulaires et tissulaires différenciés et spécialisés ainsi que l'acquisition de la structure tridimensionnelle complexe des organes internes. Ces cycles successifs sont appelés EMT primaire, secondaire et tertiaire et ils sont étroitement régulés à la fois par des voies de signalisation complexes mais aussi par l'activation de facteurs de transcription associés à l'EMT, les EMT-TFs.

### a. Les voies de signalisation

L'EMT est un processus complexe qui nécessite une régulation importante. Différentes voies de signalisation, initiées par de nombreux facteurs, sont activées au cours du développement embryonnaire et chez l'enfant ou l'adulte lors du phénomène de cicatrisation ou lors de pathologies. Indépendamment de ces contextes variés, les voies de signalisation mises en place sont très similaires et conduisent finalement, dans la grande majorité des cas, à l'activation des EMT-TFs, au remodelage du cytosquelette et au désassemblage des jonctions cellulaires, ensemble de modifications indispensables à la transition épithélio-mésenchymateuse. Ces voies de signalisation entraînent aussi la réorganisation spectaculaire de la matrice extra-cellulaire (MEC). De nombreux facteurs induisant l'EMT régulent l'expression des protéines de la MEC : telles que la fibronectine et les collagènes ; mais aussi des protéases : telles que les métalloprotéinases (MMP) ainsi que d'autres enzymes de remodelage. Toutes ces voies de signalisation ne sont pas activées en même temps, et leur activation dépend de la nature de l'EMT, EMT totale ou partielle. Ces voies sont activées par les signaux envoyés par le microenvironnement et les structures adjacentes, assurant ainsi une certaine spécificité. Ces signaux activateurs sont divers, cela peut être un signal de contrainte physique, un signal d'hypoxie, d'inflammation, ou encore un stress oncogénique ou métabolique (Lamouille, Xu, and Derynck 2014; Polyak and Weinberg 2009). Ces voies sont les suivantes : la voie du facteur de croissance transformant  $\beta$  (TGF $\beta$ ), la voie des récepteurs tyrosine kinases (RTK), la voie NF-kB, la voie Notch et enfin la voie WNT

(Figure 5). Plus généralement, des modifications physiques de l'environnement de la cellule peuvent aussi induire une EMT, comme *via* la modification des intégrines, l'inflammation ou l'hypoxie.

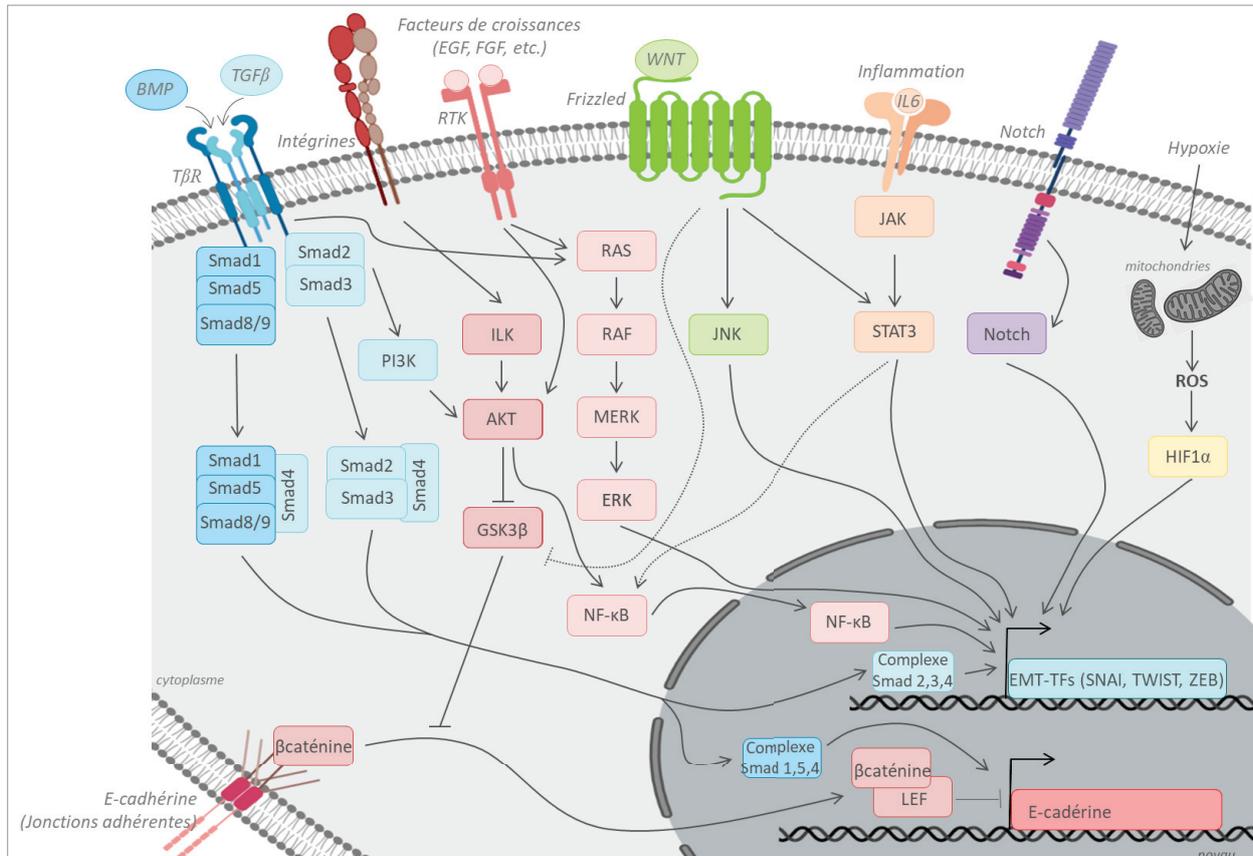


Figure 5 : Les voies de signalisation de l'induction de l'EMT

Représentation schématique des différentes voies de signalisation conduisant à l'activation ou l'inhibition de l'EMT. La voie du BMP ou du TGFβ induit la voie des Smads (en bleu). Les intégrines modulent la voie PI3K/AKT (en rouge), aussi activée par la voie des Smads. L'E-cadhérine module aussi l'EMT par son interaction avec la β-caténine. Les récepteurs aux facteurs de croissance (RTK) activent, lors de l'interaction avec leur ligand, la voie des MAPKines et la voie NFκB (en rose) ainsi que la voie PI3K/AKT. La voie JNK (en vert), la voie JAK/STAT (en orange), la voie Notch (en violet) et la voie de l'hypoxie (en jaune) permettent aussi l'activation à différents niveaux de l'EMT. L'ensemble de ces voies conduisent à l'activation ou à l'inhibition de la transcription des facteurs impliqués dans l'EMT (EMT-TFs).

### 1. La voie du TGFβ

La signalisation du TGFβ est connue comme la voie principale d'induction de l'EMT et agit à travers divers messagers intracellulaires. La voie du TGFβ peut activer à elle seule trois voies distinctes : La cascade de signalisation RAS–RAF–MEK–ERK, autrement dit la voie des Mitogen-activated protein kinases (MAPKines), la voie PI3K-AKT, et la voie des protéines SMADs. La signalisation est généralement activée par la superfamille de ligands TGFβ, qui comprend, entre autres, trois isoformes de TGFβ (TGFβ-1, 2 et 3) et six isoformes de BMP (BMP2 à BMP7). La plupart des systèmes dans lesquels l'EMT est observée, y compris le cancer et la fibrose, sont régulés par TGFβ-1 (Akhurst,

Derynck, and Akhurst 2001), alors que TGF $\beta$ -2 contrôle principalement le développement cardiaque (Camenisch et al. 2002), et TGF $\beta$ -3 assure l'EMT nécessaire lors du développement du palais, pour la fermeture des cavités buccale et nasale (Nawshad and Hay 2003). Les isoformes de BMP semblent, quant à eux, plutôt impliqués dans des pathologies comme le cancer. Cependant, quelques études montrent que la famille des BMP a des rôles physiologiques tout aussi important que les TGF $\beta$  dans le développement embryonnaire. Par exemple, BMP4 permet le développement du cœur et notamment, la formation et la séparation des ventricules (McCulley et al. 2008). BMP7, quant à lui, a un rôle important notamment lors de l'organogénèse avec la formation des reins et des yeux (Dudley, Lyons, and Robertson 1995). Inversement, de façon surprenante, tous les facteurs BMP ne sont pas responsables d'une induction de l'EMT chez l'adulte dans des conditions pathologiques. Par exemple, il a été démontré que la BMP7 contrecarre l'EMT dans le cancer du sein et réduit considérablement la croissance tumorale et les métastases (Buijs, Henriquez, Van Overveld, Van Der Horst, Que, et al. 2007; Buijs, Henriquez, Van Overveld, Van Der Horst, Ten Dijke, et al. 2007). Il est considéré alors comme facteur favorisant un phénotype de cellules épithéliales. BMP5, lui aussi, atténue les EMT induites par le TGF $\beta$ , soulignant la spécificité d'isoformes particulières de BMP dans le développement embryonnaire et dans la maladie (Ohta, Schoenwolf, and Yamada 2010; Romagnoli et al. 2012).

Le TGF $\beta$ 1 est capable d'induire, à lui seul, l'ensemble des changements morphologiques lié au processus d'EMT, en particulier dans les cellules épithéliales mammaires comme la perte des jonctions intercellulaires, la réorganisation du cytosquelette, la perte de la polarité épithéliale et le remodelage des adhésions cellule-matrice ainsi que la sécrétion de protéases pour envahir les tissus environnants. Sa liaison au récepteur hétérodimérique T $\beta$ RI/T $\beta$ RII induit la phosphorylation du domaine cytoplasmique du récepteur de type I (T $\beta$ RI). Il s'ensuit une activation en cascade des protéines SMADs qui, une fois transloquées dans le noyau, peuvent activer la transcription de nombreux acteurs dont les EMT-TFs. À noter que les protéines BMP activent aussi la voie des SMADs en se liant au récepteur T $\beta$ RI/T $\beta$ RII mais les SMADs activées ne sont pas les mêmes. Il y a donc une compétition entre les SMADs 2 et 3 activées par le TGF $\beta$  et les SMADs 1 et 5 activées par les BMP. Dans le cas de BMP7, il a été montré qu'une forte augmentation de BMP7 inhibe l'EMT et permet la transcription, par le complexe SMADs 1-5-9-4, de l'E-cadhérine, marqueur épithélial (Buijs, Henriquez, Van Overveld, Van Der Horst, Ten Dijke, et al. 2007; Zeisberg et al. 2003; Zeisberg, Shah, and Kalluri 2005).

L'activation de la voie PI3K-AKT par la voie du TGF $\beta$  peut conduire à la diminution de l'expression de l'E-cadhérine, marqueur clé des cellules épithéliales. L'E-cadhérine, codée par le gène *CDH1*, est une protéine transmembranaire présente dès les premières divisions cellulaires chez l'embryon. Par son rôle fondamental dans l'adhésion cellulaire notamment par la formation de jonctions adhérentes, permettant ainsi de lier physiquement les cellules entre elles, elle provoque la compaction au stade

embryonnaire 8 cellules et contribue à former le premier épithélium. Il a aussi été montré que l'E-cadhérine peut intervenir dans l'arrêt de la prolifération cellulaire induit par les mécanismes d'inhibition de contact, propriété essentielle pour la formation et le maintien des tissus. Outre l'interaction de cellule à cellule, l'E-cadhérine par le biais de la  $\beta$ -caténine interagit avec le cytosquelette. C'est, entre autres, la perte de l'interaction entre l'E-cadhérine et la  $\beta$ -caténine qui en libérant cette dernière permet de bloquer la transcription de l'E-cadhérine indépendamment de l'activation des EMT-TFs. En effet, en dehors de son rôle au niveau des jonctions adhérentes, la  $\beta$ -caténine est une molécule « navette » dont le rôle varie en fonction de sa localisation subcellulaire. Ainsi, la  $\beta$ -caténine se répartit dans les cellules en trois grands « pools » : un pool membranaire, un pool cytoplasmique et un pool nucléaire. Le pool membranaire reliant la E-cadhérine au cytosquelette d'actine *via* la  $\beta$ -caténine est spécifique des cellules épithéliales et sa disparition au profit des pools cytoplasmique et nucléaire est couramment utilisée comme marqueur de l'EMT dans divers contextes. La présence de GSK3 $\beta$  (Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$ ) favorise le pool membranaire. Son inhibition est donc un évènement clé dans le processus d'EMT. Le pool nucléaire étant absent chez les cellules épithéliales, celui-ci se voit augmenté lorsque GSK3 $\beta$  est inhibée par la voie PI3K-AKT et donc par la voie du TGF $\beta$ . La  $\beta$ -caténine peut alors interagir avec Lymphoid Enhancer binding Factor 1 (LEF1) et inhiber la transcription de l'E-cadhérine et activer la transcription des facteurs clés de l'EMT. Par son interaction avec le facteur de transcription TCF4, la  $\beta$ -caténine nucléaire active notamment la transcription de l'EMT-TF ZEB1 (Ester Sánchez-Tilló et al. 2011).

### 2. La voie des récepteurs aux tyrosines kinases (RTK)

La voie des MAPKinases (ou MAPKs) fait partie des mécanismes majeurs de signalisation intracellulaire et parmi celles les plus ubiquitaires dans les cellules eucaryotes (animales comme végétales). Leur activation est commune à la plupart des récepteurs aux facteurs de croissance : les récepteurs aux tyrosines kinases (RTK). Plusieurs facteurs de croissance agissent par le biais de cette voie, y compris le facteur de croissance épidermique (EGF), le facteur de croissance des fibroblastes (FGF), le facteur de croissance des hépatocytes (HGF) et le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) et peuvent induire une EMT. À elle seule, la voie des MAPKs régule de manière coordonnée des processus aussi variés que l'embryogenèse, la différenciation, la prolifération, l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN ou l'apoptose. Elle réside en une succession de phosphorylation en cascade effectuée par différentes kinases conduisant finalement à la phosphorylation de ERK, JNK ou p38 pour les MAPKs conventionnelles. Ces MAPKs peuvent alors favoriser la transcription de

nombreuses protéines. Une fois activée, la voie des MAPKs et notamment ERK facilite l'EMT en augmentant l'expression des EMT-TFs et des régulateurs de la mobilité et de l'invasion cellulaires.

Par l'ensemble de ses caractéristiques, cette voie est souvent impliquée dans des pathologies. Son activation constitutive par la perte des systèmes de contrôles sus-jacents (mutations des récepteurs et/ou des protéines adaptatrices, inflammation prolongée) est une des caractéristiques majeures et souvent la première étape du processus de transformation cancéreuse. Dans la glande mammaire, par exemple, un évènement initiateur de la tumorigenèse fréquemment observé est une mutation du domaine cytoplasmique du récepteur à l'EGF (ERBB1 et ERBB2 ou HER2 essentiellement). Une telle mutation peut se produire sur différents résidus ; la conséquence est en général une activation constitutive du site catalytique (sérine/thréonine-kinase) aboutissant à un maintien permanent de la signalisation des MAPKs et de toutes ses autres cibles de phosphorylation. Un second acteur des MAPKs fréquemment retrouvé activé dans les cancers est l'oncogène HRAS. Les gènes HRAS ont été les premiers gènes mutés identifiés dans le cancer. L'activation oncogénique de HRAS entraîne l'initiation et la progression de la tumeur dans de nombreux types de cancers. Les protéines HRAS sont des protéines G permettant la transduction du signal après activation par les récepteurs transmembranaires par le biais de molécules GDP/GTP. Les protéines HRAS activent une cascade hiérarchique de voies interconnectées qui modulent les fonctions biologiques telles que la prolifération cellulaire, l'apoptose, la motilité, le métabolisme, l'évasion immunitaire. La dérégulation de la fonction HRAS, largement associée à la tumorigenèse, peut reposer soit sur des mutations génomiques qui modifient la structure intrinsèque du HRAS, soit sur une altération des facteurs de régulation du HRAS, ce qui améliore l'expression et l'activité de celui-ci (Galiè 2019).

### 3. Les autres voies

D'autres voies de signalisation, telles que les voies WNT et Notch participent également à l'activation de l'EMT. La signalisation WNT favorise l'EMT en inhibant GSK3 $\beta$  pour stabiliser la  $\beta$ -caténine, qui se transloque vers le noyau pour activer le facteur de transcription LEF1. De plus, la dégradation de la  $\beta$ -caténine par le protéasome est largement contrôlée par les ligands de la famille WNT capables de se lier au récepteur transmembranaire Frizzled. L'activation de cette voie empêche l'assemblage du complexe de dégradation de la  $\beta$ -caténine et permet alors d'enrichir le pool nucléaire. Les protéines WNT sont une famille de glycoprotéines sécrétées qui interviennent dans de nombreuses étapes du développement embryonnaire et de la morphogenèse (formation des axes, migration et différenciation). Ces protéines représentent une grande famille de protéines très conservées

comprenant au moins 16 membres (WNT 1 à 16) et sont activées dans différentes conditions, tissus ou environnements. Des mutations ou une dérégulation de la voie WNT sont associées à diverses malformations et peuvent conduire à la transformation tumorale dans la plupart des organes. Les ligands WNT4, WNT5A et WNT6 sont particulièrement impliqués dans le développement normal de la glande mammaire et peuvent être sécrétés en réponse aux hormones sexuelles au cours des cycles d'invasion/involution. La voie Notch quant à elle permet d'activer l'expression de SNAI2, un EMT-TF, et de favoriser ainsi la diminution des niveaux de E-cadhérine. La voie NF- $\kappa$ B (facteur nucléaire  $\kappa$ B) normalement impliquée dans la réponse immunitaire et la réponse au stress cellulaire est, elle aussi, essentielle à l'initiation de l'EMT. Activée de nombreuses manières, elle protège les cellules en EMT contre l'apoptose. Finalement, les voies de l'inflammation comme des intégrines l'active par le biais elles aussi de la voie PI3K-AKT.

Enfin, le microenvironnement cellulaire régule également l'EMT. Pendant l'inflammation et le cancer, l'interleukine-6 (IL-6) peut favoriser l'EMT *via* la Janus kinase (JAK) et le facteur de transcription STAT3 (Signal Transducers and Activators of Transcription 3) responsable de l'induction de l'expression SNAI1, autre EMT-TF. L'hypoxie, le stress oncogénique ou encore le stress métabolique peuvent favoriser l'EMT par une production mitochondriale accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui provoquent des effets pléiotropes, notamment l'activation du facteur  $1\alpha$  inducible par l'hypoxie (HIF1 $\alpha$ ). HIF1 $\alpha$  peut alors activer la transcription de TWIST, un autre EMT-TF.

L'apparition de phases intermédiaires d'induction de l'EMT peut être donc due à une coopération entre ces différentes voies. L'utilisation d'une ou plusieurs voies peut alors conduire à l'induction d'une EMT partielle ou totale.

## b. Les facteurs de transcription de l'EMT

Les cellules épithéliales sont caractérisées par une polarité apico-basale et des jonctions cellule-cellule étroites entre les cellules épithéliales voisines (Pásti and Labouesse 2014). Au contraire, les cellules mésenchymateuses sont identifiées comme des cellules isolées, allongées et en forme de fuseau sans adhésion intracellulaire étroite, ce qui permet une mobilité accrue et favorise la migration cellulaire (Pittenger and Martin 2004). La transition d'un état à l'autre, appelée EMT, est étroitement régulée, comme nous venons de le voir. De nombreuses voies de signalisation permettent d'initier ce processus. Toutes ces voies convergent vers le même résultat : la transcription et l'activation des facteurs de transcriptions de l'EMT, les EMT-TFs. Ces facteurs sont responsables de l'activation et la répression transcriptionnelles de nombreuses protéines intervenant dans différents mécanismes tels que le réarrangement du cytosquelette, la motilité, le métabolisme, le cycle cellulaire, la survie et la réparation de l'ADN (Figure 6).

Ces EMT-TFs sont nombreux mais ils sont principalement regroupés en 3 grandes familles : les familles SNAI, TWIST et ZEB (Stemmler et al. 2019) (Figure 6).

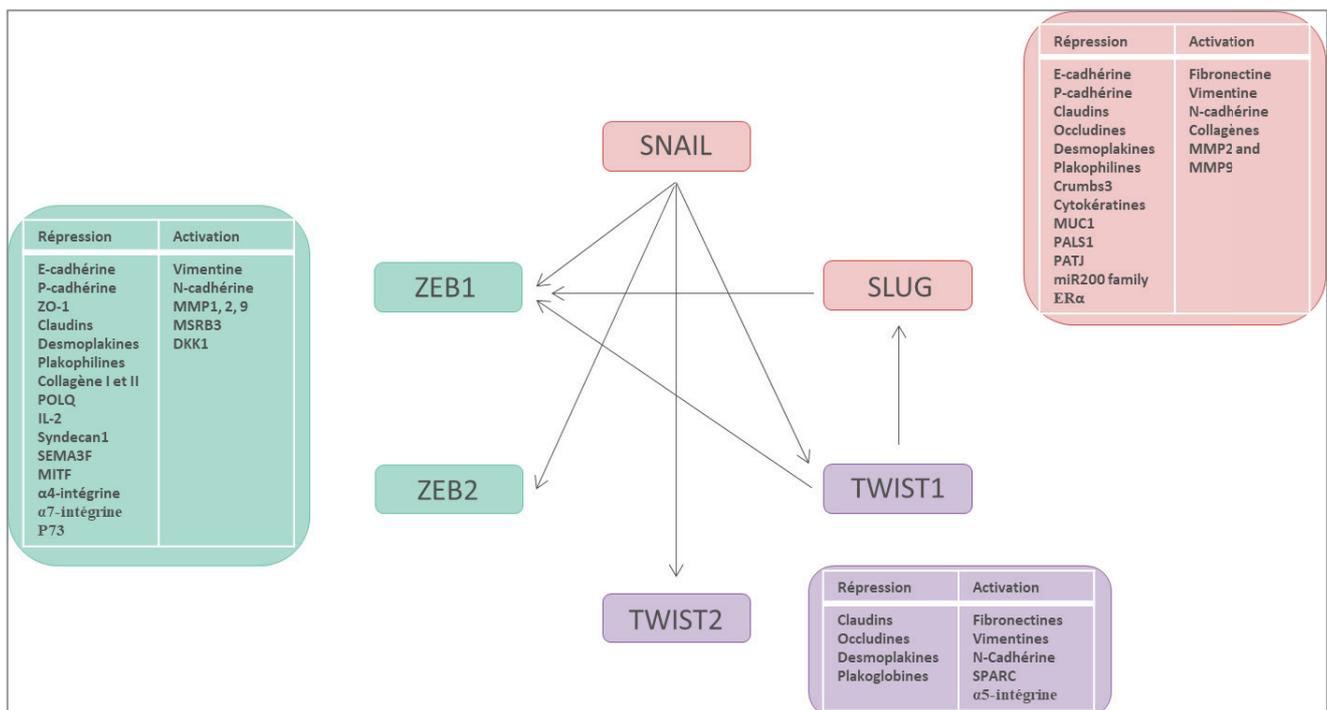
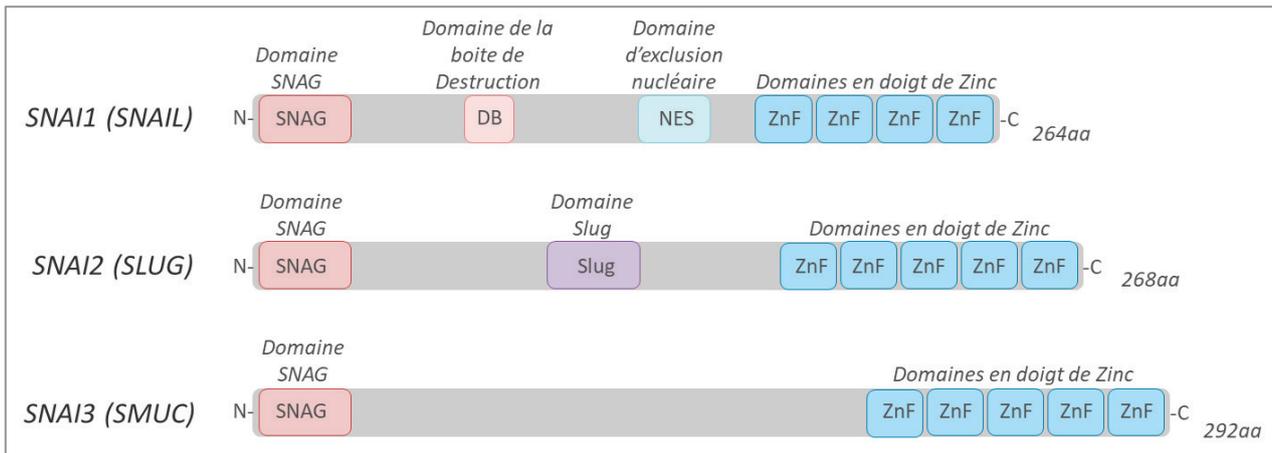


Figure 6 : Rôles transcriptionnels des EMT-TFs

Représentation schématisée des rôles transcriptionnels des différents EMT-TFs (les flèches indiquent l'activation transcriptionnelle d'un acteur par un autre). Les différents gènes activés ou réprimés par SNAIL et/ou SLUG sont représentés en rose. En violet, ce sont les différents gènes activés ou réprimés par la famille TWIST. Les rôles transcriptionnels de la famille ZEB1 sont quant à eux représentés en vert.

## 1. La famille SNAIL

La superfamille SNAIL est une grande famille regroupant les protéines issues des gènes SNAIL (famille SNAIL) et SCRATCH (famille SCRATCH). Ici nous nous intéressons principalement à la famille SNAIL dont les membres sont au nombre de trois : la protéine SNAIL codée par le gène *SNAI1*, SLUG codée par le gène *SNAI2* et SMUC codée par le gène *SNAI3*. Mis en évidence pour la première fois chez la drosophile (Grau, Carteret, and Simpson 1984), des homologues de SNAIL ont depuis été décrits dans de nombreuses espèces d'invertébrés et de vertébrés montrant ainsi que cette famille de protéines est très conservée et essentielle au développement de nombreuses espèces dont l'Homme (Barrallo-Gimeno and Nieto 2005, 2009) Ces différents facteurs ont des fonctions communes comme par exemple leur implication dans la formation du mésoderme lors du développement embryonnaire mais ils possèdent aussi des fonctions spécifiques comme SNAIL qui est essentiel lors de la gastrulation et SLUG lors d'étapes plus tardives comme lors de la neurulation. Le rôle de SMUC dans le processus d'EMT qu'il soit physiologique ou pathologique est beaucoup moins connu. Les protéines de la famille SNAIL sont composés de domaines conservés entre ses membres (Figure 7). Les facteurs de transcription de la famille SNAIL contiennent des domaines à doigts de zinc, à raison de quatre à six de ces domaines en région C-terminale. Les doigts de zinc permettent la fixation à l'ADN sur les séquences E-box (CANNTG), entraînant la répression de la transcription de gènes épithéliaux tels que la E-cadhérine (Assani and Zhou 2019; Cano et al. 2000). Le site de fixation spécifique du facteur de transcription SNAIL est la séquence CAGGTG (Mauhin et al. 1993). Ces facteurs possèdent un domaine SNAG (SNAIL/Gfi domain) dans leur région N-terminale, associé à la répression transcriptionnelle de gènes spécifiques, notamment en recrutant et en interagissant avec d'autres facteurs. Alors que les domaines en C- et N- terminal sont conservés entre ces facteurs, leurs domaines centraux apportent leurs spécificités relatives. SNAIL possède un domaine spécifique dénommé boîte de destruction (Destruction-box domain : domaine lié à la régulation du cycle cellulaire et à l'interaction avec l'ubiquitine-ligase APC/C (anaphase-promoting complex or cyclosome)) permettant l'adressage de SNAIL vers le protéasome et à sa dégradation (Díaz, Viñas-Castells, and De Herreros 2014; Manzanares, Locascio, and Nieto 2001; Wenhui Zhou, Gross, and Kuperwasser 2019) ainsi qu'un domaine d'exclusion nucléaire (NES) qui permettent la régulation de l'activité de SNAIL. SLUG, qui ne possède pas ces deux domaines, possède un domaine qui lui est spécifique appelé SLUG dont la fonction n'est pas encore bien connue. La famille SNAIL par ces domaines possède un fort pouvoir de répression de la transcription mais ces facteurs peuvent aussi activer la transcription de nombreuses protéines dont les autres EMT-TFs (Lamouille, Xu, and Derynck 2014; Škovierová et al. 2018).



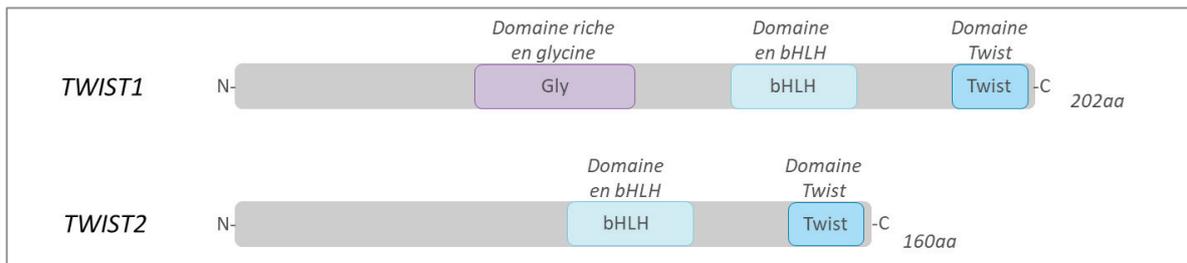
**Figure 7 : Représentation schématique des gènes de la famille SNAI**

L'ensemble de ces protéines contiennent le domaine SNAG (SNAIL/Gfi domain), mais aussi des domaines permettant aux facteurs de transcription de se lier à l'ADN : les domaines en doigt de zinc (ZnF). Certains de ces EMT-TFs possèdent des domaines spécifiques permettant de réguler l'activité de ces protéines comme la D-Box (DB ; Destruction-box domain), la séquence NES (nuclear export signal) et le domaine Slug.

## 2. La famille TWIST

La famille TWIST comprend deux membres : les protéines TWIST1 et TWIST2. Ces protéines sont elles aussi très conservées au cours de l'évolution et la famille TWIST se caractérise par leur domaine bHLH (pour basic Helix Loop Helix) (Figure 8). Les protéines TWIST ont été découvertes également chez la drosophile et elles sont les membres fondateurs d'une sous-famille de protéines bHLH basées sur l'identité et la conservation des acides aminés de ce domaine bHLH (Castanon and Baylies 2002). Les protéines bHLH représentent une super famille très conservée de près de 100 facteurs de transcription différents comme les protéines TWIST mais aussi c-MYC, facteur de transcription souvent activé dans les cancers (Massari and Murre 2000; Rodriguez, Gonzalez-mendez, and Cadilla 2016). Structuellement, le motif consiste en une courte séquence d'acides aminés basiques suivie d'une hélice  $\alpha$  amphipathique, une boucle de longueur variable, se terminant par une seconde hélice  $\alpha$  amphipathique. La face hydrophobe de l'hélice permet d'établir des contacts protéine-protéine avec un autre facteur bHLH, créant ainsi un dimère essentiel à la régulation transcriptionnelle en créant un domaine complet de liaison à l'ADN. La formation du dimère est dépendante d'un ensemble de modifications post-traductionnelles ainsi que de l'expression de cofacteurs. Le dimère peut être un homodimère (TWIST-TWIST) ou un hétérodimère formé avec d'autres protéines bHLH. Chaque dimère formé génèrera des fonctions distinctes et spécifiques, voire antagonistes. En effet, les facteurs dimérisés forment un domaine basique opérationnel qui permet une fixation sur des séquences spécifiques de l'ADN appelées E-box (CANNTG) ou spécifiquement de TWIST (TWIST-box) dont la

séquence de fixation est CATCTG (Bouard et al. 2014; Casas et al. 2011). Par conséquent, le dimère permettra l'activation ou la répression de la transcription de gènes cibles spécifiques (Barnes and Firulli 2009; Z. F. Chen and Behringer 1995). A la différence des facteurs des familles SNAI et ZEB, TWIST1 ou TWIST2 ne semblent pas réguler l'expression de la E-Cadhérine de manière directe (Barnes and Firulli 2009).



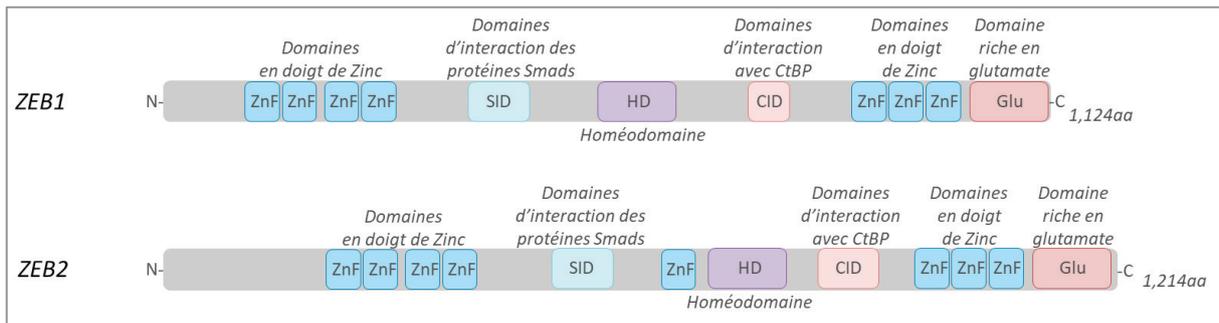
**Figure 8 : Représentation schématique des gènes de la famille TWIST**

Le domaine TWIST et le domaine bHLH (basic Helix Loop Helix) sont très conservés entre TWIST1 et TWIST2. TWIST1 contient un domaine spécifique comme le domaine riche en glycine.

### 3. La famille ZEB

La famille ZEB quant à elle possède 2 gènes codant pour les facteurs de transcription ZEB1 et ZEB2. Tout comme la famille SNAIL, ces facteurs sont des protéines à doigts de zinc qui peuvent spécifiquement se fixer sur les séquences E-box de l'ADN mais ils ont aussi leur propre « box » appelée ZEB-box ou Z-box, dont la séquence spécifique est CACCTG. ZEB1 et ZEB2 agissent principalement comme des répresseurs transcriptionnels mais selon leurs partenaires, ils peuvent aussi agir comme activateur de la transcription (Lamouille, Xu, and Derynck 2014; Škovierová et al. 2018). Ils peuvent réprimer tous deux l'E-cadhérine et ZEB1 peut activer la transcription d'acteur régulant le stress oxydatif tels que MSR3 (Methionine Sulfoxide Reductase B3), une oxydo-réductase (A.-P. Morel et al. 2017).

Ces protéines se caractérisent par la présence de deux domaines à doigt de zinc (ZnF) en N et C-terminal très conservés, ainsi que d'un homéo-domaine (HD) au centre, permettant l'interaction du facteur à l'ADN (Angrand 1993; Postigo and Dean 2000) (Figure 9). Le domaine SID participe à l'interaction avec les protéines SMADs connectant ainsi ZEB1 ou ZEB2 avec la voie du TGFβ. Leur structure comprend un domaine de recrutement du corépresseur CtBP (CID) responsable de leur rôle de répresseur de la transcription (Vandewalle, Van Roy, and Berx 2009).



**Figure 9 : Représentation schématique des gènes de la famille ZEB**

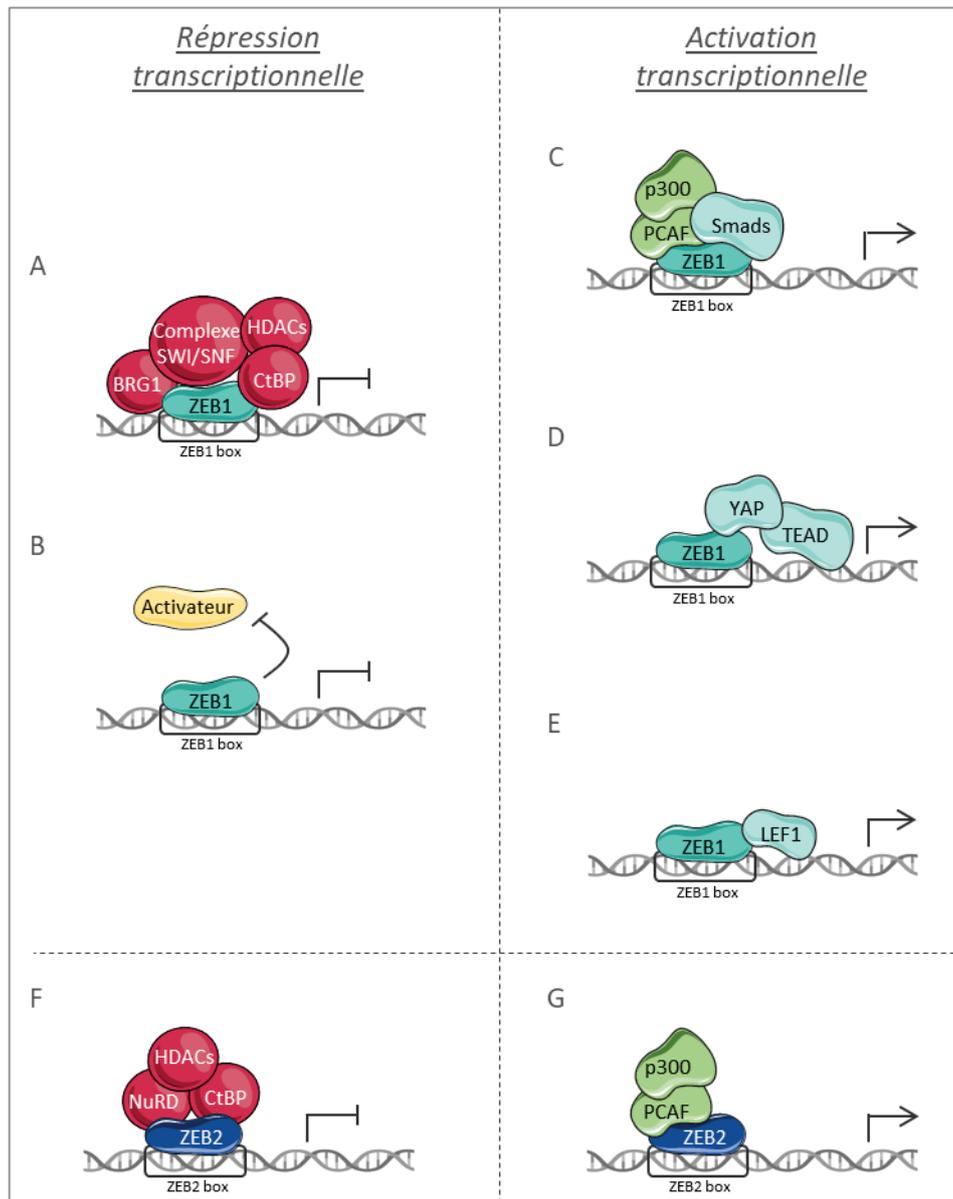
De nombreux domaines sont conservés entre ces deux membres, comme les domaines en doigt de zinc (ZnF). Certains de ces EMT-TFs vont posséder d'autres domaines un peu plus particuliers permettant de réguler l'activité de ces protéines comme des homéodomaines (HD), des domaines d'interaction avec les protéines Smads (SID) et d'interaction avec les protéines CtBP (CID) et enfin des domaines riches en glutamate.

ZEB1 est donc capable d'activer et de réprimer la transcription de différents gènes (Caramel, Ligier, and Puisieux 2018). Le choix entre ces deux fonctions est dépendant des interactions avec d'autres facteurs. Par exemple, dans le cas de l'inhibition de l'E-cadhérine, la répression transcriptionnelle par ZEB1 implique le recrutement de protéines co-répressives comme CtBP1/2, ou des facteurs de modification et remodelage de la chromatine tels que histones désacétylases (HDAC ; HDAC1, HDAC2 et HDAC3 notamment), et enfin, BRG1 (sous-unités ATPase du complexe SWI/SNF de remodelage de la chromatine) (Aghdassi et al. 2012; Furusawa et al. 1999; Peña et al. 2006; Ponticos et al. 2004; Postigo and Dean 1997, 1999b, 1999a; E. Sánchez-Tilló et al. 2010) (Figure 10). Par le biais de ce complexe, ZEB1 réprime de nombreuses protéines agissant dans différents processus comme la perte de jonctions cellules-cellules (E-cadhérine, Claudins, ZO-1, Plakophilines (Aigner et al. 2007; M. Liu et al. 2018)), perte de la polarité apico-basale (Crumbs3 ; Aigner et al. 2007; Whiteman et al. 2008) modification de la MEC (par l'inhibition de collagène I et II ; Ponticos et al. 2004), mais aussi dans la modification de la réponse immunitaire (IL2 ; J. Wang et al. 2009), et bien d'autres encore. De manière plus surprenante, ZEB1 se retrouve dans le contrôle de l'instabilité génomique avec l'inhibition notamment du facteur de transcription BLC6 responsable de 20 à 30% des translocations chromosomiques lors la génération des anticorps dans les lymphocytes B (Papadopoulou et al. 2010), et ainsi que, comme nous le verrons plus tard, ZEB1 agit dans l'inhibition de la transcription du gène *POLQ* codant pour une ADN polymérase participant à une voie de réparation des cassures double-brin de l'ADN hautement infidèle.

En plus de son rôle bien défini de répresseur, quelques études impliquent également ZEB1 dans l'activation transcriptionnelle notamment grâce à son interaction avec les histones acétyltransférases p300 et PCAF (p300/CBP-associated factor) (Van Grunsvan et al. 2006). Lors de l'induction de l'EMT par le TGF $\beta$ , ZEB1 peut se lier aux protéines SMADs pour activer la transcription des gènes, comme

avec l'exemple l'actine et la myosine dans les muscles lisses (Postigo 2003; Postigo et al. 2003). De plus, ZEB1 peut aussi activer la transcription de certains gènes par son interaction avec YAP (Yes-associated protein), effecteur principal de la voie hippo permettant le contrôle de gènes agissant dans la prolifération cellulaire et l'apoptose (W. Lehmann et al. 2016). D'autre part, ZEB1 active, lors de son interaction avec LEF1, la transcription Prex1 (facteur d'échange nucléotidique de guanine de RAC, permet d'activer RAC, une petite GTPase) et RNP2 (protéine membranaire du réticulum endoplasmique) entre autres) et promeut ainsi l'invasion cellulaire (Rosmaninho et al. 2018). Finalement au sein de notre équipe, il a été montré ZEB1 participe à préserver la stabilité du génome en réduisant significativement le stress oxydatif induit par les ROS, généralement fortement augmenté lors de la progression tumorale et responsable de nombreux dommages à l'ADN, par l'activation de la transcription de l'oxydo-réductase MSRB3 (A.-P. Morel et al. 2017).

De même, ZEB2 agit aussi bien comme un répresseur que comme un activateur de la transcription mais les complexes de transcription interagissant avec lui sont encore peu étudiés (Ester Sánchez-Tilló et al. 2012). Tout comme ZEB1, ZEB2 est capable de réprimer la transcription de certains gènes par son interaction avec CtBP (Postigo 2003). ZEB2 peut aussi interagir avec les HDAC 1 et 2 ainsi que le complexe qui permet à la fois un remodelage de la chromatine et une activité d'histone désacétylase nommé les complexe NuRD (nucleosome remodeling and deacetylase complex) afin d'inhiber la transcription de Notch (L. M. N. Wu et al. 2016). De plus, ZEB2 interagit aussi avec p300 et PCAF afin d'activer la transcription tout comme pour ZEB1 (Van Grunsven et al. 2006). Cependant, ZEB1 et ZEB2 présentent des rôles antagonistes, notamment dans les mélanomes. En effet, ZEB2 favorise l'activation de la transcription du facteur de transcription MITF (microphthalmia-associated transcription factor), alors que ZEB1 l'inhibe (Bruneel et al. 2020; Caramel, Ligier, and Puisieux 2018; Denecker et al. 2014; Vandamme and Berx 2014).



**Figure 10 : ZEB1 et ZEB2 agissent à la fois comme répresseur et activateur de la transcription**

**A,** Répression transcriptionnelle par ZEB1 interagissant avec le complexe SWI/SNF, BRG1, HDACs et CtBP. **B,** Répression transcriptionnelle par ZEB1 par compétition d'interaction entre l'ADN et un acteur activateur de la transcription. **C,** Activation de la transcription par ZEB1 interagissant les histones acétyltransférase p300 et PCAF ainsi que les différentes protéines Smads conférant ainsi la spécificité de l'activation. **D,** Activation de la transcription par ZEB1 interagissant avec YAP et TEAD. **E,** Activation de la transcription par ZEB1 interagissant LEF1. **F,** Répression transcriptionnelle par ZEB2 interagissant avec le complexe NuRD, les HDACs et CtBP. **G,** Activation de la transcription par ZEB2 interagissant p300 et PCAF.

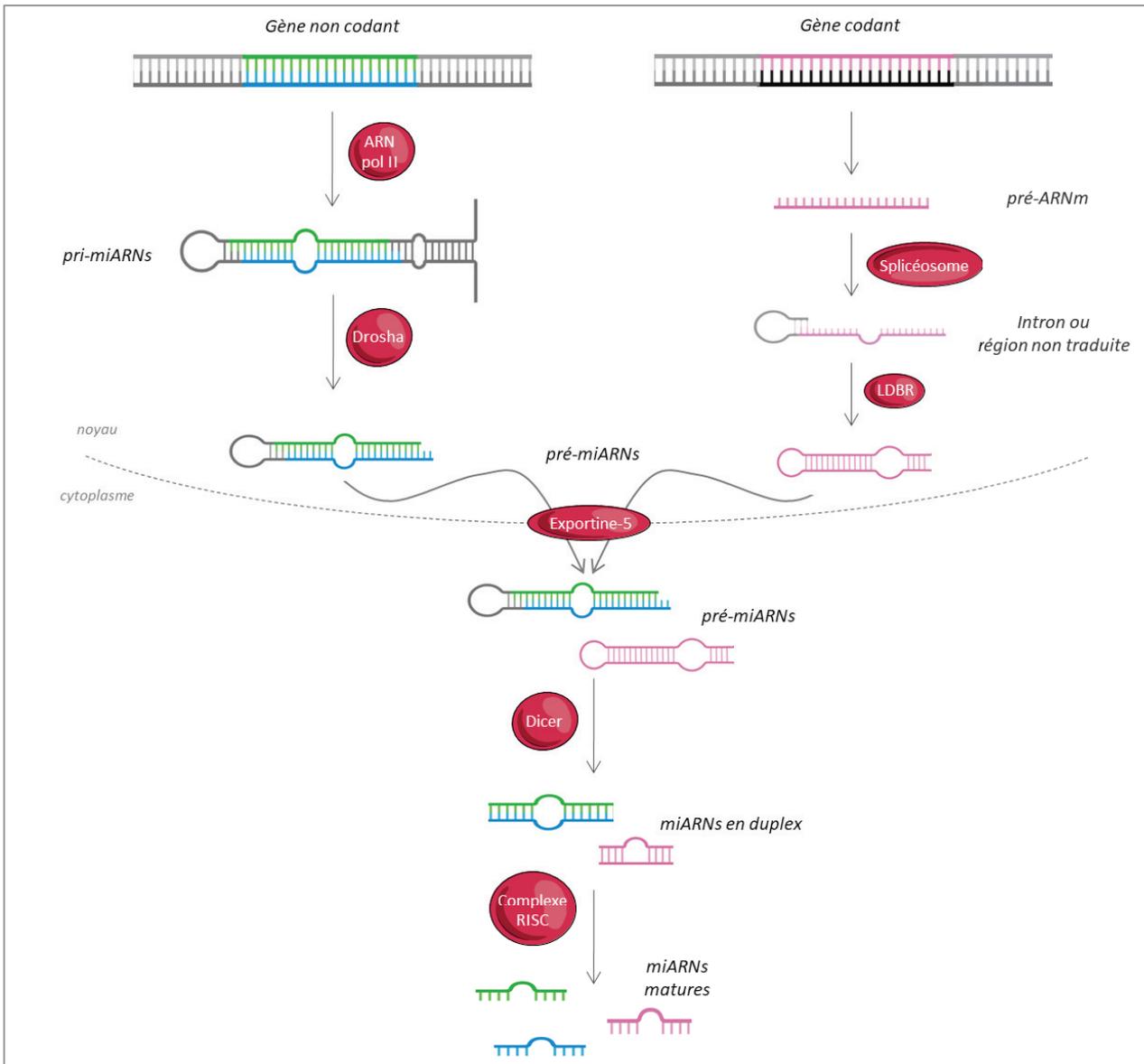
### c. Régulation de l'EMT par les microARNs

Les microARNs (miARNs) sont des petits ARN non codants d'environ 22 nucléotides (20 à 24nt) régulant l'expression de nombreux gènes au niveau post-transcriptionnel. Les miARNs reconnaissent une séquence spécifique appelée « seed-sequence » située dans la majorité des cas dans la région non-codante 3'UTR de l'ARN messager (ARNm) du gène cible. De manière moins fréquente, elle peut aussi être retrouvée sur la région 5'UTR. Les miARNs possèdent deux modes d'action principaux inhiber la traduction du messager ou induire sa dégradation. Il existerait plus de 2000 miARN chez l'Homme permettant de contrôler l'expression de plus de 60% des gènes (Alles et al. 2019). Les miARNs ont été impliqués dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques, allant du développement embryonnaire à la progression tumorale. Ils peuvent être exprimés différemment d'un type cellulaire à l'autre. Des thérapies ciblées permettant l'expression ou au contraire l'inhibition de miARN sont actuellement en phase de développement clinique (Hammond 2015). Un miARN peut avoir plusieurs gènes cibles tout comme l'ARNm d'un gène peut être régulé par de nombreux miARNs.

#### 1. La biogénèse des microARNs

Les gènes des miARNs sont localisés dans l'ensemble du génome, en majorité dans des régions intergéniques mais ils peuvent être également présents dans des séquences exoniques, introniques ou UTR. Ils sont transcrits par l'ARN polymérase II et présentent une coiffe en 5'UTR ainsi qu'une queue PolyA. Un peu moins de la moitié chez l'Homme est polycistronique. Les miARN subissent une série d'étapes de biogénèse et de maturation qui convertissent le transcrite principal en miARN mature de 22nt (Figure 11). Les miARN sont transcrits sous la forme de précurseurs appelés pri-miARNs faisant quelques centaines jusqu'à un milliers de nucléotides de long et pouvant présenter une structure secondaire complexe présentant plusieurs « tiges-boucles » d'environ 60 à 100 nucléotides chacune. Dans un premier temps, le complexe formé par Drosha, une ribonucléase de type III et DGCR8, clive le pri-miARN pour donner le pré-miARN. Le pré-miARN, constitué approximativement de 70 nucléotides sous forme d'épingle à cheveux, est exporté vers le cytoplasme par l'exportine-5 et est digéré par le complexe formé par Dicer, une seconde ribonucléase de type III et TRBP-PACT, qui retire la boucle pour former un miARN mature double-brin de 22 nt. Le miARN mature double-brin est alors chargé dans le complexe RISC (RNA-induced silencing complex) où il est dissocié en ne gardant que le miARN simple brin complémentaire de l'ARNm imparfaitement apparié qui conduit à une répression traductionnelle ou à une dégradation de l'ARNm cible (Amrouche and Anglicheau 2012; Hammond 2015). Parfois, les

deux brins complémentaires du miARN mature sont fonctionnels et ciblent par conséquent des messagers différents.



**Figure 11 : Biogénèse et maturation des microARNs**

Représentation schématique de la biogénèse et de la maturation des miARNs. Les miARNs sont transcrits par la polymérase de tyoe II à partir de séquence intergénique ou à l'intérieur d'un gène codant pour une protéine. Lors de la biogénèse des miARNs, différents complexes interviennent. Le complexe Drosha clive le pri-miARN alors que le spliceosome et l'enzyme « lariat-debranching enzyme » (LDBR), processent le préARNm. Le pré-miARN alors obtenu est exporté vers le cytoplasme par l'exportine-5 où il est digéré par Dicer et le miARN mature et est pris en charge par le complexe RISC ((RNA-Induced Silencing Complex).

## 2. Les miARNs régulent l'EMT

Depuis une dizaine d'années, de nombreux miARNs ont été impliqués dans la régulation de l'EMT. En 2008, l'équipe de Gregory Goodall ([Gregory et al. 2008](#)) a montré pour la toute première fois que des miARNs jouait un rôle de régulateur de l'EMT en réprimant la traduction de certains facteurs de l'EMT. Par ailleurs ils ont également montré qu'un traitement au TGF $\beta$  réprimait l'expression de nombreux miARNs dont celle des membres de la famille miR-200. Aujourd'hui, la famille des miR-200 est celle qui semble être la plus déterminante dans l'inhibition de l'EMT notamment par sa régulation des ARNm des EMT-TFs, en particulier ceux de la famille ZEB, avec de nombreuses séquences cibles des miR-200 présentent dans les régions 3'UTR de ZEB1 et ZEB2. La famille miR-200 est composée de 5 miARNs : miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 et miR-429, regroupés et exprimés en deux transcrits polycistroniques pri-miARN distincts : miR-200a, miR-200b et miR-429 (chromosome 1) et miR-200c et miR-141 (chromosome 12).

La perte d'expression des miR-200 est positivement corrélée à la répression de l'expression de l'E-cadhérine. L'inhibition de miR-200 est donc suffisante pour induire l'EMT. Il a été montré dans un modèle de souris de tumeur mammaire inductible ZEB2, qu'après traitement au TGF $\beta$ , les deux clusters miR-200 sont réprimés ([Park et al. 2009](#)). Réciproquement, l'expression forcée de miR-200 seule s'est avérée suffisante pour réprimer l'EMT induite par le TGF $\beta$ . De plus, l'expression ectopique des membres de la famille miR-200 dans les cellules mésenchymateuses est capable de déclencher une MET. Dans ce modèle, la surexpression des différents membres de la famille miR-200 a provoqué une régulation positive de l'E-cadhérine et inhibé l'EMT en ciblant les facteurs de transcription ZEB1 et ZEB2 ([Park et al. 2009](#)). Il a été mis en évidence une boucle de régulation négative existant entre les facteurs ZEB1 et ZEB2 et les différents membres de la famille miR-200 ([Brabletz and Brabletz 2010](#); [Burk et al. 2008](#)). En effet ZEB1 et ZEB2 inhibent l'expression des gènes des deux clusters miR-200 en agissant directement sur leur promoteur ([Korpal et al. 2008](#); [Park et al. 2009](#)). Cette boucle de régulation est impliquée dans la progression tumorale avec une expression mutuellement exclusive de chacun des acteurs de cette boucle. L'expression des membres de la famille miR-200 est totalement associée et est un acteur majeur de la mise en place du phénotype épithélial, à l'inverse l'expression des facteurs ZEB est fortement associée au phénotype mésenchymateux. Ce qui implique qu'au cours de la progression tumorale la famille miR-200 joue un rôle de suppresseur de tumeur au cours de l'initiation tumorale, et au contraire un rôle pro-tumoral au cours de la progression métastatique en participant à la mise en place de la MET ([Dykxhoorn et al. 2009](#); [Gibbons et al. 2009](#)). D'autres miARNs et d'autres EMT-TFS sont également impliqués dans le même type de boucle de régulation et participent à la progression tumorale formant ainsi un interactome complexe orientant la cellule tumorale vers l'un

ou l'autre des phénotypes. Par exemple miR-218 et miR-200 agissent de manière synergique dans la régulation de ZEB2 (Mudduluru et al. 2015; Perdigão-Henriques et al. 2016). Ou encore, l'activation de la voie TGF $\beta$  induit une répression de miARNs des familles miR-200, miR-205 et miR-41 qui est associée à une perte du phénotype épithélial alors que l'activation de la transcription de miR-10b, miR-21 et miR-155 est corrélée à une augmentation de l'invasion et de la dispersion métastatique (C. S. Yang and Rana 2013). PTEN, qui régule négativement l'EMT et la transdifférentiation en cellules souches cancéreuses (CSCs), est une cible majeure de miR-21 tout comme le cluster miR-103/107. Ces miARN sont impliqués dans la transformation tumorale mammaire en réprimant l'expression de Dicer et PTEN. Le miR-10b a également été identifié comme un régulateur positif de l'EMT car son expression est induite par TWIST et associée à des capacités de migration et d'invasion dans les cellules cancéreuses du sein (Moyret-Lalle, Ruiz, and Puisieux 2014). La famille miR-200 collabore aussi avec la famille miR-203 pour inhiber l'EMT. L'expression de miR-203 permet de réguler négativement SNAIL et SLUG (Z. Zhang et al. 2011; P. Zhou et al. 2016). Une boucle de rétrocontrôle existe là aussi entre les gènes SNAIL/SLUG et le miR-203.

Enfin, plusieurs études ont démontré l'implication de la famille miR-200 dans l'acquisition d'une résistance à la thérapie, qui, dans la plupart des cas, est due à la perte d'expression de ces miARNs (Senfter et al. 2016). Les tumeurs du sein *claudin-low* montrent une expression élevée de différents EMT-TFs et sont considérablement enrichies en CSCs résultant en un phénotype très agressif et une résistance à la chimiothérapie. Knezevic et ses collaborateurs ont transfecté des cellules de tumeur *claudin-low* avec miR-200c et montré une diminution de la prolifération, associée à une augmentation de la différenciation, une réduction de la capacité métastatique et une augmentation de la sensibilité à la chimiothérapie *in vitro* (Knezevic et al. 2015).

### III. La transition épithélio-mésenchymateuse est un processus à la fois physiologique et pathologique

L'EMT est un processus normal et essentiel au développement embryonnaire ou chez l'adulte. Afin de mieux comprendre l'action des différentes EMT au cours des nombreuses étapes de développements, plusieurs chercheurs ont décidé de classer ces EMT en 3 grands types : deux groupes physiologiques regroupant les EMT de type 1 et de type 2, et un pathologique : l'EMT de type 3 (Kalluri and Weinberg 2009; Taylor, Parvani, and Schiemann 2010; Thiery et al. 2009) (Figure 12).

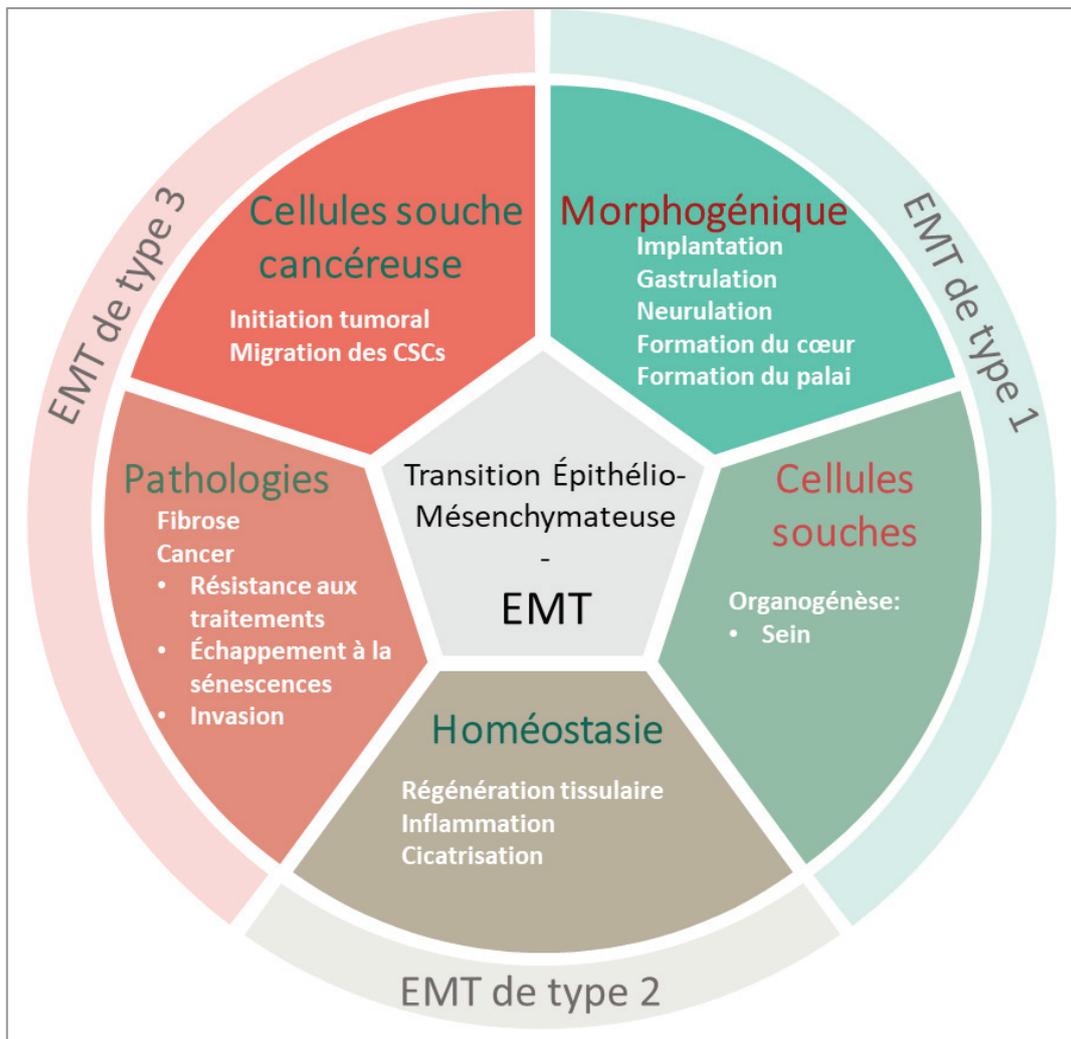


Figure 12 : Classification des différentes EMT

L'EMT de type 1 correspond à une EMT subit par une cellule pour la première fois. La première EMT après l'implantation est celle subie par les progéniteurs mésendodermiques pendant la gastrulation, tandis que la délamination des cellules de la crête neurale est un événement plus tardif. Chez l'enfant et l'adulte, l'EMT de type 1 est retrouvée notamment chez les cellules souches qui permet le développement d'organes et tissus après la naissance (tel que les seins chez la femme). L'EMT de type 2 intervient principalement lors de l'homéostasie tissulaire. L'EMT de type 3 consiste aux EMT liées à des pathologies dont notamment le cancer avec l'invasion métastatique.

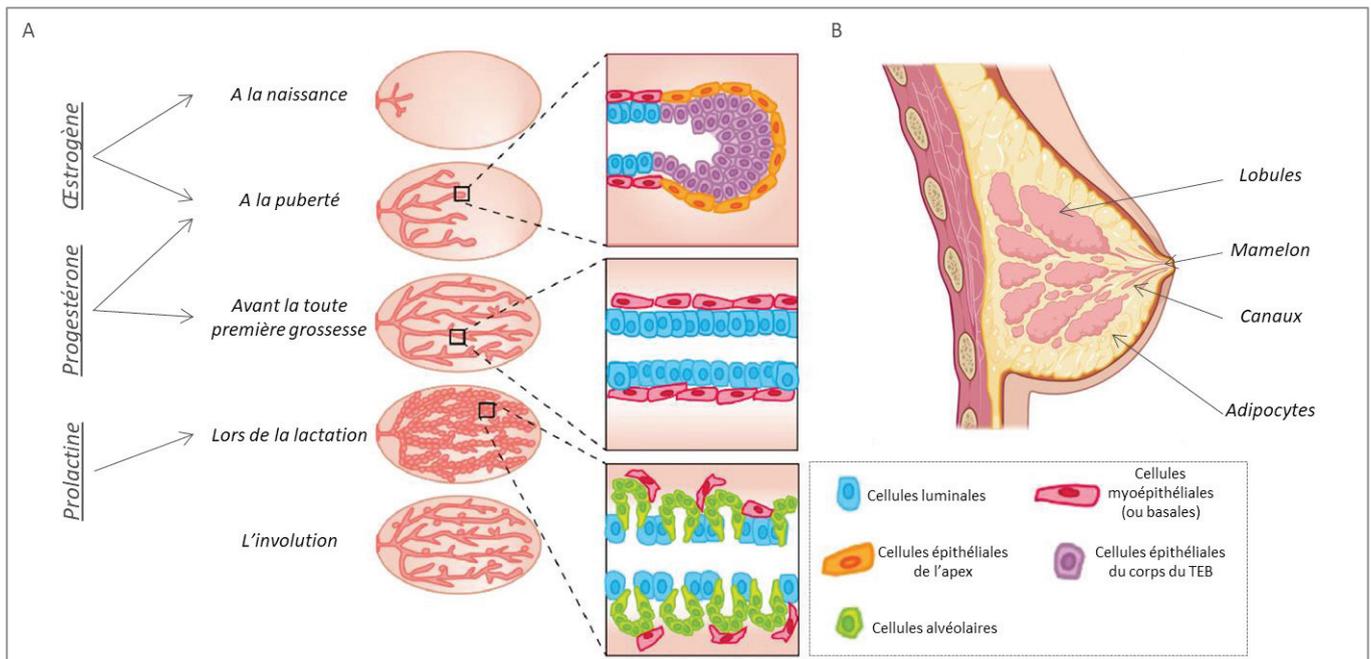
### a. Les EMT de type 1 : Développement embryonnaire et organogénèse

Durant le développement embryonnaire, l'organisation tridimensionnelle de nombreux organes nécessite, dès les premières étapes, la migration coordonnée d'ensembles cellulaires qui répond à des stimuli extracellulaires biologiques, chimiques ou physiques. Faisant référence aux premières étapes du développement embryonnaire, les EMT primaires définissent les processus visant la mise en place d'un tissu à partir de cellules épithéliales directement issues du blastomère, *i.e.* n'ayant jamais subi de processus d'EMT au préalable. L'EMT primaire intervient donc dans les premières phases du développement embryonnaire comme expliqué dans la partie I du chapitre I, mais elle intervient aussi plus tardivement lors de l'organogénèse et même après la naissance lors du développement de la glande mammaire.

Après l'implantation, la gastrulation et la neurulation, les cellules issues de la crête neural migrent pour former différents tissus et organes. Elles sont à l'origine de la grande majorité des cellules précurseurs de nombreuses structures (structure cranio-faciale), organes (cœur, thyroïde), tissus (tissus conjonctifs et tissus squelettiques) et types cellulaires (neuroblastes, glioblastes, myoblastes, ostéoblastes, mélanoblastes). Ces cellules subissent alors un cycle d'EMT-MET perdant peu à peu leurs potentiels dédifférenciés pour générer uniquement certains types de cellules dépendant notamment de leurs localisations et des signaux environnants. Parmi ces différents types tissulaires et cellulaires la notocorde, les somites, le cœur, l'intestin, les reins, la paroi corporelle, la paroi du coelome peuvent être cités en exemple (S. C. Chen, Liao, and Yang 2018; Ohta, Schoenwolf, and Yamada 2010; Thiery et al. 2009).

L'EMT de type 1 peut intervenir également dans l'homéostasie post-natale telle que la génération de la glande mammaire chez la femme au cours d'un processus appelé la mammogénèse. Chez l'embryon, l'épithélium mammaire, qui provient de l'ectoderme, envahit le mamelon dans le coussinet adipeux pour former un petit réseau canalaire ramifié. Cependant, aucune preuve directe de l'implication des gènes de l'EMT dans le développement précoce de la glande mammaire n'a encore été démontré chez l'embryon (Hassiotou and Geddes 2013; Russo and Russo 2011). Toutefois, lors du développement post-natal, pendant la puberté, la grossesse, la lactation et l'involution, l'EMT semble jouer un rôle important dans la mise en place des glandes mammaires (Figure 13 A). La glande mammaire est un tissu complexe composé d'un arbre canalaire épithélial ramifié entouré d'une couche de graisse et de stroma (Figure 13 B). Cet arbre canalaire mammaire est constitué d'unités lobulaires interconnectées par un réseau de canaux qui convergent vers le mamelon. L'épithélium mammaire quant à lui, est une structure en bicouche composée de 2 types cellulaires : les cellules luminales et les basales (aussi appelées myoépithéliales). Les cellules précurseurs luminales polarisées

peuvent se différencier en cellules canalaire ou en cellules alvéolaires productrices de lait. Les cellules luminales tapissent les lumières internes des canaux et des alvéoles, et sont souvent séparées de la membrane basale et du stroma par une couche intermédiaire de cellules basales. Ces cellules forment une gaine monocouche autour des cellules luminales et possèdent des capacités contractiles qui leur permettent, par pression sur les cellules alvéolaires, de sécréter le lait dans les canaux pendant la lactation lors de la grossesse.



**Figure 13 : Développement post-natal de la glande mammaire**

**A**, Représentation schématique du développement de la glande mammaire. Au cours de la puberté, les bourgeons terminaux (TEBs : Terminal End Buds) se développent aux extrémités distales des canaux sous l'influence des hormones sexuelles (Œstrogène et Progestérone). Les canaux s'allongent et se ramifient jusqu'aux limites du tissu adipeux (les adipocytes). La complexité de ce réseau continue de croître jusqu'à l'étape de lactation, stade terminale de croissance. A la fin de la grossesse et lors de la lactation, les alvéoles se forment et se différencient sous l'action de la prolactine afin de produire le lait. Lors de la phase finale, l'involution, le tissu sécrétoire est éliminé par apoptose. **B**, Représentation schématique de la structure d'une glande mammaire d'une femme adulte.

D'après l'article de Inman et al, 2015

Ces dernières années, de nombreuses études ont permis de mettre en évidence une hiérarchie des cellules épithéliales mammaires plus complexe que seulement les deux catégories de cellules jusqu'alors décrites. Cette hiérarchie cellulaire permet la croissance et l'entretien des tissus pendant les périodes de développement et d'homéostasie. Chez l'adulte, cette hiérarchie cellulaire est constituée de cellules souches mammaires (les MaSCs) à l'origine de deux types cellulaires : les progéniteurs luminaux, donnant eux même les cellules luminales matures, les cellules canalaire et les cellules alvéolaires, et les progéniteurs basaux, précurseurs des cellules myoépithéliales (N. Fu,

Lindeman, and Visvader 2014; N. Y. Fu et al. 2020; A.-P. Morel et al. 2017; Visvader and Stingl 2014) (Figure 14).

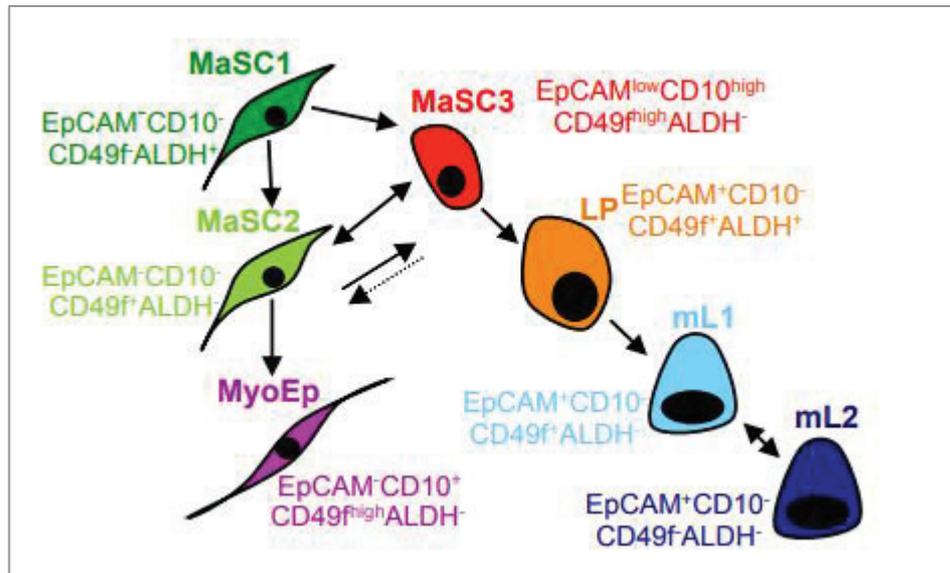


Figure 14: Organisation hiérarchique des cellules de la glande et leurs marqueurs membranaires spécifiques

D'après de l'article de Morel et al, 2017

Les MaSCs et les cellules progénitrices contribuent donc à la croissance canalaire, à l'expansion alvéolaire et à l'entretien des tissus tout au long du développement de la glande mammaire (Puisieux et al. 2018; Shackleton et al. 2006; Visvader and Stingl 2014). À la puberté, les canaux se développent et se ramifient. A leur extrémité, apparaissent des bourgeons terminaux constitués de cellules épithéliales et myoépithéliales. La maturation de ces bourgeons, appelée maturation ducto-lobulaire, permet la formation d'acini non fonctionnels. À ce stade, les acini se regroupent pour former des lobules peu différenciés (Hassiotou and Geddes 2013; Macias and Hinck 2012; Russo et al. 2006). Les hormones stéroïdiennes, l'œstrogène ( $17\beta$ -estradiol) et la progestérone, jouent un rôle central dans le développement des glandes mammaires. Ces hormones ont un impact sur les changements morphogénétiques profonds dans le développement de la glande en induisant par exemple une croissance et une ramification des canaux, la formation du bourgeon terminal et des alvéoles (Briskin and O'Malley 2010). Les œstrogènes, notamment, activent des cascades de signalisation qui régulent l'expression de nombreux gènes contrôlant à la fois le métabolisme, la progression du cycle cellulaire ou l'apoptose et favorisant *in fine* la croissance cellulaire. Elles stimulent donc la croissance cellulaire des cellules luminales et des progéniteurs luminaux en initiant la multiplication et la différenciation de ces cellules. Même si ces dernières jouent un rôle majeur dans le développement de la glande

mammaire, elles n'ont pas la capacité d'envahir les tissus environnant afin de créer de nouveaux canaux et alvéoles.

En parallèle de l'action des œstrogènes, l'EMT semble donc avoir un rôle crucial à la fois dans le maintien de l'homéostasie du tissu mammaire et dans l'initiation de la croissance canalaire et alvéolaire (Silberstein 2001). A l'inverse des œstrogènes et de leurs récepteurs qui sont exprimés exclusivement chez les cellules luminales, les EMT-TFs, dont SLUG, semblent exprimés uniquement dans les cellules souches mammaires (MaSCs) et les progéniteurs basaux (Nassour et al. 2012a). SLUG participe au maintien des MaSCs dans l'état d'équilibre d'EMT partielle. Il permet donc aux MaSCs de rester dans l'état souche dans lequel elles étaient au moment du développement embryonnaire (Côme et al. 2006). Par l'induction de l'invasion de la membrane basale et du tissu adipeux par ces cellules, SLUG permettrait aux progéniteurs basaux de former de nouveaux canaux et alvéoles lors de la puberté (Storci et al. 2008). Cette EMT partielle permet alors aux cellules basales d'acquérir des propriétés invasives et mobiles tout en conservant des jonctions cellules-cellules et donc d'embarquer avec elles les cellules luminales en croissance (Fata, Werb, and Bissell 2004). En plus de son rôle dans l'invasion tissulaire et la croissance de la glande mammaire, SLUG maintient un état d'équilibre entre les cellules souches (et progéniteurs) et les cellules différenciées. SLUG est donc essentiel dans le processus d'homéostasie de la glande mammaire à la puberté. En effet, il a été montré à de nombreuses reprises que SLUG régule négativement l'expression des récepteurs aux œstrogènes, notamment  $ER\alpha$ , dans les cellules souches progénitrices ainsi que dans les cellules basales différenciées (Bai et al. 2017; Dhasarathy et al. 2011). SLUG et les œstrogènes ont donc des rôles complémentaires. En étant exprimés de façon mutuellement exclusive (Sleeman et al. 2005, 2007; Thiery and Sleeman 2006; Zeps et al. 1998), ces deux facteurs ont des rôles distincts mais essentiels dans la croissance de la glande mammaire. Leurs activités doivent donc être finement régulées. SLUG est notamment responsable de la régulation de la quantité d'œstrogènes dans le tissu mammaire. Okubo et ses collègues ont montré que SLUG réprime l'expression des aromatasés, enzyme permettant de convertir les androgènes en œstrogènes, dans le tissu mammaire (Bulun et al. 2005; Okubo et al. 2001). Cependant, l'inverse semble lui aussi vrai, même si cela n'a pour le moment été montré que dans un contexte de cancer du sein. Il semblerait que les cellules exprimant le récepteur aux œstrogènes  $ER\alpha$  soient capable de réprimer l'expression de SLUG. En effet,  $ER\alpha$  activé stabilise le facteur de transcription C/EBP $\delta$  (Ccaat / enhancer-binding protein  $\delta$ , codé par le gène CEBPD) qui inhibe la transcription de SLUG (Mendoza-Villanueva et al. 2016). La régulation entre d'un côté les cellules luminales exprimant  $ER\alpha$  et dépendante des œstrogènes et de l'autre les cellules basales et

progéniteurs ayant besoin de SLUG est donc très complexe et essentiel au bon déroulement du développement de la glande mammaire.

Malgré l'arrêt de la croissance cellulaire après la puberté, la glande mammaire atteint son stade de développement final uniquement pendant la grossesse et l'allaitement. Là encore, les hormones induisent l'expansion et la différenciation terminale de l'épithélium mammaire en alvéoles lobulaires sécrétoires productrices de lait, tandis que les cellules graisseuses dédifférenciées s'éreintissent en de petits adipocytes (Hassiotou and Geddes 2013). La dernière phase, faisant suite à l'arrêt de la lactation, consiste en l'involution (Côme et al. 2006; Debnath and Brugge 2005; Fata, Werb, and Bissell 2004). Pendant cette phase, la glande mammaire régresse en raison de l'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires et du remodelage de la membrane basale, qui permet au sein de revenir à son état antérieur (Foubert, De Craene, and Berx 2010; Hennighausen and Robinson 2001; Wiseman and Werb 2002).

Lors de ces deux dernières phases, SLUG a un rôle très important dans l'homéostasie des cellules souches (MaSC et progéniteurs basaux) et des cellules basales. En effet, SLUG limite l'impact de l'apoptose lors de la formation de la lumière des canaux et alvéoles mais il protège surtout ces populations cellulaires lors de l'étape d'involution en freinant celle-ci (Nassour et al. 2012b). Au cours de cette involution, la fraction de cellules épithéliales lobulaires ER $\alpha$  négatives meurent, mais la structure basale est maintenue pour une éventuelle grossesse future grâce à la fonction anti-apoptotique de SLUG (Sikandar et al. 2017).

### b. Les EMT de type 2

L'EMT joue donc un rôle majeur à différents stades du développement embryonnaire, elle est également mise en place à l'âge adulte dans des réponses physiologiques, par exemple à la suite d'une blessure. Les EMT associées à la cicatrisation des plaies, à la régénération tissulaire et à la fibrose cicatricielle sont définies comme les EMT de type 2. La régénération des cellules et des tissus altérés lors d'une blessure implique une prolifération cellulaire (notamment des kératinocytes), qui est provoquée par des facteurs de croissance et qui est extrêmement dépendante de l'intégrité de la matrice extracellulaire (MEC) modulée par les fibroblastes (Botaille et al. 2008 ; Haensel and Dai 2018). Cependant, contrairement aux EMT primaires, ces EMT secondaires sont associées à l'inflammation et cessent une fois l'inflammation réduite après cicatrisation et régénération tissulaire. L'état intermédiaire ou métastable du processus d'EMT est essentiel pour le bon déroulement du processus (Arnoux et al. 2005; Savagner et al. 2005). La transition incomplète vers l'état mésenchymateux permet

entre autres d'arrêter le processus de cicatrisation lorsque celui-ci est fini et donc d'enclencher rapidement une MET. Sans ces états intermédiaires, le processus de cicatrisation ne peut s'arrêter, ce qui engendre des pathologies comme la fibrose ou le cancer (EMT de type 3).

La réparation des lésions tissulaires est donc la conséquence de plusieurs processus finement coordonnés associant l'inflammation, la coagulation, la migration des kératinocytes (ré-épithélialisation), le remodelage de la membrane basale et de la MEC ainsi que des étapes de maturation du derme et de l'épiderme (Eming, Martin, and Tomic-Canic 2014; Martin 1997).

Lors de la cicatrisation, les cellules mettent en place une EMT partielle. Ces EMT ont été découvertes en étudiant la réponse à la suite d'une blessure cutanée effectuée sur la souris. Les kératinocytes situés en bordure de la blessure rentrent en EMT en réponse à l'EGF et au TGF $\beta$  et se mettent à exprimer SLUG (Aomatsu et al. 2012; F. Cheng et al. 2016; Kusewitt et al. 2009). Un modèle murin déficient pour SLUG a montré une incapacité à cicatriser (Hudson et al. 2009). *In vitro*, le traitement de kératinocytes de rat avec de EGF et des cytokines inflammatoires TGF $\beta$  ou interleukine 1 bêta (IL1 $\beta$ ) induisent la production de métalloprotéinases (MMP9 et MMP13) associées à l'EMT, ainsi que des changements de morphologie cellulaire semblables à l'EMT (Lyons et al. 1993; Stoll et al. 2012; Stone et al. 2016). Un réarrangement du cytosquelette d'actine s'effectue alors avec une perte des liaisons cellulaires comme les desmosomes (Baum and Arpey 2005; Santoro and Gaudino 2005). La modification de la morphologie des kératinocytes ainsi que leurs capacités à modifier la MEC leurs permettent de migrer et de ré-épithélialiser la zone blessée, en maintenant toutefois une certaine cohésion entre eux, permettant la migration collective de kératinocytes reliés entre eux (Arnoux et al. 2005; Savagner et al. 2005; Thiery et al. 2009).

La fibrose cicatricielle, quant à elle, prend place dans de nombreux tissus épithéliaux et est liée au processus d'inflammation. Les cellules inflammatoires et les fibroblastes émettent des signaux pro-inflammatoires et modifient les composants de la MEC. La MEC est une structure complexe comprenant de nombreux composants dont des fibres de collagènes, des fibres élastiques, des glycoprotéines de structure dont la fibronectine et la laminine, et des mucopolysaccharides. Il s'agit d'un milieu dynamique, organisé en un réseau tridimensionnel et physiologiquement en équilibre entre les processus de synthèse et les processus de dégradation de ces molécules. La fibrose résulte donc d'une rupture de l'équilibre de la MEC : augmentation des processus de synthèse et diminution de leur dégradation. Une augmentation des constituants fibrillaires de la matrice extra-cellulaire dans un tissu ou un organe est donc observé. Cependant, si cette formation de tissu est excessive et incontrôlée, la fibrose devient pathologique. En effet, si le dépôt de fibres devient trop important, les fonctions de l'organe sont compromises et à terme ce dernier peut devenir défaillant. La fibrose est

donc initiée par des signaux moléculaires pro-inflammatoires sécrétés par des cellules inflammatoires (produites en réaction à une lésion) mais aussi des fibroblastes du tissu conjonctif ou encore par des cellules épithéliales elles-mêmes. L'inflammation va alors induire une EMT partielle et transitoire conduisant les fibroblastes à remodeler la MEC (Gawronska-Kozak et al. 2016; Stone et al. 2016). Les myofibroblastes, acteurs clés de la phase de remodelage et de maturation de la cicatrisation, sont dérivés de cellules épithéliales résidentes qui se sont transformées par EMT pour synthétiser les composants ECM et contracter le lit de la plaie, permettant alors la cicatrisation complète en joignant les bords de la blessure (Q. K. Chen et al. 2013; Hinz and Gabbiani 2003; Iwano et al. 2002; Radisky, Kenny, and Bissell 2007; Wynn and Ramalingam 2012). Des études *in vitro* ont montré que l'activation du récepteur du FGF par le FGF-2 augmente la motilité des kératinocytes et des fibroblastes (Bakhshayesh et al. 2012; Sogabe et al. 2006; G. Di Vita et al. 2005; Gaetano Di Vita et al. 2006) et stimule les fibroblastes pour produire de la collagénase permettant ainsi le remodelage de la MEC (Sasaki 1992). Lorsque la plaie est réparée, les différents signaux dont l'inflammation diminue et ne sont donc plus suffisants pour maintenir l'EMT partielle. Les cellules en EMT dont les nombreux myofibroblastes subissent une apoptose et disparaissent une fois la ré-épithélialisation terminée (Desmoulière et al. 1993; Desmoulière, Chaponnier, and Gabbiani 2005; Desmoulière and Gabbiani 1988; Gabbiani 2003, 2004). La MEC retrouve alors son équilibre et sa composition naturelle.

### c. Les EMT de type 3

Enfin les EMT de type 3 regroupent toutes les EMT ayant lieu lors d'une pathologie comme la fibrose tissulaire et le cancer.

#### 1. La fibrose tissulaire

La fibrose tissulaire est une caractéristique de nombreux troubles dégénératifs chroniques et est associée à une fonction organique réduite et à une éventuelle défaillance organique. A l'opposé de la fibrose cicatricielle, la fibrose tissulaire est par essence une forme continue de cicatrisation des plaies due à une inflammation persistante. Dans ce contexte, les fibroblastes activés lors de la fibrose cicatricielle deviennent des myofibroblastes, cellules qui expriment en excès des composants de la matrice extracellulaire et particulièrement du collagène de type I. La réponse inflammatoire mise en

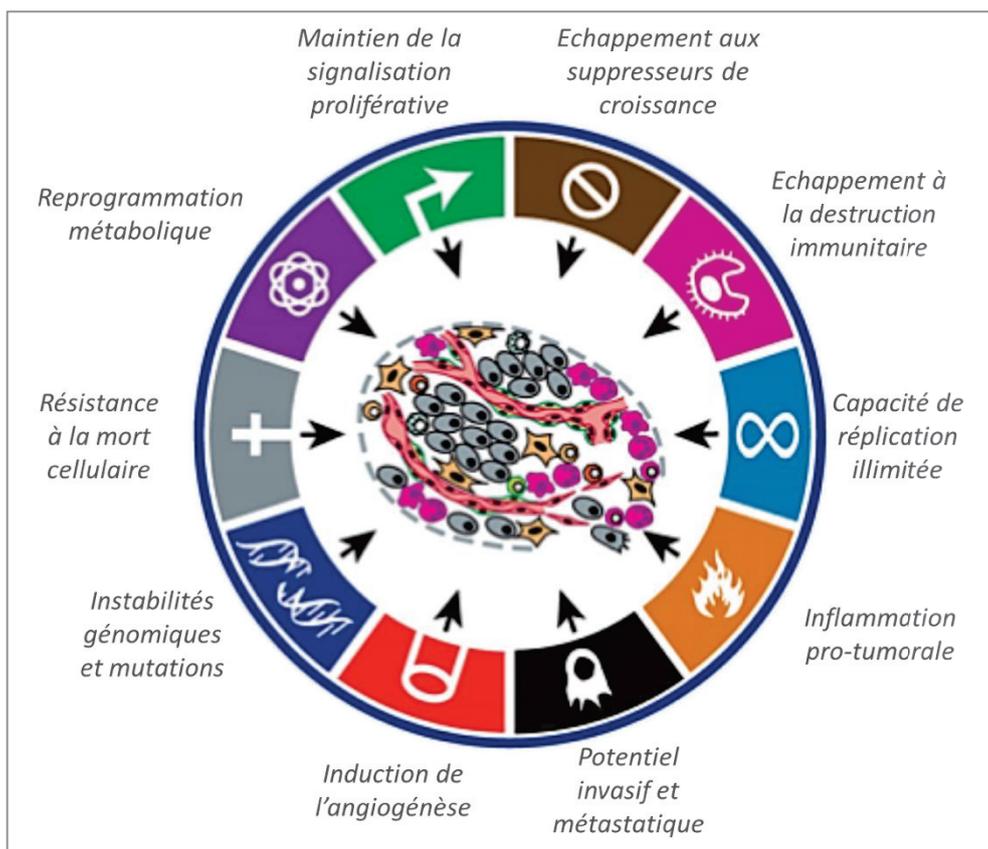
place en réponse à une blessure induit une EMT partielle. Cependant, en cas de réponse immune trop intense ou non contrôlée, des fibroblastes issus de cette EMT sont générés en trop grand nombre et finissent par altérer les fonctions de l'organe (Zeisberg and Kalluri 2004). L'origine des fibroblastes responsable de cette pathologie est encore débattue. De nombreuses études de suivi cellulaire ont permis de mettre en évidence que les myofibroblastes pouvaient émerger de la conversion de cellules épithéliales par une EMT (Iwano et al. 2002; Zeisberg et al. 2007), mais plus récemment, notamment le traçage de lignées chez des souris transgéniques indique que la contribution de ces cellules à la population de myofibroblastes est négligeable (Cook 2010; Humphreys et al. 2010; Lebleu et al. 2013; J. Li and Bertram 2010; J. Li, Qu, and Bertram 2009). Cependant, l'ensemble des données s'accorde pour conclure que la fibrose tissulaire nécessite une activation continue d'une EMT même partielle pouvant être différente d'un tissu à l'autre en termes d'activateurs (EGF, FGF, TGF $\beta$ , Interleukines) et en terme d'EMT-TFs (SLUG, SNAIL, Twist) (Nieto et al. 2016; Stone et al. 2016).

### 2. *Le cancer et la dissémination métastatique*

Le cancer est une pathologie décrite depuis l'Antiquité qui touche tous les organismes vivants, animaux ou végétaux. C'est le médecin grec Hippocrate qui, en comparant les tumeurs à un crabe, leur a donné pour la première fois les noms grecs de « karkinos » et « karkinoma » en comparaison avec certaines tumeurs, dont les prolongements rappellent les pattes de l'animal.

Sur le plan biologique, le cancer est généralement décrit comme une pathologie qui se caractérise par un développement anarchique et incontrôlé de cellules. Ces cellules, initialement normales, deviennent malignes à la suite d'un ou plusieurs évènements mutationnels. Elles se mettent alors à se multiplier de manière désordonnée, à proliférer de façon excessive et finissent par former une masse appelée tumeur. Ces cellules prolifèrent, donc, dans un premier temps localement, tumeurs primaires, puis dans le tissu avoisinant, et enfin à distance où elles forment les tumeurs secondaires, les métastases. Le terme tumeur (du latin *tumere*, enfler) désigne, en médecine, une augmentation de volume d'un tissu, sans précision de cause. C'est une néoformation de tissus corporels, néoplasie, qui se produit à la suite d'un dérèglement de la croissance cellulaire, de type bénin ou malin, le terme cancer est utilisé lorsqu'il s'agit d'une tumeur maligne. Sur le plan médical, le mot « cancer » désigne en fait un groupe de maladies très différentes les unes des autres faisant références aux tumeurs malignes solides ou même liquides. C'est pourquoi on ne devrait pas parler du cancer, mais des cancers au pluriel. Depuis ces dernières années, la définition des pathologies cancéreuses a beaucoup évolué, mettant en évidence quelques tumeurs rares n'évoluant pas sur une base d'une forte instabilité ou d'un développement anarchique.

En effet, au cours de ces vingt dernières années des efforts considérables ont été réalisés pour mieux comprendre le développement tumoral et ses conséquences. Pendant longtemps la prolifération cellulaire anormale servait, à elle seule, de définition au cancer. Dans les années 2000, Hanahan et Weinberg ont proposer six nouvelles caractéristiques propres aux cellules cancéreuses : l'indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance, la résistance à la mort cellulaire, l'induction d'angiogénèse, la capacité de réplcation illimitée, le fort potentiel invasif et métastatique ainsi que l'échappement aux signaux inhibiteurs de croissance (Hanahan and Weinberg 2000). Depuis, la définition des « Hallmarks of Cancer » a bien évolué en ajoutant de nouvelles propriétés comme l'instabilité génétique, l'échappement à la destruction immunitaire, la reprogrammation métabolique et l'inflammation (Hanahan and Weinberg 2011) (Figure 15). L'analyse des phénotypes de cellules provenant de différentes tumeurs, a permis de recenser un ensemble de stress cellulaire (stress réplicatif, stress mitotique, stress métabolique, stress oxydatif) qui pourrait participer au déséquilibre et au dysfonctionnement des cellules cancéreuses. Ces nombreux stress pourraient être à l'origine des Hallmarks du cancer comme ils pourraient en être leurs conséquences (Luo, Solimini, and Elledge 2009).



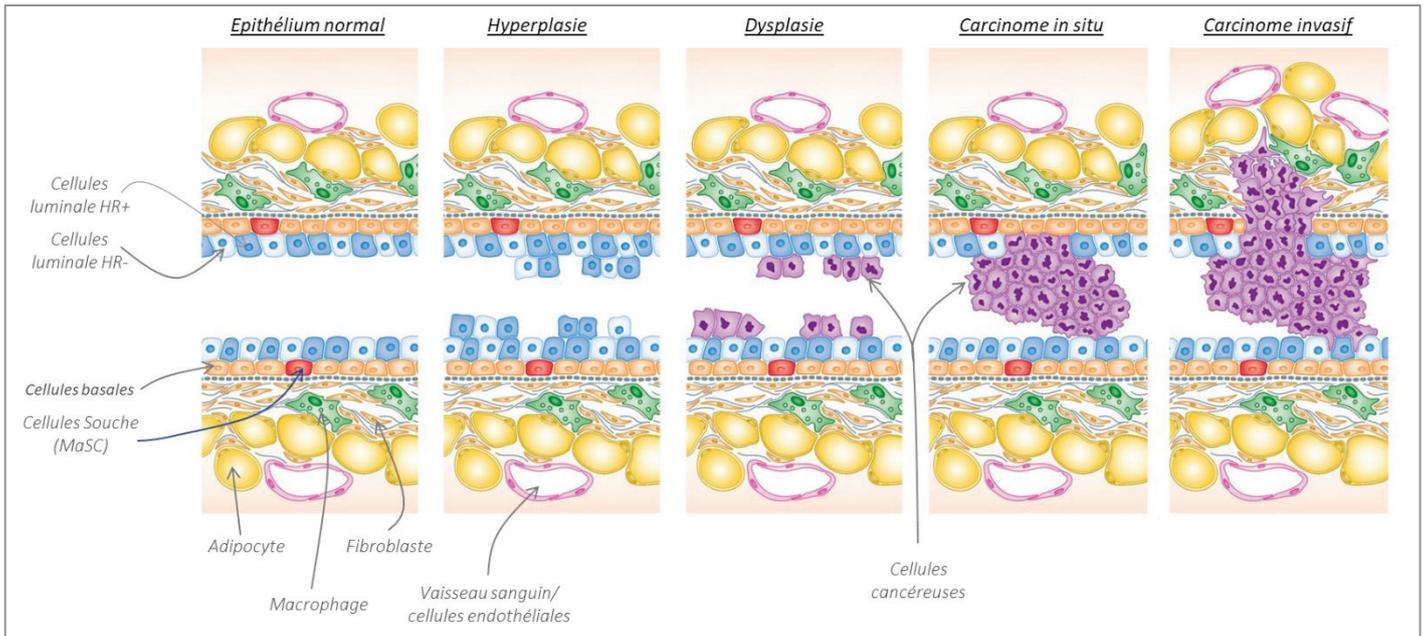
**Figure 15 : Les "Hallmarks of cancer"**

Représentation schématique des grandes caractéristiques des cancers

D'après de l'article de Hanahan et Weinberg, 2011

L'EMT de type 3 peut avoir lieu à différentes phases du cancer à : l'initiation tumorale (détaillé page 36), la propagation métastatique et la résistance aux traitements. Dans le cancer, l'induction d'une EMT est une condition *sine qua non* dans les phases tardives du cancer notamment lors de la dissémination métastatique. En l'absence de traitement, la majorité des cancers, tumeurs dites solides, évolue en suivant les mêmes étapes, mais à des vitesses très variables et selon des modalités propres à chaque type de cancer. Il y a 4 grandes étapes au développement d'un cancer (Figure 16) :

- La maladie débute par une lésion précancéreuse, qui contient des cellules en cours de transformation, l'hyperplasie. Toutes les lésions précancéreuses ne donnent pas forcément des cancers. La plupart de ces cellules arrêtent naturellement de proliférer et sont éliminées soit par mort cellulaire soit par intervention du système immunitaire. Mais si les cellules transformées progressent dans l'oncogénèse, la tumeur forme une dysplasie.
- Une cellule devient alors tumorigène et commence à se multiplier. Dans un premier temps, la tumeur de petite taille reste localisée dans le tissu d'origine. Il s'agit de tumeurs bénignes ou de carcinome *in situ*. Dans les carcinomes *in situ*, la membrane basale qui sépare l'épithélium du mésenchyme n'est pas franchie par la tumeur, ses limites sont encore confinées à l'épithélium.
- La tumeur grossit et commence à envahir les tissus voisins. La tumeur est devenue maligne. Le carcinome est devenu invasif.
- Dans le dernier stade, les métastases apparaissent, il s'agit de carcinome métastatique. Souvent, elles atteignent d'abord les ganglions lymphatiques, petits organes dispersés dans tout le corps et palpables au niveau du cou, de l'aîne et des aisselles, qui jouent un rôle clé dans la lutte contre les infections par exemple car siège de la réponse immunitaire. Puis les métastases s'étendent aux autres organes. Elles sont responsables de 90% des décès par cancer.



**Figure 16 : les différentes étapes du développement d'un carcinome**

Représentation schématique du développement d'un carcinome mammaire

La dissémination métastatique, souvent associée aux deux dernières phases du développement, nécessite l'activation du processus d'EMT pour envahir et métastaser et ainsi générer les dernières manifestations potentiellement mortelles de la progression du cancer (Revenco et al. 2019). Ce processus est très complexe et les cellules qui y entrent subissent de nombreuses modifications et doivent survivre à un nombre important d'obstacles. Très peu de cellules survivent à ces changements internes et environnementaux. Ce sont leurs capacités d'adaptation qui font la différence et leurs permettent de survivre. Cette adaptation est favorisée par l'induction de l'EMT. Ce processus est initié par le détachement de certaines cellules cancéreuses du tissu épithélial à la suite de modification interne comme une diminution des interactions cellules-cellules (pertes de protéines favorisant les différentes jonctions : E-cadhérine, Occludines, Desmoplakines, Claudins). Les cellules qui survivent à ce stress peuvent migrer, de manière individuelle ou collective, dans le tissu conjonctif intra- et péri-tumoral en détruisant la MEC et en entraînant une invasion locale (Pearson 2019). Cette étape précoce n'est pas forcément associée à la formation d'une tumeur secondaire puisqu'une tumeur invasive localement ne devient pas forcément métastatique. Le processus d'intravasation constitue une étape critique de la dissémination des cellules tumorales au sein de l'organisme puisqu'elle consiste en la traversée de la paroi des vaisseaux sanguins ou lymphatiques par les cellules cancéreuses pour entrer dans la circulation. Les cellules en EMT se retrouvent alors dans un environnement complètement différent de leur environnement d'origine puisque liquide, chargé en oxygène et en nutriments et où

le système immunitaire, qui pourrait les éliminer, est très présent. Les pressions physiques et les contraintes soumissent par la circulation rendent leur survie là encore difficile. Alors que la majorité de cellules ne survive pas, certaines s'adaptent suffisamment pour subsister et atteindre ganglions ou autres tissus et organes. Elles subissent alors l'extravasation et enfin une MET afin de s'installer dans leur nouvel environnement. Si là encore, elles arrivent à s'adapter, elles pourront alors développer une tumeur secondaire. La dissémination métastatique conduisant au développement de nouvelles tumeurs éloignées de la tumeur d'origine est un processus hautement inefficace. Seules 2% des cellules tumorales circulantes (CTC) survivent à la circulation et arrivent à réaliser le processus d'extravasation. Mais seulement 1% de ces cellules développeront des tumeurs secondaires (Luzzi et al. 1998). De nombreuses études montrent que ce pourcentage peut être expliqué par le phénomène de dormance observé lors de cette étape (Weidenfeld and Barkan 2018). Ce phénomène est notamment caractérisé par une absence de prolifération. Son échappement est donc nécessaire au développement des métastases (Moyret-Lalle et al. 2016).

### 3. La résistance thérapeutique

La relation entre la résistance thérapeutique et l'EMT a été bien établie dans de nombreuses études. L'enrichissement des marqueurs EMT aux niveaux de l'ARN, des protéines et des phénotypes a été décrit après exposition à un large éventail de modalités thérapeutiques, y compris les thérapies hormonales, les chimiothérapies, la radiothérapie et de nombreuses thérapies ciblées.

Généralement dans les cancers, l'activation de l'EMT signifie résistance aux traitements et diminution de la survie du patient. Par exemple, chez les patients atteints d'un cancer de l'œsophage qui avaient reçu une chimiothérapie, une augmentation de la SNAIL et une diminution de l'expression de la E-cadhérine sont prédictives d'une mauvaise réponse à la chimiothérapie et d'une survie globale inférieure (Hara et al. 2014; Takeno et al. 2004; Uchikado et al. 2005). Chez les patients atteints d'un cancer du rectum, une expression réduite de la E-cadhérine, une expression nucléaire de la  $\beta$ -caténine, une expression réduite du miR-200c et la présence de bourgeons tumoraux sont toutes associées à une absence de réponse à la chimiothérapie et à la radiothérapie, tandis qu'une expression réduite de la E-cadhérine et du miR-200c est associée à une diminution de la survie (Bhangu et al. 2014). Dans le cancer du sein métastatique exprimant les récepteurs d'œstrogènes, l'expression de SLUG a été corrélée à une diminution de la survie sans progression. L'induction de l'EMT après une chimiothérapie est associée à une diminution de la survie sans maladie chez 24% des patientes atteintes d'un cancer du sein (Tsai and Yang 2013; E. D. Williams et al. 2019).

L'EMT, dans les tumeurs après un traitement chimio-thérapeutique, pourrait entraîner une augmentation de la prolifération cellulaire, de l'angiogenèse, de l'immunosuppression, de la dissémination métastatique, la suppression de l'apoptose, l'induction des CSC ou encore la modulation des voies de réparations de l'ADN (E. D. Williams et al. 2019; Yun Zhang and Weinberg 2018). Les causes de ces résistances sont nombreuses et elles sont encore mal comprises. Par exemple, dans le cancer du sein, de nombreuses études ont montré que les marqueurs de l'EMT sont enrichis après le traitement à la chimiothérapie corrélée à une expression accrue des pompes à efflux, la familles ABC avec notamment les membres ABCG2 et ABCB1 (également connu sous le nom de MDR1), favorisant les agents de chimiothérapies de sortir de la cellule et les empêchent donc d'agir (Saxena et al. 2011). L'EMT est aussi capable de modifier des processus tels que la réparation de l'ADN et le cycle cellulaire. En effet, dans le cancer du sein, en réponse à la radiothérapie, la phosphorylation de ZEB1 par ATM conduit à sa stabilisation et par conséquence celle de CHEK1 qui entraîne l'arrêt du cycle cellulaire et l'initiation de la réparation des cassures double-brin générées par les rayonnements ionisants. L'hypothèse proposée dans cet article est que ZEB1 participe à la survie cellulaire après traitement par radiothérapie en permettant l'arrêt des cellules dans leur cycle cellulaire et ainsi donne plus de temps à la réparation les dommages (P. Zhang et al. 2014).

Il est important de noter que, bien que l'EMT dans le cancer conduise à un mauvais pronostique pour le patient, l'EMT induite par la cicatrisation en réponse à une blessure est bénéfique. Par conséquent, l'analyse des similitudes et des différences entre ces deux types d'EMT est essentielle pour mieux concevoir des thérapies spécifiques et pouvoir un jour trouver un traitement efficace pouvant inhiber l'EMT dans le cancer (Leopold, Vincent, and Wang 2012).

#### IV. La transition épithélio-mésenchymateuse est un acteur majeur de l'initiation tumorale

Comme nous venons de le voir, l'EMT est un processus essentiel au développement embryonnaire et à la cicatrisation et dans le maintien de l'homéostasie tissulaire notamment lors de la formation de la glande mammaire. Cependant il peut aussi avoir un rôle important lors des pathologies graves comme le cancer. Bien que son implication dans les phases tardives du développement tumoral ne soit plus à démontrer, l'EMT semble aussi avoir un rôle dans l'initiation tumorale et ce dès les étapes les plus précoces du cancer. La mise en évidence de l'expression de certains EMT-TFs dans des carcinomes non invasifs, dès le stade *in situ*, a permis d'émettre l'hypothèse qu'ils pourraient jouer un rôle oncogénique dans l'initiation tumorale, bien avant le stade métastatique. En effet, au sein de l'équipe, nous avons pu démontrer que la réactivation aberrante des EMT-TFs permet *in vitro* d'inhiber les systèmes de sauvegarde tels que la sénescence et l'apoptose mis en place par la cellule en réponse à des stress oncogéniques favorisant ainsi la survie cellulaire (Ansieau et al. 2008; Valsesia-Wittmann et al. 2004).

##### a. L'EMT et les cellules souches cancéreuses

Les tumeurs sont constituées de populations de cellules cancéreuses différentes par leur phénotype mais aussi par leur profil mutationnel. Cette hétérogénéité intra-tumorale peut être expliquée notamment par l'acquisition successive de mutations distinctes à l'origine des différents sous-clones. Pendant plusieurs décennies, le cancer était considéré comme le résultat final d'un processus d'évolution somatique dans lequel une seule lignée clonale avait acquis de nombreuses mutations oncogéniques conférant aux cellules des avantages adaptatifs et prolifératifs (Hahn and Weinberg 2002; Martincorena et al. 2017). Ce modèle met en évidence l'exigence de l'accumulation par étapes d'une série d'événements indépendants pour qu'une cellule humaine normale soit transformée. De manière cohérente, de nombreuses études notamment épidémiologiques révèlent que le processus de développement tumoral se déroule sur une période prolongée, probablement des décennies, et prédisent que les tumeurs solides de l'adulte nécessitent de nombreux événements, au moins huit, avant de devenir cliniquement détectables (Armitage and Doll 1954). Cependant, les nouvelles technologies, ces dernières années, ont su modifier ce dogme. De nouveaux modèles pouvant expliquer le développement plus complexe d'une tumeur ont été élaborés (Figure 17) (Visvader and Lindeman 2012) : 1- le modèle clonal, où la tumeur est issue d'une cellule ayant subi une mutation initiale et qui donne naissance à une population génétiquement homogène contenant cette

mutation initiale. L'hétérogénéité génétique provient des événements de mutations secondaires apparaissant au cours de temps ; 2- le modèle stochastique, où l'hétérogénéité cellulaire et phénotypique dépendent de la vitesse de prolifération exacerbée de chaque cellule ayant possiblement subi des mutations différentes. Dans ce modèle tous les phénotypes sont capables d'initier une tumeur ; et 3- le modèle hiérarchique où une population cellulaire ayant des caractéristiques de cellules souches est capable de redonner la totalité des autres populations de cellules cancéreuses qui constituent la tumeur. Cependant ces hypothèses se sont avérées insuffisantes pour expliquer la diversité des tumeurs observées.

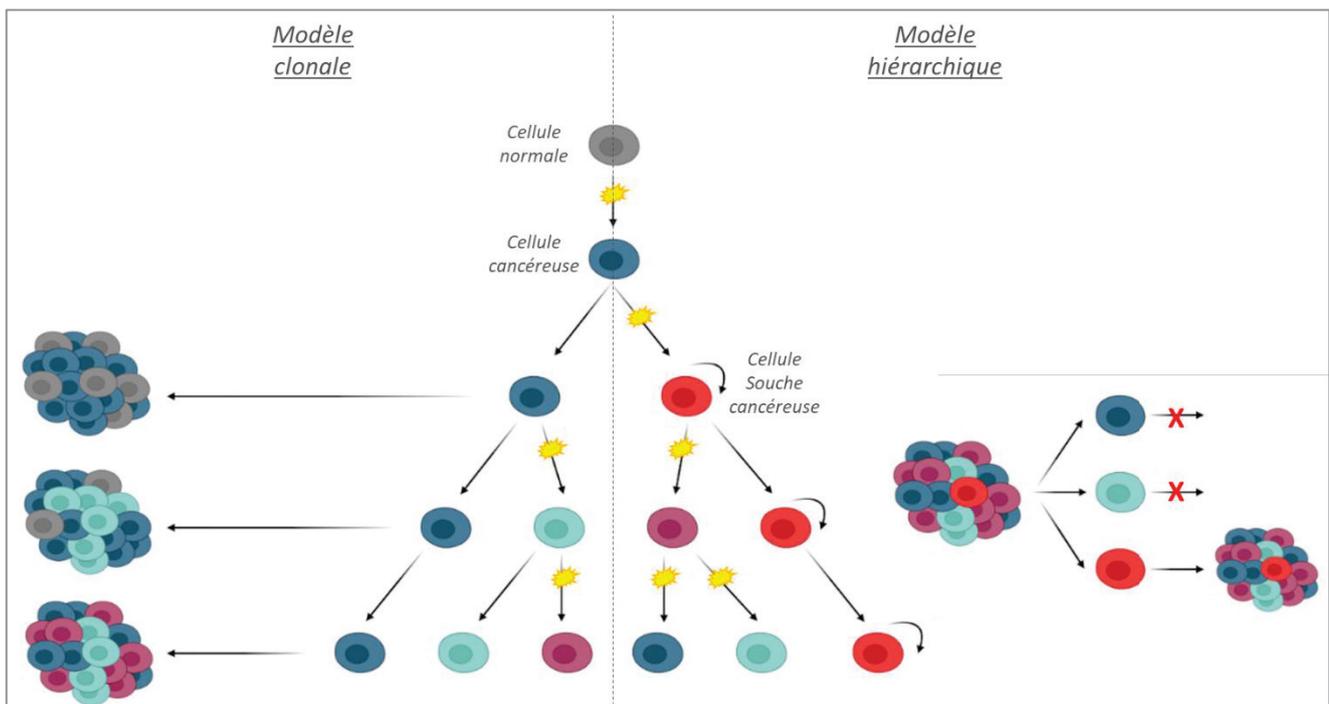


Figure 17: Les différents modèles théoriques de l'hétérogénéité tumorale

Représentation schématique des modèles théoriques de l'évolution de l'hétérogénéité tumorale opposant à gauche le modèle d'évolution clonale au modèle hiérarchique mettant en avant le rôle des cellules souches cancéreuses à droite.

D'après l'article de Visvader and Lindeman, 2012

L'analyse conjointe de cancers pédiatriques et de l'adulte a mis en évidence que toutes les tumeurs ne nécessitent pas le même nombre de mutations et le même niveau d'instabilité génomique nécessaire à l'induction d'un cancer (Puisieux et al. 2018). En effet, le jeune âge des patients atteints de cancers pédiatriques semble incompatible avec le temps attendu pour accumuler les anomalies nécessaires à la transformation cellulaire et à la progression tumorale. Les voies vers la tumorigénèse dépendraient également de l'état de la cellule d'origine. Conformément à cette hypothèse, des variations significatives de la proportion de mutation par tumeur pour les différents types de cancers ont été mises en évidence (Martincorena et al. 2017; Vogelstein et al. 2013). Dans ce contexte, la

différenciation cellulaire agit généralement comme une barrière contre la tumorigénèse. L'établissement du concept des cellules souches cancéreuses (CSCs) et de la cellule d'origine a permis d'appréhender une nouvelle vision du développement tumoral. Les mécanismes moléculaires et cellulaires qui sous-tendent l'hétérogénéité tumorale restent des questions centrales dans le domaine de la biologie du cancer. Les concepts de cellule d'origine et de CSCs sont des notions bien distinctes l'une de l'autre. La cellule d'origine, ou la cellule normale qui acquiert la ou les premières mutations favorisant le cancer, n'est pas nécessairement une cellule souche cancéreuse (CSC). En effet, les CSC correspondent au sous-ensemble cellulaire de la tumeur qui soutient la croissance maligne et ainsi maintient l'homéostasie tumorale. Autrement dit, le concept de cellule d'origine fait référence aux cellules initiatrices de la tumeur (TICs) alors que les CSCs sont les cellules propageant le cancer. Les CSCs présentent les mêmes caractéristiques que les cellules souches normales, c'est-à-dire une capacité d'autorenouveaulement par division asymétrique, générant ainsi des progéniteurs qui se différencient, assurant ainsi la spécificité de la structure et de la fonction du tissu. Les CSCs représentent donc un faible pourcentage de la tumeur, elles sont à l'origine de la progression en soutenant la croissance tumorale, en maintenant le pool de CSCs et en générant une population non-tumorigène différenciée. De nombreuses preuves aujourd'hui dans divers cancers, à la fois des leucémies et des tumeurs solides, démontrent que ces tumeurs sont organisées et soutenues hiérarchiquement par une sous-population de cellules auto-renouvelables qui peuvent générer le répertoire complet des cellules tumorales, à la fois tumorigènes et non-tumorigènes.

Les CSCs peuvent être caractérisées et isolées sur la base de l'expression d'une série de marqueurs membranaires spécifiques de chaque organe considéré. Par exemple, dans les carcinomes mammaires, les CSCs peuvent être isolées des autres types cellulaires présents dans la tumeur sur la base d'une perte d'expression du marqueur de surface CD24 et d'un gain de CD44 (Al-Hajj et al. 2003; Al-Hajj and Clarke 2004; O'Brien, Kreso, and Jamieson 2010). D'autres marqueurs spécifiques des cellules souches existent, tel que le marqueur ALDH. Le marqueur positive ALDH a permis notamment d'isoler à la fois des cellules souches mammaires du sein humain normal mais aussi des cellules tumorales ayant un phénotype souche ou progéniteur (Armstrong et al. 2004; Charafe-Jauffret et al. 2008; Ginestier et al. 2007). L'activation d'un oncogène, combinée avec l'expression ectopique d'un EMT-TF dans des cellules épithéliales mammaires immortalisées entraîne une expression élevée de CD44 et une perte de CD24 similaire au profil observé dans des cellules souches (Mani et al. 2008; A. P. Morel et al. 2008; Nieto and Cano 2012). De nombreuses équipes dont la nôtre et celle dirigée par Dr R. Weinberg ont montré que l'initiation de l'EMT dans les cellules épithéliales mammaires, induite par la surexpression de EMT-TFs, était associée à l'acquisition de caractéristiques et de propriétés de CSCs, en particulier des propriétés d'auto-renouvellement. Il a en effet été mis en évidence que des cellules mammaires

transformées ayant subi une EMT sont très similaires aux cellules souches mammaires (MaSC). De plus, des cellules souches isolées de glandes mammaires murines ou humaines sont enrichies en marqueurs de l'EMT. Notre équipe a par ailleurs aussi démontré *in vivo* que l'expression conjointe de l'oncogène HRAS et du facteur de transcription TWIST1 dans l'épithélium mammaire murin conduisait à la génération de tumeurs de type *claudin-low* (voir chapitre 2), un type tumoral mammaire enrichi en cellules souches CD44+/CD24- (A. P. Morel et al. 2008; Youssef et al. 2010). De nombreuses expériences, *in vivo*, ont pu mettre en évidence le rôle crucial de la population des CSCs dans le développement tumoral. Ces expériences consistent à séparer les différents phénotypes cellulaires, identifiés par des marqueurs notamment CD24/CD44, et à les injecter dans un modèle murin. Dans le cancer du sein par exemple, seul le sous-type CD24+/CD44- est en mesure de développer une tumeur (Al-Hajj et al. 2003). Toutes les populations des cellules cancéreuses ne sont donc pas capables de former une tumeur. Certaines de ces populations sont très différenciées or ce type de résultats met en avant la nécessité d'une plasticité cellulaire dont font preuve les cellules en EMT. Seules les cellules ayant les capacités de prolifération, de différenciation et d'auto-renouveau sont capables de donner une tumeur. L'origine même des CSCs est là aussi diverse. Selon le type cellulaire de la cellule d'origine, la CSC peut provenir d'une cellule épithéliale ayant subi une EMT par l'acquisition des différents facteurs dont les EMT-TFs, mais elle peut aussi provenir d'une cellule souche normale exprimant déjà les EMT-TFs (Pattabiraman and Weinberg 2014). La CSC peut donc avoir une origine différente. De même, l'activité transcriptionnelle de chaque EMT-TF est impliquée dans cette acquisition de propriétés souches à différents niveaux. Le facteur TWIST1 est par exemple capable d'activer l'expression de BMI1, une protéine appartenant au groupe Polycomb. Ce dernier permet d'assurer une répression du locus INK4A maintenant ainsi les capacités d'auto-renouveau de la cellule. ZEB1 quant à lui réprime les membres de la famille miR200 qui contrôlent l'expression de gènes associés aux cellules souches tel que BMI1, KLF4 ou SOX2 (Puisieux, Brabletz, and Caramel 2014; Wellner et al. 2009). SNAIL2 peut lui coopérer avec SOX9, un facteur important pour la conservation du statut de cellules souches chez l'adulte, pour induire une dédifférenciation de cellules épithéliales mammaires et leur conférer des capacités de cellules souches telles que la capacité à générer des mammosphères (Guo et al. 2012). D'autres études, notamment *in vivo* chez la souris, ont montré que la perte de l'expression des facteurs de transcription induisant l'EMT, TWIST1, ZEB1 ou SLUG, présentent une résistance accrue à la tumorigenèse induite par HRAS ou CMYC (Krebs et al. 2017; Yiyang Liu et al. 2015; Yongqing Liu et al. 2014; Phillips and Kuperwasser 2014; Tripathi and Garg 2018). Dans des cellules « normales » du sein, notre équipe a mis en évidence que les cellules exprimant seulement l'oncogène HRAS n'ont pas la capacité de former une tumeur contrairement à celles qui expriment à la fois ZEB1 et HRAS (A.-P. Morel et al. 2017). A l'inverse, la déficience en ZEB1 dans un modèle de cancer du pancréas dépendant de KRAS, ou encore la perte de SNAIL dans le modèle MMTV-

PyMT de cancer du sein, affectent l'initiation et la progression de la tumeur uniquement dans un contexte sauvage pour la protéine p53, mais pas de mutant p53. Suggérant que l'initiation tumorale est soit dépendante de la réactivation des EMT-TFs, afin de modifier le cycle cellulaire et de contourner le mécanisme de sénescence et de mort cellulaire induite par p53, soit dépendante d'un nombre important de mutations permettant entre autres d'inactiver p53 (Krebs et al. 2017; Nieto et al. 2016).

L'ensemble de ces résultats, obtenus essentiellement dans les cancers d'origine épithéliale, indique que la réexpression aberrante des facteurs inducteurs d'EMT, avant même de permettre l'engagement des cellules dans un processus d'EMT, assure l'initiation tumorale en empêchant la mise en place des systèmes de sauvegarde cellulaire et en induisant la génération de cellules souches cancéreuses essentielle au développement tumoral.

### b. L'EMT, cycle cellulaire et échappement à la sénescence

L'EMT est donc essentielle à la mise en place des CSCs notamment grâce à l'expression des EMT-TFs qui permettent d'activer les voies d'auto-renouvellement et de prolifération mais ces facteurs sont aussi capables de modifier le cycle cellulaire et d'empêcher la mort cellulaire par l'inactivation de l'oncosuppresseur p53.

Le cycle cellulaire est un ensemble d'étapes qui constitue et délimite la vie d'une cellule. Ce cycle est composé de plusieurs phases pendant lesquelles la cellule grossit et duplique son matériel génétique, l'interphase, et d'une phase où celle-ci se divise pour donner naissance à deux cellules filles identiques, la mitose ou phase M. Les cellules en phase M se divisent afin de donner deux cellules filles génétiquement identiques. Ces cellules filles reproduiront ce cycle, et ainsi de suite. L'interphase est séparée en 3 grandes parties. La phase S dite de synthèse qui permet la duplication de l'ADN mais aussi de tous les autres constituants de la cellule. Pendant cette phase, l'ADN est entièrement répliqué, grâce à de nombreuses protéines dont les ADN polymérases. La transcription d'ARNm codant les protéines d'histones notamment est fortement augmentée et les histones sont utilisées pour compacter la molécule d'ADN. Dans le cytoplasme, le complexe centriolaire, le centrosome, se réplique aussi durant la phase S. Les deux centrosomes formés s'écartent pour former les deux pôles nécessaires pour la division cellulaire lors de la phase de la mitose. La phase S est entourée de deux étapes « intervalles » appelé phase G1, située entre la phase M et S (G pour Gap en anglais) et G2, située entre la phase S et M. Lors de la phase G1, la cellule effectue son métabolisme normal, elle grossit jusqu'à atteindre une taille critique qui constitue le signal d'entrée en phase S. Cette phase est souvent la plus longue et sa durée dépend du type cellulaire. Il existe une 5ème phase nommée G0, ou la phase "post-mitotique", qui désigne les cellules quiescentes ou sénescents. Durant cette phase, les cellules sont non-prolifératives. Elles ont quitté le cycle cellulaire de manière provisoire ou définitive selon le contexte qui les ont poussées à en sortir. Le cycle cellulaire est un mécanisme finement contrôlé. Chaque entrée et sortie d'une phase sont étroitement dirigées et reposent essentiellement sur des complexes protéiques complémentaires appelées CDK (Cycline-dependent kinase) et cycline. La CDK est la composante de base, mais, comme son nom l'indique, elle a besoin d'une cycline pour activer ses fonctions. Les CDK et les cyclines s'associent et forment des complexes hétérodimériques. L'activation de ces complexes permet l'entrée dans la phase du cycle concernée. De nombreux acteurs peuvent aussi bloquer l'activation de ces complexes, parmi eux les protéines CHK1 et CHK2 qui inhibent le complexe CDK1-CyclineB qui permet l'entrée en phase M. ATR (pour kinase Ataxia telangiectasia and Rad3 related) inhibe le complexe CDK1-CyclineB par l'intermédiaire

de CHK1 alors que son homologue ATM (pour kinase Ataxia-Telangiectasia Mutated), inhibe le complexe CDK1-CyclineB par l'intermédiaire de CHK2, p53 et p21. p16 en s'associant à CDK4 et CDK6, empêche la liaison avec la cycline D bloquant ainsi les cellules en phase G1. p21, dont la transcription est dépendante de p53, inhibe CDK2-CyclineE (entrée en phase S), CDK2-CyclineA (sortie de phase S) et CDK1-Cycline B (entrée phase M). p53 a donc un rôle majeur dans le contrôle de l'ensemble des phases du cycle cellulaire. Son activation engendre une cascade d'inhibition bloquant l'ensemble des phases du cycle ou autrement dit pouvant bloquer la cellule dans n'importe quelle phase de son cycle. P53 est un facteur de transcription qui régule entre autres la transcription de facteurs impliqués dans le cycle cellulaire, la sénescence et la mort cellulaire (Figure 18).

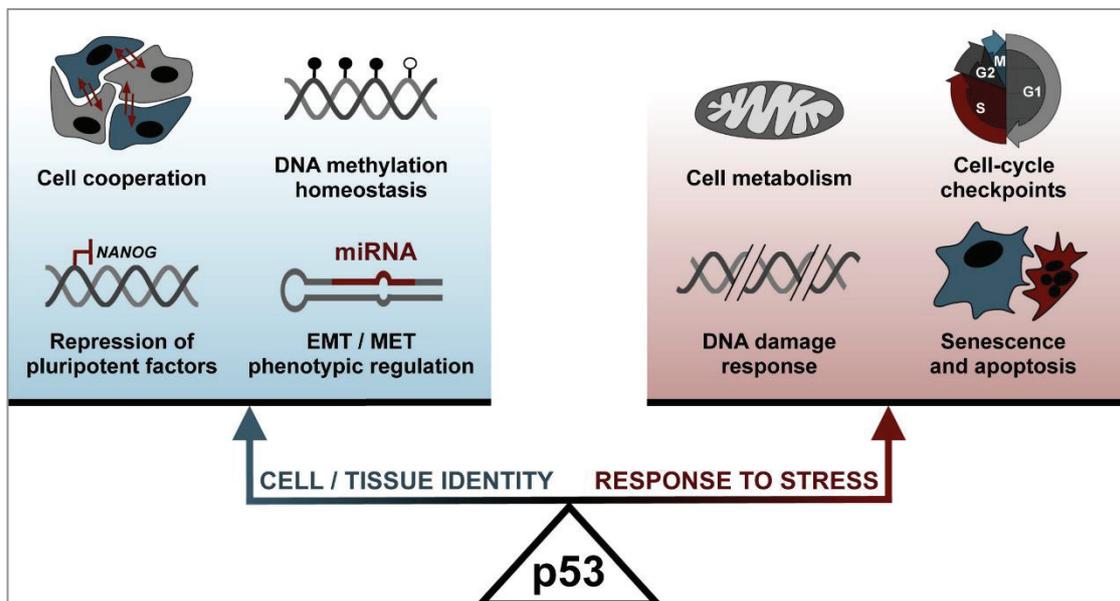


Figure 18: p53, gardien de l'identité tissulaire et cellulaire et capteur du stress cellulaire

Au cours de l'embryogenèse, p53 agit comme un maître régulateur de la coopération cellulaire. Il limite la plasticité cellulaire des cellules épithéliales en activant l'expression des membres de la famille miR-200, miR-34 et miR-192, en réprimant des facteurs pluripotents, tels que NANOG et OCT4, et en maintenant l'homéostasie de la méthylation de l'ADN. Dans les cellules différenciées, p53 agit comme un gardien de l'intégrité génomique en contrôlant le point de contrôle du cycle cellulaire G1-S et en activant des programmes à sécurité intégrée en réponse aux dommages à l'ADN et aux signaux de stress associés au cancer. MET, transition mésoenchymo-épithéliale.

D'après l'article de Puisieux et al, 2018

L'inhibition de p53 est accomplie par l'enzyme MDM2, une E3 ubiquitine ligase qui, en se fixant sur p53, induit sa dégradation. Lors d'un dommage à l'ADN, par exemple, la liaison entre p53 et MDM2 est rompue permettant l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de la sénescence ou la mort cellulaire si le dommage ne peut être réparé (Deisenroth, Franklin, and Zhang 2016; X. X. Sun, Dai, and Lu 2007). p53 est mutée dans la majorité des cancers mais il a été remarqué que p53 reste sauvage dans les CSCs en demeurant cependant inactif. De manière cohérente, l'inefficacité de la transformation maligne induite par un oncogène de cellules engagées ou différenciées est couramment associée à l'initiation d'un arrêt de croissance dépendant de p53. Cependant, la faible fréquence des mutations de p53 dans

les tumeurs pédiatriques d'origine embryonnaire a permis de mettre en évidence que la perte de p53 n'est pas forcément nécessaire au développement tumoral mais aussi que l'EMT pouvait avoir un rôle important dans l'inactivation de celui-ci (Puisieux et al. 2018). Plusieurs études ont rapporté que l'induction de p53 et la transactivation de gènes cibles spécifiques en réponse aux dommages à l'ADN sont atténuées dans les cellules souches embryonnaires (Aladjem et al. 1998; Solozobova, Rolletschek, and Blattner 2009), la stabilité de leur génome étant principalement préservée par des mécanismes de réparation robustes et des systèmes antioxydants (Marión et al. 2009; Seifert, Dejosez, and Zwaka 2017; Spike and Wahl 2011). Cependant, p53 exerce des fonctions suppressives de tumeurs par le biais de nombreux processus biologiques qui ne sont pas tous provoqués par des signaux de stress génotoxiques et ses principales activités peuvent varier selon l'état cellulaire (Vousden and Prives 2009). Par exemple, Dejosez et ses collègues ont rapporté que, lors de l'embryogenèse, p53 agit comme un régulateur de la coopération cellulaire, un processus primitif et fondamental pour le développement d'organismes multicellulaires, permettant aux cellules de répondre aux signaux de leurs voisins pour coordonner leurs activités (Dejosez et al. 2013). Ces résultats montrent ainsi le rôle essentiel de p53 dans les cellules souches et donc la nécessité de moduler son activité afin de permettre aux cellules de survivre mais aussi de communiquer.

Les EMT-TFs atténuent ces barrières oncosuppressives en affectant les fonctions des modulateurs clés des voies dépendantes de la protéine p53 et du rétinoblastome (RB) (Figure 19). Les EMT-TFs contournent cet arrêt du cycle cellulaire en inhibant différentes protéines. La capacité d'inhiber de tels programmes suppresseurs de tumeurs est une propriété commune aux EMT-TFs. Ainsi il a été montré que TWIST1 pouvait inhiber p53 de différentes façons dans des cellules épithéliales mammaires : il peut inhiber son activation en amont en inhibant l'activation de p19ARF, limiter sa réponse en inhibant en aval l'activation de p21 ou encore se fixer directement à p53, l'engageant alors dans une voie menant à sa dégradation. L'induction de l'EMT par l'activation de la voie du TGF $\beta$  promeut l'expression de MDM2 (ou l'homologue humain HMD2) ce qui a pour conséquence la destruction de p53 (Araki et al. 2010). Plus récemment, ZEB1 a été identifiée comme pouvant interagir avec p53 pour inhiber l'activité de celui-ci (R. Fu et al. 2019). D'autre part, ZEB1 et TWIST1 peuvent toutes les deux bloquer l'activation de p16 et p15 mise en place après un stress oncogénique. Ainsi ces protéines ne pourront pas lever l'inhibition effective sur RB. Des fonctions similaires sur l'inhibition de p53 ont été observées avec les protéines SNAIL et SLUG (Lee et al. 2009; W. S. Wu et al. 2005). Ainsi, en empêchant l'arrêt du cycle et l'entrée en sénescence ou en apoptose, les EMT-TFs favorisent le maintien de la prolifération cellulaire entraînant donc la transformation des cellules (Ansieau et al. 2008; Valsesia-Wittmann et al. 2004). Il convient de noter que p53 s'est également révélé être un puissant inhibiteur de l'EMT dans les cellules épithéliales (Pinho, Rooman, and Real 2011), ce qui suggère que p53 fonctionne comme un facteur d'homéostasie qui restreint la plasticité des cellules. De plus, p53 inhibe la plasticité cellulaire

des cellules épithéliales en activant l'expression des membres de la famille miR-200, miR-34 et miR-192, en réprimant les facteurs pluripotents, tels que NANOG et OCT4 (deux facteurs de transcription embryonnaires), et en maintenant l'homéostasie de la méthylation de l'ADN. Dans les cellules indifférenciées, p53 agit plutôt comme un gardien de l'intégrité génomique en contrôlant le point de contrôle du cycle cellulaire G1-S et en activant des programmes de sécurité en réponse aux signaux de dommage de l'ADN et de stress associés au cancer.

Dès 1997 Serrano et ses collaborateurs démontrent que l'expression de l'oncogène HRas dans des fibroblastes humains conduit à un engagement des cellules dans le processus de sénescence. Ce dernier est associé à une accumulation de p53 et de p16, deux inhibiteurs majeurs du cycle cellulaire (Serrano et al. 1997). Comme nous venons de le voir, l'EMT et plus précisément l'expression des EMT-TFs sont capables d'inhiber l'activité des facteurs régulant le cycle cellulaire dont p53. De nombreuses études montrent par ce biais que les EMT-TFs favorisent l'évasion de la sénescence et de l'apoptose induites par les oncogènes et fournissent aux cellules un avantage de survie dans de nombreuses conditions de stress. La sénescence et l'apoptose induites par les oncogènes limitent la croissance cellulaire dans les lésions pré-malignes, agissant comme des barrières de sécurité primaires contre la transformation maligne. Par exemple, la perte de ZEB1 dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) provoque une MET et déclenche la sénescence prématurée en empêchant l'inhibition directe engendrée par ZEB1 sur les promoteurs de CDKN1A (p21WAF1) et de INK4B (p15INK4B), affectant ainsi simultanément la signalisation p53 et RB (Swarbrick et al. 2008). L'inhibition de l'arrêt du cycle cellulaire est l'une des causes directes de l'échappement à la sénescence. Une autre façon de contourner la sénescence induite par les oncogènes et de favoriser le développement tumoral est leur coopération avec les EMT-TFs. Cette capacité des EMT-TFs à coopérer avec des oncogènes tels que HRAS dans la transformation cellulaire *in vitro* a également pu être démontrée *in vivo* via le croisement avec des modèles de souris transgéniques pour TWIST1 dans un premier temps. Si l'activation de HRAS seul *in vivo* ne permet pas la formation de tumeurs, l'expression conjointe de TWIST1 et HRAS promeut l'initiation tumorale et la formation de carcinomes dans des modèles mammaires et pulmonaires (A.-P. Morel et al. 2012; Phuoc T. Tran et al. 2012). TWIST1 peut aussi collaborer avec l'oncogène Myc. En effet, la surexpression seule de TWIST1 ou Myc n'est pas suffisante pour induire une tumeur, mais la collaboration des deux permet le développement tumoral (Valsesia-Wittmann et al. 2004). D'autres EMT-TFs, tels que SNAIL, ZEB1 ou encore ZEB2 ont par la suite également été montrés comme capable de coopérer avec des altérations oncogéniques pour promouvoir l'initiation tumorale. Des expériences utilisant une déplétion conditionnelle de TWIST1, ont permis d'étudier l'implication de ce facteur aux différentes étapes de la carcinogénèse de la peau (B. Beck et al. 2015).

L'ensemble de ces données indique que les EMT-TF présentent de véritables fonctions oncogènes et peuvent coopérer avec les oncoprotéines mitogènes pour favoriser la transformation maligne et le développement de tumeurs primaires.

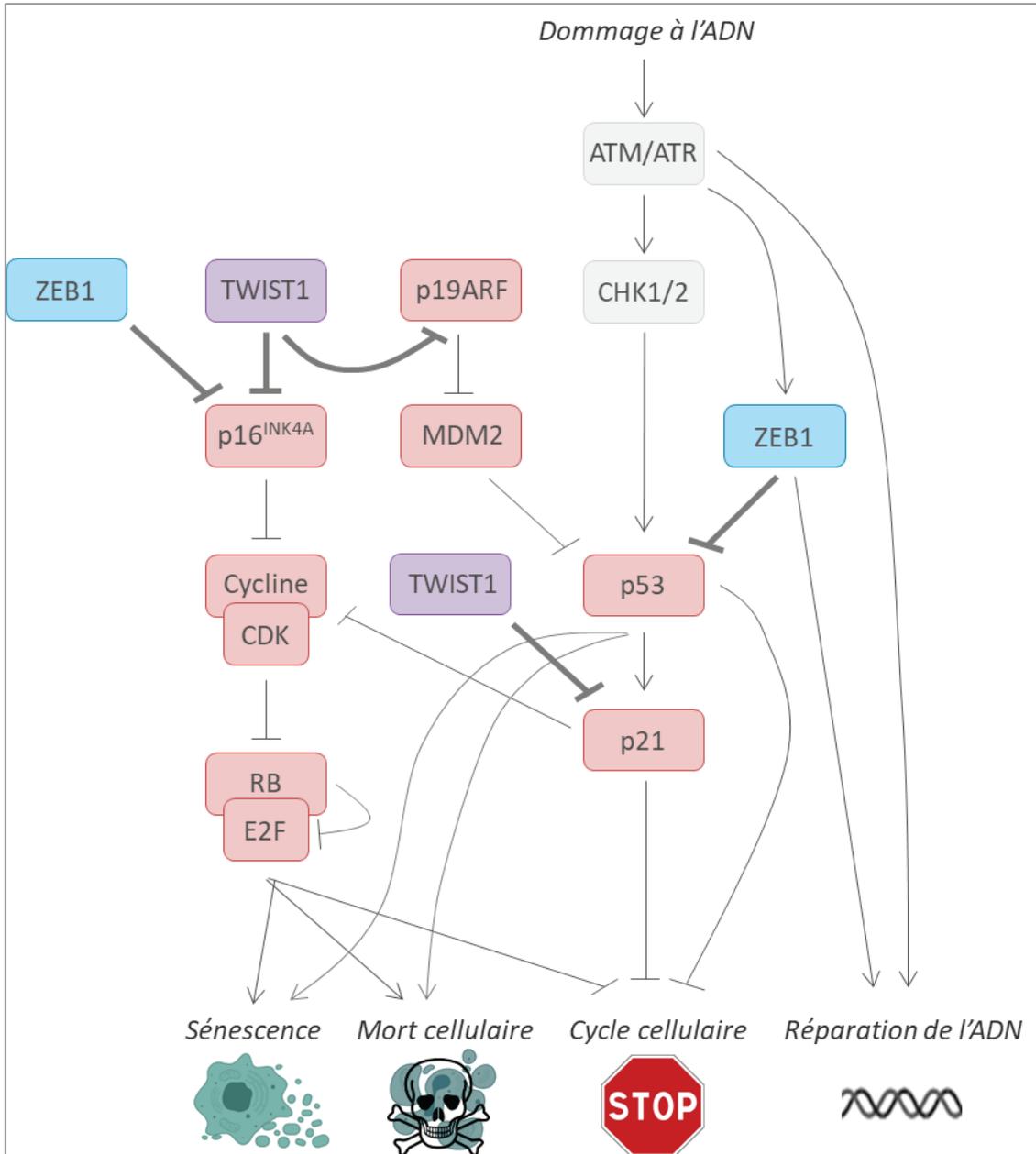


Figure 19: Rôles des EMT-TFs dans le contrôle du cycle cellulaire lors d'un dommage à l'ADN

## Chapitre II : Les cancers du sein

La glande mammaire est l'organe féminin présentant la plus grande incidence de cancer avec environ 54 062 nouveaux cas en France (33,5% de l'ensemble des nouveaux cas de cancer). Près d'une femme sur huit sera atteinte au cours de sa vie (Figure 20). Le cancer du sein est multifactoriel avec un risque qui augmente avec l'âge. Moins de 10% des cancers du sein surviennent avant 40 ans et l'incidence augmente ensuite régulièrement jusqu'à 65 ans, souvent associée avec la ménopause et une diminution de la densité de la glande mammaire (75% des cancers du sein se déclarent après 50 ans, avec une moyenne d'âge de 61ans). Le développement du dépistage du cancer du sein a notamment permis d'améliorer considérablement les chances de guérison des patientes. Aujourd'hui, 87 % des patientes sont encore en vie 5 ans après le diagnostic et 3 femmes sur 4 sont probablement en rémission totale. Notons aussi que les hommes peuvent également développer un cancer du sein. Ces cas sont cependant rares, puisqu'ils représentent seulement 1% du nombre total de cancers du sein et 0,5% des cancers masculins (La ligue contre le cancer ; INCa ; ©Les cancers en France, Les Données, INCa, édition 2015. 2016; Inca 2019; INCa 2019).

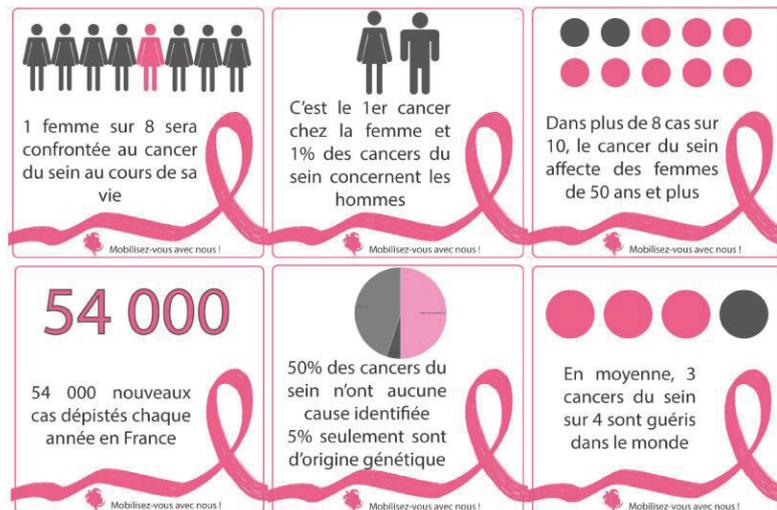
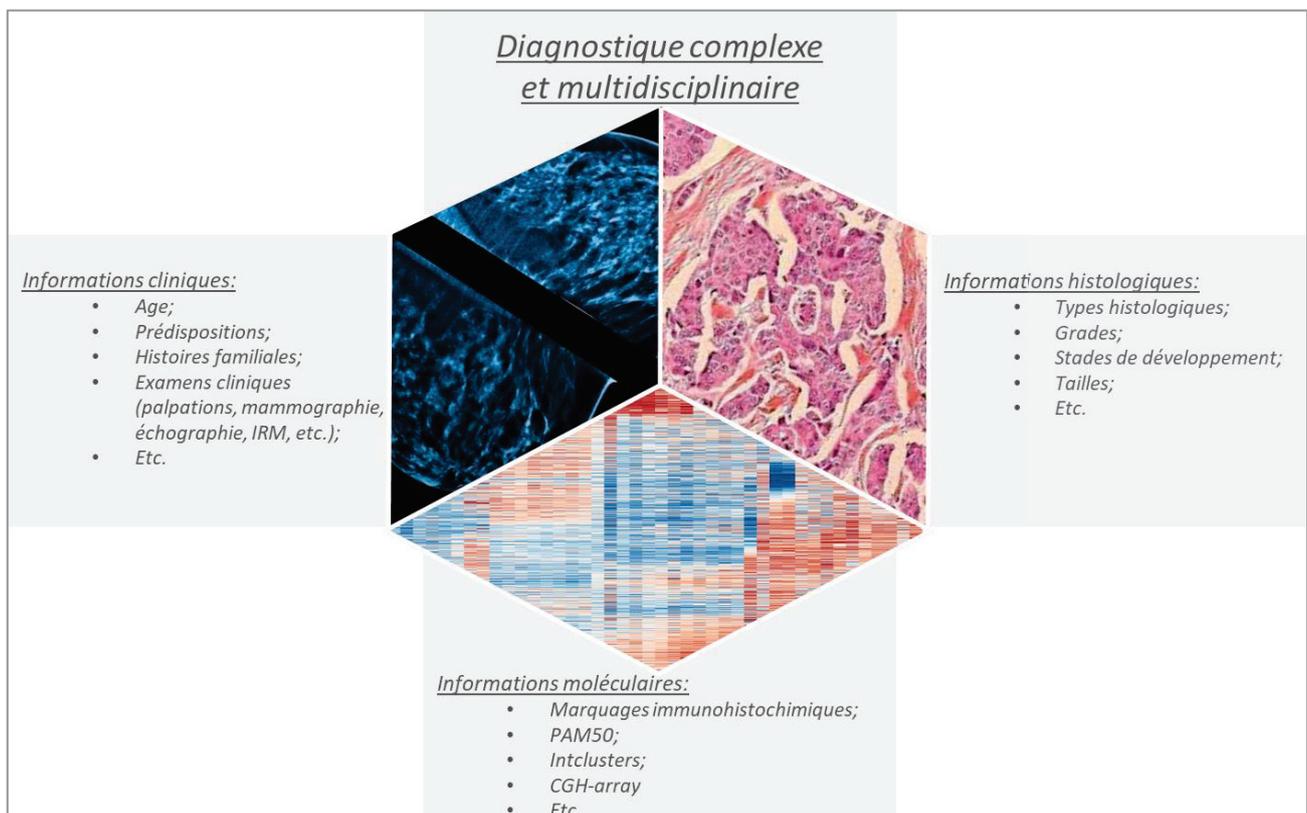


Figure 20: Les chiffres sur le cancer du sein

### I. Classifications

Le cancer du sein, comme beaucoup d'autres cancers, est très hétérogène. On devrait donc parler des cancers du sein et non du cancer du sein comme un seul et même cancer.

Le dépistage du cancer du sein s'articule autour d'un examen clinique des seins (palpation des seins et des aisselles pour rechercher des ganglions anormaux) et d'un examen radiologique (mammographie, échographie, IRM) qui permettent de préciser la nature d'une éventuelle grosseur : taille, consistance ou mobilité. Le diagnostic est réalisé lors d'un examen anatomopathologique, après chirurgie ou sur une biopsie qui permet de classifier la tumeur dans un des différents sous-types tumoraux afin d'adapter le traitement (Figure 21).



**Figure 21: Diagnostic complexe et multidisciplinaire des cancers du sein**

Le diagnostic des cancers du sein se base sur trois grandes informations : les informations cliniques qui reprennent les informations du patients, les informations histologiques se concentrant sur les caractéristiques physiologiques de la tumeur et enfin les informations moléculaires propres à la tumeur.

## a. Caractéristiques clinico-histo-pathologiques des cancers du sein

### 1. Les stades

La détermination du stade tumoral est fondamentale pour la décision thérapeutique ([la ligue nationale contre le cancer 2018](#)). Moins le stade est avancé, meilleur est le pronostic. La classification par le stade tumoral, ou aussi connu sous le nom de stadification ou classification TNM, permet d'évaluer la progression de la maladie. Elle s'effectue à l'aide d'examen clinique, radiologique et anatomopathologique. Cette classification repose sur 3 critères :

- «T» pour la taille et l'infiltration de la tumeur, allant de Tx (tumeur non évaluable) à T4.
- «N» pour le degré d'envahissement des ganglions lymphatiques (« Node » en anglais), allant de Nx (envahissement des ganglions non évaluable) à N3.
- «M» pour la présence ou non de métastases à distance ; avec Mx (renseignements insuffisants pour classer les métastases), M0 (absence de métastase) ou M1 (présence de métastases).

La combinaison TNM indique le stade. Plusieurs stades sont alors définis.

#### *Stade 0 : Cancer in situ.*

La tumeur reste localisée au niveau du canal ou de l'alvéole où elle a pris naissance. Selon la localisation il s'agit de carcinome canalaire *in situ* ou carcinome lobulaire *in situ*. La tumeur est de petite taille (non détectable à la palpation), non infiltrante, elle n'a pas dépassé la membrane basale (T0 ou Tis, N0, M0).

#### *Stade I :*

La tumeur est de petite taille,  $\leq 2$  cm. Il n'y a pas d'atteinte ganglionnaire, ni de métastases à distance (T1 N0 M0).

#### *Stade II :*

Dans un premier cas, la tumeur est  $\leq 2$  cm avec envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires ou atteinte des ganglions sentinelles mammaires internes mais sans métastases (T0/1/2 N1 M0). C'est le stade IIA. Dans un second cas, le stade IIB, la tumeur est  $> 2$  cm mais sans atteinte ganglionnaire ni de métastases (T2/3 N0 M0).

#### *Stade III :*

Ce stade est sous-classifié en 3 stades. Le premier, le stade IIIA, il n'y a pas encore de développement de métastases, mais la tumeur a atteint au moins 4 ganglions axillaires ou atteinte des ganglions sous-claviculaires ou des ganglions sus-claviculaires homolatéraux (tous T N2/3 M0). Dans le

## Introduction

stade IIIB, la tumeur possède des extensions directes à la paroi thoracique ou à la peau. La tumeur peut être inflammatoire (T4 tous N M0). Mais il n'y a toujours pas de métastases. Enfin, concernant le stade IIIC, la tumeur est > 5 cm avec envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires ou atteinte des ganglions sentinelles mammaires internes et sans métastases (T3/4 N1 M0).

### *Stade IV : cancer métastatique.*

Indépendamment de la taille de la tumeur et du degré d'envahissement ganglionnaire, la présence de métastases à distance classe le cancer en stade IV (tous T tous N M1).

## 2. Les grades

L'évaluation histologique de la tumeur est très importante et passe dans un premier temps par l'évaluation du grade histologique (Galant et al. 2010). Le grade est une autre façon d'évaluer l'évolution et l'agressivité de la tumeur. Il existe deux grades histo-pronostiques : le grade de Scarff-Bloom et Richardson (SBR) ou le grade Elston et Ellis (EE) (Tableau 1). Ils sont déterminés lors de l'examen anatomopathologique, en prenant en compte :

- L'aspect des cellules cancéreuses : plus une cellule cancéreuse s'est modifiée par rapport aux cellules normales, plus elle est agressive.
- Les caractéristiques des noyaux des cellules : plus les noyaux des cellules sont gros et de taille et de forme variées, plus les cellules sont agressives.
- Le nombre de cellules en mitoses (division cellulaire) : plus ce nombre est important, plus les cellules de la tumeur se divisent rapidement, plus le cancer peut se propager, ce qui est un critère d'agressivité. Le marqueur de prolifération Ki67 en immunohistochimie est également souvent utilisé en complément du compte des mitoses. Il permet d'évaluer les cellules en cours de division. Ki67 détecte un antigène nucléaire présent pendant tout le cycle cellulaire sauf lors de la phase quiescente (G0).

Chacun de ces 3 critères est noté de 1 à 3, le score global obtenu permet de déterminer le grade histo-pronostique :

- Le grade est I ou bas grade : les tumeurs sont les moins agressives. Elles ont pour des scores totaux de 3, 4 ou 5.
- Le grade est II pour les scores de 6 ou 7.
- Le grade est III ou haut grade : Les tumeurs sont les plus agressives. Les scores sont de 8 ou 9.

Il existe très peu de différence entre ces deux grades.

Tableau 1: Comparaison des grades histo-pronostiques :

	<u>Grade Eiston et Ellis (EE)</u>		<u>Grade Scarff-Bloom et Richardson (SBR)</u>	
<u>Formation de glandes</u> (architecture)	>75%	Score1	100%	Score1
	10 à 75%	Score 2	99% à 1%	Score 2
	<10%	Score 3	0%	Score 3
<u>Pléiomorphisme</u> (nucléaire)	Léger	Score1	Léger	Score1
	Modéré	Score 2	Modéré	Score 2
	Marqué	Score 3	Marqué	Score 3
<u>Nombre de mitoses</u> (Ki67 en immunohistochimie)	0 à 1	Score1	0 à 1	Score1
	2	Score 2	2	Score 2
	3 ou plus	Score 3	3 ou plus	Score 3

Le grade EE est actuellement le plus recommandé et utilisé en Europe.

### 3. La classification histopathologique

La majorité des cancers du sein sont des adénocarcinomes (Figure 22). D'après l'INCa, un adénocarcinome est une tumeur maligne qui se développe à partir de l'épithélium d'une glande (le sein, poumon, pancréas,..), de son revêtement (ovaire) ou d'une muqueuse (estomac, côlon). En pratique, une tumeur est reconnue comme adénocarcinome lors de l'analyse anatomo-pathologique d'une biopsie ou de la tumeur entière et démontre que celle-ci a un aspect de glande (tubes glandulaires) ou la présence de sécrétions mucineuses (muco-sécrétions).

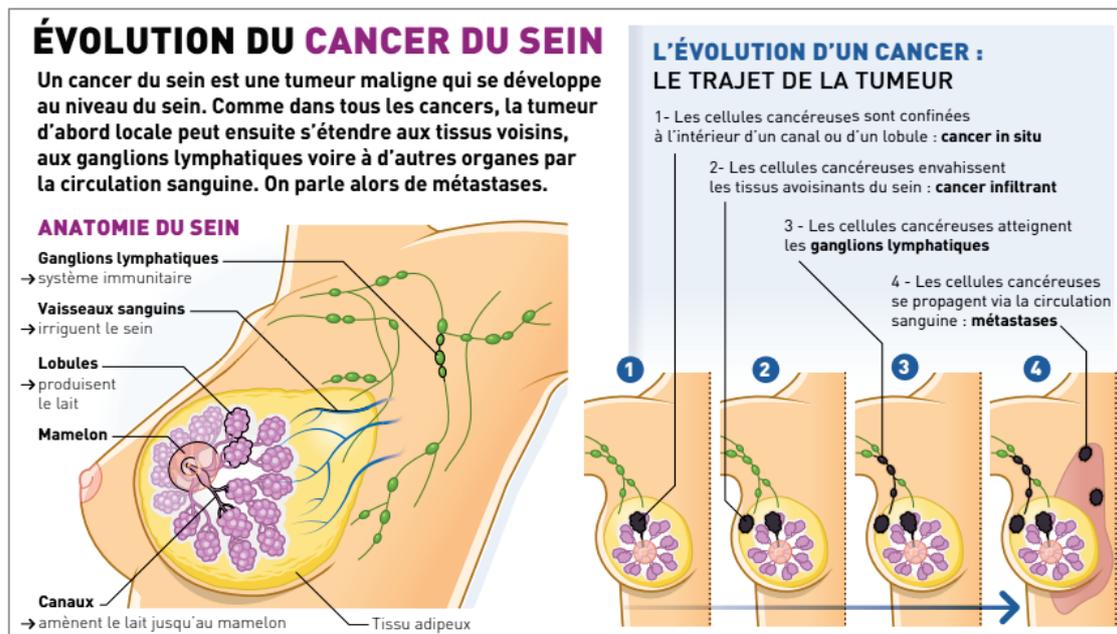


Figure 22: Evolution du cancer du sein ; différenciation entre carcinome in situ et carcinome invasif

Figure issue du journal de la fondation pour la Recherche Médicale (FRM) : recherche et santé, 2018

## Introduction

La classification histopathologique ou anatomopathologique repose donc sur l'anatomie de la tumeur, sa capacité invasive (*in situ* ou invasive) et son origine histologique (lobulaire, tubulaire ou canalaire) (APHP 2016). Classiquement, les carcinome *in situ* sont distingués des carcinomes infiltrants (Figure 23). Les carcinomes *in situ* correspondent à une prolifération de cellules malignes sans rupture de la membrane basale, donc ne comportant pas de risque théorique d'envahissement ganglionnaire. Les carcinomes infiltrants, quant à eux, sont caractérisés par une prolifération tumorale qui dépasse la membrane basale et envahit le conjonctif palléal. L'origine du cancer est, le plus souvent, l'unité terminale ductulo-lobulaire. Il existe différents types histologiques permettant de classer au mieux la tumeur (du plus fréquent au plus rare) :

- Adénocarcinome canalaire *in situ* ou infiltrant
- Adénocarcinome lobulaire *in situ* ou infiltrant
- Adénocarcinome tubulaire
- Carcinome mucineux ou colloïde muqueux
- Carcinome adénoïde cystique ou cylindrome
- Carcinome apocrine
- Carcinome médullaire
- Carcinome inflammatoire
- Maladie de Paget du mamelon

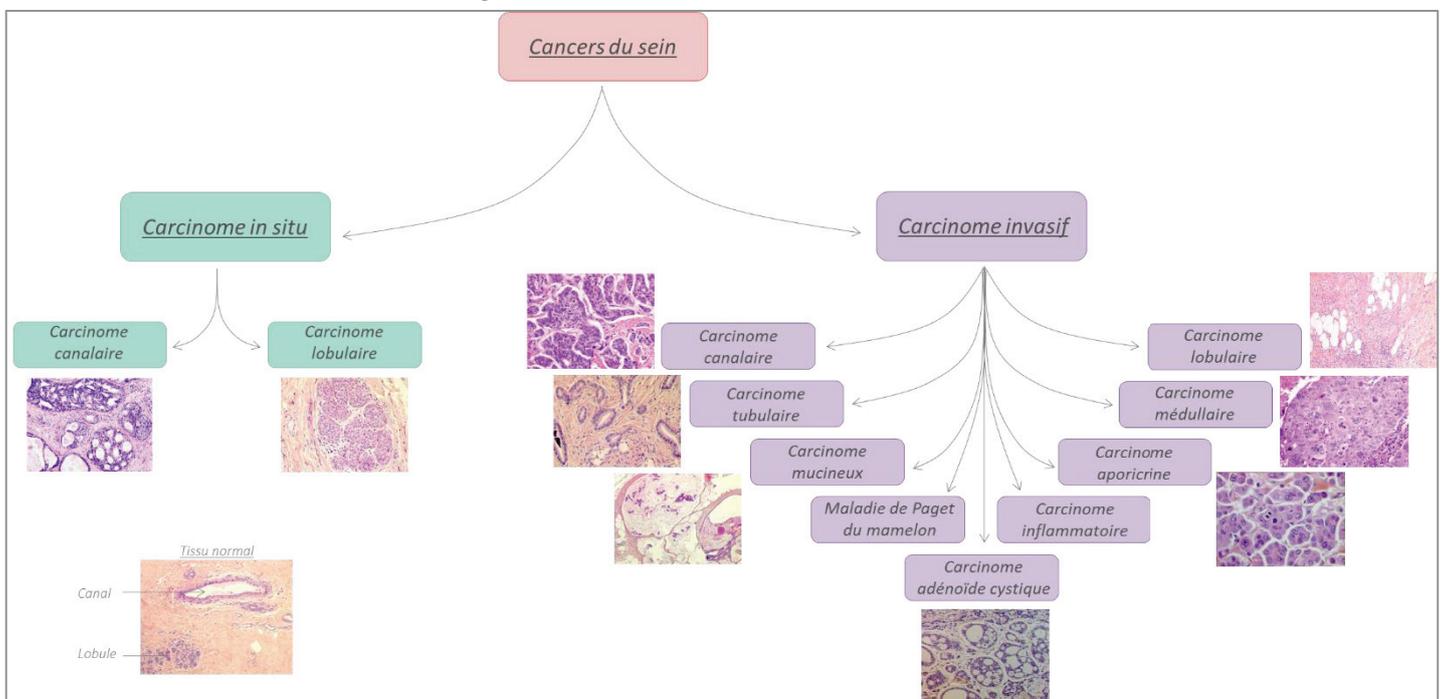


Figure 23: Classification histopathologique des cancers du sein et leurs marquages histologiques

Représentation schématique de la classification histopathologique des cancers du sein illustré par des coupes de tumeurs avec la coloration hématoxyline/éosine hormis pour la maladie de Paget du mamelon et les carcinomes inflammatoires qui sont souvent diagnostiqués par l'aspect extérieur du mamelon.

Le plus fréquent reste l'adénocarcinome canalaire. Parmi l'ensemble des cancers mammaires, 55% sont des carcinomes canaux invasifs, 13% des carcinomes canaux *in situ* et 5% des carcinomes lobulaires invasifs (Eheman et al. 2009; C. I. Li et al. 2003). L'adénocarcinome canalaire *in situ* (CCIS) représente 15 à 20 % de l'ensemble des cancers du sein. L'évolution de ces tumeurs en adénocarcinome infiltrant représente plus de 75 % des cancers du sein infiltrants. L'adénocarcinome canalaire apparaît très hétérogène d'une tumeur à l'autre et au sein d'une même lésion. Il est donc très difficile de le classer. Il est généralement constitué de cellules de grandes tailles et irrégulières entre elles, pourvues d'un cytoplasme plus abondant que les cellules normales. Ces cellules sont plus cohésives et peuvent donc créer diverses structures (tubes ou canaux). La maladie de Paget du mamelon (colonisation de l'épiderme du mamelon et des canaux lactifères par des cellules anormales dites « de Paget ») peut être à l'origine d'un adénocarcinome du sein et le plus souvent c'est un adénocarcinome canalaire *in situ* de haut grade.

Les Carcinomes lobulaires au stade *in situ* (CLIS) sont beaucoup plus rares (environ 0,5 % des carcinomes mammaires) car évoluant beaucoup plus vite en adénocarcinome infiltrant. La fréquence de survenue d'un cancer infiltrant est estimée entre 20 et 30 % (Makki 2015). Des données moléculaires concernant le gène de la E-cadhérine révèlent que des anomalies y sont retrouvées de façon précoce dans les stades *in situ*. Les mécanismes d'inactivation de l'E-cadhérine dans les cancers lobulaires peuvent être multiples (hyperméthylation, mutations somatiques, modifications post-traductionnelles...), mais il ne semble pas en tout cas que des mutations germinales soient en cause, en d'autres termes la E-cadhérine n'est pas un gène dont la mutation soit causale (Canas-Marques and Schnitt 2016; Esposito, Chivukula, and Dabbs 2007; Qureshi et al. 2006).

Le carcinome lobulaire infiltrant représente, quant à lui, 4 % à 15 %, des cancers infiltrants. Il est constitué de petites cellules généralement régulières et peu mitotiques, présentant une forte inclusion de mucus dans le cytoplasme. De nombreux sous-type le caractérisent et sont identifiés, selon l'aspect cytologique des cellules tumorales (histiocytoïde, à cellules indépendantes, pléomorphe, apocrine) et selon la disposition architecturale (tubulo-lobulaire, trabéculo-cordonnale, alvéolaire, solide). Les autres types de tumeurs, comme l'adénocarcinome tubuleux ou encore le carcinome médullaire, sont beaucoup plus rares. Le carcinome médullaire, par exemple, représente environ 1 à 5 % des cancers du sein. Il touche souvent des femmes d'âge plutôt jeune (inférieur à 50 ans) et est souvent retrouvé chez les patientes ayant une mutation de BRCA1 et sont plutôt de mauvais pronostic. Concernant l'adénocarcinome lobulaire, bien que celui-ci soit de meilleur pronostic que le type canalaire, ces sous-types peuvent faire varier ce pronostic si la tumeur est plutôt du type « tubulo-lobulaire » ou « pléomorphe » (ou « tumeur mixte », constitué de plusieurs types cellulaires) par exemple. Dans le cancer du sein, de manière surprenante, les types histologiques dits « rares » (carcinome tubulaire ou

## Introduction

mucineux) sont le plus souvent de meilleur pronostic que l'adénocarcinome canalaire par exemple. D'autres formes existent encore, comme le carcinome tubuleux, de bon pronostic, et essentiellement composé de petits tubes à une seule couche de cellules tumorales régulières ; le carcinome mucineux qui est une forme rare de cancer touchant la femme âgée comportent de larges plages de mucus extracellulaire dans lesquelles flottent des îlots de cellules malignes ; ou encore le carcinome adénoïde cystique ou cylindrome similaire à celui des glandes salivaires, est caractérisé par une prolifération biphasique de cellules basaloïdes (petites et rondes) et de cellules épithéliales. D'autres formes de carcinomes mammaires sont connues pour leur mauvais pronostic comme le carcinome inflammatoire, défini sur des critères cliniques (sein rouge, chaud, aspect de peau d'orange, évolutivité rapide de la tumeur) ou pathologiques comme la présence d'emboles lymphatiques (présence de cellules tumorales dans les vaisseaux lymphatique créant un bouchon).

### b. Les classifications moléculaires

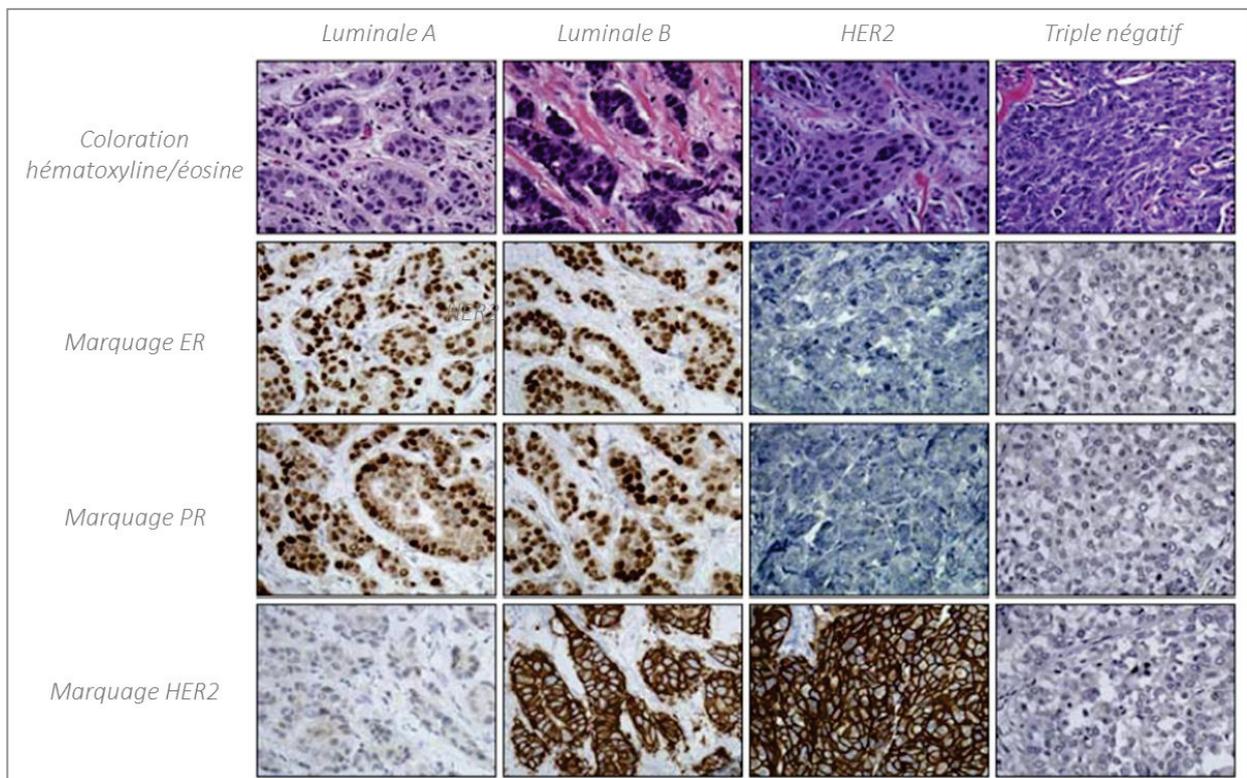
Comme pour beaucoup de cancers, les caractéristiques cliniques et histologiques sont apparues insuffisantes pour prédire efficacement la réponse aux traitements. Les progrès réalisés en biologie moléculaire ont permis d'apporter de nouveaux outils de diagnostic et de pronostic surtout, permettant une nouvelle classification des cancers du sein. Grâce aux nouvelles techniques d'analyses, utilisant en premier lieu l'immunomarquage puis dans un second temps, les puces à ADN (ou microarrays), plusieurs milliers de gènes et leur expression en ARN messagers et en protéines ont pu être analysés dans différentes tumeurs, permettant ainsi de créer de nouvelles classifications dépendantes de la signature et de l'expression génique et non de la morphologie de la tumeur. Ces différentes techniques ont permis d'identifier au moins 4 nouveaux types moléculaires de cancers du sein pouvant correspondre à des pronostics et des traitements différents. Plusieurs classifications ont vu alors le jour.

#### 1. La classification immunohistochimique

La classification immunohistochimique est l'une des premières classifications moléculaires. Elle est principalement basée sur l'immunomarquage des récepteurs hormonaux : le récepteur aux œstrogènes (ER) et le récepteur à la progestérone (PR) ; du récepteur HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 ou Erb-B2) ; de l'index de prolifération cellulaire (Ki67) et pour certains types tumoraux : les cytokératines et la E-cadhérine. En clinique, la présence ou l'absence de ces marqueurs au niveau protéique est caractérisée en routine par immunohistochimie (IHC) complétée par

hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) du gène codant pour HER2 amplifié dans environ 20% des cancer du sein (Gown 2008; Singh et al. 2016) (Figure 24). Ces marqueurs ont permis d'établir 4 catégories de cancer du sein :

- Les tumeurs Luminale A
- Les tumeurs Luminale B
- Les tumeurs HER2
- Les tumeurs Triple-négatives (TNBC)



**Figure 24: Classification des cancers du sein selon l'expression du récepteur à l'œstrogène (ER), du récepteur à la progestérone et de l'amplification du récepteur HER2**

D'après de l'article de Rivenbark et al, 2013

Les tumeurs appelées lumorales (A ou B) expriment des marqueurs très proches des cellules épithéliales de la lumière des canaux galactophores ou des lobules mammaires. Elles représentent 40 à 60% des tumeurs du sein. Leur profil protéique est caractérisé par l'expression des récepteurs hormonaux œstrogènes (ER) et à la progestérone (PR), et des cytokératines CK8+, CK18+ et CK19+. Le niveau d'expression du marqueur KI67 permet de différencier les sous types A et B. Ces tumeurs représentent les formes les plus fréquentes des cancers du sein avec près des deux tiers des cas. Dans plus de 10 % des cas, ces tumeurs sont associées à une mutation du gène de maintien du génome,

## Introduction

le gène *TP53*. Le sous-type luminal A est caractérisé par une expression des récepteurs hormonaux œstrogènes (ER+) et/ou à la progestérone (PR+), l'absence de surexpression de gène *HER2* et un taux de mutation *TP53* faible. Les tumeurs sont souvent de bas grade histologique et donc de bon pronostic. Le sous-type luminal B a la même caractéristique en ce qui concerne les récepteurs hormonaux (ER+ et/ou RP+) mais il est aussi caractérisé le plus souvent par une amplification du gène *HER2* +. Les tumeurs sont habituellement de haut grade histologique et donc de plus mauvais pronostic.

Le sous-type HER2, retrouvé dans 20 à 25% des cas, correspond à une amplification du gène *HER2*, identifié par la technique de FISH, sans expression des récepteurs hormonaux. Ces tumeurs sont plutôt considérées comme étant de grade élevé et possèdent des mutations de *TP53* dans plus des deux tiers des cas. Cependant, leur pronostic a été fortement amélioré ces dernières années par les thérapies ciblées. Le gène *HER2* est un oncogène situé sur le bras long du chromosome 17 (17q21). Ce gène code pour des protéines constitutives du récepteur à thyronine kinase (RTK) de la famille des récepteurs de facteurs de croissances épidermiques (ErbB). Lorsque HER2 est stimulé, il transmet un signal dans la cellule grâce à une cascade de réactions qui permet entre autres la prolifération cellulaire (voie des MAPKinases). Le récepteur de croissance HER2 est surexprimé chez environ un quart des patientes présentant un cancer du sein. La recherche d'une surexpression de HER2 est maintenant systématique chez toutes les femmes présentant un cancer du sein.

Enfin le sous type des cancers du sein triple-négatives (TNBC) constitue un sous-type caractérisé par son absence d'expression des récepteurs hormonaux et par l'absence d'amplification du gène *HER2* (ER-, PR-, HER2-). Ils sont considérés comme ceux, parmi tous les cancers du sein confondus, présentant le plus mauvais pronostic. Survenant dans 15 à 25% des cas et il est associé à une croissance rapide et des métastases précoces expliquant son mauvais pronostic par rapport aux autres sous-types de cancer du sein (Bauer et al. 2007; Blows et al. 2010)

## 2. Le PAM50

Dans les années 2000, Perou et collaborateurs ont identifié 5 sous-types intrinsèques de cancer du sein avec des implications cliniques à partir de données d'expression génique : Luminal A, Luminal B, HER2 enrichi, Basal-like et Normal-like (Perou et al. 2000; Sørlie et al. 2001). Ces différents sous-types permettent de classer les carcinomes du sein en fonction des variations des profils d'expression génique et de corrélérer les caractéristiques tumorales aux résultats cliniques. Ces sous-types de cancer du sein ont produit un impact pronostique supérieur aux facteurs d'immunohistochimie classique (IHC). Si les différentes caractéristiques clinico-histopathologiques permettent d'établir un pronostic,

néanmoins elles apportent des informations limitées sur la biologie de la maladie et ne permettent pas d'anticiper la réponse au traitement. Ainsi, l'hétérogénéité cellulaire et moléculaire des tumeurs du sein et le grand nombre de gènes potentiellement impliqués dans le contrôle de la croissance, de la mort et de la différenciation cellulaires soulignent l'importance d'étudier de multiples altérations génétiques et expressionnelles simultanément. De nombreuses études, notamment menées par Prat, Perou et leurs collaborateurs, ont permis de développer à partir des sous-types initiaux, une signature de 50 gènes permettant ainsi de créer la classification du PAM50 (Bastien et al. 2012; A. Prat et al. 2012; Aleix Prat et al. 2013, 2015; Aleix Prat, Guo, et al. 2010; Sweeney et al. 2014; Tamez-Peña et al. 2018). Initialement développé sur des données de puces transcriptomiques, le PAM50 a évolué grâce aux dernières améliorations technologiques telles que NanoString nCounter® (technologie permettant l'analyse de l'ARNm de plus de 800 gènes différents de manière simultanée sur un seul et même échantillon), qui est la base du test Prosigna®, utilisé aujourd'hui avec succès lors du diagnostic et de la classification tumorale. Le test Prosigna® permet la combinaison des critères du PAM50 avec les facteurs cliniques (comme par exemple la taille de la tumeur) et permet alors une meilleure prise en charge thérapeutique de la patiente en évaluant notamment le risque de rechute potentielle. Le séquençage de l'ARN ou ARN-seq est lui aussi devenu essentiel dans l'analyse de transcriptome. Il représente un outil primordial pour la découverte et la validation de biomarqueurs (Picornell et al. 2019).

Cette classification a permis de caractériser les 5 sous-types suivants (Figure 25) :

- Les tumeurs Luminale A (ER+ ; PR-(+) ; HER2 - ; Ki67 faible ; bas grade ; p53/PIK3CA/FOXA1 muté) : représentent 30 à 40% de l'ensemble des cancers du sein
- Les tumeurs Luminale B (ER+ ; PR+(-) ; HER2 -/+ ; Ki67 fort ; haut grade ; p53/PTEN/PIK3CA muté) : représentent 20 % de l'ensemble des cancers du sein
- Les tumeurs HER2 (ER- ; PR- ; HER2 + ; Ki67 fort ; haut grade ; p53/APOBEC/PIK3CA muté) : représentent 20 % à 25% de l'ensemble des cancers du sein
- Les tumeurs Basal-like (ER- ; PR- ; HER2 - ; Ki67 fort ; haut grade ; BRCA1/p53 muté) représentent 15 à 25 % de l'ensemble des cancers du sein
- Les tumeurs Normale-like (ER+/- ; PR+/- ; HER2 +/- ; Ki67 faible ; bas grade ; p53 muté) représentent moins de 5% de l'ensemble des cancers du sein

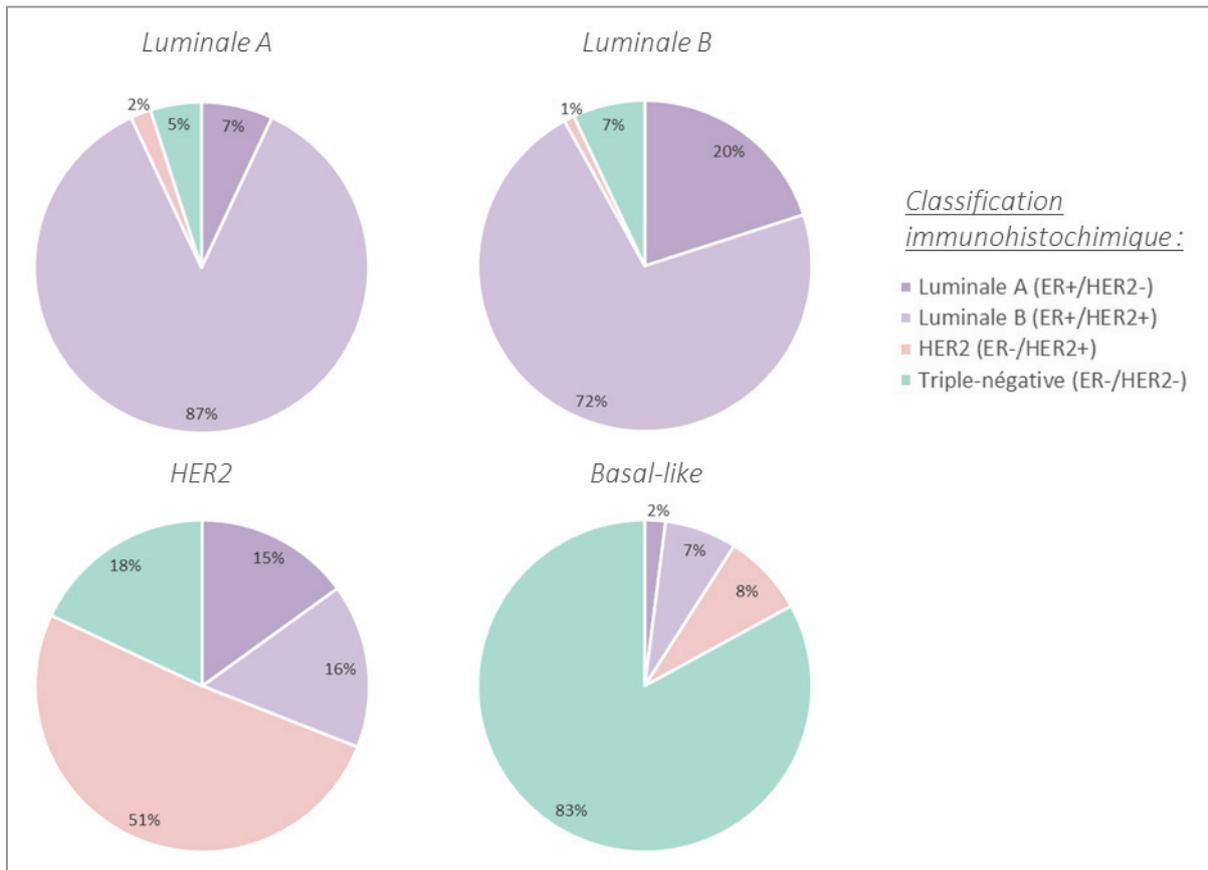


Figure 25 : Répartition des tumeurs immunohistochimiques selon la classification du PAM50

Inspiré de l'article de Prat et Perou, 2010

Parmi ces sous-types intrinsèques, le sous-type *basal-like* a été nouvellement caractérisé et se caractérise, entre autres, par l'expression unique des cytokératines généralement exprimées par la couche basale, un très faible niveau d'expression des gènes liés aux cellules luminales, aucun marqueur hormonal et est très agressif. Il serait donc l'équivalent du groupe histologique des tumeurs triple négatives. Cette observation a conduit à l'hypothèse d'une origine cellulaire différente des cancers du sein avec des tumeurs dérivées des différents lignages mammaires et provenant de différents stades de différenciation. Les tumeurs luminales A et B ainsi que les tumeurs HER2 proviennent de la transformation de cellules luminales plus ou moins différenciées. Enfin, le groupe normal-like fait encore débat car leur faible pourcentage et leurs caractéristiques particulières peuvent amener à penser à une contamination des tests par le stroma.

Bien que séduisante par sa simplicité, cette classification néglige la reprogrammation potentielle de populations initiée par un événement oncogénique ou par un signal du microenvironnement au cours du développement tumoral. De plus, il ne tient pas compte de la diversité intrinsèque de chaque

sous-type de cancer du sein, et ce notamment pour les tumeurs *basal-like* connues pour leur très grande hétérogénéité.

### 3. Les intclusters

En 2012, Curtis et collaborateurs proposent une nouvelle classification qui prend en compte les altérations du nombre de copie de gènes (CNA) des tumeurs du sein jusqu'ici non étudiées (Curtis et al. 2012). Cette analyse intégrant altérations génétiques et expressionnelles a été réalisée sur plus de 2000 tumeurs du cancer du sein, tout sous-type du PAM50 confondu, et a permis la mise en évidence de 10 clusters d'intégration (ou intclusters) (Figure 26). Ces résultats permettent de mieux appréhender l'impact des variations du nombre de copies des gènes sur leur expression dans les cancers du sein et révèlent alors une nouvelle stratification moléculaire.

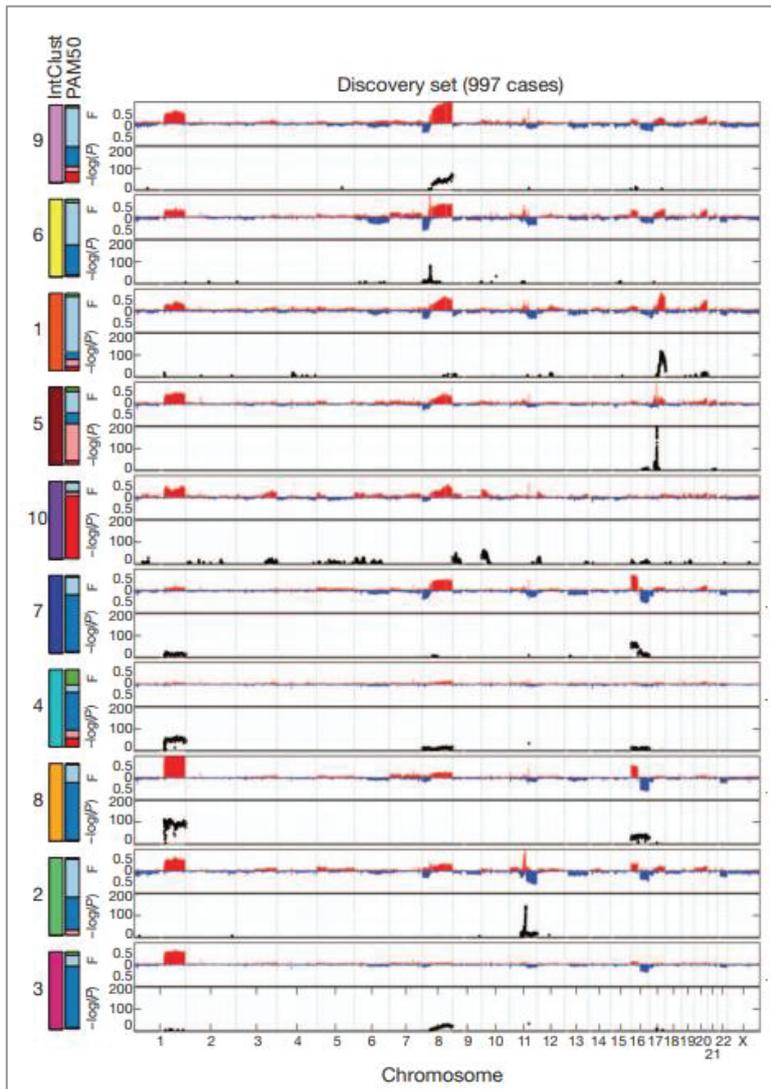


Figure 26: Représentation des 10 sous-types des clusters d'intégration (Intclusters) selon les profils d'altération du nombre de copie de gènes (CNA)

Les régions de gain de nombre de copies sont indiquées en rouge et les régions de perte en bleu dans le tracé de fréquence (tracé supérieur)

Figure issue de l'Article de Curtis et al, 2012

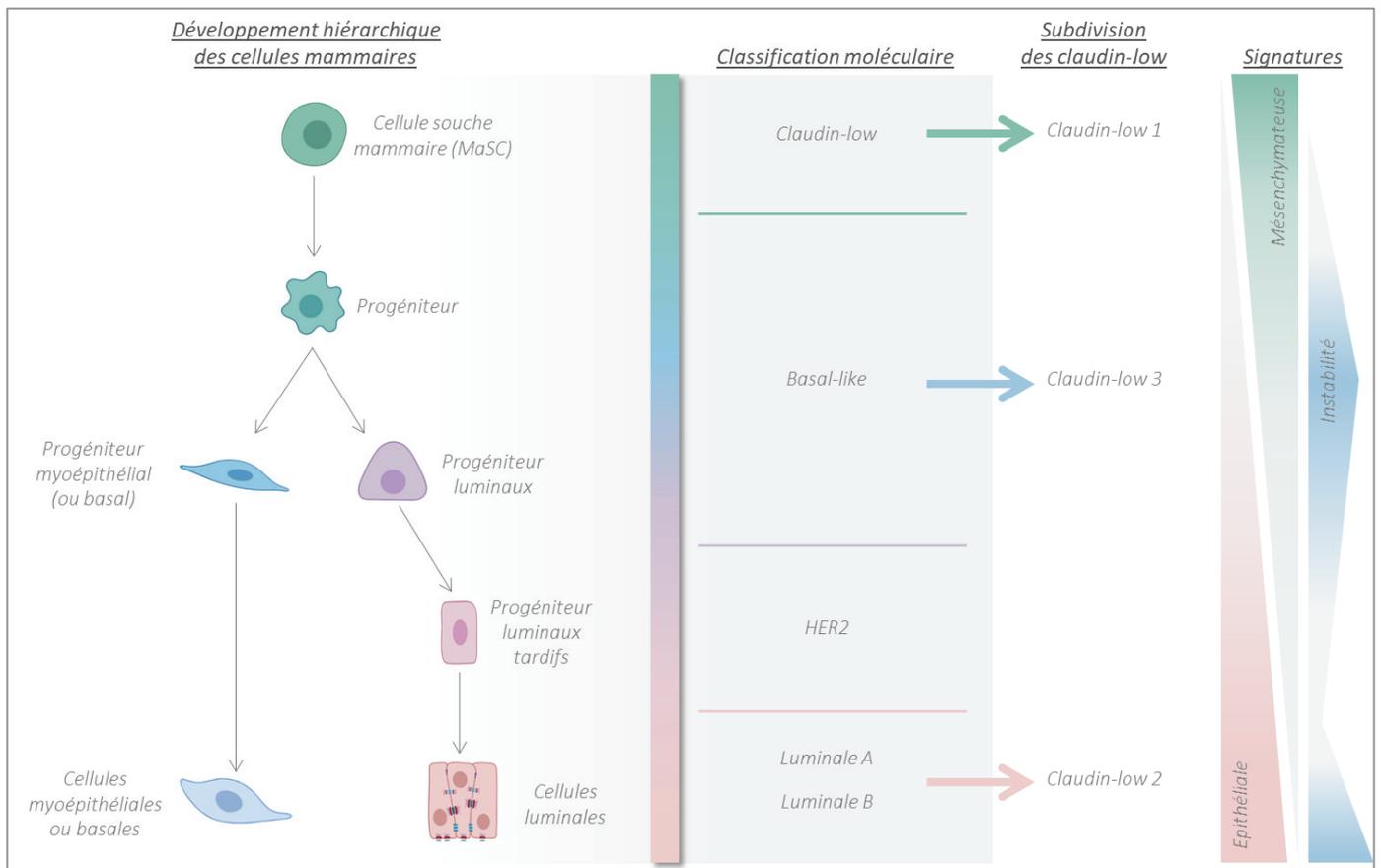
### 4. Les *claudin-low*

La très forte hétérogénéité tumorale des cancers du sein complexifie grandement la classification de ces tumeurs. Les techniques de séquençage haut débit, notamment whole genome et RNA-seq, ainsi que les profils de méthylome ont permis de découvrir un nouveau sous-type. Initialement découvert chez la souris (Herschkowitz et al. 2007), le sous-type « *claudin-low* » est l'un des seuls sous-types à être caractérisé entre autres par une expression élevée de facteurs de l'EMT telle que l'expression des EMT-TFs (Figure 27). Ces tumeurs ont des caractéristiques biologiques et cliniques très différentes des sous-types moléculaires jusqu'à présent décrits. La caractérisation moléculaire de ce sous-type, hormis sa faible teneur en protéines claudines, révèle que ces tumeurs agressives sont définies par la faible expression des composants clés des jonctions cellulaires, considérablement enrichies en marqueurs de cellules souches (Dias et al. 2017; Gupta et al. 2009; Mani et al. 2008; Prat and Perou 2011). Une étude immunohistochimique sur environ 500 tumeurs du sein a montré qu'une expression élevée de marqueurs mésenchymateux et une faible expression de CDH1 ont été trouvées presque exclusivement dans le type triple négatif des tumeurs (Sarrió et al. 2008). Le nombre de cellules souches mammaires (CD44+/CD24-) semble aussi considérablement augmenté dans ces tumeurs, tout comme la population CD49f+/Epcam- (Prat, Parker, et al. 2010). HIF1 $\alpha$  (facteur hypoxique induisant l'EMT) semble lui aussi fortement augmenté dans ces tumeurs. Les tumeurs *claudin-low* présentent une forte résistance à la chimiothérapie et l'évolution de ces tumeurs sont globalement de mauvais pronostic. Ce sous-type supplémentaire de cancers du sein ne représente que 5 à 10% de l'ensemble des cancers du sein (Perou 2011). Il montre plusieurs caractéristiques communes avec les tumeurs *basal-like* du PAM50. Les tumeurs *basal-like* et *claudin-low* forment donc la majorité des cancers du sein triple négatifs.

Dans son article de 2009, Prat et Perou avancent l'hypothèse que les *claudin-low* auraient pour origine des cellules souches telles que les MaSC précédemment décrites. Les tumeurs *basal-like* auraient elles pour origine des progéniteurs basaux, les tumeurs HER2 proviendraient des progéniteurs luminaux et enfin, les tumeurs luminales A et B auraient pour origine des cellules luminales différenciées (Perou 2011; Aleix Prat and Perou 2009).

Plus récemment, deux équipes, dont la nôtre, ont mis en évidence que bien que les tumeurs *claudin-low* soient généralement considérées comme issues des cellules les plus primitives du lignage mammaire, leur origine serait en fait plus diverse. En effet, notre équipe a montré que ce sous-type moléculaire des cancers du sein présente une grande diversité intrinsèque, comprenant trois sous-groupes principaux qui émergent de processus évolutifs différents. Des analyses bio-informatiques d'intégration de profils génétiques, de méthylation et d'expression des gènes révèlent que deux de ces

sous-groupes se rapportent, respectivement, aux cancers du sein luminaux et aux cancers du sein *basal-like* dans lesquels l'activation d'un processus EMT est survenue au cours de la progression tumorale. Ces deux groupes n'auraient donc pas pour origine les MaSC mais une cellule plus différenciée. L'acquisition de l'EMT dans ces 2 sous-types n'est pas à l'origine du développement tumoral mais permettrait plutôt sa progression. Toutefois, le troisième sous-groupe, quant à lui, dériverait de cellules souches mammaires (Fougner et al. 2020; Pommier et al. 2020). Ce sous-groupe de cancers du sein montre un faible niveau d'altération du génome et une faible fréquence de mutations *TP53*, soutenant la notion émergente selon laquelle les propriétés intrinsèques de la cellule d'origine constituent un déterminant majeur de l'histoire génétique de la tumorigenèse. Aujourd'hui, il est couramment admis l'utilisation de la classification du PAM50 en y intégrant le sous-type claudin-low.



**Figure 27 : Développement hiérarchique des cellules mammaires et le parallèle avec le développement des tumeurs mammaires**

Inspirée des articles de Prat et Perou, 2009 et Pommier et al, 2020

### 5. La classification de Lehmann

D'autres équipes se sont aussi intéressées à classer les cancers du sein et plus particulièrement le sous-type histologique des tumeurs triple négatives. En 2011, Lehmann et collaborateurs ont élaboré une nouvelle classification permettant le sous-typage des cancers du sein triple négatifs afin d'identifier des cibles thérapeutiques dans ce sous-type très hétérogène (cette classification est moins utilisée et reconnue que le PAM50).

Cette classification se base sur l'analyse des profils d'expressions géniques de différentes signatures de voies de signalisations et de mécanismes cellulaires (cycle cellulaire, réparation de l'ADN, EMT, métabolisme) sur le cancer du sein TNBC. Cette classification permet aussi de prendre en compte l'environnement immunitaire de la tumeur et la prédiction thérapeutique la plus efficace sur chaque sous-type. Cette analyse a permis d'identifier 6 sous-types de TNBC affichant des profils d'expression génique uniques :

- Les tumeurs *basal-like* de type 1 (BL1)
- Les tumeurs *basal-like* de type 2 (BL2)
- Les tumeurs immunomodulatrices (IM),
- Les tumeurs mésenchymateuses (M),
- Les tumeurs mésenchymateuse-like (MSL)
- Les tumeurs luminales à récepteurs aux androgènes (LAR)

Les sous-types BL1 et BL2 ont une expression plus élevée des facteurs du cycle cellulaire et des gènes de réponse aux dommages à l'ADN, et les lignées cellulaires représentatives de ce sous-type répondent préférentiellement au traitement par la cisplatine. Les sous-types M et MSL ont été enrichis en expression génique de la transition épithéliale-mésenchymateuse, et les voies de signalisation des facteurs de croissance. Ces sous-types semblent plus sensibles au NVP-BE235 (un inhibiteur PI3K / mTOR) et au dasatinib (un inhibiteur abl / src). Le sous-type LAR, quant à lui a été caractérisé par la signalisation des récepteurs aux androgènes (AR). Les lignées cellulaires LAR sont donc particulièrement sensibles au bicalutamide (un antagoniste AR). Ces données peuvent être utiles dans la sélection de biomarqueurs, dans la découverte de médicaments et la conception d'essais cliniques qui permettront d'orienter les patients TNBC sur les thérapies ciblées appropriées (Coussy et al. 2019; B. D. Lehmann et al. 2011; B. D. Lehmann and Pietenpol 2014; Nicholas C. Turner and Reis-Filho 2013).

### 6. Le phénotype BRCAness

Les mutations génétiques peuvent conduire à un risque important d'apparition de certains types de cancer. Les mutations génétiques héréditaires transmises d'un parent à un enfant sont rare dans les cancers du sein (environ 5 à 10 %) et ils sont le plus souvent attribuables à une mutation génétique héréditaire du gène nommé BRCA1 (breast cancer susceptibility 1) ou du gène BRCA2 (breast cancer susceptibility 2) (Breast Cancer Linkage Consortium 1997; Lakhani et al. 1998). BRCA1 et BRCA2 sont normalement présents dans le corps. On les appelle gènes suppresseurs de tumeurs parce qu'ils semblent jouer un rôle dans le contrôle de la croissance des cellules cancéreuses. BRCA1 et BRCA2 jouent aussi un rôle important dans la réparation de cassures double brins de l'ADN, dans un processus appelé recombinaison homologue (HR), contribuant au maintien de la stabilité et à l'intégrité de l'ADN. L'une des premières informations concernant ces cancers mutés pour BRCA1 est leur appartenance majoritaire au groupe des cancers triple-négatifs, en effet parmi les patientes atteintes d'un cancer du sein avec une mutation héréditaire BRCA1, plus de 80% sont des TNBC (Lakhani et al. 2002) (Figure 28). Une grande proportion de ces tumeurs de type BRCA1 ont soit une mutation BRCA1 pour les formes héréditaires, soit une méthylation du promoteur BRCA1 somatique (Lips et al. 2011, 2013). La mutation de BRCA2, beaucoup moins fréquente, est aussi retrouvée dans les tumeurs du sein héréditaires et sporadiques. Comme les tumeurs du sein triples négatives sporadiques présentent souvent les mêmes caractéristiques histologiques et résultats cliniques que les porteurs de mutation germinale BRCA1, plusieurs études ont postulé que l'inactivation de BRCA1 pourrait jouer un rôle majeur dans la progression tumorale des TNBC sporadiques (Joosse et al. 2009, 2011; Silver et al. 2010; N. C. Turner et al. 2007). Les caractéristiques cliniques et moléculaires partagées avec le cancer familial-BRCA définissent un sous-groupe de tumeurs sporadiques appelé BRCAness (N. Turner, Tutt, and Ashworth 2004). En 2016, Christopher J. Lord et Alan Ashworth ont répertorié tous les gènes pouvant mimer le phénotype BRCAness (Lord and Ashworth 2016) (Tableau 2).

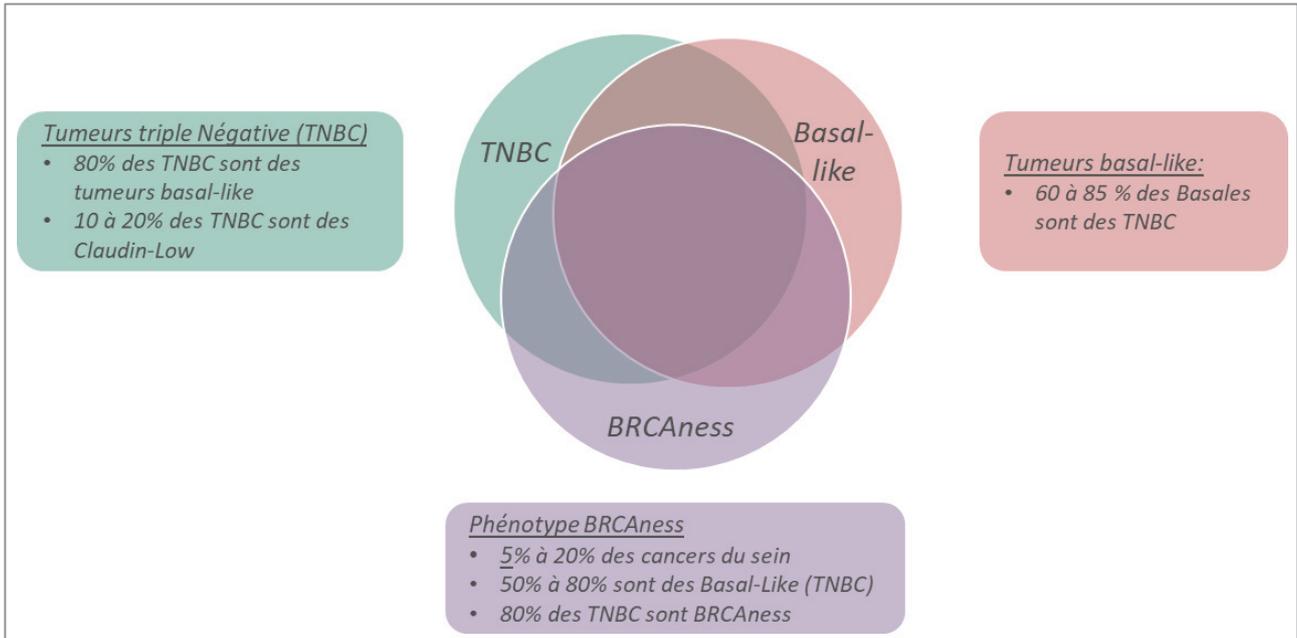


Figure 28 : Liens entre les tumeurs TNBC, les tumeurs basal-like et le phénotype BRCAness

L'importance de classer les tumeurs réside notamment dans la gestion clinique de celles-ci et les tumeurs BRCAness sporadiques pourraient bénéficier du même traitement réservé aujourd'hui aux formes familiales BRCA1/2 (Lips et al. 2013). En effet, l'ensemble de ces protéines (Tableau 2) interviennent directement ou indirectement dans la voie HR. La déficience en l'une de ces protéines entraîne une inactivation complète de la voie. Les dommages à l'ADN créés par des événements extérieurs ou par un stress interne (oncogénique, oxydatif ou métabolique) ne sont pas réparés de manière fidèle créant ainsi une instabilité génomique induisant un cancer. Ces cellules utilisent un mécanisme alternatif peu fidèle pour réparer ces dommages, appelé voie alternative de jonction des extrémités dépendante de *POLQ* (Alt-EJ ou TMEJ ; cf chapitre III page 112), conduisant à une instabilité génomique (Ceccaldi et al. 2015; Dai et al. 2016; N. Turner, Tutt, and Ashworth 2004). Ainsi, les tumeurs mutantes BRCA1 présentent de nombreuses aberrations du nombre de copies (CNA). Le profil CGH-array des cancers de type BRCA2 est caractérisé par une fréquence plus importante des aberrations génomiques que ceux mutés pour BRCA1 (Jooisse et al. 2009). Le phénotype BRCAness n'est donc pas définit comme un sous-type mais il permet d'identifier des tumeurs qui pourraient s'avérer sensibles aux inhibiteurs de l'enzyme PARP1 (poly(ADP-ribose) polymérase 1) protéine clé de la voie TMEJ (cf chapitre III page 112). En effet, il a été démontré que les porteuses de mutations BRCA1 et BRCA2 ont une sensibilité élevée aux agents alkylants et plus récemment à la nouvelle classe d'inhibiteurs de PARP1 (Fong et al. 2009; Kriege et al. 2009; M. Vollebergh et al. 2009; M. A. Vollebergh

## Chapitre II : Les cancers du sein

et al. 2011). Alors que ces mêmes tumeurs ne sont pas sensibles aux poisons du fuseau mitotique, tels que les taxanes (Kriege et al. 2012). Malgré une meilleure prise en charge thérapeutique depuis quelques années, les tumeurs BRCAness restent de mauvais pronostic (Tanino et al. 2016). L'intégration de toutes ces signatures mutationnelles, expressionnelles et leurs profils d'altérations génomiques révèle ainsi une proportion plus élevée de patientes atteintes d'un cancer du sein présentant un phénotype ressemblant à une déficience en BRCA1/2 (jusqu'à 22%) que ce qui était jusqu'à présent apprécié (~ 1 à 5%) et qui pourrait présenter une forte sensibilité thérapeutique à l'inhibition de PARP1 (H. Davies et al. 2017).

Tableau 2 : Gènes possiblement impliqués dans le phénotype BRCAness

(D'après par l'article de Lord and Ashworth, 2016)

<u>Gènes</u>	<u>Mutations, délétions, hyperméthylation du promoteur, etc.</u>	<u>Voies d'actions</u>	<u>Cancers et pathologies</u>
ATM	Mutations	Signalisation des dommages à l'ADN; cycle cellulaire	De nombreux cancers et pathologies dont le cancer du sein, du poumons, du pancréas, etc.
ATR	Mutations	Signalisation des dommages à l'ADN; cycle cellulaire	De nombreux cancers et pathologies dont le cancer du sein, de l'utérus, du colon, etc.
BAP1	Mutations	Ubiquitine régulant BRCA1 (entre autres)	Cancers du foie et mélanome
BLM	Mutations	Voies de réparations (HR et FA)	Syndrome de Bloom
BRCA1	Mutations, hyperméthylation du promoteur	Voies de réparations (HR et FA)	De nombreux cancers et pathologies dont le cancer du sein, de l'ovaire, de la prostate, du pancréas, etc.
BRCA2	Mutations, hyperméthylation du promoteur	Voies de réparations (HR et FA)	De nombreux cancers et pathologies dont le cancer du sein, du poumons, du pancréas, etc.
BRIP1	Mutations	Voies de réparations (HR et FA)	Cancers de l'ovaire
CDK12	Mutations	cycle cellulaire	Cancers de l'ovaire et cancers gastriques
CHEK1	Mutations	cycle cellulaire	Cancers du pancréas et sarcomes
CHEK2	Mutations	cycle cellulaire	Cancers du sein, de l'ovaire et de l'utérus
FANCA	Mutations, délétions	Voies de réparations (FA)	Leucémies, cancers des ovaires et des poumons
FANCC	Mutations, délétions	Voies de réparations (HR et FA)	leucémies
FANCD2	Mutations, délétions	Voies de réparations (HR et FA)	leucémies
FANCE	Mutations, délétions	Voies de réparations (FA)	leucémies
FANCF	Mutations, délétions	Voies de réparations (FA)	leucémies
MRE11A	Mutations	Voies de réparations (résection et HR)	Cancer du colon
NBS1	Mutations	Voies de réparations (résection et HR)	Cancers gastriques et de l'utérus
PALB2	Mutations	Voies de réparations (résection et HR)	Cancers gastriques et des ovaires
RAD51B	Mutations	Voies de réparations (résection et HR)	Cancers des ovaires
RAD51C	Mutations	Voies de réparations (résection et HR)	Cancers des ovaires et du sein
RAD51D	Mutations	Voies de réparations (résection et HR)	Cancers des ovaires et du sein
WRN	Mutations	Voies de réparations (HR)	Syndrome de Werner, cancers des ovaires, des poumons, etc.

## II. Traitements

Il est devenu évident que le cancer du sein n'est pas une maladie unique, mais qu'il représente en fait plusieurs types de maladies, chacune nécessitant un traitement spécifique. La mise en œuvre de programmes de dépistage et prévention ainsi que de nouvelles stratégies de traitement réduit la mortalité par cancer du sein (Jemal et al. 2009). Cependant, chaque année les cancers de sein font plus de 12 000 décès en France (INCa 2013a, 2014, 2019). Une des explications possibles à ce taux de mortalité encore élevé est qu'il manque encore une image suffisamment complète de l'hétérogénéité biologique de ces cancers en ce qui concerne les altérations moléculaires, et surtout la sensibilité aux traitements. Les traitements sont actuellement prescrits en fonction des principaux paramètres cliniques (âge, statut ganglionnaire, taille de la tumeur, grade histologique), et de la classification histopathologique et immunohistochimique (récepteur des œstrogènes, récepteur de la progestérone et HER2). La découverte de traitements ciblés et personnalisés a grandement amélioré la prise en charge des cancers du sein, et la mortalité a fortement diminué ces 15 dernières années. Néanmoins, il reste des formes de cancer du sein en échec thérapeutique, comme les cancers du sein de type « triple-négatif » dont l'hétérogénéité complique la prise en charge et le développement d'une thérapie ciblée unique et efficace.

Le traitement du cancer du sein repose sur une stratégie associant plusieurs traitements :

- La chirurgie
- La chimiothérapie
- La radiothérapie
- L'hormonothérapie
- Thérapies ciblées

La proposition de traitements est établie par des médecins d'au moins trois spécialités différentes (chirurgien, oncologue médical, oncologue radiothérapeute, pathologiste...) dans le cadre d'une réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP). Dans les cas les plus compliqués ou en seconde ligne, il peut également être proposé de participer à un essai clinique. Selon les cas, les traitements peuvent avoir différents objectifs :

- Supprimer la tumeur ou les métastases ;
- Réduire le risque de récurrence ;
- Ralentir le développement de la tumeur ou des métastases ;

## Chapitre II : Les cancers du sein

- Améliorer le confort et la qualité de vie de la personne malade, en traitant symptômes engendrés par la maladie.

Il arrive parfois qu'un seul type de traitement soit nécessaire. Mais dans d'autres cas, une combinaison de traitements peut être utilisée pour mieux maîtriser la maladie.

### a. Les traitements conventionnels

#### 1. La chirurgie

Le traitement chirurgical du cancer du sein repose généralement sur l'exérèse de la tumeur et sur l'ablation des ganglions lymphatiques du creux axillaire (creux de l'aisselle). La chirurgie peut être conservatrice (ablation de la tumeur avec la conservation du sein) ou radicale (ablation du sein tout entier ou mastectomie). Une chirurgie reconstructrice du sein peut être effectuée dans le même temps opératoire ou après la fin des autres traitements.

#### 2. La radiothérapie

La radiothérapie permet de réduire le risque de récurrence locale d'un cancer du sein. Elle est systématique en cas de traitement chirurgical conservateur afin de réduire le risque de récurrence dans le sein traité. En cas d'un traitement radical, son indication dépend de la taille initiale de la tumeur. Elle peut être néo-adjuvante (réalisée avant la chirurgie), si la masse tumorale est très importante. Elle vise alors à réduire le risque de récurrence au niveau de la paroi thoracique. L'irradiation complémentaire des chaînes ganglionnaires est aussi possible et dépend du siège de la tumeur et de son extension ganglionnaire. La radiothérapie engendre des dommages à l'ADN par deux types d'actions, une action directe sur l'ADN et une action indirecte par l'augmentation du stress oncogénique. En une fraction de seconde, les cellules subissent des altérations atomiques et moléculaires engendrées par le passage des rayonnements ionisants. Pour une dose de 1 Gy délivrée à une cellule, on considère avoir induit :

- De 1 000 à 2 000 lésions de bases ;
- Environ 200 pontages ;
- De 500 à 1 000 lésions simple brin ;
- Environ 40 lésions double brins.

## Introduction

De manière indirecte, la radiothérapie induit des réactions chimiques, comme la coupure des molécules d'eau qui aboutissent à la création de radicaux libres, qui vont ensuite interagir avec les autres molécules. L'action sur les cellules est alors indirecte, *via* les radicaux libres dont la cible principale est l'ADN. La majorité des lésions surviendraient *via* ces mécanismes (INCa 2008, 2013b).

### 3. La chimiothérapie

La chimiothérapie agit sur les mécanismes de division cellulaire, bloque le métabolisme cellulaire ou la réparation de l'ADN et conduit ainsi les cellules à la mort cellulaire à l'origine de la régression tumorale ou à la sénescence qui limite le développement tumoral. Elle touche toutes les cellules indépendamment de leurs caractéristiques tumorales. La chimiothérapie peut être adjuvante (réalisée après la chirurgie) ou néo adjuvante (réalisée avant la chirurgie). Elle est généralement administrée par voie intraveineuse ou *per os*. Les agents de chimiothérapie prescrits de façon standard pour les cancers du sein sont les suivants (APHP 2016; INCa 2013b; Institut Gustave Roussy et Institut Curie 2019):

- Les anthracyclines comme la Doxorubicine (abrégié par les médecins par la lettre A) et l'épirubicine (E), sont des agents intercalants de l'ADN et inhibiteurs de l'ADN topoisomérase II, qui génèrent des cassures simple- et double-brins dans l'ADN induisant à terme la mort cellulaire ;
- Les taxanes, comme le paclitaxel et docetaxel, sont des poisons du fuseau mitotique. Ils inhibent la dépolymérisation des microtubules, bloquant le mécanisme de la mitose ;
- Les sels de platines, comme le cisplatine, carboplatine ou l'oxaliplatine, et le cyclophosphamide sont des agents alkylants de l'ADN qui se fixent sélectivement sur les bases puriques de l'ADN (A ou G) et induisent un changement de la conformation locale de la double hélice de l'ADN pouvant conduire à des cassures simple et double-brins de l'ADN, inhibant la réplication et induisant la mort cellulaire ;
- La gemcitabine (G) est un antimétabolite pyrimidique qui s'incorpore dans l'ADN en mimant la cytidine et inhibe la synthèse nucléotidique ce qui entraîne un blocage en phase S du cycle cellulaire ;
- Le 5-fluoro-uracile, appelé aussi 5-FU, (F) : est un agent intercalant de l'ARN et bloque la synthèse de thymidine en agissant sur l'enzyme de synthèse la thymidylate synthase.
- Le méthotrexate (M) bloque la voie des folates impliquée notamment dans la synthèse des bases nucléiques, purines et pyrimidines.

Dans la majorité des cancers du sein invasifs, des agents des familles des anthracyclines et des taxanes sont prescrits aux patientes. Dans la plupart des cas, la chimiothérapie utilisée est la combinaison de plusieurs agents. À titre d'exemple, le protocole FEC associe le 5-FU (F), l'épirubicine (E) et le cyclophosphamide (C). Mais le choix du protocole dépend de la nature de la tumeur ([APHP 2016](#); [INCa 2013b](#); [Institut Gustave Roussy et Institut Curie 2019](#)).

En première ligne, les patientes avec un cancer de type luminale A ou B sont traitées par une combinaison de taxanes et d'anthracyclines (EC ou AC) en combinaison avec le docetaxel.

Avant l'avènement des thérapies ciblées, les cancers du sein avec amplification de HER2 étaient traités plus efficacement par une chimiothérapie qui comportait des médicaments de type anthracycline, comme la doxorubicine ou l'épirubicine que par les associations de chimiothérapies qui ne contiennent pas ce type de médicament.

Les sels de platines sont eux plus souvent utilisés pour les cancers triple-négatifs en combinaison avec les taxanes et/ou les anthracyclines (EC ou AC puis dans un second temps : paclitaxel avec carboplatine par exemple).

### **b. Les thérapies ciblées**

#### *1. L'hormonothérapie*

L'hormonothérapie est un traitement « anti-hormonal » utilisant des anti-oestrogènes ou des inhibiteurs de l'aromatase. Elle est administrée dans le traitement des tumeurs lumineales. Ce type de tumeurs est donc de bon pronostic, notamment car le récepteur aux œstrogènes peut être ciblé à l'aide de traitements antagonistes tels que le Tamoxifène ([C. Davies et al. 2013](#); [Jordan 2015b, 2015a](#)). Il se lie aux récepteurs cytosoliques des œstrogènes dans les cellules tumorales, empêchant ainsi le 17 bêta-œstradiol, sous-produit des œstrogènes, de s'y fixer. Le Tamoxifène est prescrit aux femmes non ménopausées. Comme la chimiothérapie, elle peut être adjuvante ou néo adjuvante.

Les anti-aromatases (inhibiteurs non stéroïdiens des aromatasases : anastrozole, exemestane ou létrozole) font eux aussi parti de l'hormonothérapie ([Baselga et al. 2012](#)). Ce sont des inhibiteurs d'aromatase qui entrent en compétition directe avec celle-ci. L'aromatase est une enzyme qui permet à l'organisme de continuer à produire des œstrogènes par transformation des androgènes chez la femme ménopausée. En effet, entre la puberté et la ménopause, les œstrogènes sont produits en grande partie par les ovaires. Après la ménopause, les ovaires cessent de produire de l'œstrogène, mais l'organisme continue à en fabriquer une petite quantité par le biais des androgènes. Ce

traitement est donc conseillé uniquement aux patientes en postménopause. Les anti-aromatases sont utilisés autant en première comme en deuxième intention dans les cancers du sein invasif possédant des récepteurs hormonaux.

### 2. Les anticorps anti-HER2

Historiquement, les tumeurs présentant une amplification de HER2, qui représente de 15 à 25% des patientes atteintes de cancer du sein, étaient de mauvais pronostic. Cependant, les nouvelles thérapies ciblant spécifiquement la signalisation de ce récepteur ont permis une amélioration significative du pronostic pour ce type de cancer (I. Smith et al. 2007). Les cancers du sein avec amplification du gène HER2 peuvent donc être soignés avec un médicament appelé Herceptin ou Trastuzumab. Il s'agit d'un anticorps monoclonal humanisé spécifique qui bloque la protéine HER2 et prive donc les cellules cancéreuses d'un facteur stimulant leur croissance. L'Herceptin est souvent donné en combinaison avec la chimiothérapie. De nombreuses études se sont succédées ces dernières années afin de trouver de nouvelles combinaisons thérapeutiques dans les traitements des tumeurs HER2 positives. Parmi elles, de nombreux essais ont été réalisés avec un second inhibiteur de protéines kinases, dont le HER2, le lapatinib. En bloquant ces récepteurs, le lapatinib contribue à limiter la division et le développement des cellules cancéreuses. Le lapatinib est utilisé pour certains cancers du sein métastatiques HER2 positifs. En combinaison avec le Trastuzumab, l'action de ce dernier est considérablement augmentée pour certains types tumoraux hormonaux dépendant (Johnston et al. 2018).

### 3. Les inhibiteurs des PARPs

Le traitement standard des cancers du sein triple négatifs est majoritairement une chimiothérapie conventionnelle, qui est malheureusement très peu efficace. Outre la chimiothérapie, les patientes ont très peu d'options impliquant des traitements ciblés (Linn and Van 't Veer 2009). La découverte des nouveaux sous-types des classifications moléculaires comme les tumeurs mutées pour les gènes *BRCA1/2* et les *BRCAness* ont permis d'ouvrir la voie à de nouvelles thérapies. Comme cité précédemment, *BRCA1/2* sont des gènes impliqués dans la réparation fidèle de l'ADN par la voie HR. Leur mutation ou inactivation engendre donc une mauvaise réparation des dommages par l'utilisation de voies parallèles moins fidèles. L'une de ces voies, appelé TMEJ, nécessite plusieurs protéines dont PARP1. La poly(ADP-ribose) polymérase 1 (PARP1) est une enzyme de liaison à l'ADN qui est activée par des cassures d'ADN, les convertissant en un signal intracellulaire *via* la poly(ADP-ribosyl)ation, ou

PARYlation de plusieurs protéines nucléaires dont elle-même. Les polymères chargés négativement d'ADP-ribose attachés à PARP1 elle-même et aux histones conduisent à la relaxation de la chromatine, facilitant l'accès aux protéines de réparation de l'excision de base (BER) ou des cassures double-brins (TMEJ) et activant ces enzymes de réparation.

L'utilisation d'un inhibiteur de PARP1 (PARPi) empêchent les cellules BRCAness de réparer ses dommages à l'ADN, induisant à terme leur mort. Aujourd'hui, cet inhibiteur est utilisé uniquement dans le traitement des tumeurs triple-négatives *BRCA1* ou *BRCA2* mutées, qui représentent 80% des triple-négatives dont majoritairement les *basal-likes*. En 2018, deux traitements ont été validés par la FDA (Food and Drug Administration, organisme responsable de l'autorisation de la commercialisation des médicaments sur le territoire des États-Unis ; équivalent de AFSSAPS, Agence Française de Sécurité Sanitaires des Produits de Santé ou de l'AEM, Agence européenne des médicaments). Le premier est l'olaparib, qui se lie au site actif de PARP1 associé à l'ADN en empêchant sa dissociation de PARP1 de l'ADN, bloquant ainsi le processus de réparation. Le deuxième est le talazoparib, dont l'activité est très similaire à celui de l'olaparib. Tout comme celui-ci, la molécule entraîne l'inhibition de l'activité catalytique de PARP1 et la non-dissociation de PARP1 à l'ADN. Le talazoparib s'avère environ 100 fois plus efficace dans la non-dissociation de PARP1 associés à l'ADN que l'olaparib (Shen, Aoyagi-scharber, and Wang 2015). Cependant, cette différence d'activité n'est pas forcément synonyme d'efficacité thérapeutique accrue car de nombreux autres facteurs doivent être pris en considération. Lors de l'essai clinique OlympiAD, il a été montré que la survie sans progression est plus longue après traitement à l'olaparib (7,0 mois contre 4,2 mois) qu'avec la chimiothérapie conventionnelle (M. Robson et al. 2017; M. E. Robson et al. 2019). Concernant le talazoparib et son essai clinique EMBRACA, la survie sans progression est elle aussi plus longue après traitement (8.6 mois contre 5.6 mois) qu'avec la chimiothérapie conventionnelle (Litton et al. 2018).

Ce traitement en monothérapie semble être prometteur. De nombreuses études sont en cours de réalisation pour trouver la meilleure combinaison de thérapie pour les patients BRCAness.

#### 4. Les autres thérapies ciblées

##### *Le bévacicumab*

Parmi elles, on retrouve le bévacicumab qui comme l'Herceptin, fait partie de la famille des anticorps monoclonaux. Il a été conçu pour interagir avec le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF). En se liant au VEGF, le bévacicumab inhibe la néo-angiogénèse et par conséquent, les cellules cancéreuses sont privées d'oxygène et de nutriments, ce qui favorise le ralentissement de la croissance des tumeurs. Le bévacicumab est utilisé pour certains cancers du sein métastatiques

## Introduction

triple-négatifs, en association avec des médicaments de chimiothérapie. Dans l'essai clinique RIBBON-2, la survie sans progression augmente sensiblement (de 2.7 mois à 6.0 mois) (Brufsky et al. 2012).

### L'évérolimus

L'évérolimus appartient lui aussi aux inhibiteurs de protéines kinases. Dérivé de la Rapamycin, l'évérolimus agit en inhibant l'activité de mTOR et bloque les mécanismes de prolifération et de division cellulaire en inhibant notamment la traduction. Ce traitement est spécifique des cancers du sein hormonaux-dépendants post ménopausiques en complément des traitements plus conventionnels des anti-aromatases (Baselga et al. 2012). De nombreuses études ont testé la combinaison de différents agents de chimiothérapies ou d'inhibiteurs, tels que les anti-aromatases, avec l'évérolimus dans le traitement des tumeurs triple-négatives notamment les *basal-likes*, mais malheureusement sans grand succès jusqu'à présent.

### L'immunothérapie

Depuis 5 ans l'immunothérapie connaît un essor considérable en oncologie. Les principales molécules d'immunothérapie développées depuis 5 ans ciblent les points de contrôle immunitaires (ICI, immune checkpoint inhibitors). Ces anticorps thérapeutiques ciblent des co-signaux inhibiteurs entre cellules tumorales ou cellules présentatrices d'antigènes (ligands) et lymphocytes T (récepteurs), réactivant ainsi une immunité CD8 anti-tumorale. Les anti-PD1 (anti-récepteur) et les anti-PDL1 (anti-ligand) ont permis des avancées majeures dans le traitement des mélanomes notamment (Eggermont et al. 2018; Larkin et al. 2019; Schadendorf et al. 2015).

Dans le cancer du sein, l'utilisation de l'atézolizumab (un anti PD-L1), en combinaison avec le paclitaxel, a été approuvée par la FDA dans le traitement d'un cancer du sein triple négatif localement avancé ou métastatique qui ne peut pas être traité chirurgicalement et dont les tumeurs sont positives pour l'expression de PD-L1 (Schmid et al. 2018). La survie sans progression de ces patients passe de 5.0 mois à 7.5 mois. Il est donc important d'identifier à la fois le statut d'expression de PD-L1 et de PD1 des tumeurs pour éclairer le choix du traitement. En effet, le traitement atézolizumab en combinaison avec le paclitaxel n'apporte aucun bénéfice aux tumeurs triple-négatives métastatiques non infiltrées par des CD8 même si celles-ci expriment un taux élevé de PDL1 (Schmid et al. 2020). Cependant, l'évaluation de l'expression de PD-L1 semble difficile dans les cancers du sein. Une étude sur plus de 650 tumeurs tout sous-type et stade confondu, montre que PD-L1 est exprimé dans 23% des cancers du sein (Muenst et al. 2014). Mais dans une autre étude sur plus de 4000 tumeurs, l'expression de PD-L1 représentent seulement 6% des cancers du sein tout type confondu et moins de 1% par les cellules tumorales elle-même (Ali et al. 2015). Néanmoins, cette population paraît plus riche dans les cancers du type *basal-like* et HER2.

c. Conclusion

La diversité des tumeurs mammaires complexifie grandement le choix et la pertinence des traitements. Bien que la majorité des tumeurs du sein soient correctement prises en charge, l'hétérogénéité des tumeurs triple-négatives et l'absence de traitement ciblé rend leurs traitements difficiles, ceci expliquant leur mauvais pronostic.

## Chapitre III : Dommages à l'ADN et la réparation des cassures double-brin

Nos cellules sont constamment soumises à de nombreux stress internes ou externes responsables de dommages pouvant perturber l'intégrité de la cellule elle-même et de ses divers composants. Cependant, nos cellules résistent et arrivent à en limiter l'impact. Au cours de l'évolution, de nombreux mécanismes performants ont été sélectionnés pour maintenir l'intégrité de la cellule, limiter l'impact du vieillissement et/ou moduler l'activation de la mort cellulaire. L'une des cibles, qu'il semble primordial de protéger de ces stress, n'est autre que la molécule support de notre information génétique : l'ADN. Le génome humain est une molécule très complexe à l'origine de tous les mécanismes et structures qui nous constituent. La cellule lutte pour maintenir l'intégrité de son génome, une caractéristique essentielle pour continuer de proliférer dans de bonnes conditions et garder son statut de cellule normale. De ce fait, en réponse aux agents endogènes et exogènes qui engendrent des dommages à l'ADN, la cellule a développé un système sensible de détection des lésions sur son ADN, induisant l'arrêt de sa prolifération cellulaire pour permettre la réparation de l'ADN endommagé, ou, dans le cas où ces dommages ne peuvent être réparés, pousser la cellule à se « suicider », entrer dans un processus de mort cellulaire par apoptose. La détection des lésions, l'arrêt du cycle cellulaire et les mécanismes de réparation sont orchestrés par de nombreuses voies complémentaires ou redondantes, constituant une roue de secours pour la cellule si l'une de ces voies est dans l'incapacité d'agir. Plusieurs protéines œuvrent à différents niveaux dans cette cascade pour assurer une prise en charge et une réparation efficace des dommages à l'ADN. Étant donné l'importance de ces voies dans l'homéostasie cellulaire, il est essentiel de les étudier et de caractériser leurs fonctions et leurs régulations.

### I. Les dommages à l'ADN

Les cellules sont compartimentées en deux parties : le noyau contenant l'ADN génomique et les protéines nucléaires jouant un rôle dans la stabilité de l'ADN et sa réparation, et le cytoplasme contenant toute la machinerie nécessaire pour le bon fonctionnement de la cellule, allant de la production de l'énergie cellulaire à la synthèse protéique et l'adressage de ces protéines aux différents compartiments cellulaires. L'ADN, codant pour chaque ARNs et protéines jouant un rôle essentiel dans l'homéostasie cellulaire, est soumis à des agressions multiples d'origine intracellulaire et extracellulaire. La protection de l'ADN, son entretien et sa réparation sont primordiaux pour assurer l'intégrité et la stabilité du génome ainsi que le bon fonctionnement des divers processus cellulaires, allant jusqu'à la survie même de la cellule. Différentes voies de réparation de l'ADN, redondantes ou complémentaires, sont utilisées par la cellule pour réparer son ADN et éviter la perte d'informations génétiques ou l'accumulation de mutations qui pourraient conduire à sa mort ou à sa transformation maligne.

#### a. Nature des dommages

L'intégrité de l'ADN, c'est-à-dire la capacité de l'ADN à demeurer intact est constamment soumise à diverses attaques de nature exogène, tel que les rayons ultraviolets (UV), le tabac, l'alcool, les produits chimiques, certains médicaments et agents de chimiothérapies ou radiothérapies. Mais ces dommages peuvent aussi avoir une origine endogène comme l'incorporation d'un mauvais nucléotide, l'arrêt des fourches de réplication ou encore l'action d'espèces réactive de l'oxygène (ROS) lors de stress oxydatifs ou métaboliques. En temps normal et en combinant les facteurs environnementaux et les erreurs intervenant lors de processus physiologiques, ces acteurs responsables des dommages induisent plus de  $10^5$  à  $10^6$  lésions par jour (Hoeijmakers 2009; Rahman and Seo 2008). La majorité de ses lésions sont responsables de cassures simples brins (environ  $10^4$  cassures simples brins (Sudhir Ambekar 2017)). Cependant, une seule journée d'exposition au soleil induit plus de  $10^5$  dommages par UV, ayant un impact à la fois directement sur l'ADN mais aussi indirectement par l'augmentation de l'inflammation et de la production des ROS (Hoeijmakers 2009).

Chaque composante de la structure de l'ADN, bases azotées ou désoxyribose ou/et phosphates, peuvent être altérés. Ainsi, les bases peuvent être oxydées, alkylées, déaminées ou même éliminées. Des interruptions dans le squelette base-ribose-phosphate de l'ADN peuvent aussi avoir lieu générant ainsi des cassures simple-brin (CSBs) ou double-brin (CDBs) de l'ADN. Des pontages covalents entre pyrimidines (dimères de pyrimidines) ou entre brins (pontages inter ou intra-brins) peuvent se former.

Des erreurs lors de la réplication de l'ADN peuvent aussi être à l'origine des dommages. On retrouve donc les dommages suivants (Figure 29) :

- Altérations d'une seule base :
  - Site abasique
  - Oxydation
  - Déamination
  - Alkylation
  - Incorporation d'une base analogue
  - Décalage d'une base/mésappariement
- Altération de deux bases :
  - Dimère de purine
  - Dimère de pyrimidine
- Cassures d'ADN :
  - Cassure simple-brin
  - Cassure double-brin
- Liens croisés :
  - Liens ADN-ADN
  - Liens ADN-ARN
  - Liens ADN-Protéines
- Erreurs dues aux ADN polymérase (glissement, mésappariement)
- Blocage des fourches de réplication
- Agent intercalant

La persistance de ces lésions conduit, la majorité du temps, à l'arrêt du cycle cellulaire, à la remodelisation de la chromatine, à la mort cellulaire ou à la sénescence. Mais ces dommages, s'ils sont pris en charge dans certains cas par des systèmes de réparation fautifs, peuvent aussi être à l'origine de mutations et conduire à la mise en place d'une instabilité génétique à l'origine de la transformation tumorale.

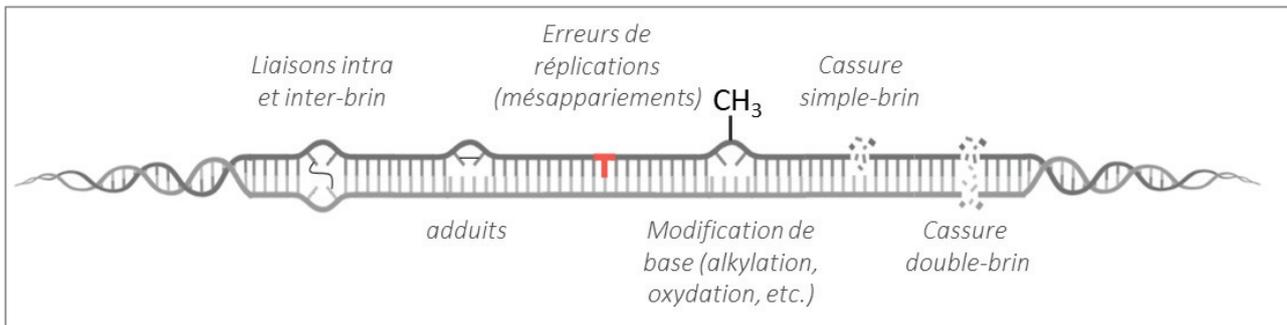


Figure 29 : les dommages à l'ADN

## b. Facteurs endogènes

### 1. Le stress oxydatif

#### La chaîne respiratoire

Le processus de respiration aérobie des mitochondries, autrement appelé la chaîne respiratoire mitochondriale ou la chaîne du transport de électrons, est responsable de la génération d'une grande partie de l'énergie nécessaire au bon fonctionnement des cellules (Figure 30). La chaîne respiratoire correspond à une association de complexes protéiques présents au sein de la membrane interne de la mitochondrie et elle est responsable, avec l'ATP synthétase, de la phosphorylation oxydative permettant la production d'énergie sous forme  $\text{NAD}^+/\text{FAD}$  et la réduction de l' $\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  à la fin de la chaîne. Ce processus permet la production d'énergie par l'oxydation du  $\text{NADH}$  et du  $\text{FADH}_2$ , tous deux produits lors des différentes voies cataboliques de l'organisme (glycolyse, cycle de Krebs, ...), et par la production d'ATP grâce à la formation d'un gradient de protons. Tout au long de la chaîne respiratoire, les électrons provenant du  $\text{NADH}$  et du  $\text{FADH}_2$ , perdent de l'énergie qui est utilisée pour former le gradient électrochimique de proton d'hydrogène ( $\text{H}^+$ ) entre l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale. Les électrons riches en énergie ainsi récupérés sont transportés successivement *via* les différents complexes enzymatiques qui constituent ce mécanisme. Les électrons de basses énergies libérés à la fin de la chaîne respiratoire réagissent ainsi avec les molécules d'oxygène et les protons présents dans la matrice mitochondriale afin de former des molécules d'eau.

Suite de ce métabolisme oxydatif, plusieurs composés sont produits. La plupart de ces composés sont bénéfiques et permettent de fournir l'énergie essentielle à la cellule, tel que le  $\text{NAD}^+$ , le  $\text{FAD}$ , l'ATP ou même les molécules d' $\text{H}_2\text{O}$ . Cependant, moins de 5% d'entre eux peuvent être toxiques pour la cellule si leur concentration augmente. Ces composés dérivés du métabolisme oxydatif sont nécessaires pour certains événements cellulaires, y compris la transduction du signal, l'activation

enzymatique, l'expression génique, la formation de liaisons disulfures lors du repliement de nouvelles protéines dans le réticulum endoplasmique, et le contrôle de l'activité de la caspase qui est activée pendant le mécanisme apoptotique. Cependant lorsque ce processus s'emballe, la concentration de ces composés augmente significativement, il s'agit de stress oxydatif (Sosa et al. 2013).

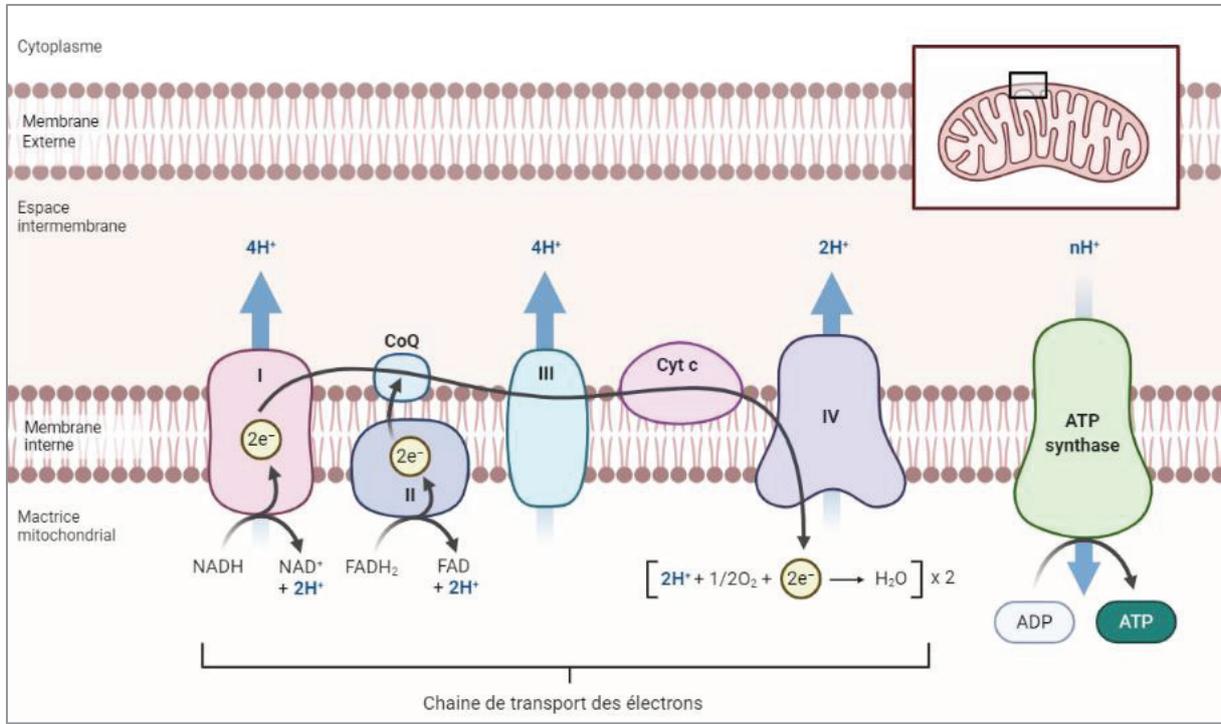


Figure 30 : la chaîne respiratoire

### Le stress oxydatif

Le stress oxydatif, aussi appelé stress oxydant, apparaît lorsque des espèces réactives ou radicaux libres sont présents en trop grand nombre dans la cellule. La chaîne respiratoire s'emballe, la production des composants énergétiques est trop rapide. La mitochondrie n'arrive plus alors à créer des déchets sous forme de molécule d'H<sub>2</sub>O, par exemple, et produit alors des dérivés toxiques. Ces molécules sont très instables et cytotoxiques car elles oxydent d'autres molécules en leur soustrayant un électron ce qui les rend de nouveau stable mais au détriment des molécules touchées qui deviennent à leur tour instables créant ainsi de nouveaux radicaux libres (Beckman and Ames 1998; Harman 2003; Yuanbin Liu, Fiskum, and Schubert 2002; Wallace 2005)

Les sources du stress oxydatif comprennent des sites de production interne tel que les mitochondries, la membrane plasmique, le réticulum endoplasmique, les peroxysomes et les enzymes intervenant en particulier dans l'homéostasie énergétique ou dans la production d'H<sub>2</sub>O, en particulier les enzymes détoxifiantes du complexe P450, l'oxydoréductase xanthine oxydase ou les complexes nicotinamide adénine dinucléotide (NADPH) oxydase (Q. Chen et al. 2003; Lenaz and Genova 2010). Les sources externes, quant à elles, comprennent, entre autres, les rayonnements UV, les composés

chimiques comme les polluants environnementaux, le tabac et l'alcool ou les infections par des pathogènes (Sosa et al. 2013).

Ces éléments responsables du mauvais fonctionnement de la chaîne respiratoire sont à l'origine de la production de composés dangereux pour la cellule, appelés les espèces réactives. Les espèces réactives peuvent être classées en quatre groupes en fonction de l'atome principal impliqué : les espèces réactives de l'oxygène (ROS), espèces réactives d'azote (RNS), espèces réactives de soufre (RSS) et espèces réactives de chlorure (RCS) (Phaniendra, Jestadi, and Periyasamy 2015).

### *Les espèces réactives de l'oxygène*

De tous les composés dérivés du métabolisme oxydatif, les ROS sont les plus abondamment produites lors de stress oxydatif. Parmi les facteurs endogènes, les mitochondries sont responsables de 90% de la production de ROS (Balaban, Nemoto, and Finkel 2005; Q. Chen et al. 2003; Lenaz and Genova 2010). Les ROS sont responsables de l'oxydation de nombreux acteurs cellulaires. L'oxydation fait partie d'une réaction appelée oxydoréduction qui permet le transfert d'un électron d'une molécule à une autre. Cette réaction peut produire des radicaux libres qui entraînent des réactions en chaîne destructrices. Dans le cas des ROS, les quatre complexes multiprotéiques qui constituent la chaîne respiratoire effectuent donc un transfert d'électrons jusqu'à l'accepteur final, l'oxygène, qui est réduit complètement en H<sub>2</sub>O (complexe IV). Une proportion non négligeable d'oxygène (2 à 5 %) échappe à la réduction complète en H<sub>2</sub>O et subit alors une mono-réduction au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire conduisant alors à l'apparition de ROS. Les ROS comprennent l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), le radical hydroxyle (OH<sup>-</sup>), l'oxygène singulet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) et l'ozone (O<sub>3</sub>) (Simic, Bergtold, and Karam 1989). Leur demi-vie varie de quelques nanosecondes à quelques heures, selon la stabilité de la molécule. Lorsqu'un stress oxydant est généré, les ROS altèrent et endommagent de nombreuses molécules intracellulaires, comprenant l'ADN, l'ARN, les lipides et les protéines (Pogozelski and Tullius 1998; Veskoukis, Tsatsakis, and Kouretas 2012; Winterbourn 1995). Les ROS s'attaquent à la fois au niveau des bases et des désoxyriboses, engendrant une grande variété de lésions telles que des sites abasiques, des bases oxydées, des cassures simple-brin (CSBs) et, indirectement, des adduits, des pontages protéines-ADN et des cassures double-brin (CDBs) (Cooke et al. 2003). Mais le dommage oxydant le plus fréquent reste les bases oxydées. Il est intéressant de noter que les modifications de bases induites par le stress oxydant ne sont pas létales pour la cellule. Néanmoins, si le dommage persiste, la cellule peut s'engager dans un processus de mort cellulaire ou de sénescence. Les ROS présentent un potentiel mutagène très puissant expliquant leur dangerosité notamment dans l'apparition de cancer. En effet, l'une des bases oxydées la plus décrite la 8-

Oxoguanine (8-oxoG) est capable de s'apparier à une cytosine comme à une adénine lors de la réplication, ce qui engendre des transversions G : C en T : A au cours de la réplication (K. C. Cheng et al. 1992). Ces dommages conduisent au dérèglement de nombreux processus et peuvent provoquer l'arrêt du cycle, la sénescence et la mort cellulaire. Dans certains cas, ces événements peuvent conduire à l'apparition de cancer.

La protection contre ces ROS est assurée par une variété de systèmes antioxydants (Mailloux et al., 2013). Afin de maintenir un niveau non cytotoxique de ROS et d'éviter une situation de stress oxydant chronique, les cellules ont recours à différents systèmes antioxydants enzymatiques ou non enzymatiques. Les antioxydants sont capables d'arrêter les réactions en chaîne des oxydations en se réduisant avec les radicaux et annihilant ainsi leur action. Ces propriétés se trouvent beaucoup dans les familles des thiols et des phénols. Les systèmes non enzymatiques comprennent notamment les vitamines C (acide ascorbique) et la vitamine E (tocophérol), le glutathion, les caroténoïdes, les polyphénols, l'acide urique et l'anthocyanoside (pigment naturel des végétaux ayant un fort pouvoir antioxydant) (J. S. Lim et al. 2004). Ces molécules antioxydantes permettent de fournir aux radicaux libres un proton H<sup>+</sup> capable de les neutraliser. La plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et sont importés par l'alimentation. Les antioxydants enzymatiques, comme la superoxyde dismutase enzymatique (SOD), la catalase (CAT), les glutathion peroxydases (GPX), les thiorédoxines (TRX) et les peroxiredoxines (PRX), quant à eux, sont considérés comme la première ligne de défense des cellules contre les ROS (Balaban, Nemoto, and Finkel 2005; Nordberg and Arnér 2001; Valko et al. 2007). Ces enzymes éliminent directement les espèces réactives dès leur production.

#### *L'impact de l'EMT sur les ROS*

Récemment, notre équipe a démontré qu'un EMT-TF, plus précisément ZEB1, est capable de protéger le génome en réduisant les niveaux d'espèces réactives induites par un oncogène. Dans ce cas, Morel et ses collaborateurs ont identifié un groupe de cellules mammaires capable de résister à un stress oxydatif. Le statut de différenciation de la cellule d'origine a été un facteur déterminant concernant l'impact d'un stress oncogénique sur le profil génomique des tumeurs. Contrairement aux cellules épithéliales mammaires différenciées, les cellules souches mammaires présentent la capacité de résister à une activation oncogénique tel que HRAS<sup>G12V</sup> grâce à un programme antioxydant dépendant du facteur de transcription ZEB1 et de la méthionine sulfoxyde réductase MSR3, une enzyme oxydoréductase. Comme expliqué précédemment (voir chapitre I), bien que les fonctions oncogéniques des EMT-TFs telles que ZEB1 soient bien établies, ces facteurs de transcription sont généralement considérés comme favorisant la dissémination métastatique plutôt que d'agir dans les

premiers stades de la transformation maligne. Néanmoins, en prévenant le stress cellulaire induit par les oncogènes, l'expression de ZEB1 et l'induction de MSR3 par celui-ci permettent aux cellules souches de contourner les barrières oncosuppressives critiques, favorisant ainsi la transformation maligne. Les tumeurs du sous-type *claudin-low* présentent alors un profil génomique dit « plat » avec très peu d'altérations génomiques, indiquant alors un processus de transformation tumorale indépendamment de la mise en place d'une forte instabilité génomique (A.-P. Morel et al. 2017).

### 2. Le stress réplicatif

Au cours de la vie d'une cellule, celle-ci est confrontée au défi de maintenir la stabilité et l'intégrité de son génome lors de la prolifération cellulaire tout en garantissant une duplication fidèle des chromosomes et leur correcte ségrégation en mitose. La cellule est alors soumise à de nombreux stress, parmi lesquels le stress réplicatif, source importante d'instabilité, nécessaire aux étapes très précoces du développement tumoral et de la sénescence (Burrell et al. 2013; Flach et al. 2014; Gorgoulis et al. 2005).

#### *Le cycle cellulaire*

Pour comprendre le stress réplicatif et l'impact de celui-ci sur le génome, il faut revenir aux bases du cycle cellulaire. Le cycle cellulaire est un processus finement régulé qui est défini par une série d'évènements complexes, coordonnés par divers signaux cellulaires, hormonaux et environnementaux, qui ont lieu de façon séquentielle et se concluent par la production de deux cellules filles. Comme expliqué précédemment (décrit chapitre NN pkk), le cycle cellulaire se décompose en deux grandes parties : l'interphase et la mitose (phase M). L'interphase comprend deux phases dites « d'intervalles », les phases G1 et G2 (« gap »), encadrant une phase de synthèse de l'ADN (phase S) (Figure 31).

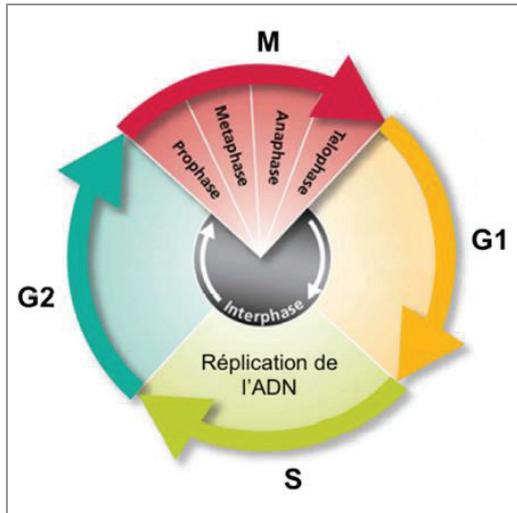


Figure 31 : Représentation schématique du cycle cellulaire

La phase G1 constitue la première étape indispensable au bon déroulement du mécanisme de réplication cellulaire. Cette phase correspond en effet à l'entrée des cellules dans un nouveau cycle de division cellulaire. C'est notamment à cette étape que sont définies les régions de l'ADN où la synthèse sera initiée. Ces zones sont appelées origines de réplication (OR). Tous les génomes possèdent de nombreuses OR qui sont distribuées tout au long du génome de manière inégale et dont l'efficacité d'activation varie, c'est-à-dire que toutes les OR ne sont pas activées en même temps (Cayrou et al. 2011). Afin de maintenir la stabilité du génome, il est nécessaire que suffisamment d'OR s'allument, dans un ordre séquentiel (Guilbaud et al. 2011), et surtout une seule et unique fois par cycle, afin de garantir une réplication complète de l'ADN (Coverley and Laskey 1994) sans duplications de séquences (Dahmann, Diffley, and Nasmyth 1995). Les OR s'activent donc séquentiellement et deux types d'OR se distinguent : les OR précoces et les OR tardives (Masai et al. 2010). Chaque fourche progresse grâce au réplisome (ou machinerie de la réplication) jusqu'à ce qu'elle rencontre une autre fourche de réplication. Cette convergence de fourches se produit au niveau de sites de terminaison de la réplication. Ces sites semblent répartis plutôt aléatoirement dans les génomes. De par leur rôle, l'activation et l'inactivation des OR sont donc étroitement contrôlées par différents complexes protéiques. L'un des premiers régulateurs est le complexe multiprotéique de reconnaissance des origines (ORC1 à 6 : origin recognition complex) qui se lie à l'ADN au niveau des origines de réplication. Ces ORC servent de plateforme de recrutement pour les protéines additionnelles telles que CDC6 ou CDT1 (Gillespie, Li, and Blow 2001). Les six protéines de maintien des mini-chromosomes (MCM2 à 7 : mini chromosome maintenance proteins 2-7) sont ensuite recrutées, formant ainsi le complexe de pré-réplication (Diffley 2004). Au cours de la transition G1/S, le complexe de pré-réplication est activé par les protéines kinases Cdc7 et CDK2 et par Cdc45 (Jares, Donaldson, and Blow 2000; Walter and Newport 2000).

La phase S ou la phase de synthèse de l'ADN s'effectue dans les deux sens à partir des origines de réplication, créant ainsi des fourches de réplication bidirectionnelles. Au niveau de chaque fourche de réplication, les deux brins d'ADN parental se séparent et un ADN néo-synthétisé se forme. L'ouverture du duplex de la molécule d'ADN au niveau d'une OR permet la fixation de l'ADN polymérase  $\alpha$  (nécessaire à l'initiation de la réplication), de la protéine RPA (Replication protein A) qui stabilise et protège l'ADN simple brin et de la protéine PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) qui permet

d'augmenter la processivité des ADN polymérase (Mimura et al. 2000; Walter and Newport 2000). Au cours de l'élongation de la réplication, le complexe MCM est dissocié de la chromatine et sa réassociation est inhibée jusqu'à ce que les cellules sortent de mitose (Madine et al. 1995), permettant ainsi, de protéger l'ADN de la réactivation de nouvelles OR (Blow and Dutta 2005). Lorsque les OR sont allumées et que la réplication a commencée, les cellules doivent réguler de façon précise leur vitesse de réplication, la consommation et la distribution des ressources essentielles, tels que les dNTPs et les facteurs de réplication, afin d'effectuer la réplication de façon efficace tout en maintenant la stabilité du génome.

La phase G2, comme la phase G1 est une phase d'intervalle. Elle va permettre à la cellule de vérifier l'intégrité du génome, ainsi que de préparer les chromosomes à la ségrégation et à la mitose. La phase G2 permet d'accorder suffisamment de temps à la cellule pour induire la transcription des gènes nécessaires à la mitose ainsi que des modifications d'histones. Ce temps peut être aussi utilisé pour réparer les éventuels dommages subit par l'ADN lors de la phase S.

La mitose est une phase de division, au cours de laquelle la cellule se divise en deux cellules filles. Cette phase est caractérisée par plusieurs étapes séquentielles :

- La prophase : correspondant à la condensation chromatiniennne,
- La prométaphase : au cours de laquelle a lieu la rupture de l'enveloppe nucléaire,
- La métaphase : au cours de laquelle les chromosomes sont alignés,
- L'anaphase : correspondant à la séparation mécanique soudaine des chromatides sœurs,
- La télophase : correspondant à la reconstitution d'une nouvelle enveloppe nucléaire autour de chaque ensemble de chromosomes,
- La cytotdiérèse : correspondant à l'invagination de la membrane cytoplasmique permettant la séparation physique des deux cellules filles.

### *Le stress réplicatif*

La réplication requiert un certain nombre de facteurs qui, lorsqu'ils sont limitants, peuvent ralentir la progression de fourches de réplication et induire un stress réplicatif. Le stress réplicatif se définit donc par un ralentissement ou un arrêt de la réplication pouvant engendrer une perte de l'intégrité du génome (Gelot, Magdalou, and Lopez 2015; Zeman and Cimprich 2014). Les facteurs responsables de ce stress incluent une diminution des dNTPs, des composants de la machinerie de réplication (polymérase, hélicase), ainsi que des histones et des chaperons d'histones qui enveloppent l'ADN néo-synthétisé (Aguilera and García-Muse 2013; Anglana et al. 2003). Une diminution ou une

augmentation du nombre d'OR activées peut aussi entraîner un stress réplicatif. En effet, la réplication de régions d'ADN pauvres en OR actives entraîne une synthèse d'ADN sur de longues distances augmentant ainsi le nombre potentiel de risque de dommages (cassures) ou d'erreurs (mauvais appariements, décalage de bases). Les obstacles rencontrés par les fourches de réplication au cours de cette synthèse peuvent entraîner l'apparition de régions non-répliquées ou au contraire l'apparition de séquences dupliquées (fréquentes au niveau des séquences répétées par exemple). C'est notamment le cas dans les cellules présentant un défaut de mise en place du complexe de pré-réplication (Bruschi et al. 1995; Lengronne and Schwob 2002; Loupart, Krause, and Heck 2000; Prasanth, Prasanth, and Stillman 2002; Shima et al. 2007). Dans cet exemple, même si l'OR est allumée, l'absence de l'ORC empêche une activation complète de l'OR. A *contrario*, l'excès d'activation d'origines de réplication est également un facteur de stress *via*, notamment, l'épuisement des différents facteurs nécessaires à la synthèse de l'ADN et au maintien de l'intégrité des fourches de réplication. C'est entre autres le cas pour la protéine RPA. Si celle-ci vient à manquer, les zones d'ADN simple brin ne sont alors plus protégées, les fourches de réplication deviennent alors plus propices à l'effondrement (Fanning, Klimovich, and Nager 2006; Wold 1997). De même, la surexpression ou l'activation constitutive d'oncogènes tels que HRAS, CMYC ou encore la Cycline E constitue aussi une source de stress réplicatif. Il a été montré, par exemple, que ces trois oncogènes forcent la prolifération cellulaire en augmentant le nombre d'origines de réplication actives, ce qui peut mener à la diminution du niveau de dNTPs et donc au ralentissement de la réplication (Bester et al. 2011; Poli et al. 2012; Srinivasan et al. 2013).

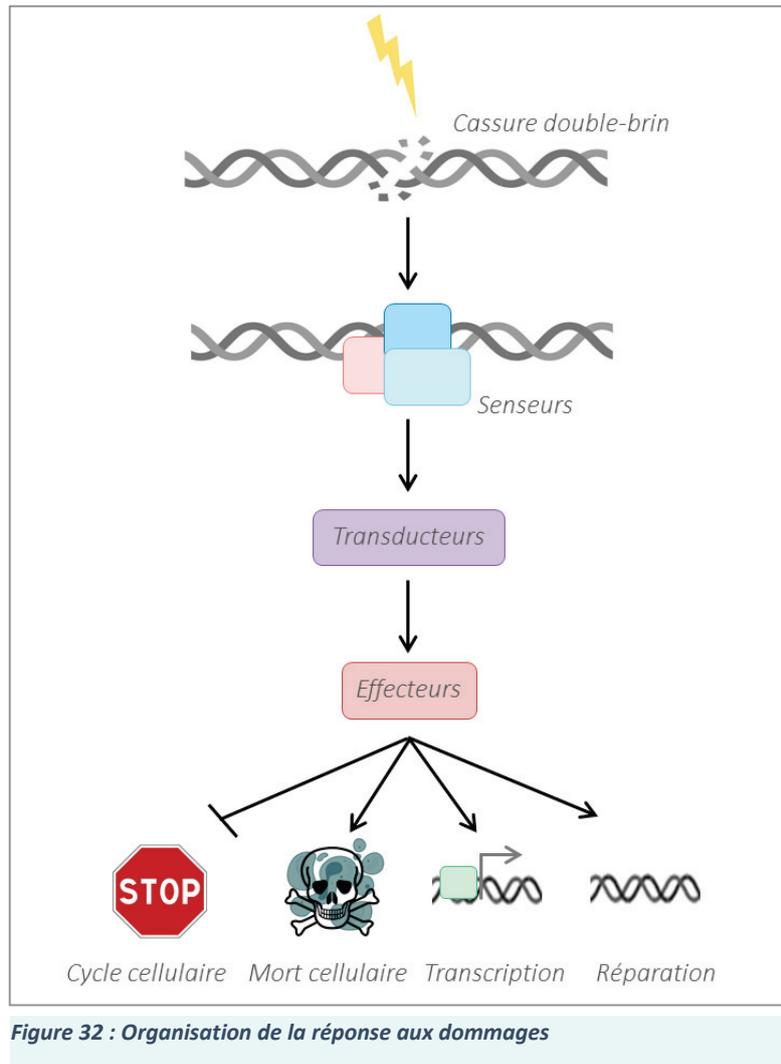
Enfin, l'effondrement des fourches de réplication peut être dû à un autre stress comme la présence de dommages à l'ADN. Comme nous l'avons vu précédemment, le stress oxydatif engendre de nombreux dommages, tels que des sites abasiques, des bases oxydées, des cassures simple- ou double-brin, servant d'obstacle à la progression de la fourche. En effet, une large variété d'obstacles peut perturber la réplication en entravant la progression des hélicases réplicatives ou encore la capacité des ADN polymérases réplicatives à incorporer de nouveaux nucléotides.

## II. La réponse aux dommages

L'ADN est la molécule la plus importante de toute la cellule. De par ses nombreux rôles, il est absolument essentiel de préserver l'intégrité du génome et de réparer celui-ci lorsque malencontreusement il y a un dommage. Les cellules ont heureusement un nombre conséquent de mécanismes pour préserver au maximum cette molécule essentielle à la vie. Ces mécanismes regroupent à la fois la signalisation de la présence de ces dommages à l'ADN (DDR : DNA damage response), la signalisation d'un stress répliatif (la RSR : replication stress response), et enfin la réparation de ces mêmes dommages par différents processus. Le DDR ou la RSR sont constitués d'un réseau de détection de dommages ou de stress répliatif, de transduction du signal et de protéines effectrices visant, entre autres, à arrêter le cycle cellulaire et à stimuler la réparation de l'ADN. Ces voies permettent alors d'adresser l'ADN endommagé, ou la fourche effondrée, à la voie de réparation la plus propice afin de préserver l'intégrité et en conséquence, dans la majeure partie des cas, la stabilité du génome. Lorsque cette réparation est impossible ou réalisée de manière fautive, il y a une augmentation de l'instabilité génétique et une prédisposition tumorale.

### a. Signalisation des dommages

La signalisation DDR ou la RSR sont les premiers processus à se mettre en place lors d'un dommage et permet d'indiquer à la cellule sa présence. Ces signalisations permettent d'initier la réparation de l'ADN, activer la transcription de certains gènes, bloquer le cycle cellulaire ou même induire la mort cellulaire. Les facteurs clés impliqués dans ses deux signalisations sont majoritairement des sérine-thréonine kinases appartenant à la famille des PIKK (pour Phosphatidylinositol 3-Kinase-like protein Kinases) : ATM (ataxia telangiectasia mutated), ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3 related) et DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit, codée par le gène PRKDC). Ces protéines kinases sont activées par des senseurs et agissent comme effecteurs afin d'activer les transducteurs du signal (Figure 32).



### 1. La réponse cellulaire aux dommages à l'ADN (DDR)

Il a été estimé que le génome d'une cellule est constamment soumis à divers stress, d'origine endogène ou exogène, pouvant former plus de  $10^5$  à  $10^6$  lésions par jour comme présenté chapitre III p76 (Hoeijmakers 2009; Rahman and Seo 2008). Ces lésions sont prises en charge par un ensemble complexe de voies de signalisation connu sous le nom de la DDR (Howard, Yanez, and Stark 2015; Lord and Ashworth 2012). La fonction de la DDR est de ralentir ou bloquer le cycle cellulaire afin de laisser le temps à la cellule de réparer les dommages et si l'ADN présente des lésions (cassure des brins, modification d'une base, intégrité des télomères), d'empêcher la prolifération cellulaire en présence d'ADN endommagé et de ce fait, éviter la propagation de mutations qui sont à la base de l'instabilité génomique. Le cas échéant, si ses dommages ne sont pas pris en charge, la cellule induit une mort cellulaire ou une sénescence par le biais de l'activation de p53.

L'étude de la DDR chez la levure a été à la base de la majeure partie des découvertes concernant cette voie de signalisation (Branzei and Foiani 2010; Friedel, Pike, and Gasser 2009; Pasero, Shimada, and Duncker 2003). La DDR est principalement activée par l'effecteur ATM lui-même responsable de l'activation et de la stabilisation de CHK2.

ATM joue notamment un rôle dans la détection et la signalisation des cassures double-brin de l'ADN. En effet à la suite d'une cassure double-brin, le complexe MRN (MRE11/RAD50/NBS1) est recruté au site d'ADN endommagé et recrute à son tour la protéine ATM. ATM est alors activée par autophosphorylation sur la serine (Ser) 1981. L'activation de la DDR entraîne un changement du paysage chromatinien et épigénétique au niveau du site de dommage. ATM phosphoryle ensuite l'histone H2AX sur son résidu Ser139 appelé alors  $\gamma$ -H2AX (Burma et al. 2001; Rogakou et al. 1998; Ward and Chen 2001). Cette modification se produit sur le site du dommage et se propage sur plusieurs milliers voir millions de paires de bases, constituant ainsi une plateforme pour le recrutement des acteurs impliqués dans la réparation (Paull et al. 2000; Rogakou et al. 1999; Shroff et al. 2004; Ward et al. 2003). Une fois phosphorylée  $\gamma$ H2AX recrute au site de l'ADN endommagé plusieurs protéines qui sont phosphorylées par ATM, dont 53BP1 (p53-binding protein 1), BRCA1 (breast cancer susceptibility 1), et CHK2 (Checkpoint Kinase 2). L'activation de la voie ATM-CHK2 inhibe l'activité de CDC25, une phosphatase à double spécificité (phosphotyrosine et phosphosérine/thréonine) qui, en absence de dommages d'ADN, active les kinases régulatrices du cycle cellulaire, les CDK, et contrôle ainsi le déclenchement de l'entrée en mitose et la prolifération. La phosphorylation de CHK2, par l'activation d'une cascade de phosphorylation, arrête le cycle cellulaire en phase G1. En parallèle, ces voies de signalisation soutiennent la réparation des lésions, en stimulant l'expression des gènes codant les protéines de la réparation de l'ADN, en recrutant les facteurs de réparation sur le site de dommage, et en régulant l'activité des protéines de réparation de l'ADN *via* des modifications post-traductionnelles.

## 2. La réponse cellulaire au stress répliatif (RSR)

Lorsque les obstacles à la progression de la réplication de l'ADN ne peuvent pas être gérés à temps, les fourches de réplication bloquées sont susceptibles de s'effondrer, conduisant à des ruptures d'ADN double-brin très létales. Cela nécessite la mise en place de voies de prise en charge du stress répliatif notamment de la stabilisation et le redémarrage des fourches de réplication bloquées ou effondrées. L'échec de cette prise en charge peut avoir pour conséquence directe l'apparition de cassures double-brin de l'ADN, mais peut également avoir des effets à l'échelle cellulaire, comme des ségrégations mitotiques aberrantes, une augmentation de l'instabilité génomique responsable de nombreuses mutations, pouvant alors aboutir à la mort cellulaire, la sénescence ou même à l'initiation d'une

tumeur. Ces dernières années, il a été proposé de différencier la voie de réponse aux dommages de l'ADN de la voie de réponse au stress réplicatif (Toledo, Murga, and Fernandez-Capetillo 2011). En effet, alors que la voie de réponse aux dommages de l'ADN est coordonnée par trois kinases ATM principalement, puis ATR et DNA-PKcs (Chehab et al. 2000; Cimprich et al. 1996; Cliby et al. 1998; Kurimasa et al. 1999; Shieh et al. 2000), la voie de réponse au stress explicatif implique uniquement la kinase ATR (Cuadrado, Martinez-Pastor, and Fernandez-Capetillo 2006; Petermann and Helleday 2010; Toledo, Murga, and Fernandez-Capetillo 2011; Zou and Elledge 2003). La distinction entre ces deux voies permet une meilleure compréhension de leur fonctionnement. L'accumulation d'ADN simple-brin au niveau des fourches de réplication est une des conséquences les plus précoces du stress réplicatif (Petermann and Helleday 2010; Seigneur et al. 1998). Ces zones d'ADN simple-brin apparaissent au niveau des fourches de réplication lorsque les hélicases réplicatives continuent de dérouler l'ADN parental tandis que les ADN polymérases réplicatives sont bloquées (Byun et al. 2005).

Donc *a contrario* de la DDR, la RSR est activée par l'apparition d'un blocage d'une fourche de réplication favorisant l'accumulation d'ADN simple-brin (ADNsb) mais aussi des cassures double-brin ou des dommages induits par UV bloquant la progression de la fourche. Les zones d'ADN simple-brin sont rapidement recouvertes par la protéine RPA (Replication Protein A), et la persistance de ces filaments simple-brin agit comme senseur (Byun et al. 2005) et signale le dommage à la voie ATR/CHK1 (MacDougall et al. 2007; Zou and Elledge 2003). RPA recrute à son tour ATR *via* ATRIP, une protéine de régulation qui forme un complexe avec ATR augmentant ainsi l'affinité de cette dernière pour l'ADN et renforçant son activité. ATR est aussi activée par TopBP1 (DNA topoisomerase II binding protein 1) et claspine (co-médiateur de CHK1). Tout comme ATM et CHK2 de la DDR, ATR active à son tour CHK1. ATR et CHK1 sont deux kinases importantes pour le maintien de l'intégrité génomique même en absence d'une source exogène de dommage à l'ADN. ATR active CHK1 en la phosphorylant sur Ser317 et Ser345 (Bonner et al. 2012; Gralewski et al. 2020; Osborn, Elledge, and Zou 2002). Lors de son activation, CHK1 se dissocie de Claspin pour phosphoryler un certain nombre de régulateurs de la division cellulaire, y compris les phosphatases CDC25A et CDC25C, conduisant à l'arrêt de la progression du cycle cellulaire soit en phase S soit à la frontière de G2/M. ATR phosphoryle aussi d'autres protéines impliquées dans la stabilisation des fourches de réplication et la réparation de l'ADN tels que Rad17, Rad9, H2AX, WRN, BLM, BRCA1 et FANCD2, permettant ainsi de réguler la réplication et les mécanismes de réparation de l'ADN une fois les points de contrôle de la phase S activés (Bian and Lin 2019; Ward and Chen 2001).

Lorsque la fourche de réplication bloquée ne peut pas être stabilisée, la fourche s'effondre ensuite en une cassure double-brin de l'ADN (CDB). En réponse à cette génération de CDBs, la voie de signalisation DDR prend alors le relais par le biais d'ATM et CHK2 (Bian and Lin 2019).

### b. Mécanismes de réparation des dommages

Une fois la signalisation des dommages mise en place, celle-ci active la voie de réparation la plus adaptée à chaque type de lésion et aux conditions cellulaires et environnementales. Ces mécanismes sont très importants car leur dysfonctionnement est souvent à l'origine de syndromes caractérisés, entre autres, par une instabilité génétique et une prédisposition tumorale. Plusieurs voies permettent de corriger les différents types de lésions : la réparation par excision de base (BER, pour Base Excision Repair), la réparation par excision de nucléotide (NER, pour Nucleotide Excision Repair), la réparation des mésappariements (MMR, pour MisMatch repair), la réparation par la voie canonique des jonctions d'extrémités non-homologues (c-NHEJ, pour canonical-Non Homologous End Joining), la réparation de la jonction des extrémités dépendante de l'ADN polymérase  $\theta$  (TMEJ, pour Theta Mediated End-Joining) et la recombinaison homologue (RH). Les 3 premiers mécanismes sont sollicités pour la réparation des lésions impliquant un défaut sur un seul brin de l'ADN ou une cassure simple-brin et sont des mécanismes très conservés au cours de l'évolution. Le c-NHEJ, le TMEJ et la RH, voies essentielles de la réparation des CDBs, seront développés dans la section suivante.

#### 1. La réparation par excision de base (BER)

La réparation par excision de base (BER) est une voie de réparation de l'ADN essentielle impliquée dans le maintien de la stabilité du génome et donc dans la prévention des maladies humaines, telles que le vieillissement prématuré, les maladies neurodégénératives et le cancer. Le BER est un mécanisme de réparation de bases endommagées qui n'altèrent pas le squelette ou la structure de l'hélice d'ADN. Ces bases endommagées peuvent correspondre à des bases oxydées (dont la 8-oxoG), à des bases alkylées (3-méthyladénine), à des bases désaminées (hypoxanthine, formée par désamination de l'adénine) ou encore à des uraciles (incorporées par erreur ou générées par la désamination de la cytosine). Le BER est initié par des ADN glycosylases, telles que OGG1 qui reconnaît la 8-oxoG. Ces enzymes clivent la liaison entre le désoxyribose et une base d'ADN modifiée ou non appariée. Au moins 11 glycosylases d'ADN distinctes sont caractérisées et plusieurs ADN glycosylases peuvent reconnaître les mêmes dommages. Elles reconnaissent et éliminent spécifiquement les bases endommagées ou inappropriées et créent ainsi des sites abasiques (sites apuriques ou apyrimidiques) (Krokan and Bjørås 2013; Krokan, Standal, and Slupphaug 1997; Lindahl and Karlström 1973; Lindahl and Nyberg 1974). Il existe deux types différents d'ADN glycosylases, les glycosylases monofonctionnelles, avec uniquement leur activité d'ADN glycosylase, et les glycosylases bifonctionnelles, pour lesquelles l'activité d'ADN glycosylase est couplée à une activité de clivage des

brins d'ADN. Les ADN glycosylases monofonctionnelles rompent la liaison N-glycosidique entre la base endommagée et le squelette d'ADN, créant un site abasique. Le site abasique est reconnu par l'endonucléase 1 AP (APE1), qui clive le squelette d'ADN créant ainsi une cassure simple-brin d'ADN. Inversement, les ADN glycosylases bifonctionnelles, en plus d'effectuer l'élimination des dommages de base, incisent le squelette d'ADN pour créer un espace mono-nucléotidique. La cassure simple-brin (CSB) ainsi générée est reconnue par PARP1 (poly(ADP-ribose)polymérase 1) qui conduit à l'accumulation de XRCC1. Les ADP-ribosyltransférases (ARTD) ou poly(ADP-ribose) polymérases (PARP) assurent la fixation d'un ADP-ribose sur les protéines cibles sous forme soit d'unité unique par mono-ADP ribosylation (MARylation), soit de chaînes polymères ou poly-ADP ribosylation (PARylation). Sur les 17 gènes humains contenant les domaines catalytiques ARTD, plusieurs ont été identifiés comme les principaux senseurs des dommages à l'ADN (Eisemann and Pascal 2020; Gupte, Liu, and Kraus 2017). PARP1, membre fondateur de la famille ARTD, détecte les ruptures d'ADN simple-brin induites soit directement, soit en conséquence du traitement des lésions d'ADN pendant la voie de réparation de l'excision de base (BER). PARP1 est activée lors de sa liaison à l'ADN et de sa propre PARylation ainsi que la PARylation d'une variété de substrats. Cette PARylation favorise l'accumulation de XRCC1 aux sites de dommages qui agit ensuite comme une plate-forme pour assembler les facteurs de réparation tel que les ADN polymérases et les ligases (Ray Chaudhuri and Nussenzweig 2017; Ronson et al. 2018). L'ADN polymérase  $\beta$  incorpore un nouveau nucléotide complémentaire et le complexe XRCC1/Ligase-III réalise la ligation avec le nucléotide suivant. Ceci termine le processus BER par la réparation et le remplacement d'une seule base d'ADN endommagée. Il s'agit du mode prédominant de BER (80% de tous les événements) et est communément appelé BER à patch court.

Un second mode de réparation de la CSB existe. Celui-ci engendre la génération d'un ADNsb plus long (2 à 12 nucléotides). Dans certaines circonstances, après l'ajout du premier nucléotide par POL $\beta$  pour initier la réparation, l'ADN polymérase  $\beta$  est remplacée par les enzymes répliquatives ADN polymérases  $\delta$  et/ou  $\epsilon$  (POL $\delta/\epsilon$ ). Les POL $\delta/\epsilon$  synthétisent un nouveau fragment complémentaire tout en déplaçant l'ancien brin dans le sens 5'-3'. Le fragment déplacé est alors clivé par l'endonucléase FEN1 avant l'intervention de l'ADN Ligase-I qui rétablit la liaison avec l'aide de PCNA (Carter and Parsons 2016; Dianov et al. 1999; Fleck and Nielsen 2004; Helleday, Eshtad, and Nik-Zainal 2014; Krokan and Bjørås 2013; Podlutzky et al. 2001; Sukhanova, Khodyreva, and Lavrik 2010).

## 2. La voie de réparation des cassures simple-brin (CSBR)

Comme décrit précédemment, les cassures simple-brin (CSB) sont souvent générées par des dommages oxydatifs à l'ADN, par la présence de sites abasiques, par les irradiations ionisantes, ou par une activité erronée de l'enzyme topoisomérase 1 de l'ADN (TOP1) (Hegde, Hazra, and Mitra 2008). Les CSB non-résolues sont l'une des causes de l'effondrement de fourches de réplifications, elles bloquent également la transcription en cours et activent l'activation PARP1, et à terme induit la mort cellulaire (Heeres and Hergenrother 2007; Wei Zhou and Doetsch 1993). La voie de réparation des CSBs rejoint la voie du BER lorsque PARP1 et XRCC1 signalent la présence du dommage à l'ADN.

## 3. La réparation par excision de nucléotide (NER)

La réparation par excision de nucléotide ou NER est la principale voie utilisée pour éliminer les lésions qui altèrent et provoquent des distorsions importantes la structure de l'hélice d'ADN, telles que celles formées par la lumière UV (adduits covalents volumineux ou dimères de thymine), les mutagènes environnementaux et certains produits chimiothérapeutiques anticancéreux de l'ADN, et les adduits chimiques volumineux (Nospikel 2009b, 2009a). La reconnaissance du dommage conduit à l'excision d'un court fragment d'ADNsb contenant la lésion (de 24 à 32 nts). Le brin d'ADNsb complémentaire intact est utilisé comme matrice par des ADN polymérases. Il existe deux modes de réparation par le NER, le premier est associé de la transcription (TC-NER, pour Transcription Coupled-NER) et le second est dit global (GG-NER, pour Global Genomic Repair). Tandis qu'ils partagent le même mode d'incision, de réparation et de ligature de la lésion, le TC-NER et le GG-NER diffèrent dans leur mode de reconnaissance du dommage. Le TC-NER est initié lorsque l'ARN polymérase II (ARN PolII) bute sur une lésion au niveau de son ADN matrice. Il fait appel à des protéines qui se fixent sur l'ARN polymérase II et dont la déficience est impliquée dans le syndrome de Cockayne (CSA ou ERCC8 et CSB ou ERCC6). Le TC-NER est donc activé par l'arrêt de l'ARN polymérase II aux sites endommagés d'un brin transcrit, tandis que le GG-NER est contrôlé par XPC, un facteur protéique spécialisé qui scanne l'ADN et révèle la présence des dommages (Sugasawa et al. 1998). Le GG-NER, initié par le complexe XPC-RAD23B, détecte et élimine les dommages volumineux dans le génome entier, y compris les régions non transcrites et la chromatine silencieuse. XPC-RAD23B recrute les facteurs impliqués dans le déroulement de l'hélice tels que les sous-unités XPB/XPD contenues dans le facteur de transcription TFIIH (Fleck and Nielsen 2004). La protéine XPA agit aussi dans la détection des dommages et se lie préférentiellement à l'ADN endommagé par rapport à l'ADN non endommagé. La protéine XPA se lie à la protéine de répllication A (RPA) qui améliore l'affinité de XPA pour l'ADN endommagé et est

essentielle pour le NER. La liaison de XPC-HR23B à une lésion d'ADN provoque une ouverture locale, de sorte que la protéine XPA se lie et que l'ensemble des machines de réparation est chargé sur le site endommagé. La protéine XPA interagit aussi avec ERCC1 et TFIIH. Le complexe XPC-HR23B n'est requis que pour la réparation GG-NER. En cas de réparation TC-NER, lorsqu'une ARN polymérase est bloquée au niveau d'une lésion, l'ADN est déroulé déjà par le complexe de transcription et XPA peut se lier indépendamment du complexe XPC-HR23B. Ensuite, le complexe XPF-ERCC1, qui présente une activité d'endonucléase spécifique à cette structure, est responsable de l'incision en 5' de la lésion. XPF-ERCC1 se lie également à XPA (*via* ERCC1) et à RPA (*via* XPF). La protéine XPG a, quant à elle, une activité d'endonucléase d'ADN et est responsable de l'incision 3'. Les dernières étapes consistent en la synthèse de l'ADN réséqué et la ligation de ce dernier. Ici, ce sont les protéines PCNA (l'antigène nucléaire à cellules proliférantes) et les ADN polymérases  $\eta$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$  qui sont requises pour la synthèse d'ADN, ainsi que l'ADN ligase I pour l'étape finale de ligation.

Des mutations dans la voie du GG-NER, notamment des gènes XPA à XPG et XPV (codant pour l'ADN polymérase  $\eta$ ), sont à l'origine de désordres génétiques, comme le syndrome *Xeroderma Pigmentosum* (XP). Les patients XP développent un syndrome caractérisé par la photosensibilité, l'atrophie cutanée, l'hyperpigmentation et un taux élevé de cancers de la peau induits par la lumière du soleil. Le risque de développer des cancers de la peau chez les patients XP est au moins 1 000 fois plus élevé que dans la population non-mutée (Petruseva, Evdokimov, and Lavrik 2014; Schärer 2013).

#### 4. La voie de réparation des mésappariements (MMR)

La voie de réparation des mésappariements (MMR, mismatch repair) est une voie post-répllicative qui contribue à la fidélité de la réplication (Arana and Kunkel 2010; T. A. Kunkel 2009). Cette voie de réparation reconnaît les erreurs d'incorporation ou des insertions-délétions (IDL pour Insertion-deletion lesion) de bases qui peuvent survenir par glissement lors de la réplication de l'ADN ou la recombinaison notamment dans les régions qui contiennent des séquences d'ADN répétées (Jiricny 2013; Peña-Diaz and Jiricny 2012; Stojic, Brun, and Jiricny 2004). Malgré le taux de fidélité élevé des ADN polymérases répliquatives, il arrive que ces dernières incorporent sur le brin néosynthétisé un nucléotide non complémentaire à celui du brin parental ou qu'elles subissent des glissements au niveau de séquences répétées. Le MMR est également impliqué dans une variété de processus cellulaires, notamment la stabilité des microsatellites, la recombinaison méiotique et mitotique, la signalisation des dommages à l'ADN, l'apoptose, la recombinaison par changement de classe, l'hypermutation somatique et l'expansion répétée en triplet (Chatterjee, N., Walker 2017; Jiricny 2006, 2013).

L'efficacité de ce système réside dans la capacité à reconnaître le brin matrice du brin nouvellement synthétisé, ce qui permet de ne pas modifier la copie originale. Chez *Escherichia coli*, cette distinction est basée sur la présence de méthylations spécifiques sur le brin matrice au cours de la réplication. Chez les eucaryotes, il est proposé que PCNA oriente les protéines du MMR vers la reconnaissance du brin néo-synthétisé contenant le mésappariement. Un autre modèle propose que l'incorporation de ribonucléotides, qui marque les brins néo-synthétisés au cours de la réplication, oriente les protéines du MMR vers la réparation du brin néosynthétisé (McElhinny, Kissling, and Kunkel 2010; Potenski and Klein 2014). Ce mécanisme est conservé au cours de l'évolution. La détection des mésappariements et des courtes insertions-délétions (10pb) se fait entre autres par les protéines MSH (ou MutS chez les procaryotes tel que *E. Coli*). L'hétérodimère MSH2-MSH6 reconnaît les mésappariements de base et les IDL nucléotidiques de 1 au 2 bases alors que le complexe MSH2-MSH3 reconnaît les larges IDL (Thomas A. Kunkel and Erie 2005; Sachadyn 2010). Le complexe MLH1-PMS2 (homologues de MutL) est alors recruté pour cliver le brin défectueux grâce à l'activité endonucléase de PMS2 et fournir un point d'entrée aux exonucléases tel que EXO1 (Kadyrov et al. 2006; G. M. Li and Modrich 1995; Papadopoulos et al. 1994). Enfin, l'ADN polymérase  $\delta$  synthétise le brin excisé et l'ADN ligase I suture le brin.

### 5. La synthèse translésionnelle de l'ADN (TLS)

Peu de temps après la découverte de la structure à double hélice de l'ADN et le dévoilement de son mécanisme de copie par Watson et Crick, Arthur Kornberg et son équipe ont isolé l'ADN polymérase I (POLI) d'*Escherichia coli* et ont démontré sa capacité de copier l'ADN de manière exacte et processive (Bessman et al. 1956; Englund et al. 1968). Au cours de ces dernières années, le nombre d'ADN polymérases connues a largement augmenté. Selon les derniers résultats, il existe plus de 25 ADN polymérases chez l'homme (<https://www.genenames.org/>), et parmi celles-ci, POL $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  et la télomérase sont responsables de la réplication de la majeure partie de l'ADN nucléaire et mitochondrial. Les autres sont spécialisées dans la synthèse translésionnelle et la réparation de l'ADN.

La plupart des lésions de base est éliminée par la réparation par le NER ou par le BER, mais lorsqu'une lésion n'est pas réparée avant ou au cours de la phase S, celle-ci est contournée par le mécanisme de la synthèse translésionnelle de l'ADN (ou TLS pour : Translesion DNA synthesis) (Ohmori et al. 2001; Sale 2013; Sale, Lehmann, and Woodgate 2012; Vaisman and Woodgate 2017; W. Yang and Woodgate 2007). La TLS n'est donc pas un mécanisme de réparation des dommages à l'ADN à proprement parlé mais plutôt un processus de tolérance des dommages à l'ADN. Ce processus est basé principalement sur la prise en charge des lésions par les ADN polymérases TLS. Les TLS polymérases

sont des ADN polymérase spécialisées qui peuvent répliquer des lésions d'ADN aberrantes d'une manière relativement moins fidèle que les ADN polymérase répliquatives (Sale 2013). En présence d'un dommage, les ADN polymérase répliquatives tels que POL $\alpha$ , POL $\delta$  et POL $\epsilon$  sont en incapacité de répliquer l'ADN, elles se détachent de PCNA et une ADN polymérase TLS prend alors le relai pour permettre à la synthèse d'ADN et donc à la répllication du génome de continuer. Contrairement à la vitesse élevée, à la haute fidélité et à la processivité élevée des ADN polymérase répliquatives, les TLS polymérase se caractérisent par une faible efficacité, une faible précision et une faible processivité, permettant ainsi la tolérance des bases endommagées. Deux grands types d'ADN polymérase TLS sont répertoriées : les polymérase qui insèrent un à deux nucléotides opposés au dommage, et celles qui permettent l'extension du brin néo-synthétisé avant que l'ADN polymérase répliquative puisse repartir et terminer la répllication.

Les ADN polymérase eucaryotes sont réparties en plusieurs familles : A, B, X, Y, RT et PrimPOL, les polymérase des groupe C et D n'ont pas leurs équivalents chez l'homme (Tableau 3). Parmi l'ensemble des polymérase, 11 d'entre-elles semblent avoir un rôle de TLS polymérase. Parmi elles, se retrouvent POL $\theta$  (famille A), POL $\nu$  (famille A), POL $\delta$  (famille B), POL $\zeta$  (composée de la sous-unité REV3 de la famille B et de la sous-unité REV7), POL $\beta$  (famille X), POL $\mu$  (famille X), POL $\sigma$  (famille X ; origine controversée), REV1 (famille Y), POL $\eta$  (famille Y), POL $\iota$  (famille Y) et POL $\kappa$  (famille Y). Bien que toutes les polymérase TLS soient moins fidèles que les ADN polymérase répliquatives, certaines TLS polymérase sont capables de copier de manière relativement précise certaines lésions spécifiques (Chatterjee, N., Walker 2017). Par exemple, POL $\eta$  est capable de reconnaître et contourner les dimères de pyrimidine cyclobutane induits par les UV en incorporant un dimère d'adénine dans le brin néosynthétisé (Kanao et al. 2015). C'est le plus souvent POL $\zeta$  qui permet alors de faire l'extension avant la reprise de la répllication par l'ADN polymérase répliquative. Mises à part les différences de fidélité, les ADN polymérase répliquatives et spécialisées présentent des structures similaires.

L'ADN polymérase  $\theta$  ou POL $\theta$  possède des activités spécifiques en comparaison avec les autres polymérase. Par homologie avec les autres ADN polymérase spécialisées, POL $\theta$  (codée par le gène *POLQ*) synthétise l'ADN avec une processivité modérée et une très faible fidélité. Mais c'est aujourd'hui la seule ADN polymérase qui contient aussi un domaine hélicase. POL $\theta$  se retrouve impliquée dans le processus de TLS pour le contournement des sites abasiques notamment, mais aussi dans la réparation des ICL (page 103) et des cassures double-brin avec la réparation mutagénique TMEJ (page 112). Dans sa fonction d'ADN polymérase TLS, elle peut à la fois faire l'insertion des nucléotides en face du dommage mais aussi réaliser l'extension de l'ADN sur plus de 70 nts contrairement à POL $\eta$  ou POL $\zeta$ , qui ne sont capables de ne faire qu'une seule des deux actions. L'aspect le plus inhabituel et imprévu

de la spécificité des erreurs de POL $\theta$  est le taux élevé de génération d'insertion et de délétion de base unique (indels) ainsi que la génération de translocation lors de la réparation TMEJ (Arana et al. 2008).

L'incorporation de nucléotides incorrects par les TLS polymérases permet donc à la cellule de survivre au dommage et cette activité est notamment nécessaire lors du réarrangement des gènes des immunoglobulines, lors de la recombinaison V(D)J et lors du changement de classe pour la production des anticorps. Cependant, ces incorporations de nucléotides inexacts engendrent aussi des mutations lors du prochain cycle de réplication, qui peuvent être à l'origine de diverses maladies comme le cancer, tout en contribuant également à l'évolution des organismes.

### Chapitre III : Dommages à l'ADN et la réparation des cassures double-brin

Tableau 3 : Les ADN polymérases humaines

<u>ADN polymérases</u>	<u>Gènes</u>	<u>Voies d'actions</u>
<b>Famille A</b>		
<i>POL<math>\gamma</math></i> (gamma)	<i>POLG</i> <i>POLG2</i>	HR, réplication
<i>POL<math>\theta</math></i> (theta)	<i>POLQ</i>	TMEJ, TLS, ICL
<i>POL<math>\nu</math></i> (nu)	<i>POLN</i>	HR, TLS
<b>Famille B</b>		
<i>POL<math>\alpha</math></i> (alpha)	<i>POLA</i> <i>POLA2</i> <i>PRIM1</i> <i>PRIM2A</i>	HR (BIR), réplication
<i>POL<math>\delta</math></i> (delta)	<i>POLD1</i> <i>POLD2</i> <i>POLD3</i> <i>POLD4</i>	HR, réplication, NER, BER, MMR, TLS
<i>POL<math>\epsilon</math></i> (epsilon)	<i>POLE</i> <i>POLE2</i> <i>POLE3</i> <i>POLE4</i>	HR (BIR), réplication, NER, BER,
<i>POL<math>\zeta</math></i> (zeta)	<i>POLZ</i> <i>bREV7</i> <i>REV3L</i>	HR, ICL, TLS
<b>Famille X</b>		
<i>POL<math>\lambda</math></i> (lamda)	<i>POLL</i>	NHEJ, TMEJ, BER
<i>POL<math>\beta</math></i> (beta))	<i>POLB</i>	BER, TLS
<i>POL<math>\mu</math></i> (mu)	<i>POLM</i>	NHEJ, TLS
<i>POL<math>\sigma</math></i> (sigma)	origine controversée	Cohésion des chromatines sœurs, TLS
Terminal deoxynucleotidyle transférase	<i>DNTT</i>	NHEJ
<b>Famille Y</b>		
<i>POL<math>\eta</math></i> (eta)	<i>POLH</i>	TLS, HR, ICL, NER
<i>POL<math>\kappa</math></i> (kappa)	<i>POLK</i>	TLS, HR, ICL
<i>POL<math>\iota</math></i> (iota)	<i>POLI</i>	TLS
<i>Rev1</i>	<i>REV1L</i>	TLS, HR, ICL
<b>Famille RT</b>		
télomérase	<i>hTERT</i>	réplication
<b>Famille PrimPol</b>		
PrimPol	<i>PRIMPOL</i>	réplication

## 6. La réparation des lésions pontantes interbrins de l'ADN (ICL)

Certaines lésions lient les deux brins d'ADN entre eux pour créer un pontage interbrin (Interstrand cross-Link ou ICL). Ces lésions dans lesquelles deux bases complémentaires sont liées de manière covalente sont causés par des agents de réticulation tels que certains agents de chimiothérapies (dont les composés de platine), la mitomycine C (MMC) et les agents d'alkylation (Clauson, Schärer, and Niedernhofer 2013). Ces lésions comprennent les adduits (fixation d'une molécule à un site nucléophile de l'ADN par liaison covalente), les lésions intrabrins et interbrins, mais aussi les réticulations entre l'ADN et les protéines. Ces lésions sont reconnues et réparées par les protéines du groupe de complémentation de l'anémie de Fanconi (FA). L'anémie de Fanconi est une maladie génétique rare causée par des mutations dans les gènes régulant la réparation des pontages interbrins de l'ADN. La famille FA comprend 21 protéines différentes (A, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, V), qui participent à la prise en charge des ICL (Bluteau et al. 2016; Michl, Zimmer, and Tarsounas 2016).

La réparation des ICL est initiée par les protéines FA pendant la phase S du cycle cellulaire (J. M. Kim et al. 2008; Mi and Kupfer 2005). Dans un premier temps, FANCM est recrutée au niveau d'une fourche de réplication bloquée par la présence d'un ICL en même temps que FAAP24 (FA Core Complex Associated Protein 24) et MFH (histone fold protein complex) (Ciccia et al. 2007; Niedernhofer 2007; Yan et al. 2010). Le complexe FANCM – FAAP24 joue plusieurs rôles dans l'activation de la voie en reconnaissant la lésion d'ADN et en recrutant l'ensemble du complexe central FA, en stabilisant la fourche de réplication bloquée et en initiant la signalisation de point de contrôle médiée par ATR (Ciccia et al. 2007; Collis et al. 2008). MHF1 et MHF2 maintiennent l'association de FANCM et FAAP24 stable avec la chromatine (Yan et al. 2010). Outre le complexe FANCM – FAAP24 – MHF1/2, le complexe de réparation des mésappariements MMR (notamment les protéines MSH) joue un rôle redondant dans la détection des dommages à l'ADN et l'activation des voies en favorisant davantage le recrutement du complexe FA sur la chromatine. Pendant l'activation, plusieurs protéines FA subissent une phosphorylation par ATR et CHK1 et sont ainsi activées (Cohn and D'Andrea 2008). ATR phosphoryle CHK1, qui à son tour phosphoryle FANCA, FANCD2, FANCI et le complexe MRN (Duquette et al. 2012; Smogorzewska et al. 2007; X. Wang et al. 2007). D'autres composants du complexe FA (FANCA / B / C / E / F / G / L / T) s'assemblent alors sur le site endommagé et activent l'hétérodimère phosphorylé FANCI–FANCD2 *via* leur mono-ubiquitination médiée par l'ubiquitine ligase FANCL (Smogorzewska et al. 2007). Cette activation de FANCI et FANCD2 par mono-ubiquitination est l'étape la plus importante, qui permet alors le recrutement des endonucléases spécifiques selon le type de

lésions : XPF-ERCC1, MUS8-EME1, SLX4-SLX1, FAN1, ou SNM1A / SNM1B. (Clauson, Schärer, and Niedernhofer 2013).

Ensuite, les lésions sont prises en charge de deux manières différentes dépendant de l'état de prolifération des cellules.

Dans les cellules répliquatives, la présence d'ICL bloque la réplication en cours sur le brin principal continu, ainsi qu'à l'extrémité 5' du brin retardé discontinu à une certaine distance de la lésion (Knipscheer et al. 2009; Räschle et al. 2008). XPF-ERCC1 et SNM1A induisent des incisions de chaque côté de la lésion qui décrochent ainsi l'ICL du brin retardé, produisant ainsi une cassure simple-brin (Wang et al., 2011). Le brin continu, où l'ICL est toujours attaché, devient le substrat de la nouvelle synthèse de l'ADN par les TLS polymérase : POL $\zeta$ , POL $\eta$ , POL $\kappa$  et REV1. La synthèse d'ADN s'étend depuis la lésion, la contourne et se déroule au-delà de la lésion jusqu'à ce qu'elle atteigne le premier fragment d'Okazaki en aval. Après cette étape, le brin 3' surplomb du brin retardé et envahit le brin nouvellement synthétisé grâce à RAD51 (Long et al. 2011). Le mécanisme du NER supprime finalement la lésion ICL qui était toujours accrochée au brin principal et la réparation bascule sur la voie de la recombinaison homologe.

Dans les cellules non-répliquatives, la réparation des lésions ICL se fait grâce aux polymérase TLS telles que REV1 et POL $\zeta$  (Clauson, Schärer, and Niedernhofer 2013). Les lésions déformant l'hélice sont reconnues par les voies GG-NER et TC-NER pour initier la résection de la réparation (Enoiu et al., 2012). Les TLS polymérase infidèles synthétisent le nouveau brin d'ADN et, finalement, l'ICL est supprimé au cycle cellulaire suivant (Clauson, Schärer, and Niedernhofer 2013).

Des mutations dans les gènes FA sont à l'origine du trouble autosomique récessif de l'anémie de Fanconi. La maladie de FA est un trouble hétérogène et rare, caractérisé par une fréquence élevée d'anomalies hématologiques, d'anomalies congénitales et de prédisposition générale aux cancers (Kee and D'Andrea 2010, 2012). L'anémie de FA est diagnostiquée en évaluant l'hypersensibilité des cellules des patients aux agents génotoxiques induisant des ICL tels que le diépoxy-butane (DEB) ou la mitomycine C (MMC). De nombreuses ruptures chromosomiques et la formation de figures chromosomiques radiales sont alors observées (A. D. Auerbach 1993; Arleen D. Auerbach 2009; D'Andrea 2010).

### III. Les mécanismes de réparation des cassures double-brin

Le génome humain est constamment la cible d'agents qui endommagent l'ADN. Comme nous venons de le voir, les dommages sont multiples et variés. Les cassures double-brin (CDBs) sont des lésions très toxiques dont l'origine peut être multiple et menacent l'intégrité et la stabilité du génome. Les cellules réparent les CDBs en utilisant deux mécanismes principaux, la recombinaison homologue (RH) qui ne peut prendre en charge les CDBs qu'à certaine phase du cycle cellulaire en utilisant la chromatide sœur comme matrice de réparation ; et la jonction des extrémités non-homologues (NHEJ) qui est indépendante du cycle cellulaire et consiste en la ligation des extrémités d'ADN endommagées. Ces dernières années, les nouvelles technologies et les dernières découvertes ont permis de mettre en évidence une 3<sup>ème</sup> voie de réparation des CDBs : la voie de réparation de jonction des extrémités médiée par l'ADN polymérase thêta (TMEJ pour theta mediated end joining). Les mécanismes de réparation par « ligature » sont alors subdivisés en deux voies : la voie initiale dite canonique (c-NHEJ pour canonical-non homologous end-joining) et le TMEJ. Finalement, une 4<sup>ème</sup> voie a été identifiée celle du « Single Strand Annealing » (SSA) (Figure 33).

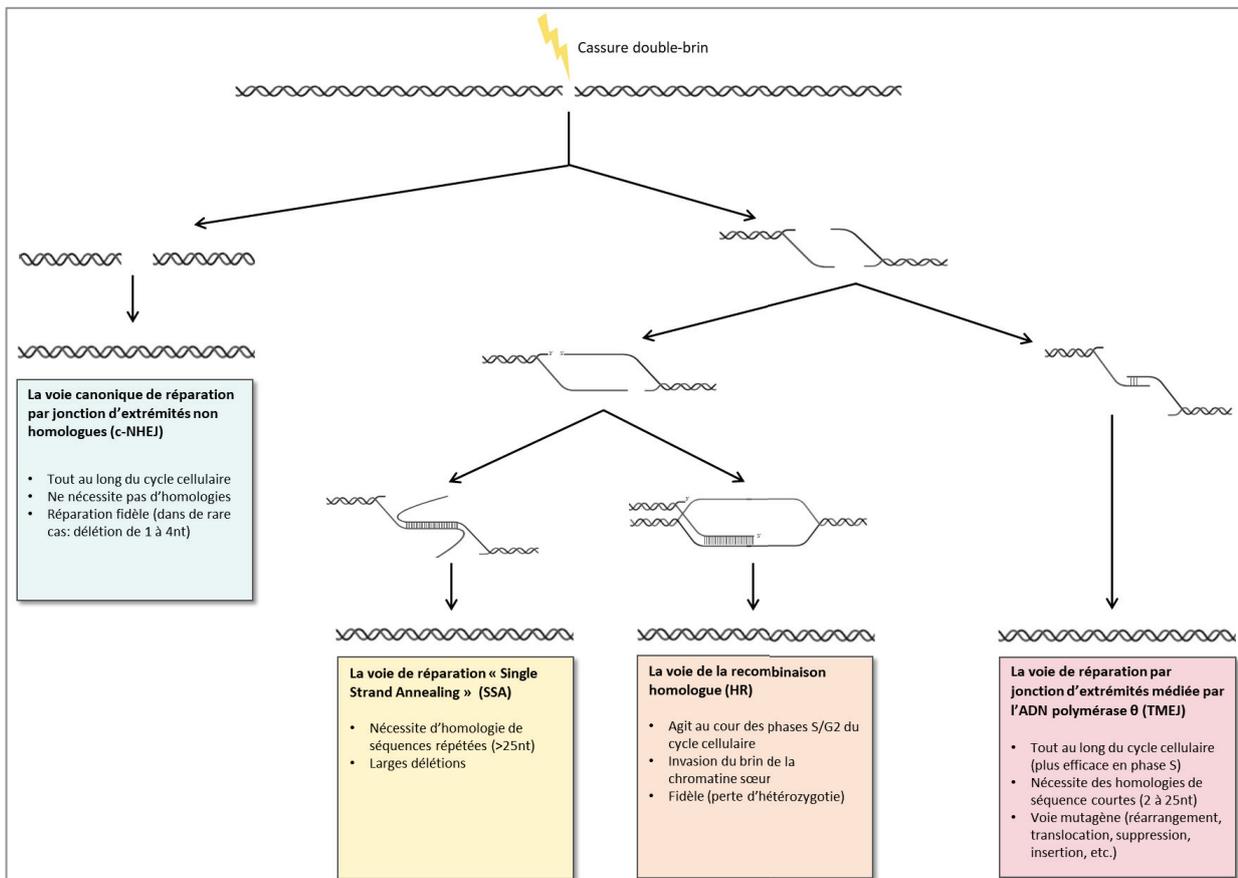


Figure 33: Les voies de réparation des cassures double-brin

### a. La voie de recombinaison homologue (HR)

La recombinaison homologue ou HR est un mécanisme qui contrôle l'équilibre entre la stabilité et la diversité génétique. Ce processus, très conservé au cours l'évolution, permet l'échange de fragments d'ADN entre des ADN possédant des séquences identiques (Jasin and Rothstein 2013; Orr Weaver and Szostak 1983; Szostak et al. 1983). Ainsi, la HR peut prendre en charge la réparation de cassures double-brin en utilisant l'ADN homologue à celui endommagé pour initier la réparation. En phase S, la proximité spatiale entre les chromatides sœurs, qui possèdent des séquences identiques, favorise la recombinaison homologue (Delacôte and Lopez 2008). La HR permet également la résolution des fourches de réplifications bloquées ou des fourches effondrées (Lisby et al. 2004). Mais elle est aussi impliquée dans le bon déroulement de la réplication, dans le maintien des télomères, la commutation de classe des immunoglobulines, le changement de sexe chez les levures et la ségrégation des chromosomes en méiose (Sung and Klein 2006). Ce qui en fait un processus charnière chez de nombreux organismes.

Le modèle de recombinaison homologue le premier découvert et le plus souvent décrit est celui de Szostak prenant en charge les cassures double-brin de l'ADN par un intermédiaire de recombinaison à double jonction de Holliday induisant alors une conversion génique (Szostak et al. 1983). Les jonctions de Holliday sont nommées ainsi car la structure d'échange inter-brins a initialement été décrite dans le modèle de Robin Holliday pour la recombinaison génétique (Holliday 1964). De nombreux aspects sont conservés entre la voie du HR prenant en charge les blocages de fourches de réplication et la voie du HR prenant en charge le CDBs.

Dans le modèle de Szostak, la recombinaison homologue est initiée par l'apparition d'une cassure double-brin (Figure 34). Le mécanisme de recombinaison homologue nécessite une extrémité d'ADN simple-brin 3'-OH sortante. Pour cela, la première étape de la recombinaison homologue consiste en une résection de l'ADN dans le sens 5'-3' pour générer un ADN simple brin (H. Sun, Treco, and Szostak 1991). La résection des extrémités des cassures, par l'action conjointe de nucléases et d'hélicases, est l'une des étapes la plus importante car elle permet d'orienter la réparation vers la voie du HR et non vers la voie du c-NHEJ. La nature de la résection, comme la longueur entre autres, conditionne même le choix entre une réparation par le TMEJ, le SSA ou la HR. Dans la voie de réparation des CDBs par le HR, cette résection se déroule en deux étapes. Une première étape de résection est régulée par le complexe MRN composé de la nucléase MRE11 et des protéines RAD50 et NBS1. Le complexe MRN permet alors le recrutement de l'endonucléase CtIP (Buis et al. 2012; R. S. Williams et al. 2009). Le complexe MRN et la protéine CtIP initient les premiers stades de résection de l'extrémité double-brin (Nicolette et al. 2010; Sartori et al. 2007). Les protéines MRE11 et CtIP interagissent aussi avec la

protéine BRCA1 qui est responsable de la régulation de leur activité (L. Chen et al. 2008). Après l'initiation de la résection, de plus longues résections dépendent de l'exonucléase EXO1 ou alternativement, de l'action combinée de la nucléase et hélicase DNA2 et de l'hélicase BLM (Gravel et al. 2008; Nimonkar et al. 2011a; Sturzenegger et al. 2014). L'association d'EXO1 avec BLM n'est pas nécessaire pour l'activité de l'exonucléase mais la stimule fortement (Nimonkar et al. 2011a). DNA2 possède des activités hélicase et endonucléase mais seule son activité nucléase est requise pour la résection (Sung Ho Bae et al. 1998; X. Chen et al. 2011). DNA2 joue un rôle essentiel dans la maturation des fragments d'Okazaki (S. H. Bae and Seo 2000) La résection des CDBs par DNA2 requiert une ouverture préalable de l'ADN par des hélicases tel que BLM (X. Chen et al. 2011; Gravel et al. 2008; Nimonkar et al. 2011b; Sturzenegger et al. 2014). Bien que dotée d'une activité nucléase bipolaire, DNA2 n'opère que sur le brin 5'. EXO1 agit donc sur le brin opposé. L'ADN simple-brin ainsi formé est ensuite recouvert par RPA, une protéine de liaison à l'ADN simple-brin. La formation du complexe BRCA1-PALB2-BRCA2 permet ensuite le recrutement de la protéine RAD51 au niveau de l'ADN simple-brin (Sy, Huen, and Chen 2009b, 2009a). La protéine BRCA2, en association avec PALB2, conduit, après détachement de la protéine RPA, à la fixation de la protéine RAD51 à l'ADN simple brin (A. A. Davies et al. 2001; Heyer, Ehmsen, and Liu 2010; J. Liu et al. 2010; Sy, Huen, and Chen 2009b, 2009a). La polymérisation de RAD51 sur l'ADN simple-brin forme un filament nucléoprotéique très organisé (Sung and Robberson 1995). BRCA2 stabilise le filament de RAD51 par son interaction direct avec la protéine elle-même, notamment au niveau des fourches de réplication bloquées (O. R. Davies and Pellegrini 2007; Schlacher et al. 2011). Ce filament de RAD51, appelé aussi filament présynaptique, constitue le centre catalytique essentiel pour la recherche d'homologie et pour la formation d'une hybridation entre l'ADN simple-brin et l'un des deux brins de la molécule d'ADN double-brin de la chromatine sœur (Morita et al. 1993). Cette structure forme une boucle D ou D-loop. L'extrémité 3' simple-brin permet alors d'initier une synthèse d'ADN, l'ADN polymérase utilise l'information contenue dans le brin d'ADN intact.

La cassure double-brin peut alors être résolue par :

- Conversion génique (DSBR : double-strand break repair) : la deuxième extrémité 3' de la cassure est également appariée à l'ADN complémentaire intact et prolongée. Ces jonctions entre les quatre brins d'ADN, appelées jonctions de Holliday (Holliday 1964), sont ensuite résolues par des nucléases telles que MUS81-EME1 (G. R. Smith et al. 2003). La résolution des jonctions de Holliday peut se faire avec ou sans crossing-over suivant le type de clivage.
- Modèle d'appariement dépendant de la synthèse d'ADN (SDSA : synthesis-dependent strand annealing) : le brin néo-synthétisé est apparié avec l'extrémité de la cassure double-brin. Une

synthèse d'ADN utilisant le brin néo-synthétisé comme matrice permet de remplir la brèche (Preston, Engels, and Flores 2002).

- Réplication induite par cassure (BIR : break-induced replication) : Cette réparation est utilisée lorsqu'une extrémité du site de cassure est absente ou lors du redémarrage de la réplication après effondrement de la fourche de réplication. L'élongation du brin néo-synthétisé se poursuit alors jusqu'au télomère (Haber and Leung 1996; Morrow, Connelly, and Hieter 1997). Une fourche de réplication unidirectionnelle est formée et entraîne une duplication complète du bras du chromosome ayant servi de matrice (Pardo, Gómez-González, and Aguilera 2009).

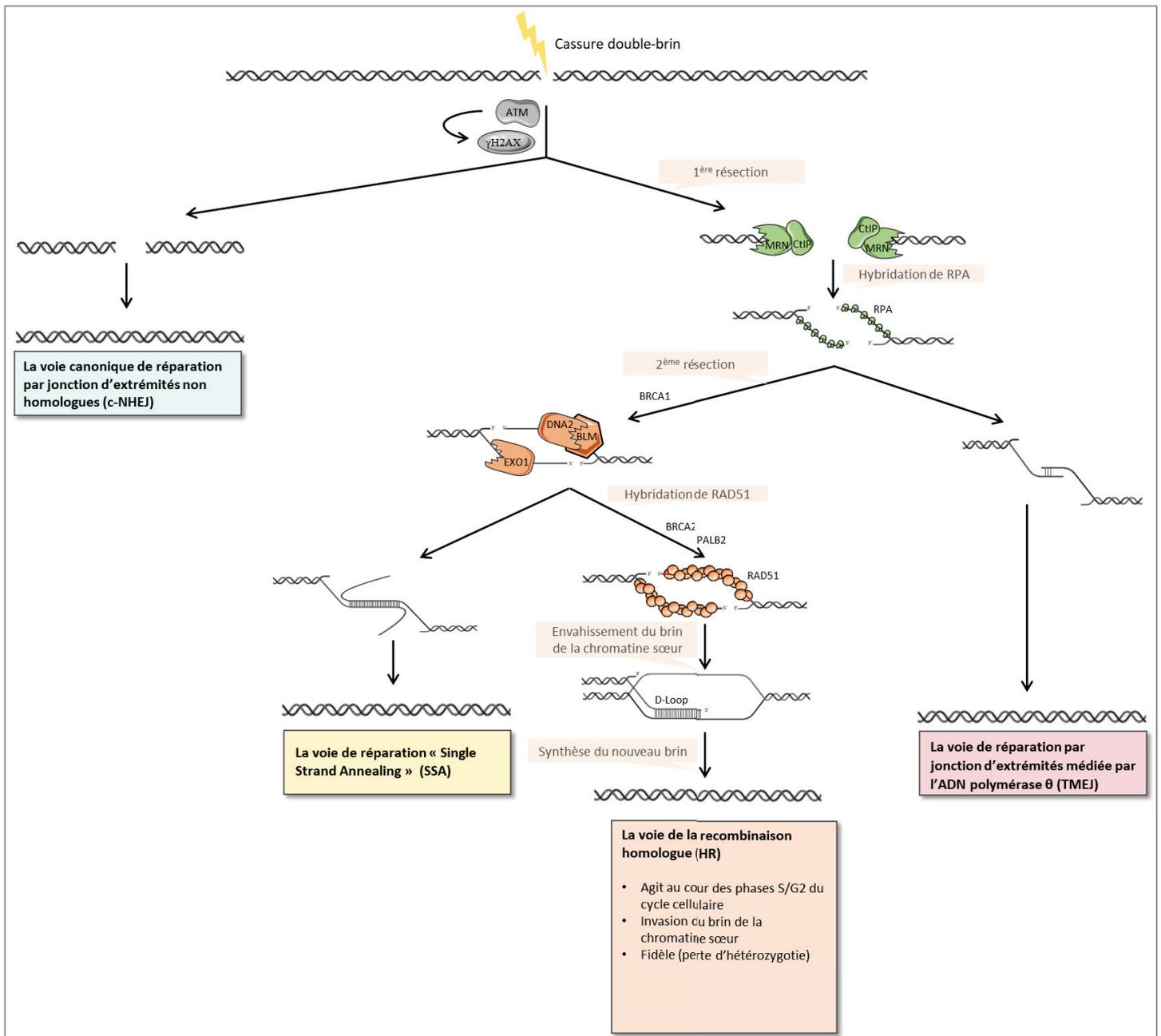


Figure 34: La voie de la recombinaison homologue (HR)

## b. La voie canonique de réparation par jonction d'extrémités non homologues (c-NHEJ)

Initialement découverte dans les cellules de mammifères, la voie de réparation par jonction des extrémités non homologues ou NHEJ est lui aussi un mécanisme très conservé chez tous les eucaryotes ainsi que chez certains procaryotes (Lieber 2010). A l'inverse de la voie du HR, le NHEJ ne requiert pas (ou peu) d'homologie de séquence pour réparer les CDBs car les deux extrémités de celles-ci sont directement reliées. Longtemps décrit comme un processus de réparation infidèle et mutagène, de nombreuses études ont remis en cause ce concept notamment en montrant l'existence de deux modes de réparation par jonction d'extrémités : la voie canonique (c-NHEJ, correspond à la voie communément décrite par NHEJ) et la voie alternative du NHEJ (Alt-NHEJ) autrement appelée jonction d'extrémités médiée par l'ADN polymérase  $\theta$  (TMEJ), ce dernier étant par essence mutagène. Cette deuxième voie sera abordée dans la partie suivante (page 112).

La voie de réparation c-NHEJ est la voie de réparation des CDBs principale chez les mammifères (Figure 35). Ce processus, très rapide, peut être utilisé pendant toutes les phases du cycle cellulaire même s'il est préférentiellement sollicité en phase G1 (Guirouilh-Barbat et al. 2004; Mao et al. 2008; Roth and Wilson 1985; Shibata et al. 2011). Cette voie de réparation se déroule en quatre phases majeures qui sont :

- La protection des extrémités contre la résection par le complexe MRN
- La détection des extrémités générées lors des CDBs
- La maturation de ces extrémités pour les rendre chimiquement compatibles pour une ligation
- La ligation des extrémités

Lors d'une CDB, 53BP1 agit en premier afin de préserver l'intégrité des extrémités de la résection par le complexe MRN (Bothmer et al. 2010; Bunting et al. 2010; Daley and Sung 2014; Zimmermann and De Lange 2014). 53BP1 oriente alors la réparation vers la voie du c-NHEJ. Les CDBs sont ensuite rapidement reconnues par l'hétérodimère KU70/80 (moins de 5 minutes) (Reynolds et al. 2012). L'hétérodimère se fixe à l'ADN indépendamment de sa séquence et avec une grande affinité pour les extrémités double-brin franches ou avec une courte séquence sortante. Il restreint ainsi l'accès des nucléases, tel que le complexe MRN, en interagissant avec chacune des extrémités de la CDB (Mimitou and Symington 2008, 2010). La fixation de ces hétérodimères permet le recrutement de l'apo-enzyme DNA-PKcs (protéine de la famille des kinases PI3K). Ensembles, les protéines Ku et la DNA-PKcs forment le complexe DNA-PK. Ce complexe stabilise les deux extrémités de la CDB ensemble l'une à côté de l'autre, formant ce qu'on appelle la synapse du NHEJ. Il a été proposé que cette synapse permettrait

de maintenir les extrémités à relier à proximité et aussi de limiter l'action de nucléases et une résection des extrémités (Dyanan and Yoo 1998; Weterings and Van Gent 2004). Ce complexe possède une activité d'auto- et transphosphorylation, respectivement sur elle-même et sur une autre DNA-PKcs de l'autre côté de la synapse, essentielle au bon déroulement de la voie c-NHEJ (D. W. Chan et al. 2002; Goodarzi et al. 2006; Uematsu et al. 2007).

Dans une seconde étape, selon la nature de la CDB, une étape de maturation des extrémités peut parfois être nécessaire. Si la CDB présente des bouts francs avec des extrémités 3'-OH et 5'-P, cette étape n'est pas nécessaire et l'étape de ligation peut avoir lieu directement après l'étape de reconnaissance. Si au contraire, la CDB présente des extrémités phosphoglycolates, comme suite à des rayonnements ionisants, des adduits peptide-ADN, suite d'une inhibition de la topoisomérase ou d'autres extrémités non-utilisables par l'ADN ligase IV, des enzymes de maturation sont recrutées pour reconstituer une extrémité 3'OH et 5'P. Parmi ces enzymes impliquées dans la maturation des extrémités, des nucléases telles qu'APLF ou Artemis, des ADN polymérases comme les ADN polymérases de la famille X, des protéines kinases telles que ATM, ou encore des phosphatases comme PPP6R1 peuvent entrer en jeu. L'ensemble de ces protéines travaille pour conduire à la génération d'extrémités liables. L'étape de maturation des extrémités peut s'accompagner du clivage de quelques nucléotides (de 1 à 4nt) aux extrémités et de l'ajout de nouveaux nucléotides par des ADN polymérases peu fidèles de la famille X : POL $\mu$ , POL $\lambda$  ou POL $\beta$  (Craxton et al. 2018; Goedecke, Pfeiffer, and Vielmetter 1994; Loc'h et al. 2019; Moore and Haber 1996; Nicolás and Young 1994; Pryor et al. 2015; Xia et al. 2019). Cette étape de maturation entraîne une certaine variabilité dans les produits de réparation d'une CDB et l'apparition de mutations ponctuelles et de indels (Bétermier, Bertrand, and Lopez 2014).

Enfin, le complexe de ligation est recruté. Le complexe de ligation fait intervenir quatre protéines : l'ADN ligase IV (LIGIV) qui est l'enzyme qui effectue la ligation, la protéine XRCC4 (X Ray sensitivity Cross Complementing factor 4) qui est le cofacteur stabilisant la ligase IV, la protéine XLF (XRCC4 Like Factor autrement appelée Cernunnos), cofacteur du complexe LIGIV-XRCC4 et la protéine PAXX (PAXX pour PAralogue of XRCC4 and XLF) qui permettrait de faire le lien entre le complexe LigIV-XRCC4-XLF et le complexe DNA-PK (Ahnesorg et al., 2006; Riballo et al., 2009 ; Ochi et al., 2015 ; Craxton et al., 2015 ; Tadi et al., 2016).

Ces facteurs semblent cependant accessoires ou redondants, car les cellules déplétées pour ces facteurs présentent une radiosensibilité proche d'une cellule sauvage. Ces facteurs ont soit une activité redondante avec un autre facteur, par exemple PAXX avec XLF, soit ils ne prennent en charge la réparation que d'une sous-catégorie de CDB peu fréquente. Parmi les facteurs cités ci-dessus, les

## Introduction

protéines KU70/80, DNA-PKcs, LIGIV, XRCC4 et XLF sont classées comme facteurs essentiels, alors que les protéines APLF, PAXX, POL $\mu$  et Artemis comme facteurs accessoires.

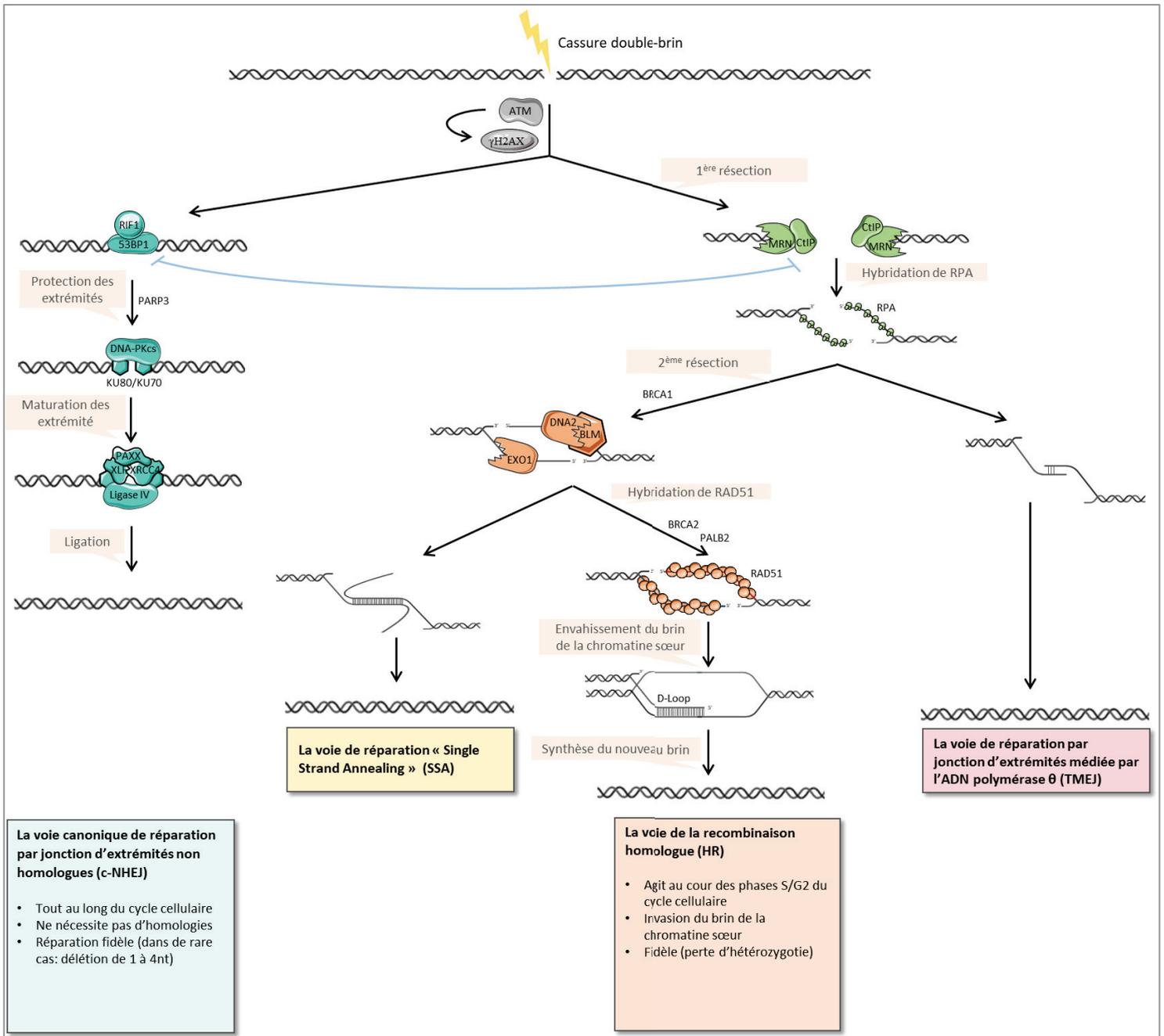


Figure 35 : La voie canonique de réparation par jonction d'extrémités non homologues (c-NHEJ)

### c. La voie de réparation par jonction d'extrémités médiée par l'ADN polymérase $\theta$ (TMEJ)

Récemment découverte, la voie de réparation de jonction d'extrémités médiée par l'ADN polymérase  $\theta$  ou TMEJ a longtemps été considérée comme une voie de secours de la voie c-NHEJ, dans les cas où les protéines KU80 ou XRCC4 ne sont pas fonctionnelles (Boulton and Jackson 1996; Guirouilh-Barbat et al. 2004; Iliakis et al. 2004; H. Wang et al. 2003) mais elle apparaît aujourd'hui comme une voie de réparation à part entière ayant un rôle important dans la réparation des dommages (Corneo et al. 2007; Seol, Shim, and Lee 2018; Truong et al. 2013; Wyatt et al. 2016). Ces dernières années, le TMEJ a pu porter plusieurs noms :

- La voie de secours du NHEJ (backup-NHEJ)
- La voie alternative du NHEJ (Alt-EJ ou Alt-NHEJ)
- La voie réparation de jonction d'extrémités médiée par des microhomologies (MMEJ pour Microhomology-Mediated End-Joining)

La voie de réparation TMEJ permet la prise en charge de certains dommages non réparés par les voies de la HR ou du c-NHEJ.

Cette voie a été mise en évidence par de nombreux laboratoires. L'une des premières démonstrations de cette voie a été la mise en évidence d'une réparation des CDBs dans une souche de drosophile déficiente pour la HR et pour le c-NHEJ (Mith McVey, Radut, and Sekelsky 2004). Ces drosophiles réparent les CDBs en utilisant une microhomologie de séquence. La voie du TMEJ semble donc très conservée et son activité a été détectée dans tous les règnes de la vie et étudiée chez les bactéries (Aniukwu et al, 2008 ; Chayot et al, 2010), les levures notamment chez les *Saccharomyces cerevisiae* (Boulton and Jackson 1996), les drosophiles (Chen et al, 2010), les nématodes tels que *C. Elegans* (Koole et al, 2014), les plantes telles qu'*Arabidopsis thaliana* (Van Kregten et al, 2016) , les poissons tels que le Zébrafish (Thyme et al, 2016) et bien sûr les mammifères (Yan et al, 2007 ; Corneo et al, 2007).

### 1. Le TMEJ : voie de réparation des cassures double-brin

Le modèle de fonctionnement de cette voie se déroule en cinq étapes (Figure 36) :

- La reconnaissance du dommage par PARP1
- La résection des extrémités d'ADN
- L'hybridation, des ADN simple-brin générés, par recherche de microhomologie
- La maturation des extrémités d'ADN générées post-résection
- La ligation des fragments d'ADN

L'initiation de cette voie se fait par la reconnaissance de la CDB par PARP1. Dans le contexte d'une CDB, PARP1 entre en compétition avec l'homodimère KU70/80 (Audebert, Salles, and Calsou 2004; Haince et al. 2008) pour la liaison aux extrémités d'ADN. Le choix entre le recrutement de ces deux facteurs semble être fait grâce à la nature chimique et la composition en nucléotides de l'extrémité de la CDB (Audebert, Salles, and Calsou 2004). PARP1 forme un complexe de protection des extrémités et recrute la protéine CtIP ainsi que le complexe de résection MRN pour recruter ensuite la kinase ATM (Aguilar-Quesada et al. 2007; Mak, Ma, and Poon 2020). Ce complexe ainsi formé effectue une résection dans le sens 5'-3' des extrémités générées au site de la cassure (Bennardo et al. 2008). Cette étape génère deux ADNs de plusieurs nucléotides de chaque côté de la CDB. Les ADNs présentent de façon stochastique des zones de microhomologie. Les ADNs aux extrémités de la cassure s'apparient au niveau des microhomologies de séquences (de 5 à 25pb) plus ou moins distales par rapport au site de cassure (Mitch McVey and Lee 2008; Roerink, Schendel, and Tijsterman 2014). Le choix entre le c-NHEJ et le TMEJ se fait donc *via* l'initiation ou non de la résection de l'ADN par le complexe MRN – CtIP (Grabarz et al. 2013; Rass et al. 2009; A. Xie, Kwok, and Scully 2009). La taille et la nature de l'ADN formé, détermine quant à elle, le choix entre le TMEJ et la HR (Rass et al., 2009). De plus, certaines phases du cycle cellulaire modulent le choix entre les voies de réparation HR, TMEJ et c-NHEJ. Il semblerait en effet que le TMEJ soit plus efficace en phase S (Ceccaldi et al. 2015). En phase M ou en phase G1, BLM limite la résection par MRN/CtIP afin de limiter la réparation par le TMEJ (Grabarz et al., 2013).

Bien que les deux mécanismes, TMEJ et HR, partagent le même processus de résection initiale, le traitement des extrémités réséquées en HR est déterminé par RAD51, tandis que PARP1 est responsable de l'adressage de la CDB aux acteurs de la voie TMEJ. PARP1 a été proposé pour servir de plate-forme pour recruter des facteurs de réparation du TMEJ, tels que l'ADN Polymérase  $\theta$ , une enzyme multidomaine qui est peu exprimée dans les tissus normaux mais surexprimée dans les tumeurs. Initialement décrite comme une TLS polymérase, l'ADN Polymérase  $\theta$  ou POL $\theta$  (codée par le

gène *POLQ*) permet la reconnaissance des séquences de microhomologies au niveau des ADNs de la cassure. *POLθ* prend alors en charge la maturation des extrémités d'ADN générées post-résection en permettant l'appariement de microhomologies et la synthèse de l'ADN complémentaire. Pour cela, *POLθ* agit sous la forme d'un dimère permettant ainsi de faire la synthèse des deux brins dans le sens 5'-3' (Black et al. 2016, 2019; Newman et al. 2015). La modulation entre les voies HR et TMEJ ne s'arrête pas à la présence de PARP1 ou non, ni à la phase du cycle cellulaire ou encore à la nature de la résection. *POLθ* a été identifiée comme un acteur de l'inhibition de la voie du HR. En effet, *POLθ* est directement responsable de l'inhibition du HR en se liant à RAD51, empêchant ainsi la formation du nucléofilament de RAD51 (Brambati, Barry, and Sfeir 2020; Ceccaldi et al. 2015; Konstantinopoulos et al. 2015; Mateos-Gomez et al. 2015).

Enfin, la dernière étape est celle de la ligation des brins synthétisés par le dimère de *POLθ*. Cette étape de ligation est majoritairement réalisée par l'ADN Ligase III associée à XRCC1 (Simsek and Jasin 2010).

Une des principales différences entre cette voie de réparation TMEJ et la voie c-NHEJ est la génération de variabilité génomique (Guirouilh-Barbat et al. 2004). Le TMEJ est donc l'une des voies les plus mutagènes. Il est responsable de longues insertions et délétions et constitue également une source majeure de translocations et de réarrangements chromosomiques (Roerink, Schendel, and Tijsterman 2014; J. Schimmel et al. 2019; Joost Schimmel et al. 2017). Cette production d'instabilité conduit la voie TMEJ à être impliquée dans l'origine de certains cancers mais aussi dans la résistance aux traitements (Stephens et al. 2009; Yanming Zhang and Rowley 2006).

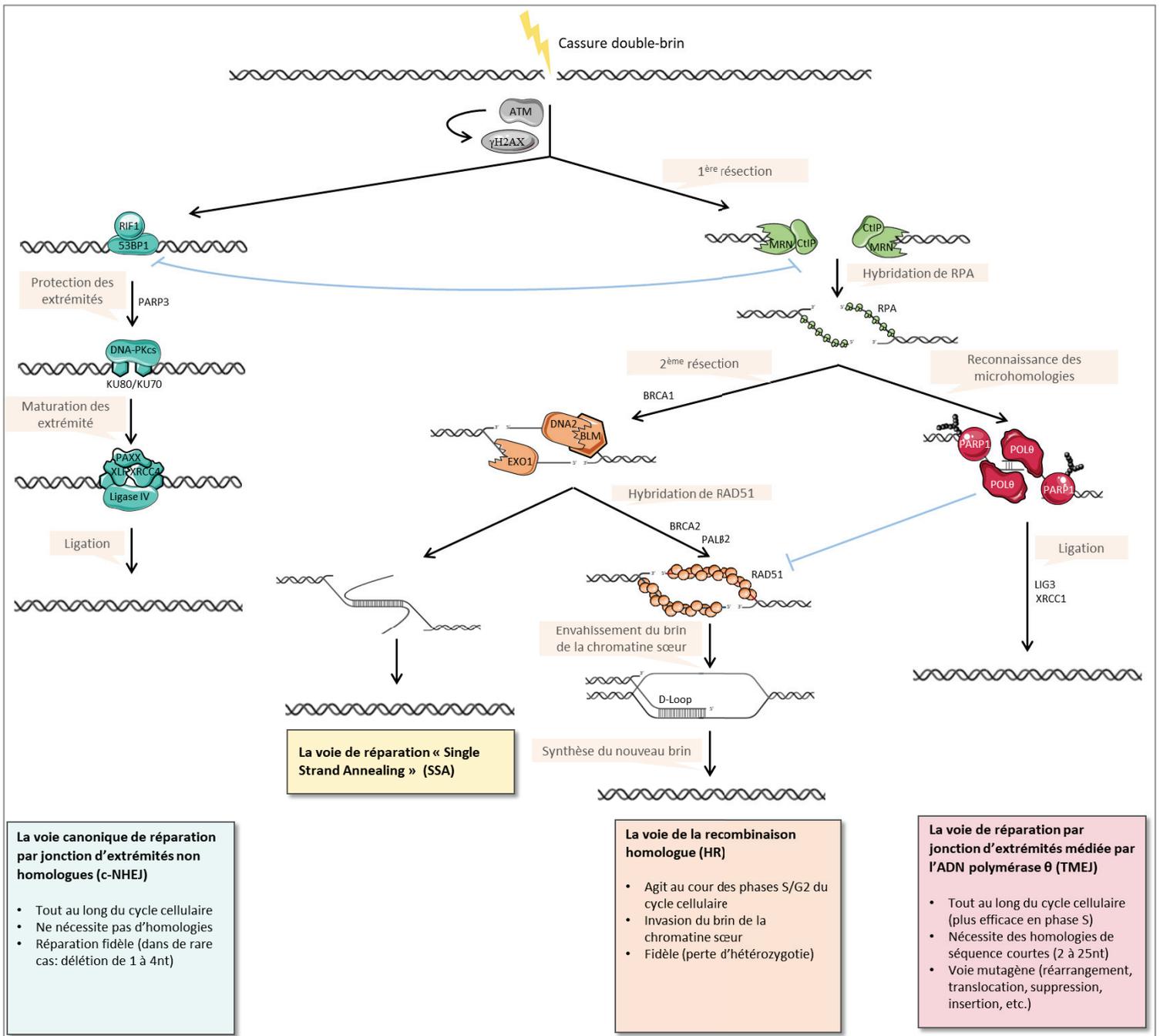


Figure 36 : La voie de réparation par jonction d'extrémités médiée par l'ADN polymérase θ (TMEJ)

## 2. *Le TMEJ, voie de réparation intervenant dans la réplication de l'ADN*

POL $\theta$  est présente et active tout au long du cycle cellulaire en l'absence de stress de réplication et de dommages à l'ADN. Cependant son activité semble accrue lors de la phase de réplication de l'ADN. L'expression de POL $\theta$  est corrélée avec l'expression des gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et de la réplication de l'ADN. De nombreux articles montrent notamment que le TMEJ est plus efficace lors de la phase S du cycle cellulaire (Baldacci, Hoffmann, and Cadoret 2015; Black et al. 2019; Ceccaldi et al. 2015; Wood and Doublé 2016) .

Aujourd'hui peu de données expliquent le rôle de POL $\theta$  dans la réplication hormis ses activités de réparations dans les voies TLS, ICL et dans le TMEJ. Cependant, POL $\theta$  semble jouer un rôle important dans la détermination du moment de la réplication dans les cellules humaines. Les cellules dépourvues de POL $\theta$  présentent une densité normale d'origines de réplication (OR) activées en phase S, mais des décalages précoces à tardifs et tardifs à précoces sont observés en présence ou en absence de POL $\theta$  dans un certain nombre de domaines de réplication montrant ainsi un rôle essentiel de POL $\theta$  dans l'initiation de la réplication de l'ADN. Pour cela, POL $\theta$  se lie à la chromatine au début de la phase G1 et interagit avec les composants Orc2 et Orc4 du complexe de reconnaissance d'origine limitant ainsi l'interaction des protéines MCM avec les origines de réplication tardive. La surexpression de POL $\theta$ , en revanche, provoque un retard de la réplication. Lorsque POL $\theta$  est exprimé, il se lie aux ORC des origines tardives en G1 et inhibe le recrutement de l'excès de MCM afin d'éviter l'activation de la réplication précoce de ces origines tardives. Lorsque POL $\theta$  est surexprimé, il pourrait également se lier aux origines précoces-moyennes *via* l'interaction ORC et retarder par conséquent leur activation. POL $\theta$  permet donc d'établir certains domaines de réplication tardive en phase S et empêche ces derniers d'être activés au début de la phase S (Fernandez-Vidal et al. 2014).

## 3. *Le TMEJ et la létalité synthétique*

Dans les cancers humains, une carence dans une voie de réparation de l'ADN peut entraîner une hyper-dépendance cellulaire à une seconde voie de réparation compensatoire de l'ADN. C'est le cas pour la prolifération des cellules cancéreuses déficientes en HR où l'expression de POL $\theta$  est particulièrement cruciale pour leur survie. En conséquence, cette réparation mutagène est apparue comme une cible attrayante pour le traitement du cancer, et des inhibiteurs sont actuellement en développement. En effet, plusieurs équipes ont pu mettre en évidence que les CDBs sont réorientées vers une réparation par le TMEJ lorsque HR et NHEJ sont compromises. Les cellules dépourvues de BRCA1 ou BRCA2, ou alors en KU80, KU70 et LIG4 dépendent du TMEJ pour leur survie (Ceccaldi et al.

2015; Mateos-Gomez et al. 2015; Wyatt et al. 2016). Ce phénomène de dépendance des cellules BRCAness (déficientes en HR) à la réparation par le TMEJ, les rendent sujettes à la létalité synthétique. La létalité synthétique correspond à la mort cellulaire lors de la déficience (mutation ou la perte d'expression) simultané d'au moins deux gènes, alors que la mutation de l'un d'entre eux seulement n'induit pas la mort de celle-ci. La létalité synthétique est très utile en clinique dans le traitement des cancers. La démonstration initiale de la déficience synthétique liée à *POLQ* a été la découverte lors d'un désavantage développemental marqué chez les souris à double mutant *ATM*<sup>-/-</sup> et *POLQ*<sup>-/-</sup> (Shima, Munroe, and Schimenti 2004). Les quelques souris survivantes ont présenté un stress lié aux dommages à l'ADN, y compris une augmentation de l'instabilité chromosomique et une diminution du poids corporel. En tant que régulateur principal des réponses au stress, la perte de l'ATM perturbe les voies qui ont de telles séquelles, y compris la réduction de l'activité des RH dans certains cas. Cependant, l'inhibition directe de l'activation de l'ATM avec l'inhibiteur KU55933 a certes augmenté la radiosensibilité des cellules *POLQ*<sup>+/+</sup> mais pas dans les cellules *POLQ*<sup>-/-</sup>, indiquant que la létalité synthétique liant *ATM* et *POLQ* implique plus que l'activité kinase d'ATM seule (Goff et al. 2009). De nombreuses équipes ont mis en évidence une létalité synthétique de *POLQ* avec RAD51 (S. H. Chan, Yu, and McVey 2010), FANCD2 (Ceccaldi et al. 2015; Kais et al. 2016) et BRCA1 (Mateos-Gomez et al, 2016). Cependant, les inhibiteurs de *POLQ* ne sont pas encore disponibles. De nombreuses équipes ont donc utilisé les inhibiteurs de PARP1 (autre acteur du TMEJ) et ont montré une toxicité accrue dans les cellules BRCA1/2 déficientes. C'est notamment la thérapie utilisée dans le traitement des cancers du sein héréditaires mutés pour BRCA1/2. La perte de BRCA1/2 dans les cellules cancéreuses permet de les rendre sensible lorsque la voie du TMEJ est ciblée par l'inhibition de PARP1 (olaparib ou talazoparib approuvés par la FDA). Ces inhibiteurs ont donc une bonne efficacité sur ces tumeurs même si aujourd'hui aucun lien n'a été encore montré entre l'inhibition de *POLQ* et de PARP1. Il est donc intéressant de déterminer si *POLQ* et PARP1 fonctionnent ensemble dans la voie du TMEJ.

### d. La voie de réparation par l'hybridation de brins complémentaires (SSA)

La voie du single strand annealing (SSA) est une voie de réparation utilisant une longue séquence d'homologie sans invasion d'un brin homologue comme observé lors de la réparation du HR (Lin et al. 1984 ; Fishman-Lobell et al., 1992 ; Maryon and Carroll, 1991). Cette réparation est initiée lorsqu'une CDB est présente entre deux séquences répétées orientées dans le même sens tel que les séquences ALU (White et al, 2015 ; Bhargava et al, 2016). Parmi toutes les voies de réparation utilisant l'homologie de séquence, le SSA est le plus simple mais aussi le plus mutagène (Figure 37). Une fois la résection 5'>3' accomplie par le complexe MRN, les deux brins d'ADNs générés s'apparient au niveau de régions

complémentaires (>25pb), générant inévitablement des délétions importantes (McVey and Lee, 2008). Un appariement inter-chromosomique est, quant à lui, une source majeure de translocations (Lin et al., 1990 ; Pannunzio et al., 2008). L'invasion de brin n'étant pas une étape dans ce processus, le SSA est indépendant de RAD51, il est même favorisé en absence de ce dernier (Ivanov et al., 1996 ; Sugawara et al., 2000). En revanche, il est exclusivement dépendant de RAD52 et de RAD59 (Bai and Symington, 1996 ; Sugawara and Haber, 1992). Une fois l'appariement accompli par RAD52-RAD59, les brins 3' non complémentaires flottants sont clivés par les nucléases du complexe RAD1-RAD10 ou MSH2-MSH3 ou encore ERCC1-XPF (Ivanov and 80 Haber, 1995 ; Sugawara et al., 1997 ; Bennardo et al, 2008). Les brèches simple-brin sont comblées par une synthèse d'ADN suivie d'une ligature.

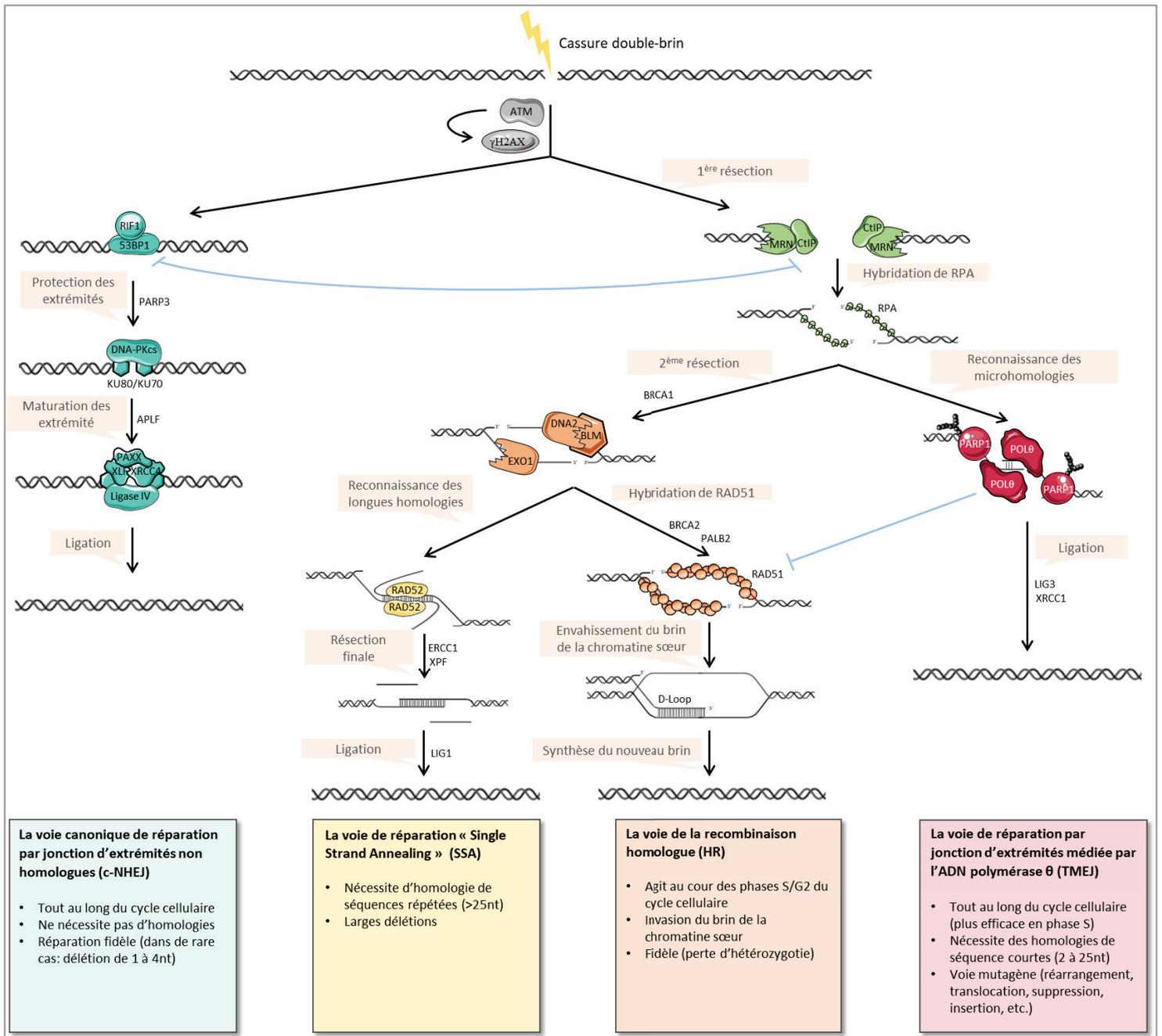


Figure 37: La voie de réparation « Single Strand Annealing » (SSA)

# Chapitre IV : Modulation des voies de réparations des dommages de l'ADN

## I. Implication de l'EMT dans la régulation de la signalisation des dommages

Comme nous avons déjà pu le voir, l'EMT est un processus physiologique réversible indispensable pour les étapes clés de l'embryogenèse et jouant un rôle majeur chez l'adulte dans le processus de cicatrisation des plaies, expliquant notamment ses aspects pathologiques dans la fibrose et le cancer. Ce processus est associé à une vaste reprogrammation épigénétique orchestrée par les EMT-TFs, en particulier les membres de la famille SNAIL, ZEB et TWIST. Les interactions physiques multiples entre les EMT-TFs et les grands complexes de remodelage des protéines de chromatine tendent à montrer que les EMT-TFs peuvent avoir d'autres rôles que la simple régulation de l'expression génique des gènes épithéliaux et mésenchymateux.

La chromatine est la plateforme centrale qui régule l'expression des gènes, la réplication de l'ADN et la réparation de l'ADN. La structure dynamique de la chromatine et ses interactions avec de nombreux complexes protéiques sont cruciaux pour maintenir l'intégrité du génome et a donc un grand impact sur la signalisation des dommages à l'ADN. La réponse aux dommages à l'ADN (DDR) est, comme expliquée dans le chapitre III, une voie de signalisation complexe qui détecte les dommages à l'ADN et mobilise une cascade de signalisation conduisant à la réparation de l'ADN ou à la mort cellulaire, contrôlant ainsi le destin des cellules. La DDR nécessite donc une régulation très fine et des études récentes ont montré comment les EMT-TFs peuvent l'influencer.

Il y a quelques années, Zhang et ses collaborateurs ont identifié ZEB1 comme une cible d'ATM en réponse à des dommages à l'ADN. Il a été démontré que la forme phosphorylée de ZEB1 par ATM interagit directement avec l'enzyme de désubiquitylation USP7 qui, à son tour, déclenche la stabilisation de CHK1 pour favoriser la réparation de l'ADN homologue dépendante de la recombinaison (P. Zhang et al. 2014). A l'inverse, la perte de ZEB1 impacte directement l'abondance de la protéine CHK1, mais pas celle de CHK2. Ce travail a été l'un des tout premiers à établir un lien entre EMT et DDR et a impliqué ZEB1 dans la radiorésistance. Plus récemment, il a été montré que le rôle du facteur de transcription de ZEB1 permet d'influencer la DDR. Ainsi, ZEB1 forme un complexe avec p300/pCAF pour activer le promoteur d'ATM participant ainsi à une boucle de rétroaction positive avec ATM et augmente la capacité de réparation de l'ADN en réponse à la radiothérapie ou à la chimiothérapie (X. Zhang et al. 2018; Yun Zhang and Weinberg 2018). Les radiations augmentent spécifiquement la stabilité de la protéine ZEB1 tout en n'ayant aucun effet sur les protéines SNAIL, SLUG ou TWIST1/2 (Yu Lin et al. 2018). Dans le contexte de déficit en ATM, Song et ses collaborateurs

## Introduction

ont montré que l'inhibition de la ZEB1 induisait la phosphorylation de CHK1 et l'arrêt en phase S en réponse aux inhibiteurs d'ATR (Song et al. 2018).

L'équipe de Zhang et des collaborateurs, qui ont pour la première fois impliqué ZEB1 dans le DDR, ont identifié une interaction entre les miRNA, ZEB1 et la DDR. En effet, comme expliqué précédemment, ATM phosphoryle et stabilise ZEB1 lors de l'irradiation, qui, à son tour, réprime la transcription de son propre régulateur négatif : miR-205 (P. Zhang et al. 2014; X. Zhang et al. 2018). D'autres miARN ont été associés à cette interaction, comme le miR-195 qui cible à la fois ZEB1 et CHK1 lors d'un stress génotoxique (C. Kim et al. 2018). La répression de l'expression de ces miARN renforce l'activation de ces voies de signalisation et de réparation des dommages à l'ADN sous l'influence des EMT-TFs dont ZEB1 qui semble avoir un rôle primordial.

La question de savoir si le processus d'EMT en soi ou si des régulateurs spécifiques de l'EMT, tel que les EMT-TFs, sont des moteurs du DDR indépendamment du processus d'EMT est toujours en débat. RNF8, une ubiquitine ligase E3, est recrutée sur le site de la CDB et interagit avec MDC1 phosphorylé. MDC1 (Mediator Of DNA Damage Checkpoint 1) est un régulateur du cycle cellulaire et permet le recrutement de nombreuses protéines au niveau des sites de dommages à l'ADN. MDC1 constitue donc un site de liaison pour RNF8 afin de favoriser l'ubiquitination des histones H2A et H2AX. RNF8 favorise également l'ubiquitination de TWIST1 pour sa localisation dans le noyau, et, à son tour, TWIST1, module la DDR en activant la transcription de HOXA9, conduisant à une expression accrue des gènes de la voie de réparation de la HR (Malek et al. 2017; P.T. Tran et al. 2014). BMI1, sous-unité du complexe répressif Polycomb 1 (PRC1), coopère avec TWIST1 pour moduler la transcription de gènes impliqués dans l'induction de l'EMT ainsi que des propriétés de cellules souches. NBS1 (du complexe MRN) aide, quant à lui, dans le recrutement de BMI1 aux CDBs et à la phosphorylation de MDC1. ATM facilite l'accumulation de PRC1 sur les sites de transcription proches des CDBs (Kakarougkas and Jeggo 2014) afin de réprimer l'expression des gènes au voisinage des dommages. En réponse aux dommages à l'ADN, BMI1 améliore le recrutement de 53BP1 aux CDBs et médie l'ubiquitination de l'histone H2A et  $\gamma$ H2AX, facilitant ainsi la réparation des CDBs par la HR ou par le c-NHEJ (Lin et al., 2015).

Certains EMT-TFs, tels que ZEB1 et TWIST1, semblent être des régulateurs importants de la voie de signalisation de la DDR.

### II. Modulation des voies de réparation des cassures double-brin par les acteurs de la réparation

Compte tenu de la variété des situations dans lesquelles les CDBs peuvent apparaître, y compris de lors de mécanismes endogènes tels que la méiose, la réplication de l'ADN ou même dans les cellules non répliquatives (phase G0), la présence de plusieurs systèmes de réparation spécialisés n'est pas surprenante. Les voies de réparation des CDBs décrites dans le chapitre III peuvent entrer en concurrence ou même collaborer à la réparation. La régulation de ces voies est donc indispensable, et de nombreux mécanismes existent pour moduler le choix entre les différentes voies utilisées selon les conditions (Figure 38).

Dans un premier temps, l'étape de la résection de l'ADN joue un rôle clé dans le choix de la voie de réparation des CDBs. La résection initiale rend les extrémités de la CDB disponibles pour la HR, SSA ou TMEJ mais non disponibles pour le c-NHEJ. Cette résection est limitée à des tronçons assez courts, environ 20 pb, et est réalisée par le complexe MRE11 et CtIP, rendant les extrémités également accessibles pour le TMEJ (Ahrabi et al. 2016). Dans une deuxième phase de résection, l'hélicase BLM et EXO1 génèrent les longues queues simple-brin indispensables pour initier la HR (Truong et al. 2013) ou le SSA.

D'autres acteurs clés des voies de réparation des CDBs de l'ADN peuvent être à l'origine du choix de l'une de ces voies. Par exemple, BRCA2, facteur essentiel de la RH permettant entre autres le recrutement de RAD51 sur ADNs<sub>b</sub>, est capable par la stabilisation des protéines RPA d'inhiber l'activité du TMEJ (Ahrabi et al. 2016). Si BRCA2 n'est pas exprimé ou la protéine mutée, RPA est déstabilisé et l'activité du TMEJ augmente, même en présence de RAD51 (Han et al. 2017). BRCA2, dans le complexe avec une protéine hautement acide appelée DSS1, une enzyme de modifications post-traductionnelles, (Yinghao Zhang et al. 2014), aide à charger le filament RAD51 pour promouvoir la HR. Mais DSS1 permet également le basculement entre la réparation par la voie HR ou par la voie SSA. En effet, sans BRCA2, DSS1 forme un complexe avec RAD52. Dans ce complexe, DSS1 facilite la réparation par le SSA *via* la stimulation des activités de liaison et d'invasion du brin RAD52. Par conséquent, en l'absence de BRCA2, le complexe RAD52/DSS1 devient indispensable pour traiter les CDBs ou la réparation des fourches de réplication *via* la voie du SSA (Stefanovie et al. 2020). Quant aux protéines de l'anémie de Fanconi, elles favorisent l'utilisation de la réparation par RH dans les cellules de mammifères. Alors que RAD51 et BRCA2 sont tous deux des acteurs clés de l'étape de l'invasion du brin d'ADN de la voie de la HR, BRCA1 et les protéines FANC peuvent réguler les étapes communes aux voies HR et SSA. FANCA, FANCG et FANCD2 sont connus pour promouvoir la voie de réparation HR (Nakanishi et al. 2005). Mais seule la perte de FANCA réduit significativement l'activité de la voie SSA (Y. G. Yang et al.

## Introduction

2005). FANCA favorise la résection bidirectionnelle simple brin et l'échange de brins qui jouent un rôle important, en particulier dans la voie SSA (Benitez et al. 2018). Finalement, POL $\theta$ , acteur clé du TMEJ, est également capable de moduler l'activité de la voie HR (Mateos-Gomez et al. 2017a). En effet, POL $\theta$  interagit directement avec RAD51, limite l'assemblage du nucléofilament de RAD51, et réprime ainsi la voie HR en faveur du TMEJ (Ceccaldi et al. 2015).

Un autre mode de régulation des voies des réparation des CDBs a émergé de plusieurs études sur les interactions fonctionnelles entre BRCA1 et 53BP1. Bunting et ses collaborateurs ont montré que 53BP1 favorise le c-NHEJ en bloquant la résection de l'ADN dépendant de CtIP et permettant ainsi aux CDBs de conserver les extrémités d'ADN franches appropriées pour la reconnaissance par l'ADN ligase 4, l'enzyme responsable de la ligation des extrémités de l'ADN pendant la réparation du c-NHEJ (Bunting et al. 2010). Une autre étude montre que BRCA1 favorise la déphosphorylation de 53BP1, ce qui libère RIF1 et permet de passer de la réparation par le c-NHEJ à la voie de HR (Isono et al. 2017). De manière constante, il a été rapporté que la perte de 53BP1 ou RIF1 améliore le recrutement de la résection dépendante de BRCA1, de CtIP/MRE11 et de RPA en phase G1, mais pas de RAD51, ce qui a pour conséquence de promouvoir l'activité TMEJ mais n'est cependant pas suffisant pour stimuler la HR (Bakr et al. 2016).

La synthèse de polymères d'ADP-ribose (PAR), catalysée par des membres de la famille des protéines PARP, est un puissant régulateur des voies de réparation de l'ADN. L'activité de PARP1, PARP2 et PARP3 augmente en réponse aux dommages de l'ADN et en particulier aux CDBs. PARP1 s'est avérée être impliquée dans la réparation des CDBs par la voie du TMEJ alors que PARP3 favorise la réparation des CDBs par la voie c-NHEJ. PARP2, quant à lui, semble avoir un rôle important dans la régulation du choix des voies de réparation des CDBs. Plus en détails, PARP1, en plus de son rôle dans TMEJ, semble être une plateforme de régulation de l'équilibre entre les voies du HR et du TMEJ. En effet, PARP1 favorise le recrutement de plusieurs protéines participant à la régulation de la voie de réparation de l'ADN. Timeless, par exemple, est recruté sur des sites de dommages à l'ADN *via* PARP1 pour favoriser la réparation des CDBs par le HR indépendamment de l'activité de PARylation (S. Xie et al. 2015). Timeless joue donc un rôle important dans le contrôle de la réplication de l'ADN, le maintien de la stabilité de la fourche de réplication, le maintien de la stabilité du génome tout au long de la réplication normale de l'ADN, la réparation de l'ADN et dans la régulation de l'horloge circadienne. Par son interaction avec PARP1, Timeless favorise l'activité de la voie de la RH. L'interaction de cGAS, une nucléotidyltransférase agissant comme un détecteur cytosolique d'ADN, et de PARP1, quant à elle, empêche la formation du complexe PARP1-Timeless et supprime ainsi la réparation par la HR (H. Liu et al. 2018). PARP1 semble favoriser la réparation mutagène du TMEJ en inhibant la réparation du c-NHEJ médiée par l'interaction inhibitrice PARP1-KU70 et PARP1-LIG4 sur le domaine BRCT de PARP1

(Hochegger et al. 2006; Paddock et al. 2011). PARP2 limite l'accumulation de 53BP1 sur l'ADN cassé, facilitant la résection finale de l'ADN dépendant de CtIP et en limitant l'activité du c-NHEJ (Fouquin et al. 2017). Enfin, PARP3 limite la résection des extrémités de l'ADN et favorise l'activité c-NHEJ par l'interaction directe avec les protéines KU70 / KU80 PARylées. L'épuisement de PARP3 entrave le recrutement de YFP-KU80 vers les sites de dommages à l'ADN induits par le laser et induit un déséquilibre entre les voies spécifiques de BRCA1 et 53BP1 (Beck et al. 2014). Parallèlement, la protéine PARG est également un puissant régulateur de la PARylation. En effet, la participation de PARG aux événements de réparation des dommages à l'ADN est principalement due à sa capacité à dégrader la PAR des protéines et des histones PARylées. Dans les cellules cancéreuses du sein, les foyers DNA-PKcs, au niveau des CDBs, sont augmentés en réponse à l'inhibition de PARG, ce qui indique une augmentation de la voie du c-NHEJ. La perte de PARG, PARG-2 chez *C. Elegans*, augmente l'activité du TMEJ qui est réduite par la combinaison de la déplétion *PARG* et *POLQ* (W. Bae et al. 2020). Dans ce cas, PARG limite l'accumulation de RPA aux CDBs.

Les facteurs épigénétiques peuvent également jouer un rôle important dans la modulation des voies de réparation de l'ADN. Par exemple, l'équipe du laboratoire du Dr Jackson a montré que HDAC1 et HDAC2 participent à la DDR par leur recrutement aux dommages à l'ADN et par leur régulation de l'acétylation des histones H3K56 et H4K16. Les HDAC1 et 2 participent aussi de manière surprenante à la stimulation de la réparation de l'ADN, notamment de la voie du c-NHEJ, vraisemblablement en remodelant la chromatine favorisant ainsi la réparation par le c-NHEJ (Miller et al. 2010). Plus récemment, d'autres résultats ont indiqué que l'USP19 semble également être un facteur clé dans la modulation de la réparation des dommages à l'ADN en interagissant directement avec les HDAC1/2 et en favorisant leur désubiquitination. La perte de USP19 provoque une instabilité du génome et contribue même à la tumorigenèse en raison de leur incapacité à réparer les CDBs par le c-NHEJ (M. Wu et al. 2017). USP38 semble lui aussi favoriser l'activité du c-NHEJ par l'activation des HDAC1/2 (Y. Yang et al. 2020).

Les voies de réparation de l'ADN sont fortement régulées par des acteurs externes mais aussi entre elles et s'équilibrent les unes avec les autres. Lorsque cet équilibre est perturbé et qu'une voie ne peut pas assurer la réparation des dommages à l'ADN, une autre voie prend le relais. Tous ces processus sont une garantie, pour les cellules, de préserver l'intégrité du génome et donc la survie des cellules parfois au détriment de l'instabilité du génome.

## Introduction

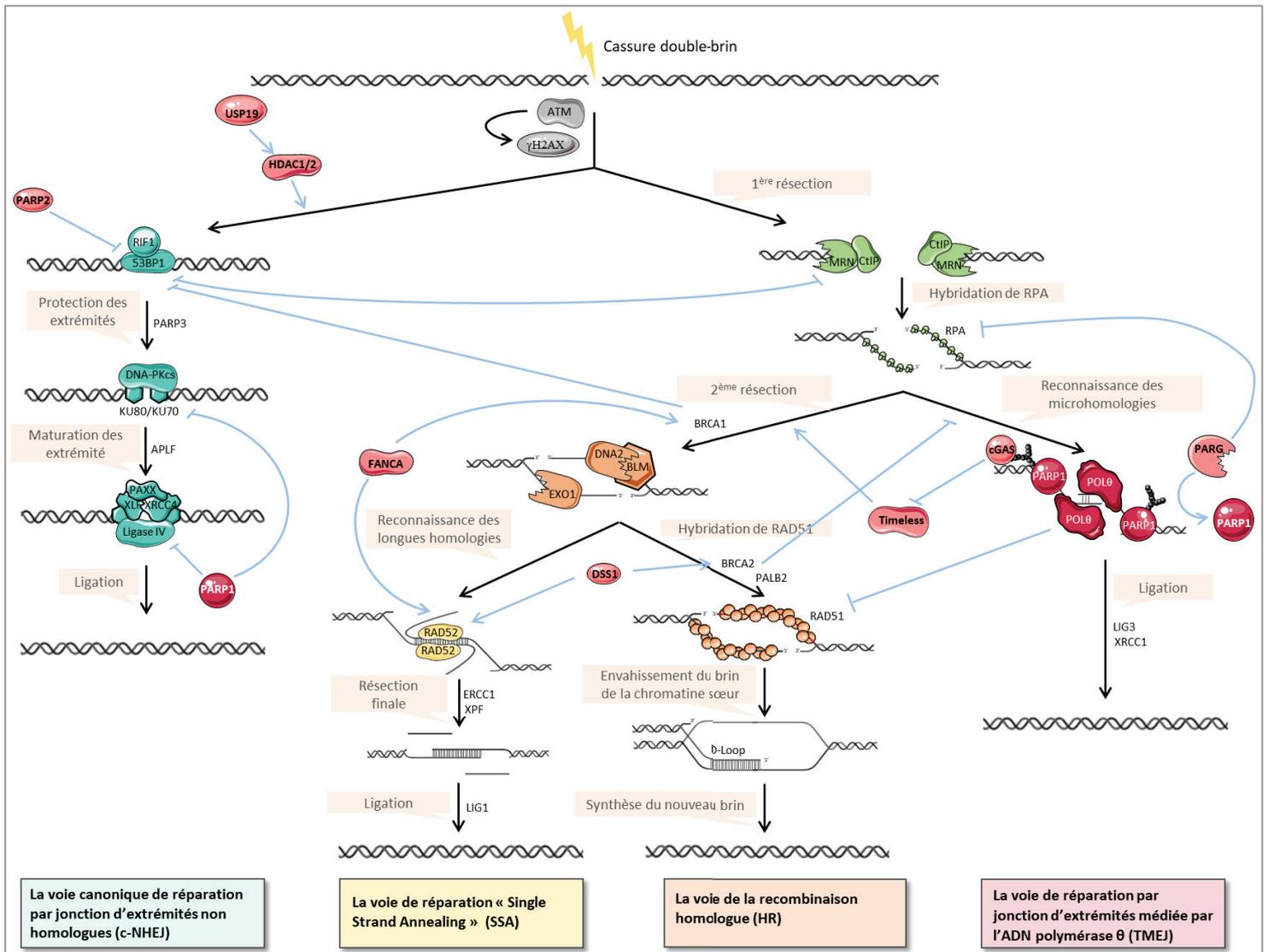


Figure 38 : Modulation des voies de réparation par les acteurs de la réparation de l'ADN

Représentation schématique des voies de réparation des cassures double-brin de l'ADN et l'influence des acteurs de la réparation sur chacune des voies. Ces modulations sont représentées par les flèches bleues représentant soit des activations soit des inhibitions.

### III. Modulation des voies de réparation des cassures double-brin par l'EMT

Ces dernières années, de nombreuses études ont montré que l'EMT et plus particulièrement les EMT-TFs ont un rôle clé dans le choix de la modulation des voies de réparation de l'ADN (Figure 39). Le TGF- $\beta$ , connu pour induire l'EMT et pour activer les EMT-TFs comme ceux de la famille ZEB, SNAI et TWIST (Lindley and Briegel 2010; Taube et al. 2010), peut bloquer l'activité du TMEJ en faveur de la voie de la HR (Q. Liu et al. 2018). En effet, le TGF- $\beta$  inhibe le miR-182, lui-même inhibant à la fois BRCA1, nécessaire dans l'activité de la voie du HR, et FOXO3, requis pour l'activité de la kinase ATM (Martinez-Ruiz et al. 2016). D'autre part, le TGF- $\beta$  augmente également directement l'activité c-NHEJ. Kim et ses collaborateurs montrent qu'un traitement par TGF- $\beta$  augmente les niveaux de Lig4, XRCC4 et KU70/80 et donc une diminution de la quantité de  $\gamma$ -H2AX est observée après irradiation (M. R. Kim et al. 2015).

À l'inverse, certains acteurs de la réparation peuvent induire ou inhiber l'EMT. Ici, la famille PARP joue à nouveau un rôle important sur la modulation de l'EMT. En effet, un défaut en PARP1 entraîne l'acquisition du phénotype EMT lors de la tumorigenèse (Lönn et al. 2010). L'altération de PARP1 conduit à augmenter les niveaux de voies TGF- $\beta$  et SMADs pour induire l'EMT et augmenter les niveaux de ZEB1 et SNAIL. En 2011, Rodríguez et ses collaborateurs révèlent un nouveau mécanisme de régulation de SNAIL par PARP1, impliquant la modification post-traductionnelle de SNAIL par la PARYlation pour stabiliser ce dernier (Rodríguez et al. 2011). Cette interaction fonctionnelle étroite met en évidence l'importance de l'activité PARP1 dans le contrôle de l'activation de SNAIL avec des conséquences majeures dans la transformation maligne par EMT. Outre le rôle dans les CDBs de réparation de l'ADN, l'interaction SNAIL-PARP1 semble être importante pour recruter le facteur LSD1 au promoteur de PTEN d'une manière dépendante de PARP1. Dans des conditions de dommages à l'ADN, SNAIL devient étroitement associé à la PARYlation médié par PARP1, qui favorise l'interaction de SNAIL avec le LSD1, entraînant le recrutement du LSD1 au promoteur PTEN pour réprimer sa transcription et, par conséquent, pour induire la survie cellulaire (Yiwei Lin, Kang, and Zhou 2014) et par conséquent laisser du temps pour réparer. PARP3, un autre acteur de la famille PARP, favorise également l'EMT par l'induction du TGF- $\beta$ , la motilité cellulaire et la chimiorésistance dans les cellules épithéliales mammaires. Mais ce sont les ROS induites par le TGF- $\beta$  qui permettent à PARP3 de promouvoir l'EMT par stimulation de SNAIL (Karicheva et al. 2016).

Enfin, comme pour ATM et son rôle sur l'activité de ZEB1, la kinase DNA-PKcs, un acteur clé de la c-NHEJ, est responsable de la stabilisation de SNAIL par sa phosphorylation à la Ser100. Mais à l'inverse, l'activité kinase DNA-PKcs a été inhibée par la forme phosphorylée de SNAIL, entraînant une inhibition de l'activité de réparation de l'ADN de la voie du c-NHEJ (Kang et al. 2013; Pyun et al. 2013). En aval de

## Introduction

l'activation d'ATM, SLUG devient essentiel à l'activation de RPA32 (sous-unité de RPA avec PRA70 et RPA14), ce qui se traduit par une réparation plus efficace des CDBs médiée par la voie de RH (Gross et al. 2019).

En conclusion, il semble qu'il existe une régulation très étroite entre les voies de réparation de l'ADN et l'EMT. Les EMT-TFs semblent induits par les acteurs de la réparation de l'ADN en utilisant la voie du TGF- $\beta$ . Ces EMT-TFs sont alors stabilisés par les acteurs de la réparation de l'ADN eux-mêmes pour moduler le choix des voies de réparation de l'ADN. Les EMT-TFs peuvent donc inhiber le TMEJ en faveur de l'activation de HR ou c-NHEJ. Mais une boucle de rétrocontrôle peut aussi exister, en particulier avec la voie c-NHEJ, pour préserver l'intégrité et la stabilité du génome.

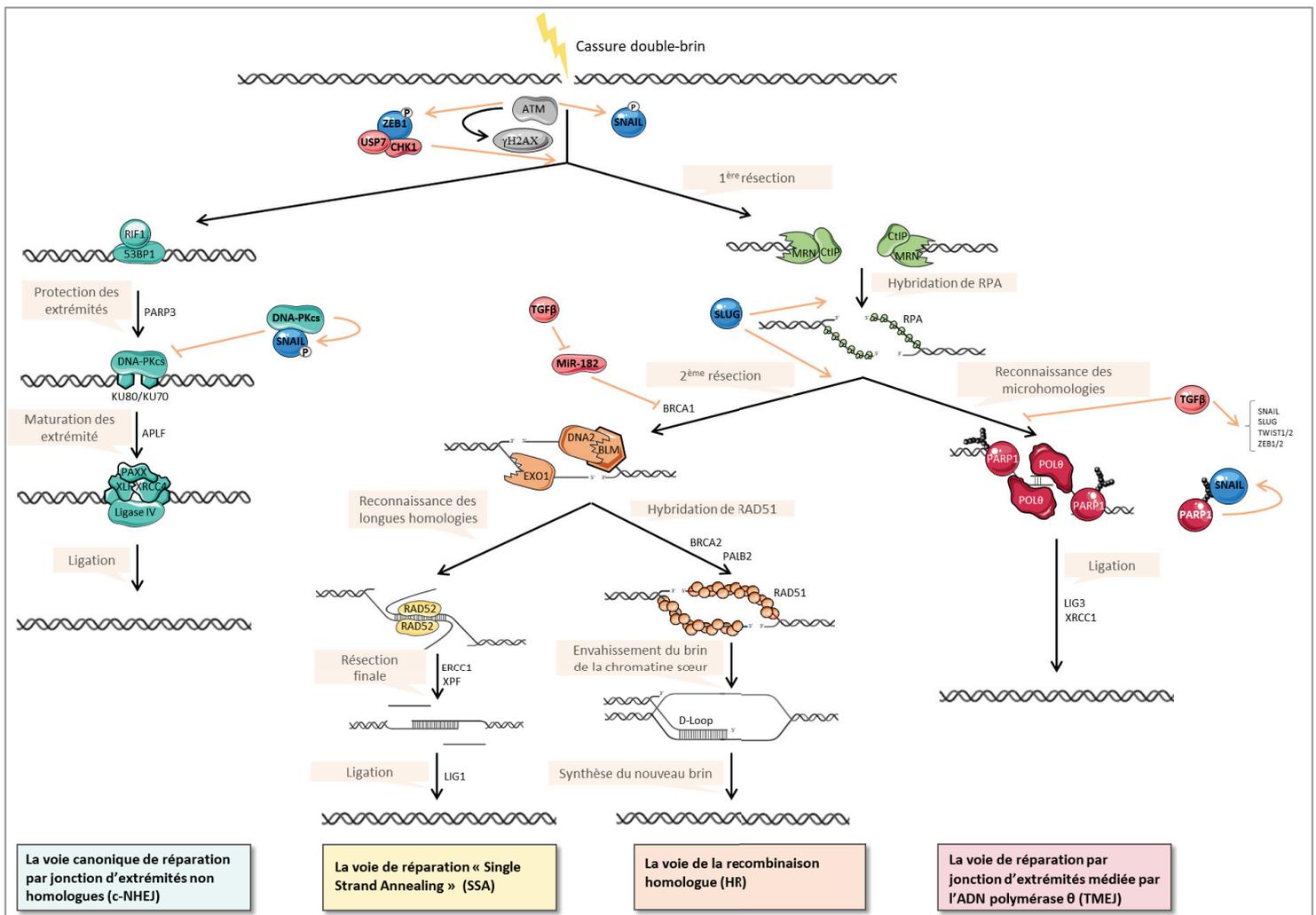


Figure 39 : Modulation des voies de réparation par les facteurs de l'EMT

Représentation schématisée des voies de réparation des cassures double-brin de l'ADN et l'influence des acteurs de l'EMT sur chacune des voies. Ces modulations sont représentées par les flèches orange représentant soit des activations soit des inhibitions.



## Résultats



## Préambule

Les cancers du sein constituent la première cause de mortalité par cancer chez la femme dans notre pays (INCa 2016). Ces cancers, très hétérogènes au niveau génétique, sont classés en différents sous-types définis par analyse histologique et immunohistochimique (IHC): les cancers luminaux qui expriment les récepteurs aux œstrogènes et/ou à la progestérone, les cancers HER2 qui surexpriment la protéine HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) et les cancers triples négatifs (TNBC, triple negative breast cancer) définis par l'absence d'expression des récepteurs hormonaux ainsi qu'une absence d'amplification du gène HER2 (Dent et al. 2007). Les TNBC représentent environ 15 à 20% de l'ensemble des cancers du sein et connaissent un taux de rechute important malgré une prise en charge thérapeutique combinant plusieurs traitements de chimiothérapies conventionnelles. Ils sont principalement divisés en deux sous-types moléculaires : *basal-like* (85%) et *claudin-low* (15%), ce dernier étant caractérisé par l'expression de marqueurs mésenchymateux et de facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT, pour « epithelial to mesenchymal transition ») (Aleix Prat and Perou 2011). L'EMT est un processus embryonnaire réversible et dynamique, impliqué dans la migration des cellules, notamment lors des mouvements morphogénétiques (Thiery et al. 2009). Au cours de l'EMT, les cellules perdent leurs caractéristiques épithéliales (contacts intercellulaires et polarité apico-basale) et acquièrent des propriétés mésenchymateuses (perte des jonctions cellulaires et acquisition de propriétés migratoires). Ce mécanisme complexe est contrôlé par de nombreuses voies de signalisation qui convergent vers un réseau de facteurs de transcription embryonnaires, dont les membres des familles ZEB, TWIST, et SNAIL. L'expression de ces facteurs de transcription (EMT-TFs) est fréquemment réactivée dans des cancers humains, associée en général à un mauvais pronostic et un risque métastatique élevé (Puisieux, Brabletz, and Caramel 2014). Des travaux menés notamment au sein de notre équipe ont démontré l'implication de ces EMT-TFs dans l'initiation et la progression tumorale (Ansieau et al. 2008; Puisieux, Brabletz, and Caramel 2014).

Plus récemment, nous avons montré au laboratoire que la plupart des tumeurs du sein TNBC de sous-type *claudin-low*, caractérisées par une forte dédifférenciation cellulaire, évoluent sur la base d'une faible instabilité génétique (A.-P. Morel et al. 2017), contrairement aux tumeurs *basal-like* décrites comme génétiquement très instables. Cette instabilité chromosomique peut être imputée à une réparation infidèle des lésions subies par l'ADN lors de la transformation. En effet, une activation mitogénique aberrante induit un stress réplicatif générant de multiples cassures double-brin de l'ADN (Halazonetis, Gorgoulis, and Bartek 2008). Plusieurs voies de réparation peuvent alors entrer en compétition pour la prise en charge de ces dommages, dont la voie de ligature d'extrémités non-homologues (c-NHEJ, *canonical non-homologous End-Joining*), la recombinaison homologue (HR),

l'hybridation de simple-brin (SSA) et la ligature d'extrémités médié par POL $\theta$  (TMEJ – *Theta mediated End Joining*) (Ceccaldi et al. 2015). Selon la voie de réparation utilisée, une instabilité génétique peut être générée. Le cNHEJ et le HR sont des mécanismes de réparation essentiellement fidèles, pouvant conduire à la délétion de quelques nucléotides au niveau du site de la cassure (pour le c-NHEJ), alors que le SSA et le TMEJ sont des mécanismes par essence infidèles, à l'origine de larges remaniements chromosomiques comme les translocations (Hastings et al. 2009; Joost Schimmel et al. 2017). L'une des causes du développement d'une tumeur est l'augmentation de l'instabilité du génome créant ainsi des mutations conduisant à l'apparition d'oncogènes tel que HRAS<sup>G12V</sup>, acteur induisant la prolifération cellulaire, ou à l'inhibition des suppresseurs de tumeurs tel que p53, régulateur du cycle cellulaire et inducteur de l'apoptose. Cependant, il apparaît que les tumeurs de type *claudin-low* présentent très peu d'instabilité chromosomique, ce qui peut être surprenant pour des cellules cancéreuses et amène de nombreuses questions concernant développement tumorale de ce type de cancer (A.-P. Morel et al. 2017; Pommier et al. 2020).

Le faible niveau d'instabilité chromosomique retrouvé dans des cellules cancéreuses exprimant les EMT-TFs, nous a conduit à émettre l'hypothèse que ces EMT-TFs, et notamment ZEB1, pourraient moduler l'activité des différentes voies de réparation de l'ADN en affectant directement l'expression des gènes codant pour les acteurs de ces voies. Un lien entre ZEB1 et la réponse aux dommages de l'ADN a précédemment été montré, *via* la stabilisation post-traductionnelle de la protéine CHK1 par ZEB1, dans des cellules résistantes aux rayonnements ionisants (P. Zhang et al. 2014). A ce jour, le rôle de ZEB1 sur la régulation des voies de réparation de l'ADN en réponse à un stress oncogénique n'a toutefois jamais été décrit.

L'objectif de ma thèse a donc été d'étudier l'impact de l'expression de ZEB1, sur la fonctionnalité des différentes voies de réparation des cassures double-brin de l'ADN dans le contexte tumoral mammaire. Ma thèse s'articule autour de deux grands axes de recherche, un premier essentiellement fondamental visant à caractériser l'impact de ZEB1 sur la réparation de l'ADN et un deuxième plus translationnel permettant de proposer un traitement spécifique pour les tumeurs du sein TNBC exprimant ZEB1.

## Chapitre I : ZEB1 réprime la voie mutagène du TMEJ

### I. Introduction

Ces dernières années, le TMEJ est au centre de nombreuses études en particulier dans le contexte de cancers compte tenu de son fort pouvoir mutagène. La surexpression du gène *POLQ*, associée à une augmentation de l'activité de l'ADN polymérase POL $\theta$  (codée par le gène *POLQ*), enzyme clé de la voie du TMEJ, est retrouvée dans de nombreux cancers (Ceccaldi et al. 2015; Lemée et al. 2010; Sallmyr and Tomkinson 2018). Nous nous sommes donc intéressés au devenir de cette voie dans les cancers du sein triples négatifs *claudin-low* exprimant les EMT-TFs en comparaison avec les cancers triples négatifs *basal-like* n'exprimant pas les EMT-TFs.

### II. Résultats

#### a. Modulation des voies de réparations de l'ADN en fonction de l'EMT

Des résultats innovants ont démontré, notamment au sein de notre équipe, que les tumeurs *claudin-low* triple négatives présentent très peu d'altérations génomiques (A.-P. Morel et al. 2017; Pommier et al. 2020). Une des hypothèses pouvant expliquer ce faible niveau d'altération chromosomique (FGA : Fraction du Génome Altérée ; ou CNA : Altération du Nombre de Copies) est que ces tumeurs présentent une diminution du nombre de dommages spontanés (A.-P. Morel et al. 2017). En effet, ZEB1 induit la transcription de *MSRB3*, une oxydoréductase, qui réduit alors le stress oxydatif lié à une activation oncogénique et limite l'impact de celui-ci sur l'ADN. Par le biais de cette enzyme, les cellules exprimant ZEB1 ont significativement moins de CDBs spontanées.

Au cours de ce travail de thèse, j'ai proposé qu'une modulation des voies de réparations de dommages à l'ADN pouvait également participer à la protection du génome dans le contexte tumoral. En effet, même si une cellule présente moins de dommages spontanés à l'ADN, si le faible taux de dommages est réparé par une voie mutagène alors la mise en place d'une instabilité génomique pourra être observée (Bunting and Nussenzweig 2013). A l'inverse si ces dommages sont réparés de manière fidèle, l'instabilité génomique restera alors faible. L'EMT peut donc favoriser l'activité d'une voie fidèle telle que la HR ou le c-NHEJ et/ou inhiber une voie mutagène telle que le TMEJ.

Dans le but de tester cette dernière hypothèse, nous nous sommes intéressés aux données disponibles dans les bases de données telles que CCLE (The Cancer Cell Line Encyclopedia ; [Barretina et al. 2012](#)), et TCGA (The Cancer Genome Atlas ; [Hampton 2006](#)). Nous avons comparé l'expression des gènes des signatures des différentes voies de réparation des dommages à l'ADN à la signature de l'EMT dans l'ensemble des cancers du sein ([Figure 40 A-G](#)). Dans cette analyse, les acteurs du TMEJ et du BER sont associés à la même signature puisque l'ensemble des acteurs du TMEJ appartient aux 2 voies. De même, les acteurs de la voie du HR et ICL font partie de la même signature. Parmi l'ensemble des voies étudiées, la signature BER/TMEJ est celle pour laquelle la significativité est la plus élevée ( $r$  et  $p$ -value). Dans ce contexte, il semblerait que les voies du BER et du TMEJ soient inversement corrélées avec l'EMT ([Figure 40 B](#)). De façon surprenante, la voie du HR semble elle aussi inversement corrélée à l'EMT alors que d'après Zhang et ses collaborateurs, une corrélation positive serait ([P. Zhang et al. 2014](#)), mais cependant ces corrélations inverses possèdent des valeurs faibles à la limite de la significativité notamment pour les analyses de l'expression dans les lignées CCLE ([Figure 40 C](#)).

L'expression individuelle de chaque acteur a alors été étudiée dans les cellules exprimant les EMT-TFs présentant la plus faible instabilité chromosomique (intclusters 4, voir chapitre II page 65) en comparaison des cellules n'exprimant pas les EMT-TFs présentant la plus forte instabilité (intclusters 10) ([Figure 40 H](#)). Il semblerait que *POLQ* (1<sup>ère</sup> position) et PARP1 (3<sup>ème</sup> position) ainsi que l'ADN Ligase III et les protéines du complexe de résection MRN soient significativement moins exprimés dans les tumeurs du IntClu4 par rapport aux tumeurs du IntClus10.

Comme lors de l'induction de MSRB3 dans la protection contre le stress oxydatif ([A.-P. Morel et al. 2017](#)) ou lors de l'activation de la DDR ([P. Zhang et al. 2014](#)), ZEB1 semble aussi avoir un rôle important dans la modulation des voies de réparation de l'ADN en particulier dans la « non-induction » de l'expression des acteurs de la voie du TMEJ. De façon plus précise, l'étude de la corrélation de l'expression des EMT-TFs et de *POLQ*, acteur clé du TMEJ, montre que l'expression de ZEB1 par rapport aux autres EMT-TFs est la plus discriminante pour l'expression de *POLQ* ([Figure 40 I](#)). ZEB1 semble donc avoir un rôle essentiel dans les processus de préservation de la stabilité du génome par plusieurs mécanismes que sont la protection des dommages, l'activation de checkpoint et finalement la prévention de l'utilisation des voies infidèles de la réparation de l'ADN. La suite de ce chapitre se concentre sur ce dernier point et plus précisément sur l'impact de ZEB1 sur le TMEJ.

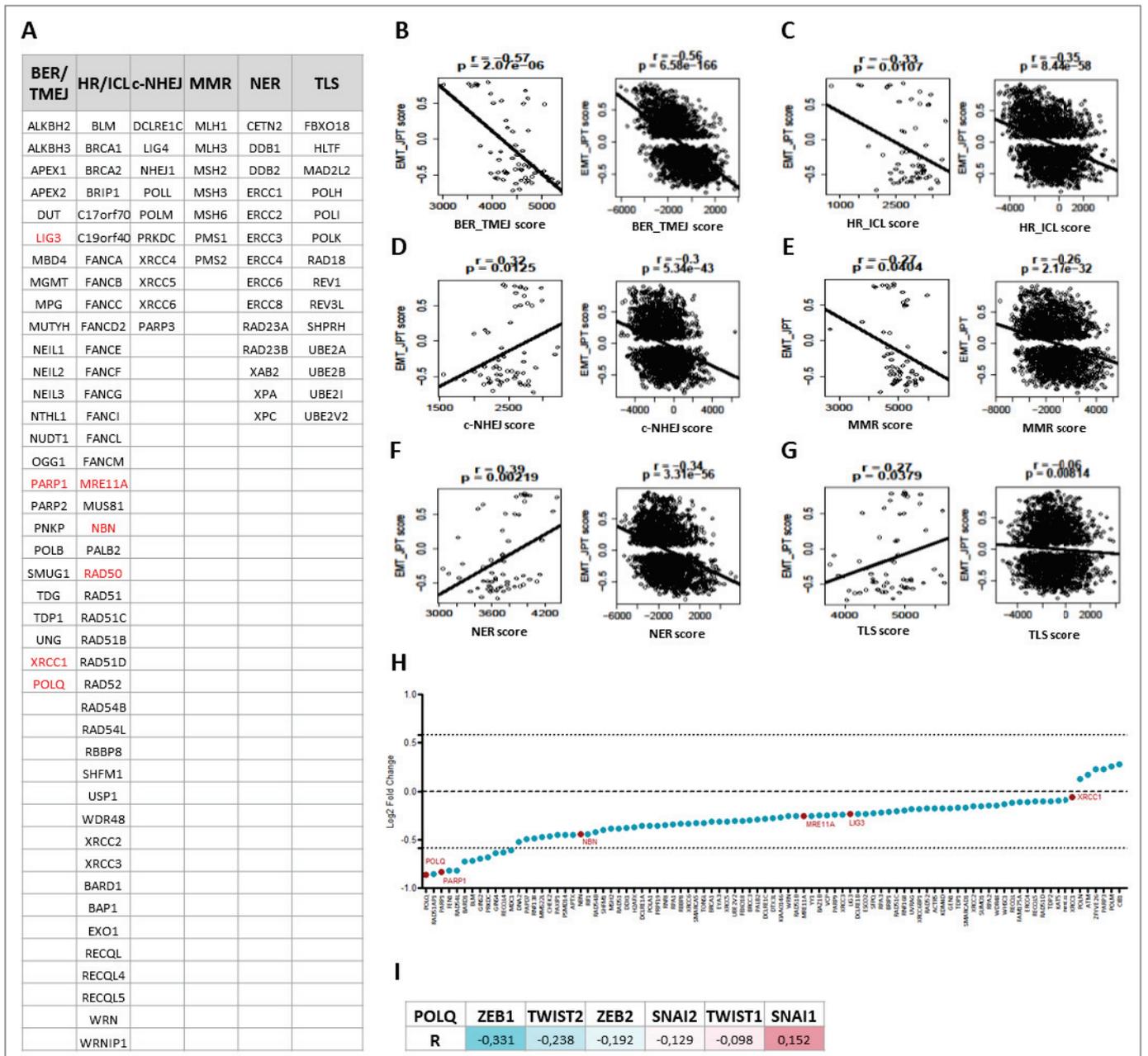


Figure 40 : Expressions différentielles des acteurs des voies de réparation selon le score EMT

**A**, liste des acteurs participant à la signature de la voie de réparation des dommages à l'ADN citée. En rouge sont signalés les acteurs intervenant dans la voie du TMEJ. **B**, Corrélation entre la signature de l'EMT (signature de Jean Paul Thiery (Tan et al, 2014) et la signature du BER/TMEJ dans la base de données du CCL (premier graphique) ou du TCGA. **C**, Corrélation entre la signature de l'EMT (signature de Jean Paul Thiery (Tan et al, 2014) et la signature du HR/ICL dans la base de données du CCL (premier graphique) ou du TCGA. **D**, Corrélation entre la signature de l'EMT (signature de Jean Paul Thiery (Tan et al, 2014) et la signature du c-NHEJ dans la base de données du CCL (premier graphique) ou du TCGA. **E**, Corrélation entre la signature de l'EMT (signature de Jean Paul Thiery (Tan et al, 2014) et la signature du MMR dans la base de données du CCL (premier graphique) ou du TCGA. **F**, Corrélation entre la signature de l'EMT (signature de Jean Paul Thiery (Tan et al, 2014) et la signature du NER dans la base de données du CCL (premier graphique) ou du TCGA. **G**, Corrélation entre la signature de l'EMT (signature de Jean Paul Thiery (Tan et al, 2014) et la signature du TLS dans la base de données du CCL (premier graphique) ou du TCGA. **H**, Différentielle d'expression des gènes des voies de réparation entre les tumeurs TNBC de l'IntCluster 4 (integrative cluster exprimant ZEB1 et ayant peu d'instabilité génomique) et 10 (n'exprimant pas ZEB1 mais ayant un fort niveau d'instabilité génomique) de la classification de Curtis et al, 2012. Apparaît en rouge l'expression des gènes des acteurs du TMEJ significativement différents. Ne sont représentés que les différentiels présentant un écart significatif. **I**, Corrélation de Pearson entre l'expression de *POLQ* et les différent EMT-TFs dans TCGA.



## Résultats

### b. ZEB1 réprime la voie mutagène de réparation par jonction d'extrémités médiée par POL $\theta$ dans les cancers du sein (Article en cours de soumission)

#### Résumé

Une des caractéristiques du développement tumoral est l'acquisition d'une l'instabilité chromosomique, qui présuppose la présence de dommages à l'ADN pris en charge par des voies de réparation de l'ADN infidèles. Parmi celles-ci, la voie hautement mutagène de réparation par jonction d'extrémités médiée par la polymérase thêta (TMEJ), dépendante de l'ADN polymérase thêta (POL $\theta$ ) codée par le gène *POLQ* et la poly (ADP-ribose) polymérase 1 (PARP1), se retrouve surexprimée dans de nombreux cancers. Cependant, les mécanismes de régulation du TMEJ restent, jusqu'à ce jour, inconnus et les conséquences d'une dérégulation de l'activité de cette voie n'ont jamais été adressées lors de l'initiation et de la progression tumorale. Ici, nous montrons que ZEB1 (zinc finger E-box binding homeobox 1), facteur de transcription induisant EMT, réprime l'expression de *POLQ* dans les cellules du cancer du sein triple négatif (TNBC) grâce à l'interaction directe de ZEB1 avec son promoteur. En conséquent, ZEB1 inhibe l'activité de la voie du TMEJ, avec un impact majeur sur la stabilité du génome du cancer.



**The EMT transcription factor ZEB1 represses the mutagenic POL $\theta$ -mediated end-joining pathway in breast cancer**

Mélanie K Prodhomme<sup>(1,2)</sup>, Roxane M Pommier<sup>(1,2,3)</sup>, Camille Franchet<sup>(4)</sup>, Frédérique Fauvet<sup>(1,2)</sup>, Valérie Bergoglio<sup>(5)</sup>, Pierre Brousset<sup>(4)</sup>, Anne-Pierre Morel<sup>(1,2)</sup>, Anne-Cécile Brunac<sup>(4)</sup>, Mojgan Devouassoux-Shisheboran<sup>(1,2)</sup>, Virginie Petrilli<sup>(6)</sup>, Caroline Moyret-Lalle<sup>(1,2)</sup>, Jean-Sébastien Hoffmann<sup>(4)</sup>, Alain Puisieux<sup>(1,2,7)\*\*\*</sup> and Agnès Tissier<sup>(1,2)#</sup>\*

(1) Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Cancer Research Centre of Lyon, Équipe Labellisée Ligue contre le Cancer, Lyon, France.

(2) LabEx DEVweCAN, Université de Lyon, Lyon, France.

(3) Gilles Thomas Bioinformatics Platform, Centre Léon Bérard, Cancer Research Centre of Lyon, Lyon, 69008, France.

(4) Laboratoire de pathologie, Laboratoire d'excellence Toulouse Cancer, Institut Universitaire du Cancer-Toulouse, Oncopole, 1 avenue Irène-Joliot-Curie, 31059 Toulouse cedex, France

(5) Cancer Research Centre of Toulouse, INSERM UMR 1037 Toulouse, France.

(6) Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Cancer Research Centre of Lyon

(7) Institut Curie, PSL Research University, Paris, France

# these authors jointly supervised this work

\* corresponding author Agnès TISSIER, CRCL, 28 rue Laennec 69373 Lyon cedex 08 France -

e-mail address: [agnes.tissier@inserm.fr](mailto:agnes.tissier@inserm.fr)

\*\* corresponding author Alain PUISIEUX, Institut Curie 26 rue d'Ulm 75248 Paris cedex 05 France –

e-mail address : [alain.puisieux@curie.fr](mailto:alain.puisieux@curie.fr)

**Running title:** ZEB1 represses *POLQ*

**Key words:** ZEB1, EMT, *POLQ*, POL $\theta$ , claudin-low, TNBC, breast cancer,

**Disclosure of Potential Conflicts of Interest**

No potential conflicts of interest were disclosed by the authors.

**ABSTRACT**

A characteristic of cancer development is the acquisition of genomic instability, which results from the inaccurate repair of DNA damage. Among double-strand break repair mechanisms induced by oncogenic stress, the highly mutagenic theta-mediated end joining (TMEJ) pathway, requiring DNA polymerase theta (POL $\theta$ ) encoded by the *POLQ* gene, has been shown to be overexpressed in several human cancers. However, little is known on the regulatory mechanisms of TMEJ and on the consequence of its dysregulation. Here, by combining a bioinformatics approach exploring both METABRIC and TCGA databases with the CRISPR/Cas9 depletion of the zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1) in claudin-low tumor cells or forced ZEB1 expression in basal-like tumor cells, two triple-negative breast cancer (TNBC) subtypes, we unveil that ZEB1 represses *POLQ* expression. Indeed, this master EMT inducing-transcription factor interacts directly with *POLQ* promoter, as shown by ChIP and luciferase assays. Moreover, *POLQ* down-regulation by ZEB1 fosters micronuclei formation in TNBC tumor cell lines. Consequently, ZEB1 expression prevents TMEJ activity, with a major impact on genome integrity.

**STATEMENT OF SIGNIFICANCE**

We report here an original mechanism of TMEJ regulation, highlighting ZEB1 as a key player in genome stability regulation during cancer progression, via its repression of *POLQ*.

### **INTRODUCTION**

Chromosomal instability (CIN) is a hallmark of cancer<sup>1</sup>, arising notably through the error-prone repair of double-strand breaks (DSBs), ultimately resulting from oncogenic activation<sup>2</sup>. Indeed, the usage of unfaithful pathways eventually leads to inappropriate end-joining events at the origin of genomic instability<sup>3</sup>. Alongside the well-documented homologous recombination (HR) and canonical non-homologous end-joining (c-NHEJ) DSBs repair pathways<sup>4,5</sup>, mammalian cells also rely on an independent highly mutagenic theta-mediated end joining (TMEJ) pathway, corresponding to one of the initial alternative end joining (Alt-EJ) pathways defined as a Ku-independent c-NHEJ then renamed microhomology-mediated end joining (MMEJ) regarding the mechanism or TMEJ, regarding the key actor<sup>6-9</sup>. In TMEJ, DSBs are sealed by microhomology-mediated base-pairing of DNA single strands, yielding products systematically associated with short DNA deletions and insertions, potentially generating chromosomal translocations and mutagenic rearrangements<sup>10-13</sup>. Key TMEJ actors in human cells include the A-family DNA polymerase theta (POL $\theta$ ) encoded by the *POLQ* gene, poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1)<sup>14-16</sup>, and DNA ligase III $\alpha$  (encoded by the *LIG3* gene)<sup>7,17</sup>. Thus far, the mechanisms regulating TMEJ in normal and cancer cells are totally unknown. In this work, we gain insight into the regulatory process of triple-negative breast cancers (TNBCs). TNBCs are aggressive breast malignancies that are characterized by the lack of estrogen and progesterone receptor expression and the absence of HER2 over-expression. TNBCs represent up to 20-25% of all breast carcinomas. According to molecular classifications based on gene expression profiles, TNBCs are essentially composed of basal-like and claudin-low subtypes<sup>18</sup>. Claudin-low tumors display a low level of expression of cell-cell adhesion molecules, such as claudins or E-cadherin, encoded by the *CDH1* gene. In addition, they are highly enriched in mesenchymal traits and stem cell features, and are therefore considered to be the most primitive breast cancers with poor survival outcomes compared to many other breast cancer subtypes<sup>19,20</sup>.

ZEB1, a transcription factor inducer of the epithelial-mesenchymal transition (EMT), modulates breast cancer cell plasticity by conferring stemness properties to the cells via numerous mechanisms among which the transcriptional repression of epithelial actors such as E-cadherin (*CDH1* gene)<sup>21</sup> or microRNAs miR-200<sup>22</sup>. ZEB1 expression was shown to promote malignant transformation while maintaining genome stability<sup>23</sup>. In particular, high ZEB1 expression is causally associated with claudin-low tumors, characterized by a subnormal genomic landscape<sup>24</sup>. ZEB1 has been implicated both in preventing of the formation of oncogene-induced DNA damage and in increasing the clearance of DNA breaks. On the one hand, ZEB1 is able to protect mammary stem cells against oncogene-induced

damage through the activation of a preemptive antioxidant program, and favors tumorigenesis in the absence of gross genomic instability<sup>24</sup>. On the other hand, the kinase ATM, critical player in DNA damage response, phosphorylates and stabilizes ZEB1, triggering the cell cycle checkpoint CHK1 stabilization at the origin of treatment-resistance<sup>25</sup>. Owing to these pleiotropic effects, ZEB1 is considered to be the central factor in providing cancer cells with a high level of plasticity and may thus be pivotal in the development of therapeutically-resistant cancers.

Here we show that ZEB1 directly controls the expression of *POLQ* and influences not only genome stability of breast cancer cells, but also genome integrity.

## **MATERIALS and METHODS**

### **Bioinformatics and statistical analyses of public databases (TCGA, METABRIC)**

All bioinformatics and statistical analyses were carried out with the R software (version 3.5.1)<sup>26</sup>. Figures were created using either the R software or GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA; RRID:SCR\_002798). Oncoprint plots were generated using the ComplexHeatMap open source software (<https://github.com/jokergoo/ComplexHeatmap>; RRID:SCR\_017270)<sup>27</sup>.

#### *Expression data processing*

METABRIC microarray expression data from discovery and validation sets were extracted from the EMBL–EBI archive (EGA, <http://www.ebi.ac.uk/ega/>; accession number: EGAS00000000083; RRID:SCR\_004944) ("Normalized expression data" files)<sup>28</sup>. The expression levels of different probes associated with the same Entrez Gene ID were averaged for each sample in order to obtain a single expression value by gene.

TCGA (The Cancer Genome Atlas, RRID:SCR\_003193) BRCA RNASeq expression data were extracted as FPKM values from the GDC data portal (<https://portal.gdc.cancer.gov/>). FPKM data by gene were converted to TPM as follows: for each gene  $g \in G$  and each sample  $s \in S$ ,

$$TPM(g, s) = \left( \frac{FPKM(g, s)}{\sum_{i=1}^G FPKM(i, s)} \right) \times 10^6$$

Expression data by gene from TCGA and METABRIC (discovery and validation sets independently) were finally merged in a common file, keeping all genes present in both datasets, and batch normalization was performed using the R function ComBat from sva package<sup>29,30</sup>. The final expression dataset is composed of 18,845 genes and 3,083 breast tumor samples.

#### *Copy number data processing*

METABRIC segmented copy-number data from discovery and validation sets were extracted from the EMBL–EBI archive (EGA, <http://www.ebi.ac.uk/ega/>; accession number: EGAS00000000083; RRID:SCR\_004944) ("Segmented (CBS) copy number aberrations (CNA)" files)<sup>28</sup>.

TCGA (The Cancer Genome Atlas, RRID:SCR\_003193) BRCA segmented copy-number data were extracted from the GDC data portal repository (files corresponding to alignments on the hg19 version of the human genome without germline CNV were chosen)

As previously described<sup>24,31</sup>, fraction of genomic alterations (FGA) was evaluated from TCGA and METABRIC segmented copy-number data (both generated from Affymetrix SNP6.0 arrays) as follows:

$$FGA = \frac{\sum_{CN_i > WM + T} L(i)}{(\sum L(i))} + \frac{\sum_{CN_i < WM - T} L(i)}{(\sum L(i))}$$

For each segment  $i$ ,  $CN_i$  is the mean Log R ratio (LRR) along segment  $i$ ,  $L(i)$  is the length of segment  $i$ ,  $WM$  is the weighted median of  $CN_i$  by  $L(i)$  for each sample  $l$ , and  $T$  is the threshold value of the  $CN_i$  above which the segments are considered to be altered. In other words, FGA is the ratio of the sum of the lengths of all segments with signal above the threshold to the sum of all segment lengths, *i.e.* FGA is the percentage of the genome displaying an aberrant copy number (deletion and amplification). For METABRIC and TCGA TNBCs analysis,  $T$  was set as 0.1, taking into account that TNBCs were not sorted by cellularity.

### *Triple negative (TN) status*

Estrogen, Progesterone and HER2 receptors statuses were determined through expression analysis of the ESR1, PGR and ERBB2 genes, respectively. Using global distribution of each gene expression, samples were classified into positive and negative subgroups using mclust R package (version 5.4.2), which decomposes the global distribution into Gaussian mixture models to classify samples<sup>32</sup>.

### *Breast cancer subtype assignment*

Breast cancer molecular subtype attribution (Basal-like, Luminal A, Luminal B, Her2, Normal-like and Integrative Clusters) was performed using the R package 'genefu', version 3.8<sup>33</sup>. Basal-like, Luminal A, Luminal B, Her2 and Normal-like subtype assignments were computed with 5 different algorithms (PAM50, AIMS, SCMGENE, SSP2006 and SCMOD2)<sup>34-38</sup>. An assignment was considered final if defined by at least 3 different algorithms. In case of divergence between classifiers, PAM50 subtype attribution was conserved.

The Claudin-low (CL) subtype classification was defined by nearest centroid method. To achieve this, we computed the Euclidean distance between each sample and the previously described CL and non-CL centroids, using the 1,667 genes defined by Prat et al. as significantly differentially expressed between Claudin-low tumors and all other molecular subtypes<sup>20</sup>.

## Résultats

### Cell cultures

HMEC-hTERT were previously generated in the laboratory as described<sup>23</sup>. HMEC-hTERT were cultured in 1:1 DMEM/Ham's F12 medium with 1% glutamax (GIBCO-Thermo Fisher Scientific; Cat# 31331093) supplemented with 10 ng/mL human EGF (PromoCell; Cat# C-60170), 0.5 mg/ml hydrocortisone (Sigma Aldrich; Cat# H0888) and 10 mg/mL insulin (Actrapid, Novonordisk).

BT-20 (human mammary carcinoma cells, ATCC) were maintained in MEM with 1% glutamax (GIBCO-Thermo Fisher Scientific; Cat# 41090093). MDA-MB-468 (human mammary adenocarcinoma, derived from metastatic site: pleural effusion, cells, DSMZ) were maintained in Leibovitz L15 with 1% glutamax (GIBCO-Thermo Fisher Scientific; Cat# 31415086). HCC70 (human mammary primary ductal carcinoma, ATCC) were cultured in RPMI 1640 with 1% glutamax (GIBCO-Thermo Fisher Scientific; Cat# 61870044) supplemented with 1.5 g/L sodium bicarbonate (GIBCO-Thermo Fisher Scientific; Cat# 25080060), 10 mM Hepes (GIBCO-Thermo Fisher Scientific; Cat# 15630056) and 1 mM sodium pyruvate (GIBCO-Thermo Fisher Scientific; Cat# 11360039). HCC1937 (human mammary carcinoma cells, ATCC) and BT-549 (human mammary carcinoma cells, ATCC) were cultured in RPMI 1640 with 1% glutamax (GIBCO-Thermo Fisher Scientific; Cat# 61870044). SUM159 cells were a gift from Hasan Korkaya's lab at Augusta University, GA, USA. SUM159 were cultured in Ham-F12 with Glutamine (GIBCO-Thermo Fisher Scientific; Cat# 21765037) supplemented with 3.2 µg/mL gentamicin (GIBCO-Thermo Fisher Scientific; Cat# 15710049), 5 mg/mL insulin (Actrapid, Novonordisk) and 2 mg/mL hydrocortisone (Sigma Aldrich; Cat# H0888). MDA-MB-231 (human mammary adenocarcinoma cells, ATCC), Hs 578T (human mammary carcinoma cells, ATCC), CAL-120 (human mammary adenocarcinoma cells, DSMZ), Phoenix, Plat-E and HEK293T were maintained in DMEM with 1% glutamax (GIBCO-Thermo Fisher Scientific; Cat# 31966047).

All media were supplemented with 10% fetal calf serum (Sigma Aldrich or Eurobio) and penicillin–streptomycin (100 µg/mL, 100 U/mL, respectively, GIBCO-Thermo Fisher Scientific; Cat# 15140130), except for MDA-MB-468 with 20% fetal calf serum (Sigma Aldrich).

All cell lines were kept at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub>/95% air incubator, and were routinely tested negative for mycoplasma contamination using the Lonza MycoAlert PLUS Mycoplasma Detection Kit (Lonza; Cat# LT07-318).

### Micronuclei

Cells were plated onto removable chamber slide (IBIDI; Cat# 81201) and treated for 36h for MDA-MB-231 or 72h for BT-20 and HCC70 with cytochalasin B in the culture media at a final concentration

of 3 µg/ml. When the majority of cells were bi-nucleated, they were fixed in formaldehyde 4% in PBS 1X, 1% BSA (Sigma Aldrich; Cat# A8412) for 20 min at room temperature. Cells were staining with phalloidin-TRITC and Hoechst. Finally, the silicone chambers are removed and the slide are mounted with Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium (Sigma Aldrich; Cat# F4680-25ML). A minimum of 200 bi-nucleated cells was counted per condition.

### **Lentiviral and retroviral infections**

To produce lentiviral particles,  $2 \times 10^6$  HEK293T cells were transfected using the GeneJuice® Transfection Reagent (Sigma Aldrich; Cat# 70967-4), according to the manufacturer's instructions, with 13 µg of total lentiviral expression vectors (5.1 µg pCMVdeltaR8.91, 1.3 µg phCMVG-VSVG and 6.6 µg plasmid of interest). The pCMVdeltaR8.91 and phCMVG-VSVG vectors were gifts from D. Nègre (International Centre for Infectiology Research, INSERM U1111–CNRS UMR5308–ENS de Lyon–UCB Lyon1, EVIR Team, Lyon, France).

To produce retroviral particles,  $2 \times 10^6$  Phoenix cells were transfected by GeneJuice® Transfection Reagent (Sigma Aldrich; Cat# 70967-4), according to the manufacturer's instructions, with 10 µg of plasmid of interest.

For both infections, the supernatant was collected, filtered, supplemented with 5 or 10 µg/mL polybrene (Sigma Aldrich; Cat# H9268) 48 h after transfection and combined with the targeted cells for 12h.

The ZEB1-depletion model in MDA-MB-231 (MDA-MB-231 ZEB1-/- clones) using the CRISPR-cas9 gene editing technology was generated. Scrambled sgRNA/Cas9 All-in-One Lentivector (Applied Biological Materials; Cat# K010) and ZEB1 sgRNA/Cas9 All-in-One Lentivector (Human) (Target 1: 5'-CACCTGAAGAGGACCAG-3') (Applied Biological Materials; Cat# K2671006) lentiviral particles were used to infect MDA-MB-231 cells. Scrambled sgRNA/Cas9 and ZEB1 sgRNA/Cas9 cells were selected with puromycin (Invivogen; Cat# ant-pr-1) at 1 µg/mL 48 h after infection. After cloning by limiting dilution, single cells were grown for approximately 3 weeks and colonies were screened for knockouts by quantitative PCR and genomic DNA sequencing and Western blotting. Genomic DNA sequencing was performed using the Sanger method with the following primers for amplification and sequencing: 5'-TGAAGTGAACGTCAGAGTGGT-3' (forward) and 5'-TCACGTGCAGTGGCATTACT-3' (reverse).

To generate the model with forced overexpression of ZEB1 in none-ZEB1-expressing cells, BT-20 basal-like cells were infected with retroviral pBabe-expression vector containing ZEB1. Cells were

## Résultats

selected with neomycin at 100 µg/mL (GIBCO-Thermo Fisher Scientific; Cat# 10131027) 48 h after infection.

For luciferase assay, MDA-MB-231 cells were infected with 4 lentiviral reporter pEZX-LvPG04 plasmids (GeneCopeia). Two *POLQ* promoter constructs, a *CDH1* promoter (GeneCopeia; Cat# HPRM45458-LvPG04) and a negative promoter (GeneCopeia; Cat# NEG-LvPG04) as a control were independently transduced. The *POLQ* promoter -691bp was generated from the *POLQ* promoter -1280bp (GeneCopeia; Cat# HPRM54321-LvPG04-01) digested by EcoR1 and Spe1 restriction enzymes and reconstituted (New England Biolabs).

To generate the model with forced overexpression of *POLQ* in MDA-MB-231, lentiviral pCDH-EF1-FHC-*POLQ* vector containing human *POLQ* cDNA (Addgene; Cat# 64875 for *POLQ* and Cat# 64874 for empty control) was used. Cells were selected with puromycin (Invivogen; Cat# ant-pr-1) at 1 µg/mL 48 h after infection.

### Drugs and siRNA

6-thioguanine (Sigma Aldrich; Cat# A4882) stock solution was dissolved in NaOH 0.1 N.

Transient siRNA-mediated knockdown was performed with INTERFERin reagent (PolyPlus-transfection; Ozyme; Cat# POL409-50) according to the manufacturer's protocol during the time of the experiment (kinetic or single point). siRNAs were used at a final concentration of 2 nM for MDA-MB-231 or 8nM for BT-549 and SUM159 and cells were treated every day. siRNA sequences (Eurogentec): siRNA non targeted siNT, 5'-GGUUUGGCUGGGGUGUUAU-3'; siZEB1#1, 5'-GGUAGAUGGUA AUGUAAUA-3'; siZEB1#2, 5'-GCAACAGGGAGAAUUAUUATT-3'; si*POLQ*, 5'-CAAACAACCCUUAUCGUAAA-3'.

### Western blot analysis and antibodies

Equal amounts of protein of each sample were analyzed using SDS-PAGE, electrophoretic transfer, immunoblotting and chemiluminescent detection. Briefly, cells were washed and scratched with ice-cold phosphate buffered saline (PBS Eurobio; Cat# CS1PBS01K-BP) supplemented with Protease inhibitor cocktail (PIC, Sigma Aldrich, Cat# 11836145001), Phenyl-methane Sulfonyl Fluoride (PMSF, Sigma Aldrich; Cat# 93482) and Phosphatase inhibitor cocktail (PhoIC 2 and 3, Sigma Aldrich; Cat# P5726-5ML and Cat# P0044-5ML respectively) on ice. The cell pellets were lysed in 2% SDS, 125 mM Tris pH 6.8, PIC, PMSF and PhoIC 2 and 3 on ice. After sonication, proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. Antibodies and dilutions were as follows: anti-ZEB1, 1:1,000

(polyclonal; Sigma Life Science; Cat# HPA027524); anti-POL $\theta$ , 1:10,000 (as previously described<sup>39</sup>); anti-PARP1, 1:1,000 (polyclonal PARP-1 (H-250); Santa Cruz Biotechnology; Cat# sc-7150); anti-LIG3, 1:1,000 (clone 6G9; Santa Cruz Biotechnology; Cat# sc-56089); anti-CAS9, 1:1,000 (clone 7A9-3A3; Cell signaling technology; Cat# 14697); anti-Human DNA Topoisomerase I, 1:1,000 (clone C-21; Cell signaling technology; Cat# 556597). Species-specific secondary HRP-coupled antibodies (Santa Cruz; goat anti-mouse Cat# SC 2005 and mouse anti-rabbit Cat# SC 2357) were used. Protein bands were visualized using clarity or clarity-max (Bio-Rad; Cat# 1705061 and Cat# 1705062 respectively) and the ChemiDoc MP system (Bio-Rad).

### Quantitative real time polymerase chain reaction

Total RNA was extracted with the RNeasy mini-kit (Qiagen; Cat# 74106) according to the manufacturer's recommendations. Reverse transcription was performed from 1  $\mu$ g total RNA with the Dynamo cDNA synthesis kit (Thermo Scientific; Cat# F-470L). The reverse transcription product was diluted 1:10 and used as cDNA template for qPCR analysis. Taqman quantitative PCR (Bioline MERIDIAN BIOSCIENCE EUROPE; Cat# BIO-86050) was used in the detection of PCR products in real time in a CFX96 Real-time PCR detection system (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. qRT-PCR was performed using 200 nM of specific primers and DNA probes (Extended Data Tables 1; design on Universal Probe Library by Roche life science). Conditions for the Taqman method were 2 min at 50 °C, 20 s at 95 °C and then 40 cycles, each consisting of 3 s at 95 °C and 30 s at 60 °C. The housekeeping genes used were UBB and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). The comparative Ct method was used to quantify the expression of the gene of interest. Refer to the list of primers and probes in Table 1.

### Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay

ChIP-IT High Sensitivity kit (Active Motif, Carlsbad, CA, USA; Cat# 53040) was used to determine the association of the transcription factor ZEB1 with *POLQ*- or *CDH1*-specific genomic regions. MDA-MB-231 ZEB1<sup>-/-</sup> cells were subjected to cell fixation, 1% formaldehyde (Sigma Aldrich, Cat# 252549-1L) on ice to cross-link the proteins bound to chromatin DNA. After washing, chromatin DNA was sheared by sonication to produce DNA fragments of around 200-1,000 bp. The same amounts of sheared DNA were used for immunoprecipitation using anti-ZEB1 antibody (Genetex; Cat# GTF105278) or an equal amount of pre-immune Rabbit IgG (Bio-Rad; Cat# PRABP01 10mg). The immunoprecipitate was then incubated with protein G magnetic beads, and the antibody-protein G magnetic beads

## Résultats

complex was collected for subsequent reverse cross-linking. The same amount of sheared DNA without antibody precipitation was processed for reverse cross-linking and served as an input control. DNA recovered from reverse cross-linking was used for qPCR to determine the abundance of the target DNA sequence(s) relative to the input chromatin. ChIP-qPCR primers for the *POLQ* promoter: primers #1: 5'-ACGTTTCAGAACTCGTTCGCT-3' (forward) and 5'-CCCCAGGGATCGTTATGAGC-3' (reverse); primers #2: 5'-CCGGCGAGATCTCTTTTATT-3' (forward) and 5'-GTCAGTTAATGAAGTGTGCCA-3' (reverse); ChIP-qPCR primers for *CDH1* promoter: primers: 5'-GGCCGGCAGGTGAACCCTCA-3' (forward) and 5'-GGGCTGGAGTCTGAACTGA-3' (reverse).

### Luciferase assay

For luciferase assay, MDA-MB-231 were transfected using a siRNA against ZEB1 or control siRNA. Cells were treated each day during 96h. After 48 h of siRNA treatment, MDA-MB-231 were infected with 4 different lentiviral GLuc-ON Promoter Reporter plasmids pEZX-LvPG04 (GeneCopeia). Two *POLQ* promoter constructs, a *CDH1* promoter (GeneCopeia; Cat# HPRM45458-LvPG04) and a negative promoter (GeneCopeia; Cat# NEG-LvPG04) as a control were independently transduced. The *POLQ* promoter -691bp was generated from the *POLQ* promoter -1280bp (GeneCopeia; Cat# HPRM54321-LvPG04-01) digested by EcoR1 and Spe1 restriction enzymes and reconstituted (New England Biolabs). pEZX-LvPG04 contains the Gaussia luciferase reporter gene under the control of the indicated promoter, and SEAP as an internal control. 48 h after infection, cells were seeded onto 96-well plates (20,000 cells by well). After 48 h, the supernatants were collected to reveal the luciferase signal using the Secrete-Pair Dual Luminescence Assay Kit (GeneCopeia, TEBU; Cat# LF032), according to the manufacturer's recommendations. Changes in transcription activity of *POLQ* promoter were normalized with respect to the corresponding negative control samples. *CDH1* promoter and negative promoter were used as controls.

### Statistical analysis

Statistical analysis and graphs were performed using GraphPad Prism 6.0 (RRID:SCR\_002798). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of at least three independent experiments and were analyzed using unpaired two-tailed Student's t-tests with a Welch's correction. Significance is represented with asterisks; Values of  $p < 0.05$  were considered to be significant. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  and \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

### **Human tumor samples and immunohistochemical analyses**

Ten rare positive and 22 negative previously characterized ZEB1 tumours<sup>24</sup> were analyzed for *POLQ* expression by RNAscope®. RNA in situ hybridization (ISH) for Hs-*POLQ* mRNA was performed on the Ventana Discovery Ultra automated slide staining system (Roche diagnostics, Rotkreuz, Switzerland) using RNAscope® VS Universal HRP Reagent Kit (Brown) (Advanced Cell Diagnostics, Inc., Hayward, CA; Cat# 323220) and RNAscope Probe specific to the region of the gene encoding Homo sapiens DNA polymerase  $\theta$  mRNA (Cat# 465519) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 5  $\mu$ m formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue sections were pre-treated at 96°C for 16 min prior to hybridization with the target probes. Preamplifier, amplifier, and HRP-labelled oligos were then hybridized sequentially, followed by chromogenic precipitate development. RNA integrity was controlled by the use of a RNAscope probe specific to Hs-PPIB RNA (Cat# 313909). A negative control with a probe specific to bacterial *dapB* RNA was also performed (Cat# 312039). Specific RNA staining signal was identified as brown dots. Slides were digitized using Panoramic 250 Flash II slide scanner (3DHISTECH, Budapest, Hungary) with x40 objective (resolution = 0.12154  $\mu$ m/pixel) and extended focus algorithm. For each case, three representative images were acquired at x60 magnification with CaseViewer (3DHISTECH, Budapest, Hungary). In the images, positive cells (cells with at least one *POLQ* RNAscope® signal in the nucleus) were manually annotated using dedicated annotation layers with the counter tool of the viewer Aperio ImageScope version 12.3.2 (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany). Percentage of stained cells, mean number of *POLQ* RNAscope® signal per stained cell and H-score (product of the two previous scores) were calculated for each case. *POLQ* expression was considered low or high with respect to a threshold for H-score at 30. This method for RNAscope® quantification relies on an excellent interobserver correlation ( $R^2 = 0.96$   $p < 0.0001$ , between two independent pathologists).

### **HPRT gene mutation assay**

Cells were infected with the indicated HPRT1 sgRNA CRISPR/Cas9 All-in-One constructs (Applied Biological Materials; Cat# K0986605) and cultured for an additional 7 days (cells were passaged twice in this period) with puromycin (Invivogen; Cat# ant-pr-1) for selection. After 7 days, cells were trypsinized, counted and seeded at low density (500 cells for untreated conditions and 3 000 cells for 6-TG treated conditions). For each sample, seven plates were seeded: three were left untreated to determine the cloning efficiency (-6TG condition), whereas 5  $\mu$ g/mL 6-thioguanine (6-TG, Sigma Aldrich; Cat# A4882) were added to the four other plates to select HPRT-deficient cells. Two weeks

## Résultats

after the addition of 6-TG, plates were washed with PBS 1X and stained with solution containing: 50% ethanol, 5% acetic acid and 0.5% brilliant blue R (Sigma Aldrich; Cat# B7920). Surviving colonies were scored, and the HPRT mutation frequency was calculated as follows:

$$\text{Mutation frequency} = \frac{\text{Number of 6-TG resistant clones}}{\text{Number of cells plated} \times \text{cloning efficiency}}$$
$$\text{(Cloning efficiency} = \frac{\text{Number of survived clones on untreated plates}}{\text{Number of cells plated}} \text{)}$$

## **RESULTS**

### ***POLQ* expression according to genomic instability in breast tumors**

To explore the importance of TMEJ in breast tumorigenesis and determine its impact on cancer genome stability, we first evaluated the expression of *POLQ*, *PARP1* and *LIG3* in primary breast tumors according to their genomic landscape. We analyzed the fraction of genome alteration (FGA), as a consequence of episodes of CIN accumulation over the course of tumor development and progression, in 3,083 primary breast cancers from combined databases, namely the cancer genome atlas breast invasive carcinoma (TCGA-BRCA) and the molecular taxonomy of breast cancer international consortium (METABRIC). We observed that the mRNA expression of *POLQ* was significantly positively correlated with FGA (Fig. 1A), whereas the correlation with *PARP1* and *LIG3* expression was less significant (Supplementary Fig. S1A). These results highlighted *POLQ* as a putative marker of CIN. We then assessed the variation in *POLQ*, *PARP1* and *LIG3* expression in primary tumors with distinct genomic landscapes by comparing their abundance at the transcript level in 10 integrative clusters (IntClust) from a molecular classification of breast cancers based on genomic and transcriptomic analyses<sup>28</sup>. The IntClust10, mostly characterized as the high-genomic instability subgroup (Fig. 1B), was greatly enriched in tumors expressing high levels of *POLQ* (Fig. 1C). Conversely, the expression of *POLQ* was reduced in IntClust4 and IntClust3 breast tumors, characterized by a paucity of FGA, IntClust4 being termed the copy number alterations (CNA)-devoid subgroup<sup>28,40</sup>.

In agreement with previous observations, we found that 52% of all claudin-low tumors belonged to the genomically-stable IntCluster4<sup>24</sup>, while 72% of basal-like tumors were mostly found in IntClust10, characterized by a large number of genomic aberrations (Fig. 1D). We have previously shown<sup>24,31</sup>, and confirmed here with additional data, that the IntClust4 was enriched in TNBCs with higher levels of ZEB1 expression (Fig. 1E, Supplementary Fig. S1B). Although *POLQ*, *PARP1* and *LIG3* expression within the subtypes displayed similar trends (Supplementary Fig. S1B), *POLQ* showed the most significant differences according to subtype. Having shown that these TMEJ actors were all under-expressed in the CIN<sup>low</sup> IntClust with high ZEB1 expression, we then examined if their regulation was coordinated. To address this, we first analyzed the steady-state levels of ZEB1, *POLQ*, *PARP1* and DNA ligase III $\alpha$  (*LIG3*) proteins in 4 basal-like and 4 claudin-low TNBC cell lines. Immunoblot analyses revealed low level of *POLQ* protein in most of the 4 claudin-low ZEB1-expressing cell lines compared to basal-like cells that do not express ZEB1 (Fig. 1F). No such correlation was seen for *PARP1* or *LIG3* (Fig. 1F). Compared to immortalized human mammary epithelial cell (HMEC-hTERT), *POLQ* protein appeared mostly increased in none-ZEB1-expressing cells (Supplementary Fig. S1C). Previous studies reported

## Résultats

variable levels of *POLQ* expression in breast cancer cell lines<sup>41</sup>, but the putative connection with ZEB1 was not explored.. Additionally, we show, using quantitative reverse-transcription PCR (qRT-PCR), that ZEB1 expression was elevated in claudin-low cell lines, whereas *POLQ* was largely poorly expressed in most of basal-like cells (Supplementary Fig. S1CD). No major variation was observed at the mRNA level for PARP1 and LIG3 in the tested cell lines as previously shown for the proteins. Taken together, these data indicate that *POLQ* expression is lower in ZEB1-expressing tumors and cancer cell lines.

### **ZEB1 positive tumors are usually *POLQ* negative**

We next performed co-occurrence analyses for gene expression across a set of 530 primary TNBCs from the combined TCGA and METABRIC databases. Statistical analysis for mutual exclusivity using the odds ratio (OR) calculation, revealed a significant likelihood odds ratio of 0.072 (p-value = 0.005574) that the changes found in the expression of these two genes were mostly mutually exclusive (Fig. 2A). Owing to the lack of available POL $\theta$  antibodies for immunohistochemistry detection, we then used RNAscope to monitor *POLQ* expression in 10 TNBCs previously characterized for ZEB1 expression<sup>24</sup>, by in situ immunohistochemistry staining (Fig. 2B). *POLQ* expression was low in 7, high in 2 and intermediate in 1 of the 10 ZEB1-expressing tumors (Fig. 2C and Supplementary Fig. S2A). Conversely *POLQ* expression was high in 16 of the 22 ZEB1 non-expressing TNBCs. It is worth mentioning that a single tumor sample displayed a ZEB1-positive staining in one part of the tumor with a *POLQ*-negative one, whereas the opposite was observed in another part (Supplementary Fig. S2B), therefore highlighting the mutual exclusivity of *POLQ* and ZEB1 expression in tumor presenting intra-tumor heterogeneity. Altogether, these results revealed highlighted an overall mutual exclusivity of ZEB1 and *POLQ* expression.

### **ZEB1 regulates *POLQ* expression**

Given the lower expression of *POLQ* in ZEB1-expressing claudin-low cancer cell lines, as compared to basal-like cell lines, we hypothesized that the ZEB1 EMT-inducing transcription factor may regulate *POLQ* expression. To address this, we first engineered ZEB1<sup>-/-</sup> cell lines using the CRISPR-Cas9 gene editing technology in the claudin-low MDA-MB-231 cell line (Supplementary Fig. S3A) and demonstrated that ZEB1 depletion resulted in a significant increase in POL $\theta$  protein (Fig. 3A) and mRNA levels (Supplementary Fig. S3B). Secondly, a depletion of ZEB1 using an siRNA approach (Fig. 3B) over 4 days resulted in an increase in POL $\theta$  protein and mRNA levels in this model (Supplementary Fig. S3C). Equivalent results were obtained by using two ZEB1 siRNA for depletion in the MDA-MB-231, BT-549

and SUM159 cell lines (Supplementary Fig. S3D). Conversely, over-expression of ZEB1 in the BT-20 basal-like cell line decreased the POL $\theta$  protein (Fig. 3C) and mRNA levels (Supplementary Fig. S3D), as well as in HCC70 cells (Supplementary Fig. S3F). Collectively, these findings suggest that *POLQ* expression is negatively regulated by ZEB1 in claudin-low cell lines. To explore whether this repression involved a direct interaction with the *POLQ* promoter, we analyzed the JASPAR database (<http://jaspar.binf.ku.dk>). We identified 3 putative ZEB1 binding sites within this region between positions -1279/-1269, -1191/-1181 and -712/-704 upstream of the transcription start site, conforming with the optimal recognition sequence of ZEB1 (CACCTG). Two putative E-boxes, binding sites for all of the EMT-TFs and other transcription factors (CANNTG), were identified at positions -1076/-1071 and -662/-654 (Fig. 3D, Supplementary Fig. S3E, F). We then performed chromatin-immunoprecipitation (ChIP) analyses and demonstrated that ZEB1 was able to bind to the *POLQ* promoter (Fig. 3E) compared to ZEB1-depleted and IgG controls, as previously demonstrated for the *CDH1* promoter used as a positive control<sup>42</sup>. To determine the significance of the ZEB1 binding to the promoter of *POLQ*, the promoter region of *POLQ* was cloned into luciferase-expressing plasmids (Supplementary Fig. S3G). The model was then validated by analyzing *CDH1* mRNA levels after knocking down ZEB1 expression in the MDA-MB-231 breast cancer cell line using siRNA (Supplementary Fig. S3H). ZEB1 depletion resulted in a significant increase in *POLQ* promoter activity for the -1280 bp construct (Supplementary Fig. S3I), suggesting a down-regulation of the *POLQ* promoter by ZEB1. We then generated a -691 bp construct lacking the ZEB1 boxes of the promoter. We observed significantly less activity of the *POLQ* promoter. The stimulation following ZEB1 depletion was no longer detected, suggesting a role for the -1280/-691 *POLQ* promoter in ZEB1 repression. Together, these results indicate that *POLQ* is a direct transcriptional target of ZEB1 and that ZEB1 represses *POLQ* expression.

### **ZEB1 modulates TMEJ**

We next focused on the functional interaction between ZEB1 and *POLQ* in order to mechanistically unravel the potential, as yet unreported, role of ZEB1 in TMEJ regulation. We directly assessed the intrinsic mutagenic TMEJ activity by evaluating the repair of a single genomic DSB in ZEB1-expressing compared to non-expressing tumor cells. To this end, we used a selection-based assay that captures mutagenic end-joining previously described<sup>43</sup>, in MDA-MB-231 claudin-low cell lines and in their ZEB1-depleted counterparts. Briefly, a unique site-specific DSB in the selectable hypoxanthine-guanine phospho-ribosyl-transferase (HPRT) marker gene is induced by CRISPR-Cas9 using a guided RNA directed against HPRT exon 2 (or exon 1 and exon 3 to evaluate the impact of the DSB location). HPRT enzymatic activity converts 6-thioguanine (6-TG) drug into toxic nucleotides inducing cell death.

Mutagenic repair of the targeted DSB in the HPRT gene leads to loss of HPRT protein expression or expression of an inactive HPRT protein, and renders cells resistant to 6-TG treatment (Fig. 4A). Thus, the frequency of HPRT mutations reflects the efficacy of mutagenic DSB repair and TMEJ activity. Colony forming assay analysis revealed a significant increase in mutation frequency in ZEB1-depleted cells (Fig. 4B), reflecting the increased level of POL $\theta$  (Supplementary Fig. S4A). As expected, no change in mutational frequency was observed following *POLQ* knockdown (Fig. 4B) since ZEB1-expressing cells displayed very low levels of POL $\theta$ . Yet, combined siZEB1/si*POLQ* rescued the increase in HPRT mutation observed in siZEB1, confirming that the HPRT assay mirrors TMEJ activity<sup>43</sup>. A significant increase in the mutational frequency in ZEB1-depleted cells compared to wild-type cells for the DSB induced both in exon 1 and in exon 3 (Supplementary Fig. S4B-E) was observed, suggesting no location effect of the single DSB generated. These data led us to propose that mutagenic repair of the DSB was alleviated in claudin-low cells because of the reduction in POL $\theta$  steady-state protein levels by ZEB1. Next, we generated an MDA-MB-231 model ectopically over-expressing POL $\theta$  and observed that it recapitulated the effects of ZEB1 depletion, *i.e.* a significant increase in the mutational frequency (Fig. 4C and Supplementary Fig. S4F), further validating our hypothesis.

### **ZEB1-mediated micronuclei formation by *POLQ* repression**

It has previously been reported in mouse models that either *Polq* mutation<sup>44</sup> or *Polq* depletion<sup>45</sup> leads to increased numbers of spontaneous micronuclei. Various molecular mechanisms contribute to micronuclei formation, including impaired DNA repair response and persistence of DSBs during mitosis associated with a defect in DNA repair pathways<sup>46</sup>. To address the consequences of a reduction of *POLQ* expression by ZEB1 in breast cancer cells, we investigated whether ZEB1 was associated with elevated levels of micronuclei in our previously described models. Consistent with our hypothesis, more than 50% of ZEB1-expressing cells, characterized by low POL $\theta$  levels, presented micronuclei (Fig. 4D). Importantly, ZEB1 depletion promoted a significant decrease in the number of micronuclei (lower than 25%), while the forced expression of ZEB1 in BT-20, resulted in a significant increase in micronuclei (Fig. 4E), as well as in HCC70 (Supplementary Fig. S4G). Moreover, the forced expression of POL $\theta$  in ZEB1-expressing cells also led to a marked decrease in their number (Fig. 4F). These data suggest that the negative regulation of POL $\theta$  by ZEB1 in claudin-low breast cancer cells, contributes to micronuclei formation. Collectively, these findings argue in favor of an essential role for POL $\theta$  during the error-prone TMEJ mechanism in preserving genomic integrity at the cost of enhancing genetic alterations.

## **DISCUSSION**

In conclusion, we provide evidence of the first mechanism of TMEJ regulation involving the EMT inducing transcription factor ZEB1 and show how the interplay between ZEB1 and *POLQ* may impact cancer genome stability and integrity (Fig. 5).

Firstly, we highlight a relatively generalized mutual exclusivity of *POLQ* and ZEB1 expressions in TNBCs. High *POLQ* gene expression is enriched in the most genomically rearranged breast cancer subtype, IntClust10 containing HR-deficient tumors<sup>31</sup>, confirming the previously described dependency of HR-deficient tumors on *POLθ* and TMEJ repair for survival in ovarian and breast tumors<sup>14,15</sup>. Our findings also show that some TNBCs displayed lower *POLQ* expression. Indeed, lower *POLQ* expression was observed in the IntClust4 subgroup encompassing high ZEB1-expressing claudin-low tumors that exhibit a paucity of genomic aberrations<sup>24,31</sup>. Our findings supported the notion that *POLθ* plays a role in the onset of some type of chromosomal alterations in breast tumors. Nevertheless, not all of the chromosomal alterations can be ascribed to *POLθ* within TMEJ. For instance, some large deletions have been shown to arise in *C. elegans* genome in the absence of *POLθ*<sup>47</sup> and papers have reported that, in cNHEJ-deficient cells, *POLθ* could also protect against chromosomal instability in non-cancer cells<sup>45,48</sup>. However, instability of the genome is inherent to the great majority of human cancers<sup>1</sup>, and *POLθ* is largely upregulated in highly unstable human cancers, including breast<sup>49</sup>, ovarian<sup>14,50</sup>, lung, gastric and colorectal<sup>51</sup>. As we shown that *POLQ* expression is highly correlated with genome instability, we suggested that the low CIN instability observed in claudin-low tumors is partly due to *POLQ* repression by ZEB1.

Secondly, we confirmed that micronuclei are observed in *POLQ*-deficient cells, and we showed that their number increased in a ZEB1-dependant manner. We proposed that increase micronuclei number occurred likely as a result of unrepaired break accumulation due to TMEJ defect. It is unclear how chromosomally-unstable cancer cells cope with the presence of micronuclei. Surprisingly in claudin-low tumors, the loss of genome integrity, *i.e.* micronuclei increase, seems to preserve genome stability. Nevertheless, these observations are consistent with the concept that ZEB1 acts in cancer progression by protecting the genome against instability. We have previously shown that ZEB1 withstands an oncogenic activation by driving an anti-oxidant program, leading to a process of malignant transformation in the absence of exacerbated genomic instability<sup>24</sup>. Similarly, it was suggested that ZEB1 is required for homologous-recombination-mediated DNA damage repair and the clearance of DNA breaks<sup>25</sup>. We report here that ZEB1 prevents the highly mutagenic TMEJ in claudin-low cells displaying micronuclei. In cancer cells, TMEJ would therefore be a fully-fledged

## Résultats

repair pathway, *i.e.* a factor assisting cancer cell survival similarly to replication stress<sup>52</sup>. As suggested previously<sup>24</sup>, ZEB1 may foster plasticity through cell adaptability rather than genomic variation. Future approaches need to address how TMEJ thus participates in genome integrity in human cells.

Finally, to further our understanding of the biological complexity of claudin-low tumors and ultimately improve the outcomes of breast cancer patients, our data may have clinical implications. The TMEJ down-regulation that we characterized in claudin-low cells, may trigger a compensatory increase in the c-NHEJ. Although this hypothesis remains to be tested, assessment of the sensitivity of claudin-low tumors to NHEJ inhibitors may be a strategy for targeting patients with claudin-low cancers.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors thank B. Manship for proofreading the manuscript. This work was supported by funding from the Ligue Nationale contre le Cancer (EL2016.LNCC/AIP and EL2019.LNCC/AIP) and SIRIC LYriCAN (INCa-DGOS-Inserm\_12563). MKP was recipient of fellowships from the Ligue Nationale contre le Cancer.

**REFERENCES**

1. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
2. Halazonetis, T. D., Gorgoulis, V. G. & Bartek, J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science (New York, N.Y.)* **319**, 1352–1355 (2008).
3. Ceccaldi, R., Rondinelli, B. & D’Andrea, A. D. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends in Cell Biology* **26**, 52–64 (2016).
4. O’Driscoll, M. & Jeggo, P. A. The role of double-strand break repair — insights from human genetics. *Nature Reviews Genetics* **7**, 45–54 (2006).
5. Scully, R., Panday, A., Elango, R. & Willis, N. A. DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2019). doi:10.1038/s41580-019-0152-0
6. Seol, J.-H., Shim, E. Y. & Lee, S. E. Microhomology-mediated end joining: Good, bad and ugly. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **809**, 81–87 (2018).
7. Schimmel, J., van Schendel, R., den Dunnen, J. T. & Tijsterman, M. Templated Insertions: A Smoking Gun for Polymerase Theta-Mediated End Joining. *Trends in Genetics* **35**, 632–644 (2019).
8. Patterson-Fortin, J. & D’Andrea, A. D. Exploiting the Microhomology-Mediated End-Joining Pathway in Cancer Therapy. *Cancer Research* (2020). doi:10.1158/0008-5472.can-20-1672
9. Brambati, A., Barry, R. M. & Sfeir, A. DNA polymerase theta (Pol $\theta$ ) – an error-prone polymerase necessary for genome stability. *Current Opinion in Genetics and Development* **60**, 119–126 (2020).
10. Simsek, D. & Jasin, M. Alternative end-joining is suppressed by the canonical NHEJ component Xrcc4-ligase IV during chromosomal translocation formation. *Nature structural & molecular biology* **17**, 410–6 (2010).
11. Chiarle, R. *et al.* Genome-wide Translocation Sequencing Reveals Mechanisms of Chromosome Breaks and Rearrangements in B Cells. *Cell* **147**, 107–119 (2011).
12. Hwang, T. *et al.* Defining the mutation signatures of DNA polymerase  $\theta$  in cancer genomes. *NAR Cancer* **2**, (2020).
13. Carvajal-Garcia, J. *et al.* Mechanistic basis for microhomology identification and genome scarring by polymerase theta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **117**, 8476–8485 (2020).
14. Ceccaldi, R. *et al.* Homologous-recombination-deficient tumours are dependent on Pol $\theta$ -mediated repair. *Nature* **518**, 258–262 (2015).
15. Mateos-Gomez, P. A. *et al.* Mammalian polymerase  $\theta$  promotes alternative NHEJ and suppresses recombination. *Nature* **518**, 254–7 (2015).
16. Seki, M. & Wood, R. D. DNA polymerase  $\theta$  (POLQ) can extend from mismatches and from bases opposite a (6-4) photoproduct. *DNA Repair* **7**, 119–127 (2008).

17. Wood, R. D. & Doublé, S. DNA polymerase  $\theta$  (POLQ), double-strand break repair, and cancer. *DNA Repair* **44**, 22–32 (2016).
18. Perou, C. M. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *The oncologist* **15 Suppl 5**, 39–48 (2010).
19. Prat, A. & Perou, C. M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular oncology* **5**, 5–23 (2011).
20. Prat, A. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast cancer research : BCR* **12**, R68 (2010).
21. Puisieux, A., Brabletz, T. & Caramel, J. Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nature cell biology* **16**, 488–494 (2014).
22. Wellner, U. *et al.* The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nature cell biology* **11**, 1487–95 (2009).
23. Morel, A.-P. P. *et al.* EMT inducers catalyze malignant transformation of mammary epithelial cells and drive tumorigenesis towards claudin-low tumors in transgenic mice. *PLoS Genetics* **8**, e1002723 (2012).
24. Morel, A.-P. *et al.* A stemness-related ZEB1-MSRB3 axis governs cellular pliancy and breast cancer genome stability. *Nature medicine* **23**, 568–578 (2017).
25. Zhang, P. *et al.* ATM-mediated stabilization of ZEB1 promotes DNA damage response and radioresistance through CHK1. *Nature Cell Biology* **16**, 864–875 (2014).
26. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. **2019**,
27. Gu, Z., Eils, R. & Schlesner, M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics (Oxford, England)* **32**, 2847–9 (2016).
28. Curtis, C. *et al.* The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* **486**, 346–352 (2012).
29. Johnson, W. E., Li, C. & Rabinovic, A. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostatistics (Oxford, England)* **8**, 118–27 (2007).
30. Leek, J. T., Johnson, W. E., Parker, H. S., Jaffe, A. E. & Storey, J. D. The SVA package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. *Bioinformatics* **28**, 882–883 (2012).
31. Pommier, R. M. *et al.* Comprehensive characterization of claudin-low breast tumors reflects the impact of the cell-of-origin on cancer evolution. *Nature Communications* **11**, (2020).
32. Scrucca, L., Fop, M., Murphy, T. B. & Raftery, A. E. mclust 5: Clustering, Classification and Density Estimation Using Gaussian Finite Mixture Models. *The R journal* **8**, 289–317 (2016).
33. Gendoo, D. M. A. *et al.* Genefu: an R/Bioconductor package for computation of gene expression-based signatures in breast cancer. *Bioinformatics* **32**, 1097–1099 (2016).
34. Haibe-Kains, B. *et al.* A Three-Gene Model to Robustly Identify Breast Cancer Molecular Subtypes. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **104**, 311–325 (2012).
35. Wirapati, P. *et al.* Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. *Breast Cancer Research* **10**, R65 (2008).

36. Parker, J. S. *et al.* Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. *Journal of Clinical Oncology* **27**, 1160–1167 (2009).
37. Hu, Z. *et al.* The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC genomics* **7**, 96 (2006).
38. Paquet, E. R. & Hallett, M. T. Absolute assignment of breast cancer intrinsic molecular subtype. *Journal of the National Cancer Institute* **107**, 357 (2015).
39. Fernandez-Vidal, A. *et al.* A role for DNA polymerase  $\delta$  in the timing of DNA replication. *Nature Communications* **5**, (2014).
40. Dawson, S.-J. J., Rueda, O. M., Aparicio, S. & Caldas, C. A new genome-driven integrated classification of breast cancer and its implications. *EMBO Journal* **32**, 617–628 (2013).
41. Wang, Z. *et al.* DNA polymerase theta ( POLQ ) is important for repair of DNA double-strand breaks caused by fork collapse. *Journal of Biological Chemistry* **294**, 3909–3919 (2019).
42. Cieply, B., Farris, J., Denvir, J., Ford, H. L. & Frisch, S. M. Epithelial-mesenchymal transition and tumor suppression are controlled by a reciprocal feedback loop between ZEB1 and Grainyhead-like-2. *Cancer research* **73**, 6299–309 (2013).
43. Schimmel, J., Kool, H., van Schendel, R. & Tijsterman, M. Mutational signatures of non-homologous and polymerase theta-mediated end-joining in embryonic stem cells. *The EMBO journal* **36**, 3634–3649 (2017).
44. Shima, N., Munroe, R. J. & Schimenti, J. C. The Mouse Genomic Instability Mutation chaos1 Is an Allele of Polq That Exhibits Genetic Interaction with Atm. *Molecular and Cellular Biology* **24**, 10381–10389 (2004).
45. Yousefzadeh, M. J. *et al.* Mechanism of Suppression of Chromosomal Instability by DNA Polymerase POLQ. *PLoS Genetics* **10**, e1004654 (2014).
46. Ye, C. J. *et al.* Micronuclei and Genome Chaos : Changing the System Inheritance. 1–21
47. Koole, W. *et al.* A Polymerase theta-dependent repair pathway suppresses extensive genomic instability at endogenous G4 DNA sites. *Nature Communications* **5**, 3216 (2014).
48. Wyatt, D. W. *et al.* Essential Roles for Polymerase  $\theta$ -Mediated End Joining in the Repair of Chromosome Breaks. *Molecular Cell* **63**, 662–673 (2016).
49. Lemee, F. *et al.* DNA polymerase  $\delta$  up-regulation is associated with poor survival in breast cancer, perturbs DNA replication, and promotes genetic instability. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 13390–13395 (2010).
50. Konstantinopoulos, P. A., Ceccaldi, R., Shapiro, G. I. & D’Andrea, A. D. Homologous Recombination Deficiency: Exploiting the Fundamental Vulnerability of Ovarian Cancer. *Cancer Discovery* **5**, 1137–1154 (2015).
51. Kawamura, K. *et al.* DNA polymerase Theta is preferentially expressed in lymphoid tissues and upregulated in human cancers. *International journal of cancer* **16**, 9–16 (2004).
52. Feng, W. *et al.* Genetic determinants of cellular addiction to DNA polymerase theta. *Nature Communications* **10**, 4286 (2019).

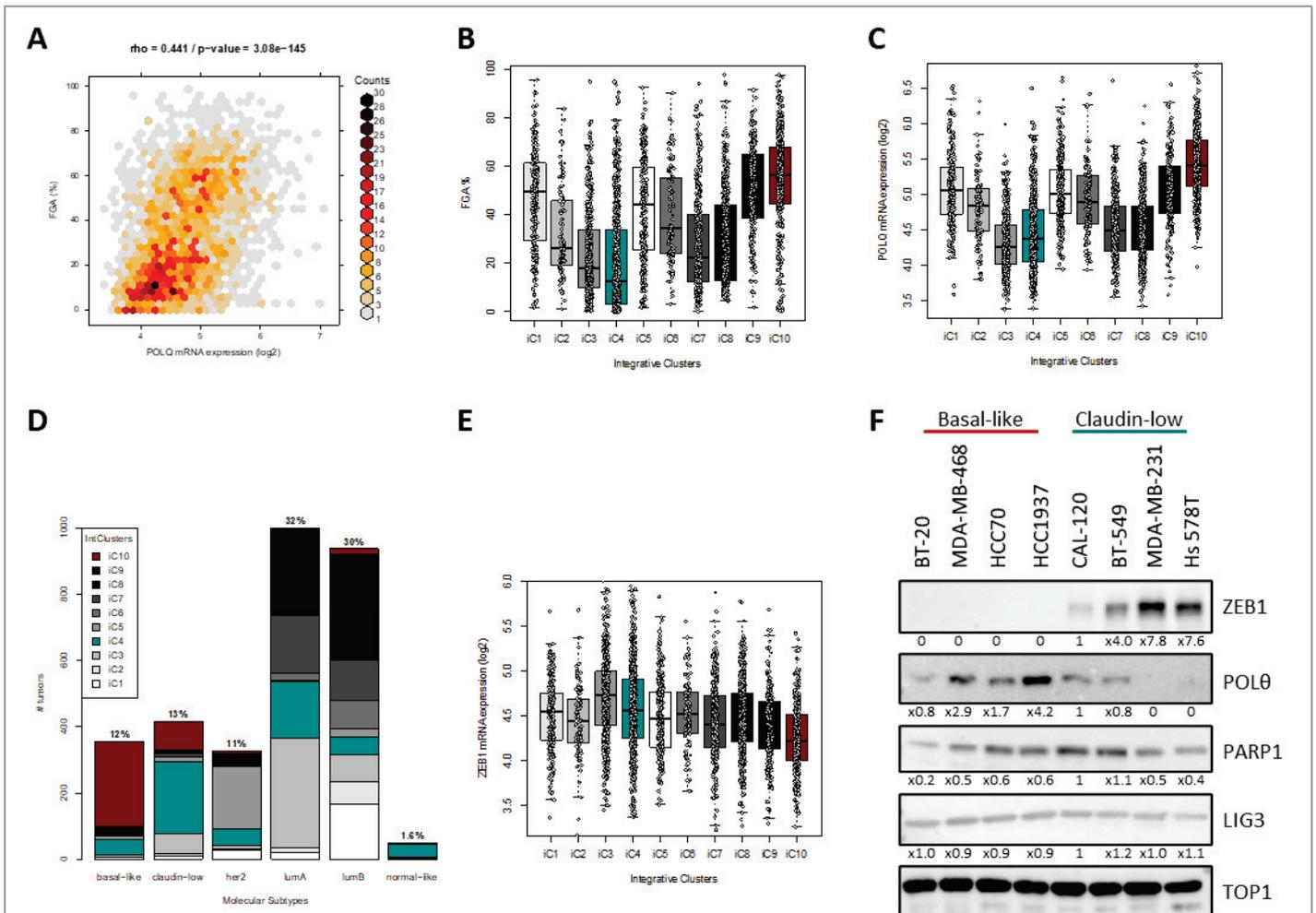
**Table 1: Primer and probe list for qPCR**

Primers	DNA probe	Forward	Reverse
GAPDH	60	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'	5'-GCCCAATACGACCAATCC-3'
LIG3	7	5'-GCTGGCCACAAAGTCTTCTC-3'	5'-CCAGTGAAGATGCCAGCAA-3'
PARP1	22	5'-TCCTTGATGTGGAAAGTATGAAGAA-3'	5'-GGCATCTTCTGAAGGTCGAT-5'
POLQ	40	5'-GATTGAGCCAGAGTCTGTTGG-3'	5'-TCCATAAATGATCCCATAGCTT-3'
UBB	39	5'-AGGATCCTGGTATCCGCTAAC-3'	5'-TCACATTTTCGATGGTGTCACT-3'
ZEB1	57	5'-AACTGCTGGGAGGATGACAC-3'	5'-TCCTGCTTCATCTGCCTGA-3'

**FIGURE**

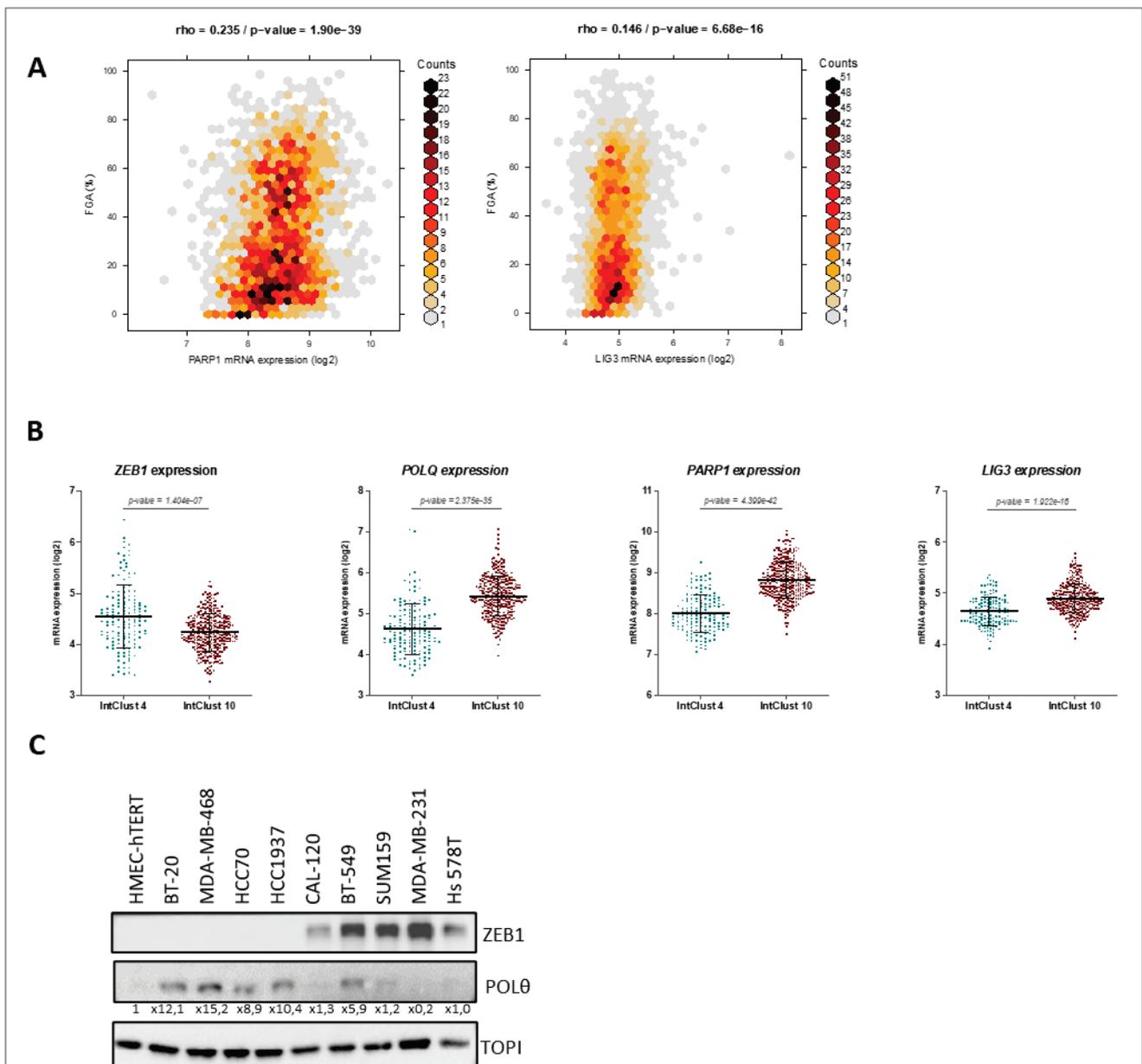
**Figure 1. *POLQ* expression according to genomic instability in breast tumors**

A, Pearson correlation between the fraction of the genome altered (FGA) and *POLQ* mRNA expression in 3,083 breast tumors for the combined TCGA and METABRIC datasets. The color code indicates the number of samples (counts) corresponding to each color. FGA (B), *POLQ* mRNA expression (C) and ZEB1 mRNA expression (E) in subgroups (integrative cluster, IntCluster) of breast tumors. Analyses were performed for the combined METABRIC and TCGA breast datasets. Results are expressed as a log<sub>2</sub> of mRNA expression. Significance was determined using the Mann-Whitney U test. Central line, median; points, all data points. D, Distribution of IntClusters among breast molecular subtypes (PAM50+claudin-low). F, immunoblot showing the protein levels of ZEB1, DNA polymerase  $\theta$  (POL $\theta$ ), PARP1 and DNA ligase III (LIG3) in TNBC cell lines normalized to CAL-120. DNA topoisomerase I (TOP1) served as a loading control; n = 4 independent experiments.



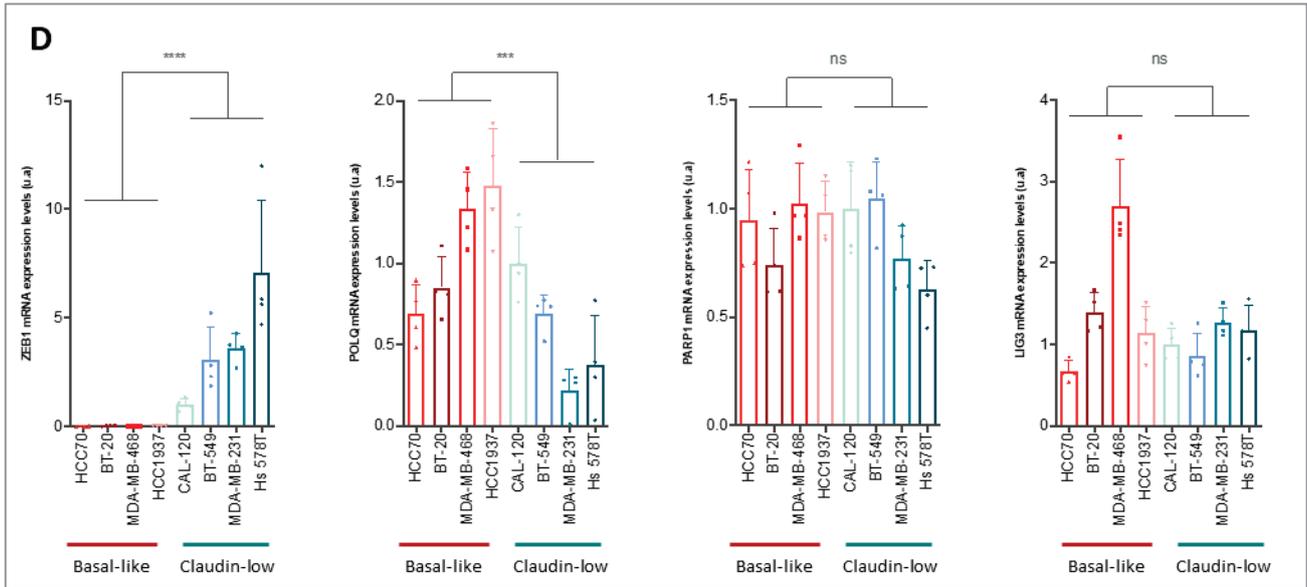
**Figure S1. PARP1 and LIG3 expression according to genomic instability in breast tumors**

A, Pearson correlation between FGA and PARP1 or LIG3 mRNA expression in 3,083 breast tumors for the combined TCGA and METABRIC datasets. The color code indicates the number of samples (counts) corresponding to each color. Results are expressed as a log2 of mRNA expression. Significance was determined using the Mann-Whitney U test. B, ZEB1, POLQ, PARP1 and LIG3 mRNA expression in 530 TNBCs in subgroups (integrative cluster, IntCluster) of breast tumors in the METABRIC and TCGA combined datasets. For IntClusters 4 and 10, n = 263 and n = 340, respectively. Results are expressed as a log2 of mRNA expression. Significance was determined using the Mann-Whitney U test. Central line, median; points, all data points. C, Immunoblot showing the protein levels of ZEB1 and DNA polymerase  $\theta$  (POL $\theta$ ) in TNBC cell lines normalized to HMEC-hTERT normal immortalized cell line. DNA topoisomerase I (TOP1) served as a loading control; n = 2 independent experiments.



**Figure S1. PARP1 and LIG3 expression according to genomic instability in breast tumors (continued)**

D, ZEB1, POLQ, PARP1 and LIG3 mRNA expression, assessed by qRT-PCR, in 8 TNBC cell lines. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of n = 4 independent experiments. \*\*\* p < 0.001; \*\*\*\* p < 0.0001; ns, not significant. unpaired two-tailed Student's t-test with Welch's correction.



**Figure 2. ZEB1 positive tumors are usually *POLQ* negative**

A, OncoPrint of high and low expression for *POLQ* and ZEB1 gene. The OncoPrint provides an overview of genomic alterations (legend) in particular genes (rows) affecting particular individual samples (columns). Gene expression of *POLQ* and ZEB1 are mutually exclusive in TNBC as evidenced by the odds ratio. Molecular breast cancer subtype, genomic copy number alterations (FGA) as well as IntClusters for each sample are depicted. N = 3,083. B, Representative immunohistochemistry of two serial sections of a negative and a positive case of TNBC for ZEB1 (brown) and RNAscope® for *POLQ* (brown dots) showing mutual exclusion in cancer cells. Scale bars, 40 μm for high magnification pictures, 4 mm for overview. C, Distribution of *POLQ* expression staining in 10 ZEB1-positive and 22 ZEB1-negative TNBCs. \* p < 0.05; unpaired two-tailed Student's t-test with Welch's correction.

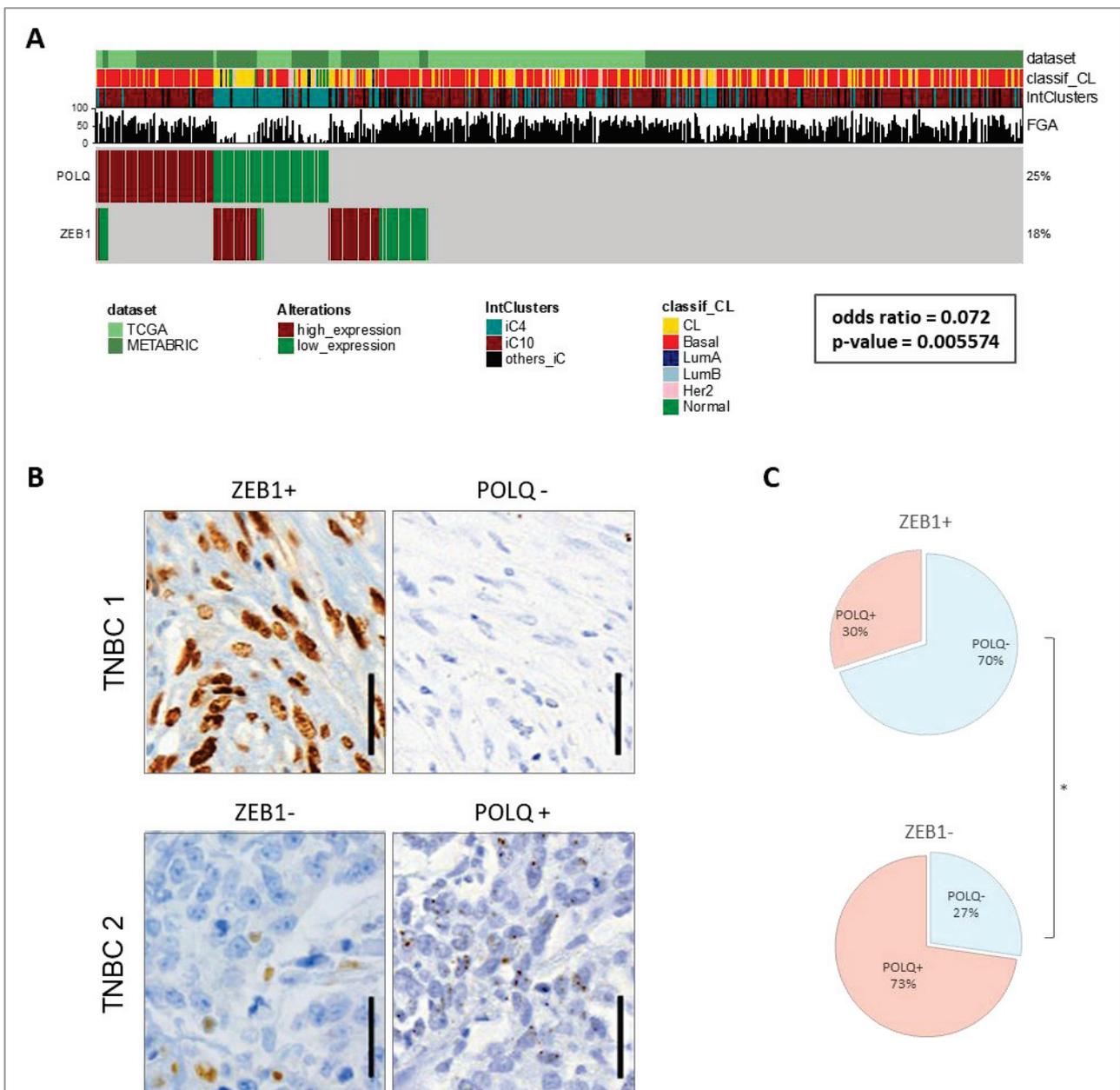
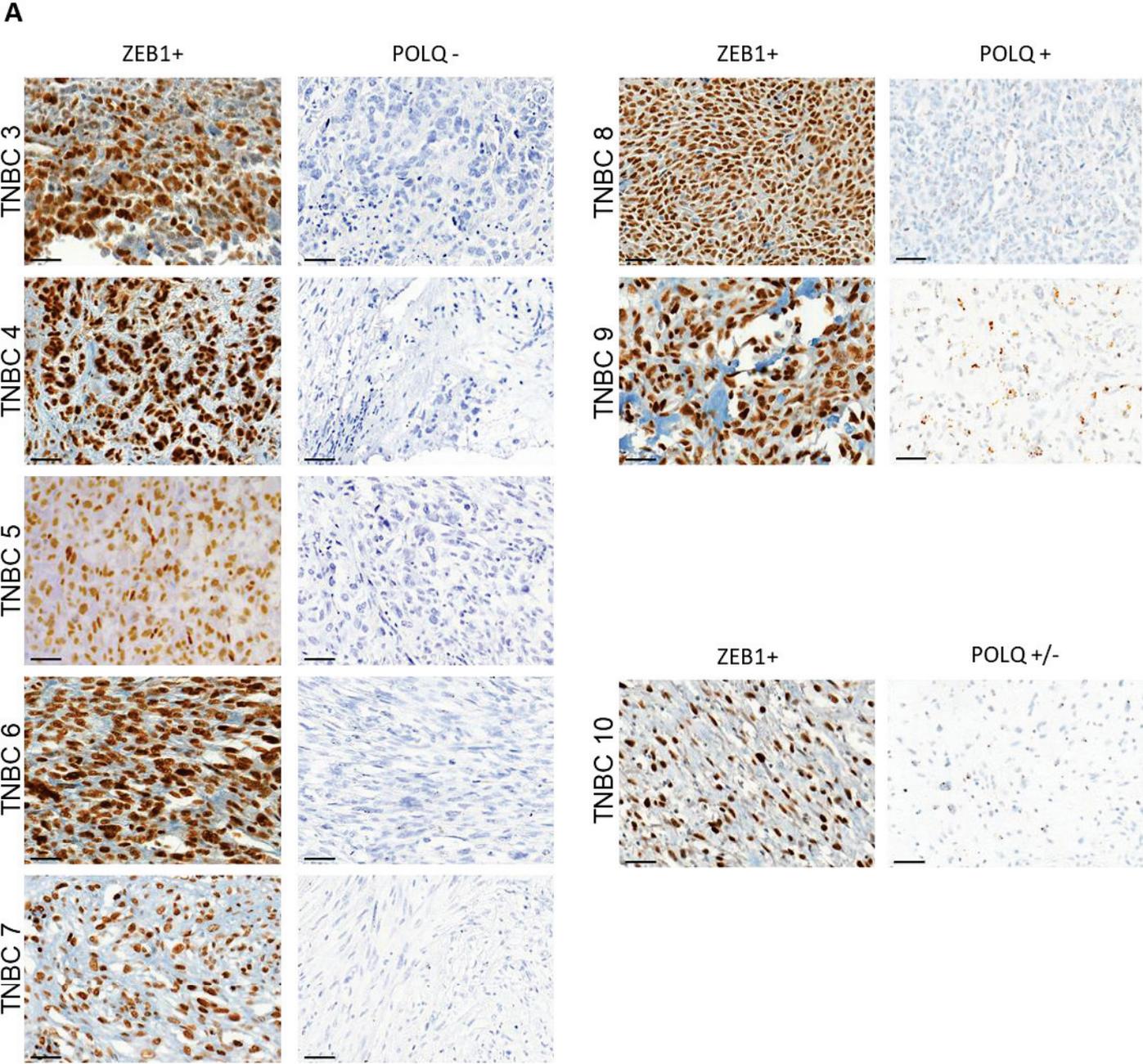


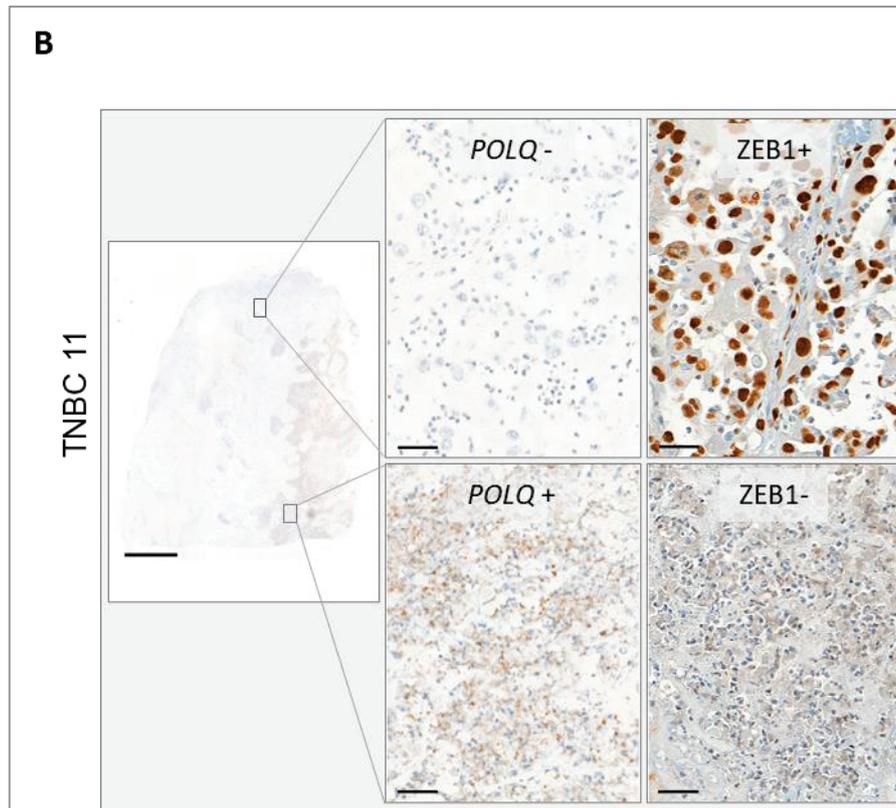
Figure S2. *POLQ* and ZEB1 expressions are mostly mutually exclusive in tumors

A, Representative immunohistochemistry of TNBCs for ZEB1 (brown) and RNAscope® for *POLQ* (brown dots) showing mutual exclusion in cancer cells. Positive cells in TNBC11 correspond to stromal cells. Scale bars, 40 µm.



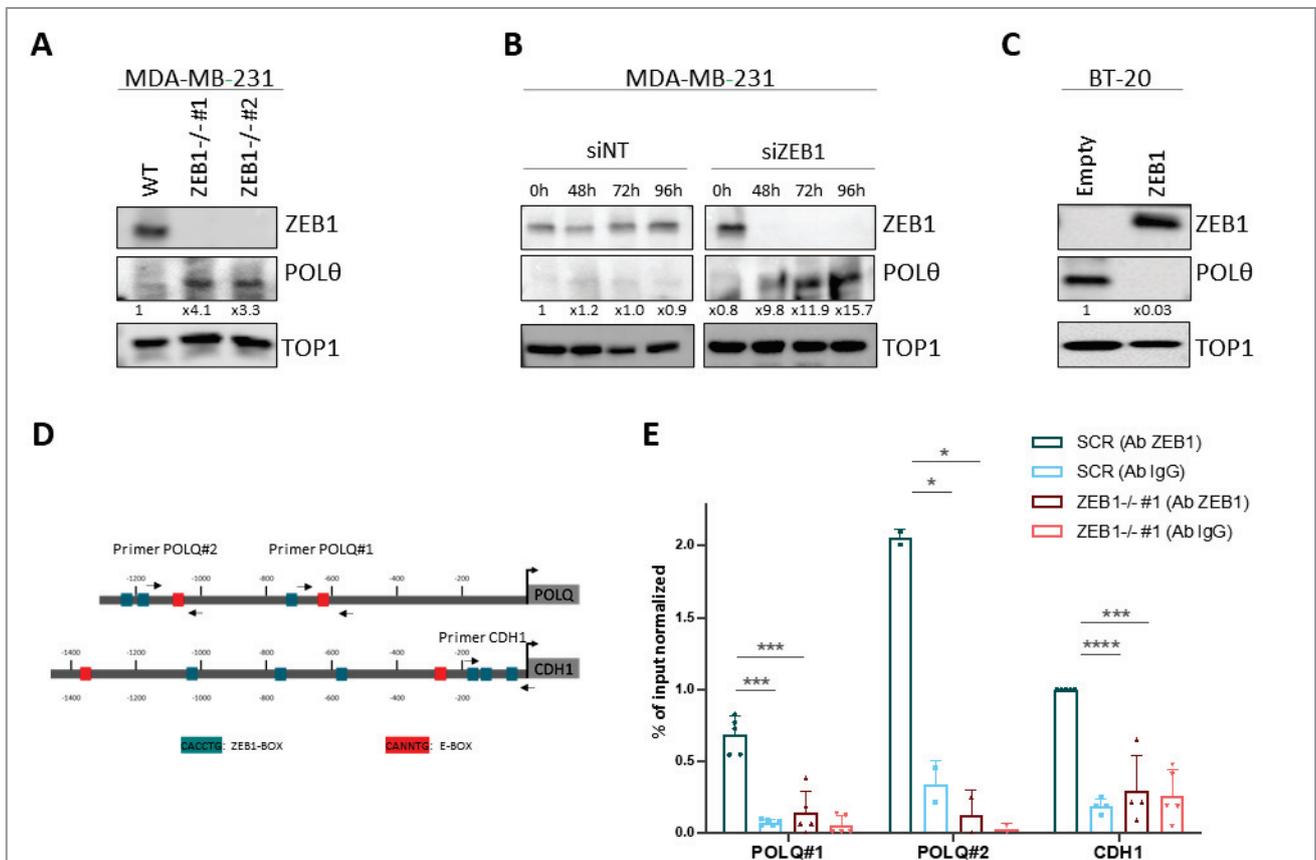
**Figure S2. *POLQ* and *ZEB1* expressions are mostly mutually exclusive in tumors**

B, Representative immunohistochemistry of TNBCs for *ZEB1* (brown) and RNAscope® for *POLQ* (brown dots) showing mutual exclusion in cancer cells. Positive cells in TNBC11 correspond to stromal cells. Scale bars, 40 µm.



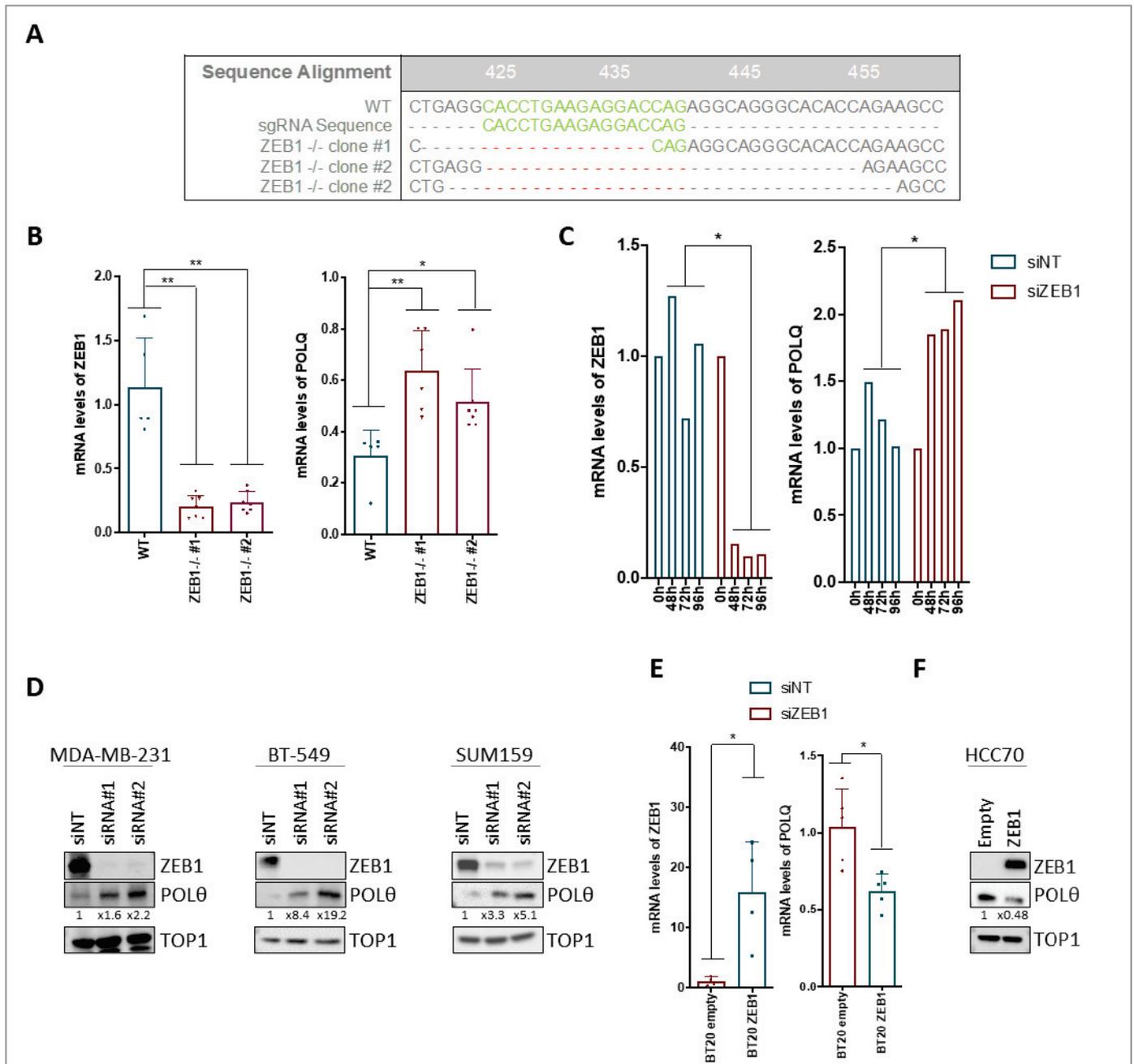
**Figure 3. ZEB1 regulates *POLQ* expression**

A, Immunoblot showing the protein levels of ZEB1 and DNA polymerase  $\theta$  (POL $\theta$ ) in stable depletion of ZEB1 in MDA-MB-231 cells (ZEB1<sup>-/-</sup> #1 or #2); n = 4 independent experiments. B, Kinetics of POL $\theta$  protein level after transient knockdown with siZEB1#2. Western blot of noted cell types assessing expression of endogenous ZEB1 and POL $\theta$  proteins. C, Immunoblot showing the protein levels of ZEB1 and DNA polymerase  $\theta$  (POL $\theta$ ) in stable overexpression of ZEB1 in BT-20 cells; n = 4 independent experiments. DNA topoisomerase I (TOP I) served as a loading control. Noted below are the mean levels of protein (normalized to correct for loading differences using the TOP I control) for the representative Western blot presented. n = 4 independent experiments. D, Schematic representation of the promoter region of human *POLQ* (top) and *CDH1* (bellow) genes on chromosomes 3q13.33 and 16q22.1, respectively. The potential ZEB1 (Z-boxes CACCTG in blue) and E-box (CANNTG in red) binding sites, the regions amplified after chromatin immunoprecipitation (ChIP) (arrows represent primer pairs) are depicted. Numbers indicate positions in bp on chromosomal DNA relative to the transcription start site (+ 1). E, qPCR analysis after ChIP for endogenously expressed ZEB1 in ZEB1-depleted (ZEB1<sup>-/-</sup> #1) or control (SCR) MDA-MB-231 cells. *CDH1* is used as positive control; n = 3 independent experiments. mean  $\pm$  SEM. \* p < 0.05; \*\*\* p < 0.001; \*\*\*\* p < 0.0001; unpaired two-tailed Student's t-test with Welch's correction.



**Figure S3. ZEB1 regulates *POLQ* expression**

A, Genomic DNA sequencing using the Sanger method for ZEB1  $-/-$  #1 or #2. B, Stable depletion of ZEB1 in MDA-MB-231 cells results in upregulation of POLQ mRNA as evidenced by qRT-PCR; n = 5 independent experiments. C, kinetics of depletion of ZEB1 in MDA-MB-231 cells results in upregulation of POLQ gene on mRNA analyzed by qRT-PCR; n = 3 independent experiments. D, Immunoblot showing the protein levels of ZEB1 and DNA polymerase  $\theta$  (POL $\theta$ ) in noted ZEB1-expressing cell types (MDA-MB-231, BT-549 and SUM159) after transient knockdown with siZEB1#1 and siZEB1#2. n = 3 independent experiments for MDA-MB-231 and BT-549; n=2 independent experiments for SUM159. E, qRT-PCR analysis of ZEB1 and POLQ genes in ZEB1-OE BT-20 cells. Data represent mean  $\pm$  SEM. n = 4 independent experiments. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, unpaired two-tailed Student's t-test with Welch's correction. F, Immunoblot showing the protein levels of ZEB1 and DNA polymerase  $\theta$  (POL $\theta$ ) in HCC70 forced ZEB1 expression cells; n = 2 independent experiments.



**Figure S3. ZEB1 regulates *POLQ* expression (continued)**

G, Schematic representation of the promoter region of human *POLQ*. Promoter sequence is represented in black and +1 of the transcription starting site (TSS) and the cDNA are depicted in blue. Red highlights correspond to E-box (CANNTG) and turquoise highlights to ZEB1 boxes (CACCTG). H, JASPAR analyses: 4 putative ZEB1-box sites were predicted using a relative profile score threshold of 85%. I, Schematic representation of the promoter region of human *POLQ* (top) and *CDH1* (bellow) genes. The potential ZEB1 (Z-boxes CACCTG in blue) and E-box (CANNTG in red) binding sites, the regions cloned in luciferase plasmids are depicted. Numbers indicate positions in bp on chromosomal DNA relative to the transcription start site (+ 1). J, qRT-PCR analysis of *ZEB1*, *POLQ* and *CDH1* genes in MDA-MB-231 cells knocked down for ZEB1 by siRNA. Data represent mean  $\pm$  SEM. n = 5 independent experiments. K, Luciferase (Gaussia) reporter constructs used with and without Z-boxes or E-boxes analyzed in MDA-MB-231 cells transiently transfected with *POLQ*, *CDH1* or empty vector control are shown; n = 3 independent experiments. For reporter assays, Gaussia luciferase activity was normalized against SEAP, an internal plasmid control. For g-h, mean  $\pm$  SEM. \* p < 0.05; \*\*\* p < 0.001; \*\*\*\* p < 0.0001; ns, not significant, unpaired two-tailed Student's t-test with Welch's correction.

**G**

```

-1280      AAGCAGCG  CAG  CATAACC  CGGCTAATTT
-1281  TTTGTATTTT  TGTAGAGAGC  GGGTTTCACC  ATGTTGGCCA  GGCCTGGCTA
-1282  GAGCTCCTGA  CACTAGCTGA  TGCACATCAT  TCGGCCCTCC  AAAGTGTCTG
-1181  GATTACAGGC  GTGAGCCACC  ACGGCCGGCG  AGATCTCTTT  TATTTCTTTA
-1101  ATAGTACTCT  TCATTTCTGC  CCAAGCTATG  GCAACTTTC  ATTAACTGAC
-1081  TTGTTTAAATG  TCTGCTTAT  TCTCTAGACT  CTTTCTCTTT  GAGAGCAGGA
-1001  ACCATTTTAT  GCCAATTCAC  TGCCATTTAC  CCAAGTGGCTA  GCTTACAGTA
-981  GATACTCAGT  AAATAGTTGT  TGATTGCGTA  AAAGGCCAAG  AGAAAAATGT
-901  TTCATTACCG  GAGTAATGTC  GCCATCTCGT  GGAACCTTAG  AATATTGTCA
-881  TTTAAATCAA  AAAAATGTTT  TCACGGAAAG  AATTGATGGT  TCGAATGCTA
-801  TTTTCCAGAT  TGTATTGCGA  TGTTTTTTTT  TTTTTTAAT  GGACTGGACC
-781  TTTTGAGATT  TTTAGTGCTC  TAGAATGCA  CAGCCTCTT  ACGCTAGCTC
-701  TAGGGCCTAC  TAGTTTTGCT  TGGTGAATG  AATTATGCAA  CTAGGTAATG
-681  AATGGTCACC  GTTTTAGCTT  CAGAATCGT  TCGCTCTAC  CTTTACAAAA
-601  GGGACAACG  AATATG  CATTA  CTAAGCTCTT  GGCCTATAAC  GATCCCTGGG
-581  GATATTACG  AGCCCTTCC  TCGCGGCTT  CATATAGTGT  CTCAGGGGTC
-501  TGTCCAGCCG  CAATCCCCAA  TTCCTCATA  CATATTCTC  ACAATGCAAG
-481  CTGGCTAATA  TGGAAATGT  GTTCAGAAAT  AGCCCTGCC  TACCATCATA
-401  TACTAGGAGA  AAGGAGGAAA  TTAGTCTTA  TTAGAAACC  TAGGTAATCT
-381  TGCATAATGC  TTCTCAATCT  GAAATTAAT  TTAGAAGAT  ACCAATACGT
-301  TAAGAGAGC  TACTTCCTGT  ATCTACCTAT  TATGGGACG  CCATTTATG
-281  AAGTTAGCAT  GGCCTTCTA  TTCAAACCA  AAATGGACA  AAGGAGAAGG
-201  AAGGCTTTTA  GGTCAATAT  GTTATAACT  TAGATTCTG  ATTCTTCTC
-181  TTTAATCTAT  CTCTCATAT  AACCACCA  GAGGTTGGG  GCCGGAAGTC
-101  TTAGAGCCCA  GCGAGAGCC  CTCCTCCCC  ACGAGTCTA  GCTTTTGGG
-81  TTACTTAAAC  CACGGAGAAC  TCTATGTTT  CCGGGCGGG  CCGGAGGTTT
-1  Gaggttgaa  actggcggga  agatgtccgc  agctgttgc  aggccagggt
+51  tctcccagga  gggaggagc  tgggactgtg  gcttgccctg  atcggccgag
    
```

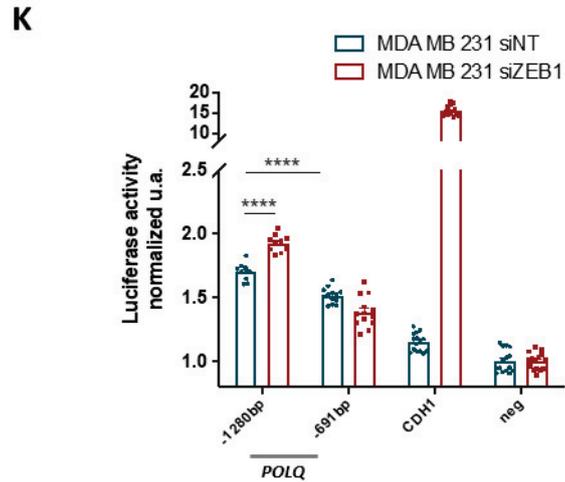
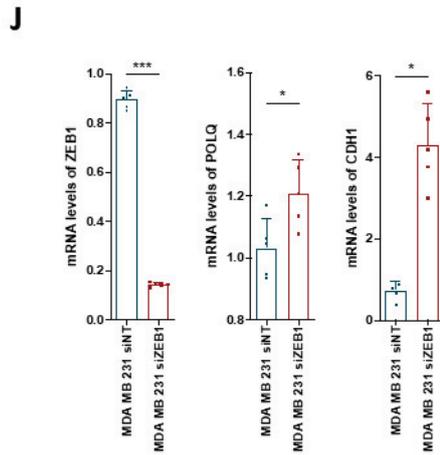
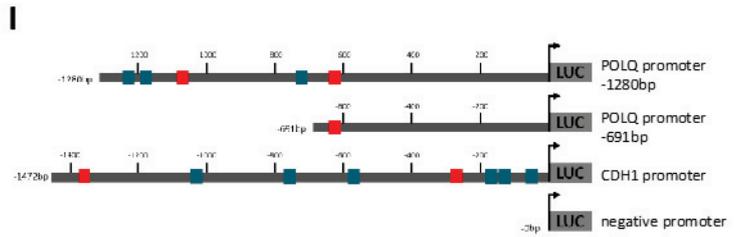
+1 = Transcription starting site then cDNA in blue

**CANNTG**: E-BOX

**CAGCTG**: ZEB1-BOX

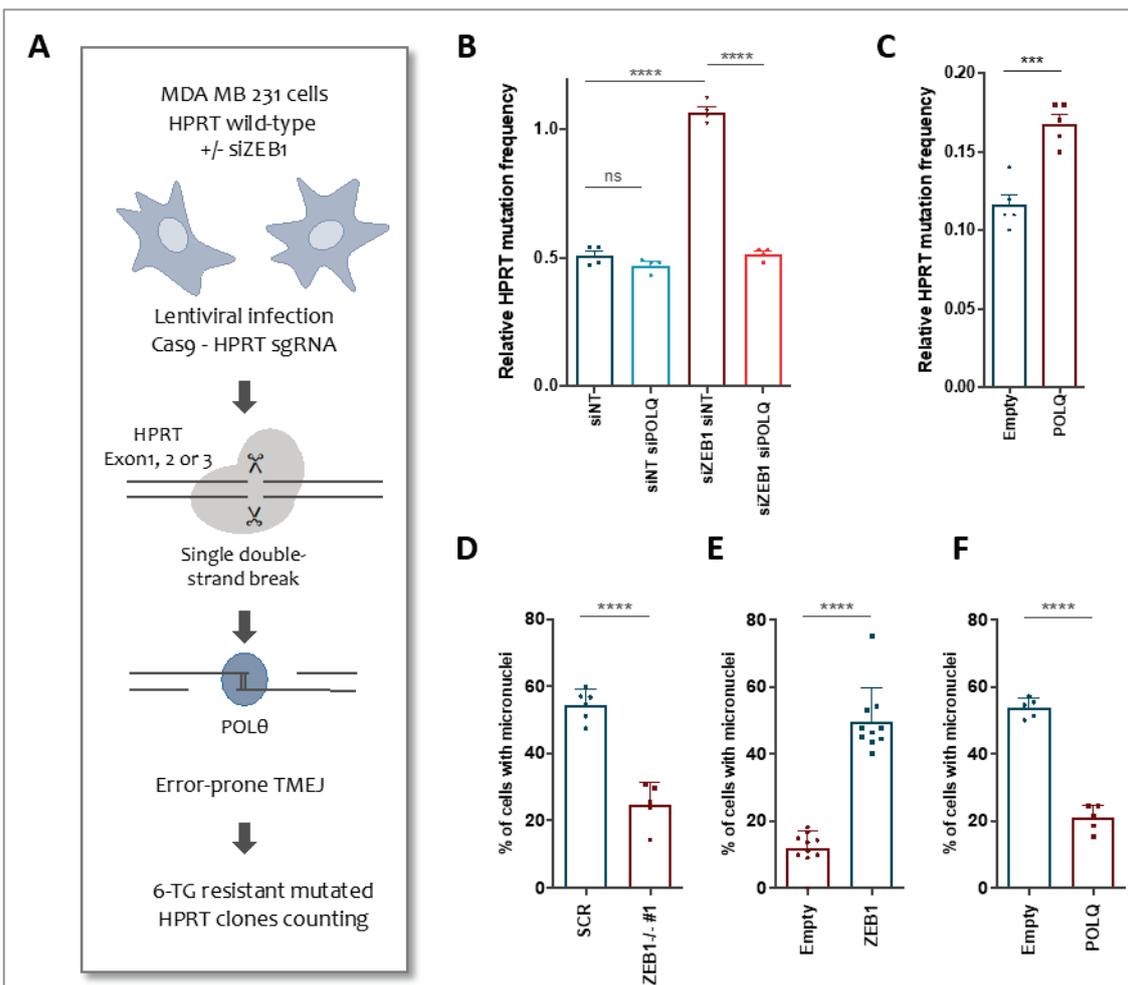
**H**  
JASPAR analyses : 4 putative sites were predicted with relative profile score threshold 85 %

Matrix ID	Name	Score	Relative score	Seq. ID	Start	End	Strand	Predicted sequence
MA0103.3	ZEB1	10.21	0.925	POLQ	-1191	-1181	+	ATCAATGAGG
MA0103.3	ZEB1	7.27	0.871	POLQ	-1279	-1269	-	GGCACCCGCCA
MA0103.2	ZEB1	7.34	0.870	POLQ	-1188	-1180	+	CATCACCTG
MA0103.2	ZEB1	7.26	0.869	POLQ	-712	-704	+	CCTGACCTG



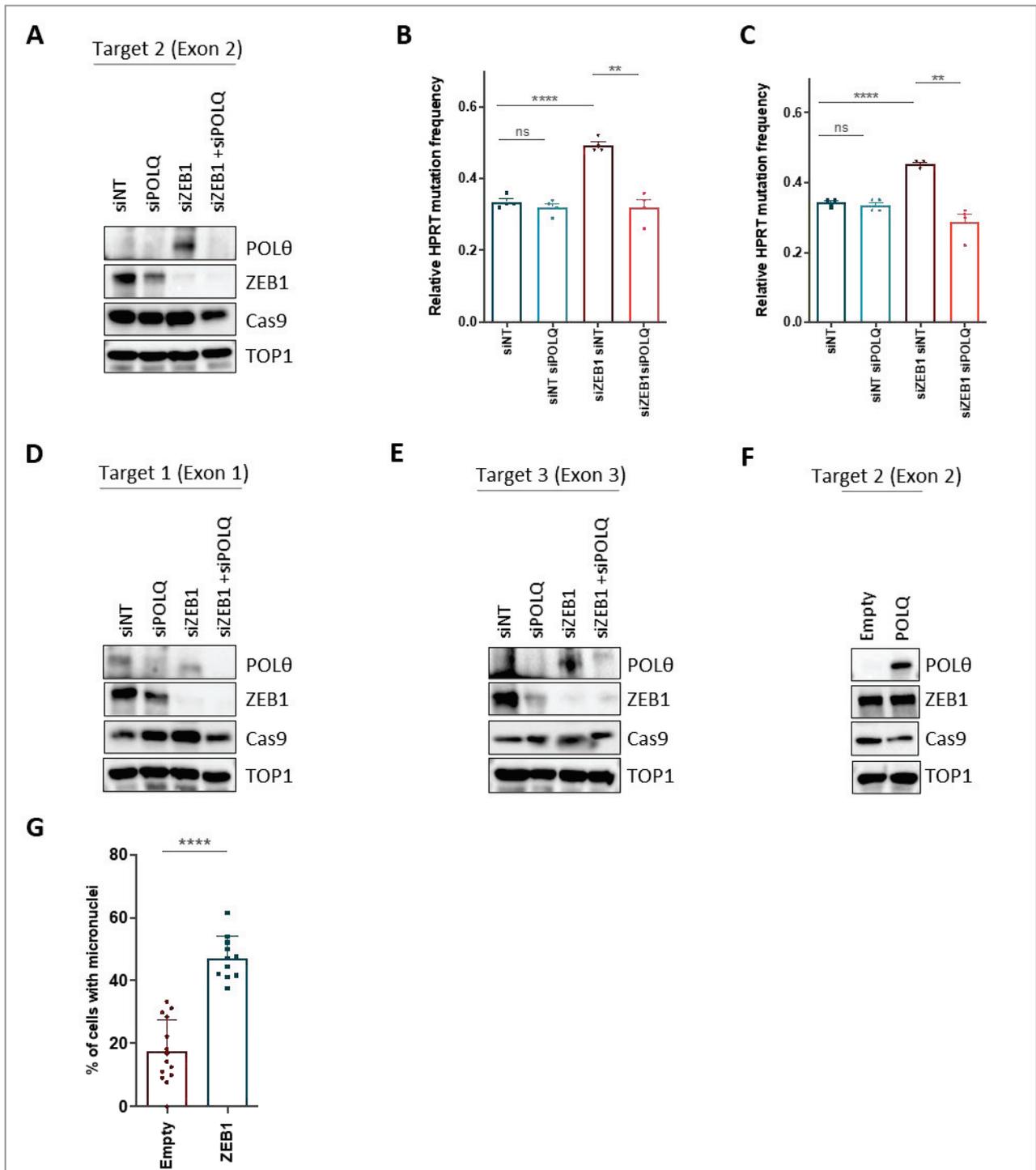
**Figure 4. ZEB1 modulates TMEJ and ZEB1 mediates micronuclei formation by *POLQ* repression**

A, Schematic outline of HPRT mutagenic test. B, Relative HPRT mutation frequency after the indicated siRNA treatment with Cas9-WT targeting exon 2 and C, in MDA-MB-231 forced *POLQ* expression cells. The data shown represent the mean  $\pm$  SEM; n = 3 independent experiments and are expressed as a fraction of the mutation frequency observed in control cells expressing a non-targeted siRNA. D, Percentage of cells with micronuclei in MDA-MB-231 cells expressing ZEB1 or ZEB1-KO, E, in BT-20 forced ZEB1 expression cells and F, in MDA-MB-231 forced *POLQ* expression cells stained with Hoechst after cytochalasin B treatment. Statistical significance was calculated via unpaired two-tailed Student's t-test with Welch's correction; \*\*\* p < 0.001; \*\*\*\* p < 0.0001; ns, not significant.



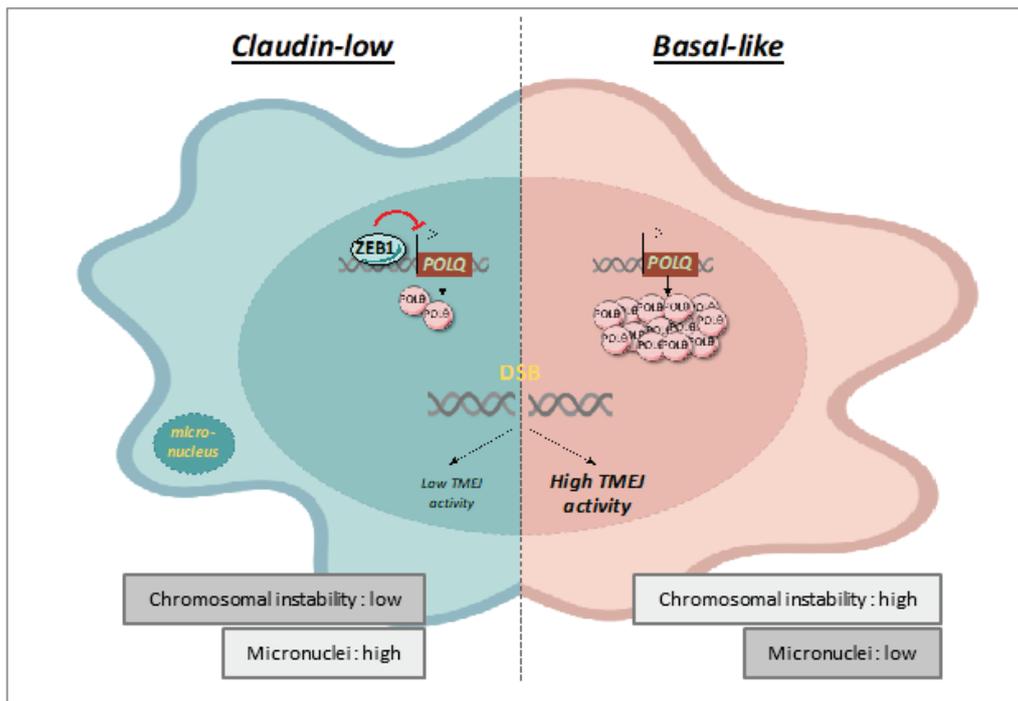
**Figure S4. ZEB1 depletion increases TMEJ activity**

A, Immunoblot showing the protein levels of ZEB1, DNA polymerase  $\theta$  (POL $\theta$ ), and CAS9 in ZEB1- and POLQ-depleted cells after infection with the exon 2 sgRNA CRISPR/Cas9 All-in-One construct. B, Relative HPRT mutation frequency after the indicated siRNA treatment with Cas9-WT targeting exon 1 and C, exon 3. The data shown represent the mean  $\pm$  SEM; n = 4 independent experiments and are expressed as a fraction of the mutation frequency observed in control cells expressing a non-targeted siRNA. Statistical significance was calculated via unpaired two-tailed Student's t-test with Welch's correction; \*\* p < 0.01; \*\*\*\* p < 0.0001; ns, not significant. D, Immunoblot showing the protein levels of ZEB1, DNA polymerase  $\theta$  (POL $\theta$ ), and CAS9 in ZEB1- and POLQ-depleted cells after infection with the exon 1 sgRNA CRISPR/Cas9 All-in-One construct and E, exon 3. F, Immunoblot showing the protein levels of ZEB1, DNA polymerase  $\theta$  (POL $\theta$ ), and CAS9 in MDA-MB231 POLQ after infection with the exon 2 HPRT1 sgRNA CRISPR/Cas9 All-in-One construct (K0986605, Applied Biological Materials); DNA topoisomerase I (TOPI) served as a loading control; n = 4 independent experiments. G, Percentage of cells with micronuclei in HCC70 forced ZEB1 expression cells



**Figure 5. Model of potential implication of TMEJ modulation by ZEB1.**

Among TNBC cell lines, *POLQ* expression is likely upregulated in the majority of basal-like tumor cell lines, especially in HR-deficient breast cancers recurrently depicted as highly genomically-unstable. Nevertheless, some claudin-low cell lines exhibit low *POLQ* due to ZEB1 repression of *POLQ* gene expression. This inhibition, which we propose here modulates TMEJ activity, may participate in the low chromosomal instability observed in claudin-low tumors, but is surprisingly associated with high micronuclei in the cancer cell lines. Many mechanisms may be at the origin of micronuclei formation, but it can however not be excluded that low *POLQ* protein level, associated with low TMEJ activity, may induce residual DNA damage at the origin of micronuclei formation.



### c. Résultats complémentaires :

#### 1. Identification d'une mutation dans le promoteur de *POLQ* insensible à la régulation par *ZEB1*

Ces dernières années, la découverte de la fonction de *POLQ* dans la réparation fautive de l'ADN et de son rôle dans la mise en place de l'instabilité génétique a permis d'initier des recherches de mutations initiatrices de tumeurs chez les patientes atteintes de cancer. En 2014, Brandalize et ses collaborateurs ont mis en évidence une mutation dans le promoteur de *POLQ* à 2 bases d'une E-box potentielle de fixation de *ZEB1*. Parmi les 6 polymorphismes identifiés, seul le SNP c.-1060G>A montre une corrélation avec les cancers du sein héréditaires. 35% des cancers du sein héréditaire possèdent donc le génotype A. Ce variant A favorise donc la survenue d'un cancer du sein héréditaire (Brandalize et al. 2014).

De manière inattendue, lors de la génération de modèles surexprimant *ZEB1*, une lignée n'a pas semblé répondre à la modulation de *POLQ* par *ZEB1*. C'est-à-dire que dans cette lignée cellulaire qui n'exprime pas *ZEB1*, l'expression forcée de *ZEB1* ne semble pas inhiber la transcription de *POLQ*, comme observé dans deux autres lignées (Figure 41 A ; Figure-Article 3 C page 168). Cette lignée est la *basal-like* MDA-MB468. Afin de vérifier le promoteur de *POLQ* dans cette lignée en comparaison des autres lignées, le séquençage du promoteur de *POLQ* sur 8 lignées TNBC (4 *basal-like* et 4 *claudin-low*) et la lignée normale du sein immortalisé HMEC-hTERT a été entrepris autour de la région du polymorphisme et a permis de mettre en évidence que la lignée MDA-MB468, mais aussi CAL120 et Hs578T, sont homozygotes pour le polymorphisme A (Figure 41 B-C). Afin de tester cette hypothèse, nous avons transfecté les MDA-MB231 déplétées ou non pour *ZEB1* (par traitement avec un siRNA contre *ZEB1*) avec un plasmide codant pour la luciférase dans lequel le promoteur *POLQ* contient soit le polymorphisme G soit le A (Figure 41 D). Comme montré dans le chapitre I des résultats (Figure-Article S3 K page 172), le variant G permet d'inhiber la transcription de la luciférase et donc de *POLQ*, lorsque *ZEB1* est exprimé. Cependant, le variant A, même en présence de *ZEB1*, ne permet pas d'inhiber la transcription (Figure 41 E). Lorsque le polymorphisme A est présent, les données suggèrent que *ZEB1* n'a aucune influence sur la transcription du gène rapporteur luciférase. En comparaison avec le variant G, le polymorphisme A permet une augmentation de la transcription de *POLQ* même en présence de *ZEB1*. Les plasmides *CDH1*, négatifs (neg) et -690 pb, plasmide ne présentant que les 690 premières bases du promoteur de *POLQ*, ne possédant pas par conséquent le site de fixation E-box présent près du polymorphisme, servent ici de contrôle. Ces résultats préliminaires renforcent l'hypothèse selon laquelle *ZEB1* se fixe sur le promoteur de *POLQ* au niveau de l'E-box situé près du

polymorphisme c.-1060G>A. Le polymorphisme A engendrerait donc une perte d'affinité de ZEB1, ou de l'un de ses partenaires, pour le promoteur de *POLQ*. Seules les cellules possédant le polymorphisme G peuvent donc répondre au contrôle de la transcription par ZEB1. Afin de valider cette hypothèse, la réalisation d'une immunoprécipitation de la chromatine pour ZEB1 sur le modèle MDA-MB468 surexprimant ZEB1 permettra de montrer que celui-ci n'a pas la capacité de se fixer sur le promoteur de *POLQ*.

Enfin, il serait intéressant de tester cette hypothèse sur des tumeurs de patient afin de déterminer si ce polymorphisme peut servir de marqueur génétique afin d'identifier des cancers héréditaires et d'adapter au mieux les traitements. La voie du TMEJ n'étant pas inhibée par ZEB1 dans ces tumeurs, les patientes ayant le variant A pourraient être de bons répondeurs au traitement par les PARPi de la même façon que les tumeurs au phénotype BRCAness (Gourley et al. 2019).

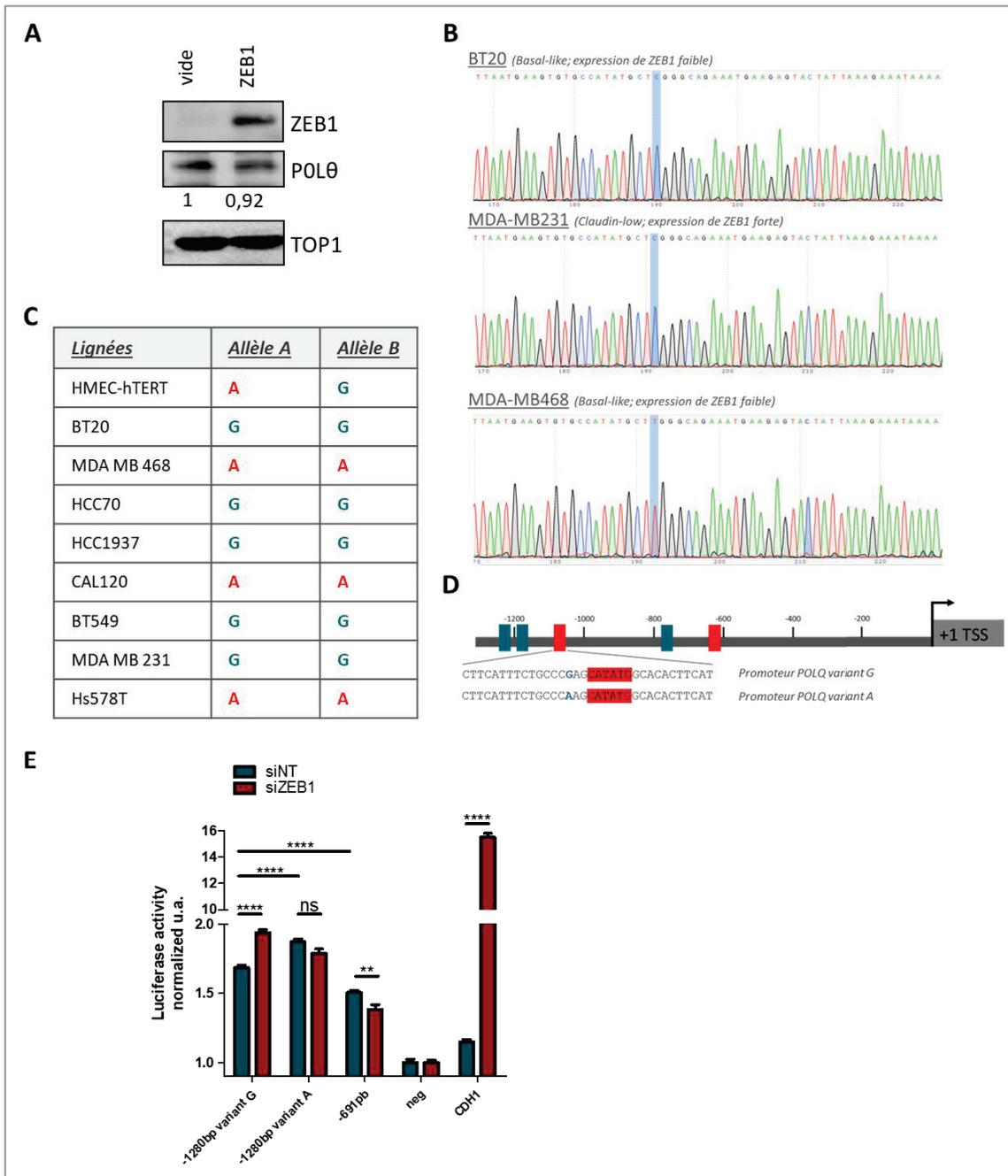


Figure 41 : Le variant A du polymorphisme c.-1060G>A empêche la fixation de ZEB1 sur le promoteur de POLQ

**A**, Immunoblot montrant les différents niveaux d'expression protéiques de ZEB1 et de POLθ dans le modèle cellulaire MDA-MB468 surexprimant ZEB1 ou non. TOP1 servant de contrôle de charge. n=2 expériences indépendantes **B**, Représentation graphique du séquençage du promoteur de POLQ par la méthode Sanger sur les lignées BT20, MDA-MB231 et MDA-MB468. Le surlignage en bleu de l'un des pics met en évidence la localisation du polymorphisme. **C**, tableau récapitulatif du séquençage du promoteur de POLQ dans l'ensemble des lignées cellulaires utilisées dans l'ensemble des expériences menées au cours de cette thèse. **D**, représentation schématique du promoteur de POLQ pour le polymorphisme c.-1060G>A utilisé pour les plasmides codant pour la luciférase sous le contrôle du promoteur correspondant. Les régions clonées dans les plasmides luciférase ainsi que les sites de liaison potentiels de ZEB1 (Z-box CACCTG en bleu) et les E-box (CANNTG en rouge) y sont représentées. Les nombres indiquent les positions en pb sur l'ADN chromosomique par rapport au site de début de transcription (+ 1). **E**, Analyses du test luciférase dans des cellules MDA-MB231 transfectées de manière transitoire avec un siRNA contre ZEB1 ainsi que les constructions de rapporteurs de luciférase (Gaussia) : -1280bp pour le polymorphisme G ou A ainsi que la construction -690pb du promoteur de POLQ, CDH1 ou un contrôle vectoriel vide ; n = 3 expériences indépendantes. Pour les dosages de rapporteurs, l'activité de la luciférase de Gaussia a été normalisée contre SEAP, un contrôle plasmidique interne. Moyenne ± SEM. \* p < 0,05; \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001; ns, non significatif, test t bilatéral de Student non apparié avec correction de Welch.

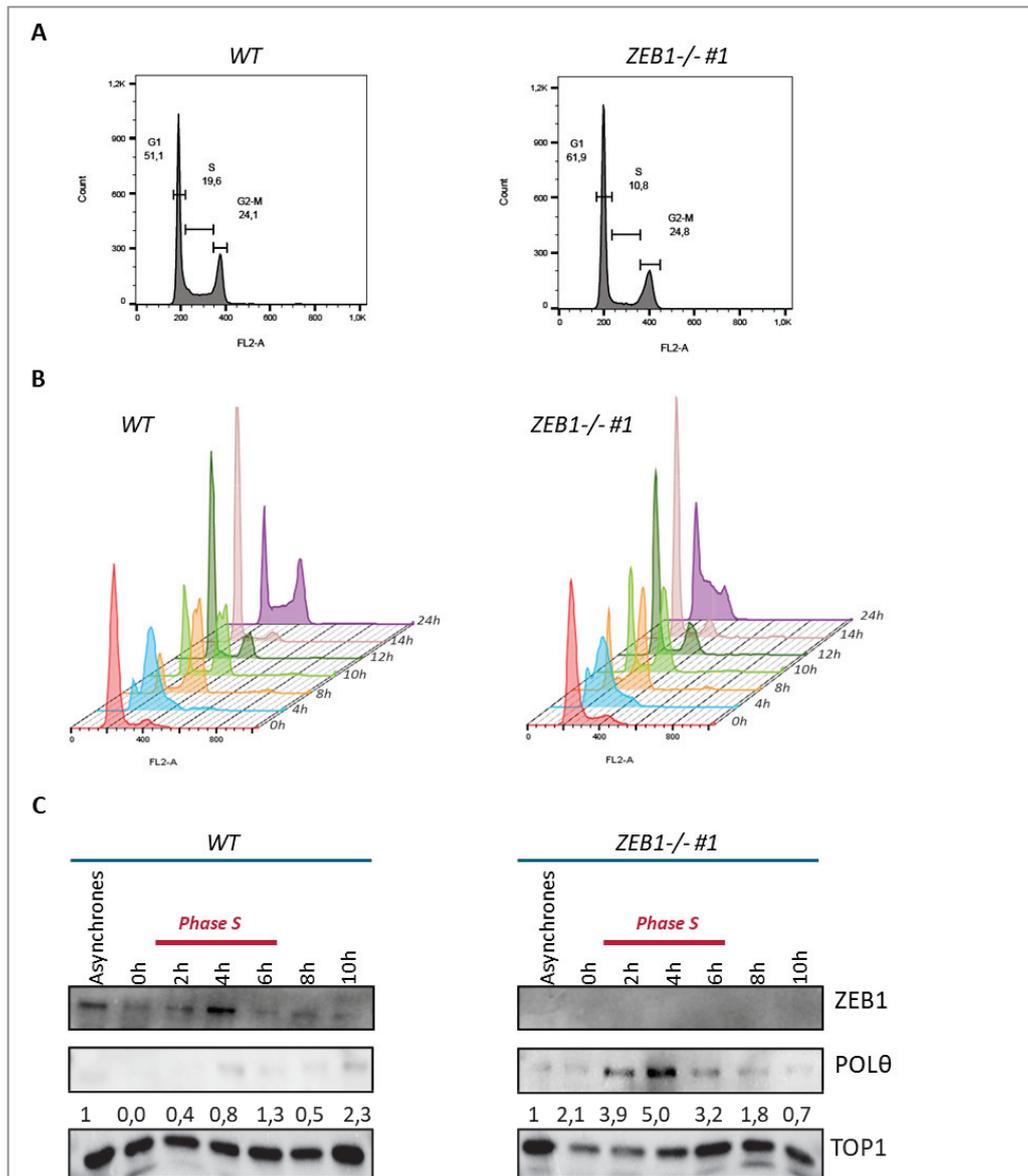
## 2. La régulation de *POLQ* par ZEB1 est indépendante du cycle cellulaire

Les dernières avancées concernant *POLQ* et son activité dans la réplication de l'ADN, le cycle cellulaire et la réparation de l'ADN suggèrent que, malgré l'activation du TMEJ tout au long du cycle cellulaire, l'activité du TMEJ semble plus forte lors de la phase S du cycle (Hustedt and Durocher 2017; Krajewska et al. 2015). Nous nous sommes donc demandé si la différence d'activité du TMEJ en fonction de ZEB1 n'était pas due à une différence de répartition des cellules au cours du cycle cellulaire. En effet, si le TMEJ a une activité plus forte en phase S qu'en phase G1 et que la majorité des lignées *claudin-low* se trouve en G1, celles-ci utiliseront moins le TMEJ pour réparer que des lignées majoritairement en phase S.

Les premières expériences de l'étude du cycle cellulaire dans le modèle CRISPR-cas9 pour ZEB1 montrent en effet une différence de répartition des cellules entre les phases du cycle pour les modèles sauvages présentant l'expression de ZEB1 et ceux appauvris en ZEB1. La répartition des cellules asynchrones exprimant ZEB1 présentent 51,1% de cellules en phase G1 et 19,6% de cellules en phase S alors que pour les cellules asynchrones n'exprimant pas ZEB1, seules 11% des cellules sont en phase S (61.9% en phase G1 et 10.8% en phase S) (Figure 42 A). Les cellules exprimant ZEB1 semblent donc, de manière asynchrone, plus nombreuses en phase S. Pour mieux comprendre cette différence, les cellules sont bloquées à la fin de la phase G1/entrée en phase S par un double-blocage de thymidine. Nous pouvons là aussi observer une différence de répartition entre les différentes phases du cycle cellulaire. Les profils de la phase S, à 4h et 8h après synchronisation notamment, sont très différents entre les cellules exprimant ou non ZEB1 (Figure 42 B). De plus, les cellules semblent se désynchroniser rapidement, le profil semble complètement différent dès 24h. L'influence de ZEB1 sur le cycle cellulaire a été très peu étudiée mais semble importante (Medina-Aguilar et al. 2016). En parallèle de l'analyse de la répartition des cellules au cours du cycle cellulaire, l'expression protéique des échantillons cellulaires, après synchronisation, a été analysée. Mais quelle que soit la phase du cycle, les cellules exprimant ZEB1 semblent toujours avoir un plus faible taux de POL $\theta$  que les cellules n'exprimant pas ZEB1 (Figure 42 C). Ces résultats suggèrent que la régulation de ZEB1 sur l'expression de *POLQ* semble donc indépendante du cycle cellulaire. Cependant, le niveau de protéine POL $\theta$  paraît plus important au cours de la phase S. En effet, même si globalement, les cellules n'exprimant pas ZEB1 présentent un plus fort niveau protéique de POL $\theta$  que les cellules exprimant ZEB1, celui-ci reste plus important lors de la phase S (à 4h). De manière intéressante, ZEB1 semble lui aussi plus fortement exprimé dans la phase S, à 4h, au moment où POL $\theta$  semble lui aussi le plus fort (dans les cellules n'exprimant pas ZEB1).

## Résultats

Étant donné le rôle primordial du TMEJ en phase S pour le déblocage des fourches effondrées (Z. Wang et al. 2019), les cellules exprimant ZEB1 semblent diminuer l'expression de *POLQ* ou stabiliser *POLθ* possiblement afin d'inhiber l'activité du TMEJ et préserver ainsi la stabilité du génome. Des expériences sur le niveau d'expression du gène *POLQ* pourraient compléter cette analyse.



**Figure 42 : La régulation de *POLQ* par *ZEB1* est indépendante du cycle cellulaire**

**A**, analyse du cycle cellulaire asynchrone des MDA-MB231 +/- déplétées pour *ZEB1* (CRISPR-cas9 *ZEB1*) après marquage à l'iodure de propidium. **B**, analyse du cycle cellulaire des MDA-MB231 +/- déplétées pour *ZEB1* (CRISPR-cas9 *ZEB1*) après marquage à l'iodure de propidium et synchronisation. **C**, Immunoblots correspondant au cycle cellulaire des MDA-MB231 +/- déplétées pour *ZEB1* (CRISPR-cas9 *ZEB1*) après synchronisation. n = 3 expériences indépendantes

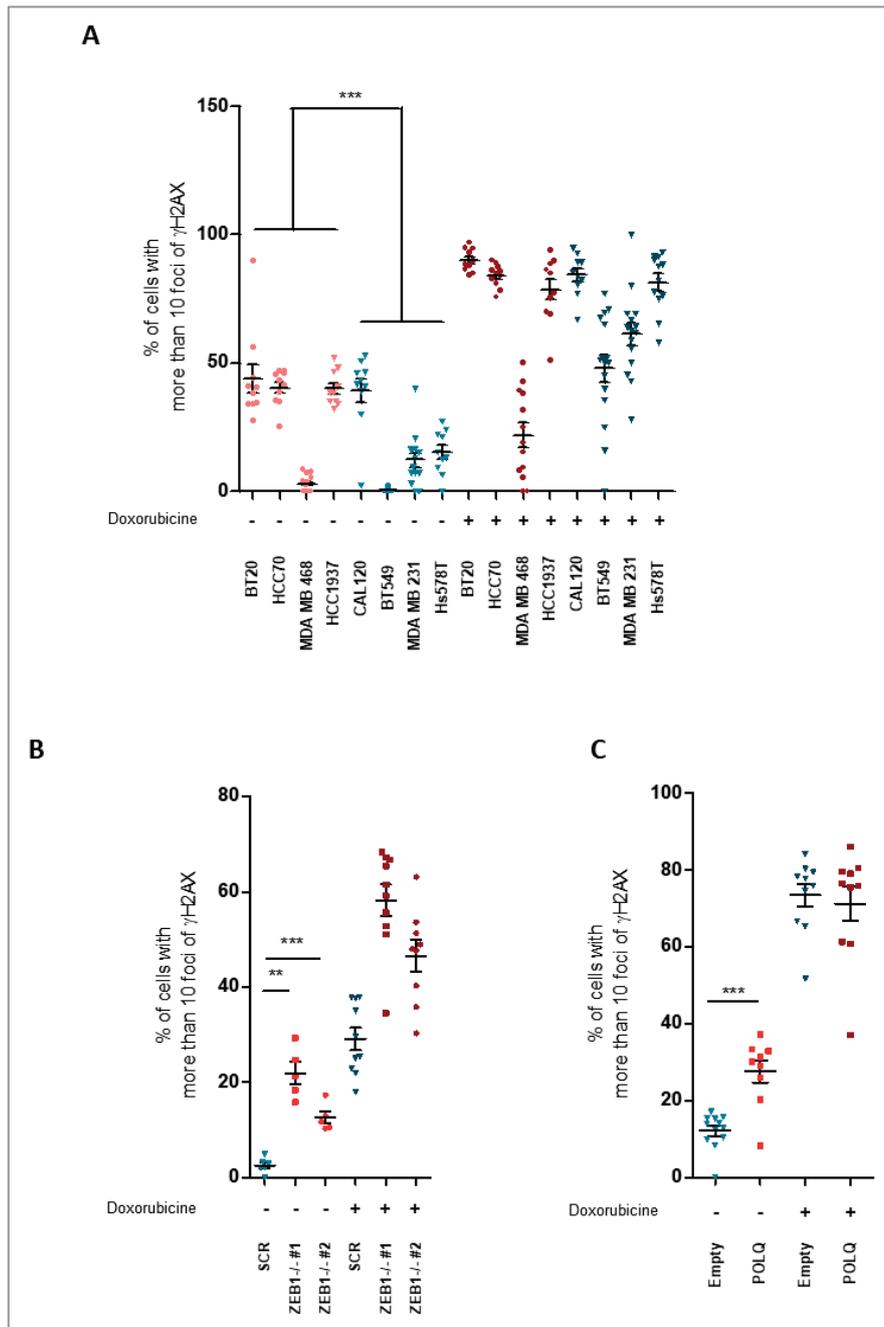
### 3. L'EMT diminue le nombre de dommages à l'ADN spontanés, analyse des foyers $\gamma$ H2AX

Comme présenté précédemment, notamment dans l'article de Morel *et al*, les tumeurs *claudin-low* présentent très peu d'altérations génomiques en conséquence d'un faible niveau de CDBs endogènes détectés par la présence de foyers  $\gamma$ H2AX, forme phosphorylée par ATM de l'histone H2AX (A.-P. Morel *et al.* 2017). Afin de vérifier dans un premier temps que nos modèles cellulaires présentaient bien les caractéristiques des *claudin-low* et des *basal-like* précédemment décrites et que les cellules *claudin-low* étaient capables d'induire une réponse aux dommages à l'ADN, j'ai dans un premier temps contrôlé leur capacité à former des foyers  $\gamma$ H2AX après traitement par des agents génotoxiques. En effet, lorsque survient une cassure double-brin de l'ADN, l'histone H2AX est l'une des premières molécules senseurs du dommage qui permet de signaler la présence de dommages.

Dans nos différentes lignées (Figure 43 A) et modèles cellulaires (Figure 43 B-C), le marquage des foyers  $\gamma$ H2AX montre très clairement que de manière endogène les lignées *basal-like* et les modèles ayant perdu l'expression de ZEB1 (en rose) présentent spontanément plus de CDBs que les lignées *claudin-low* et modèles exprimant ZEB1 (en bleu clair), comme précédemment décrit (A.-P. Morel *et al.* 2017).

Ce faible pourcentage spontané de cellules présentant des foyers  $\gamma$ H2AX en présence de ZEB1 ne semble pas impacter l'activation de la DDR en réponse aux dommages. En effet, lorsque ces mêmes lignées ou modèles cellulaires sont traitées par un agent génotoxique, tel que la Doxorubicine (agent de chimiothérapie agissant comme inhibiteur de l'ADN topoisomérase II et comme intercalant de l'ADN, bloquant ainsi la réplication de celui-ci et à terme induisant des cassures double-brin) le pourcentage de cellules présentant des foyers  $\gamma$ H2AX augmente significativement (Figure 43 A-C). Cette augmentation suggère que l'ensemble des modèles présente une voie de la DDR fonctionnelle.

La différence d'instabilité génomique observée dans les tumeurs *claudin-low* et *basal-like* ne peut donc pas s'expliquer par un défaut de l'activation de la DDR ou de la RSR mais bien par une modulation des voies de réparation qui découle de l'activation de la voie de réponse aux dommages. De manière surprenante, la réexpression de *POLQ* seule suffit à augmenter le pourcentage de cellules présentant des foyers  $\gamma$ H2AX sans aucun traitement génotoxique (niveau endogène).



**Figure 43 : La présence de POLQ et l'absence de ZEB1 génèrent de nombreux dommages à l'ADN endogènes**

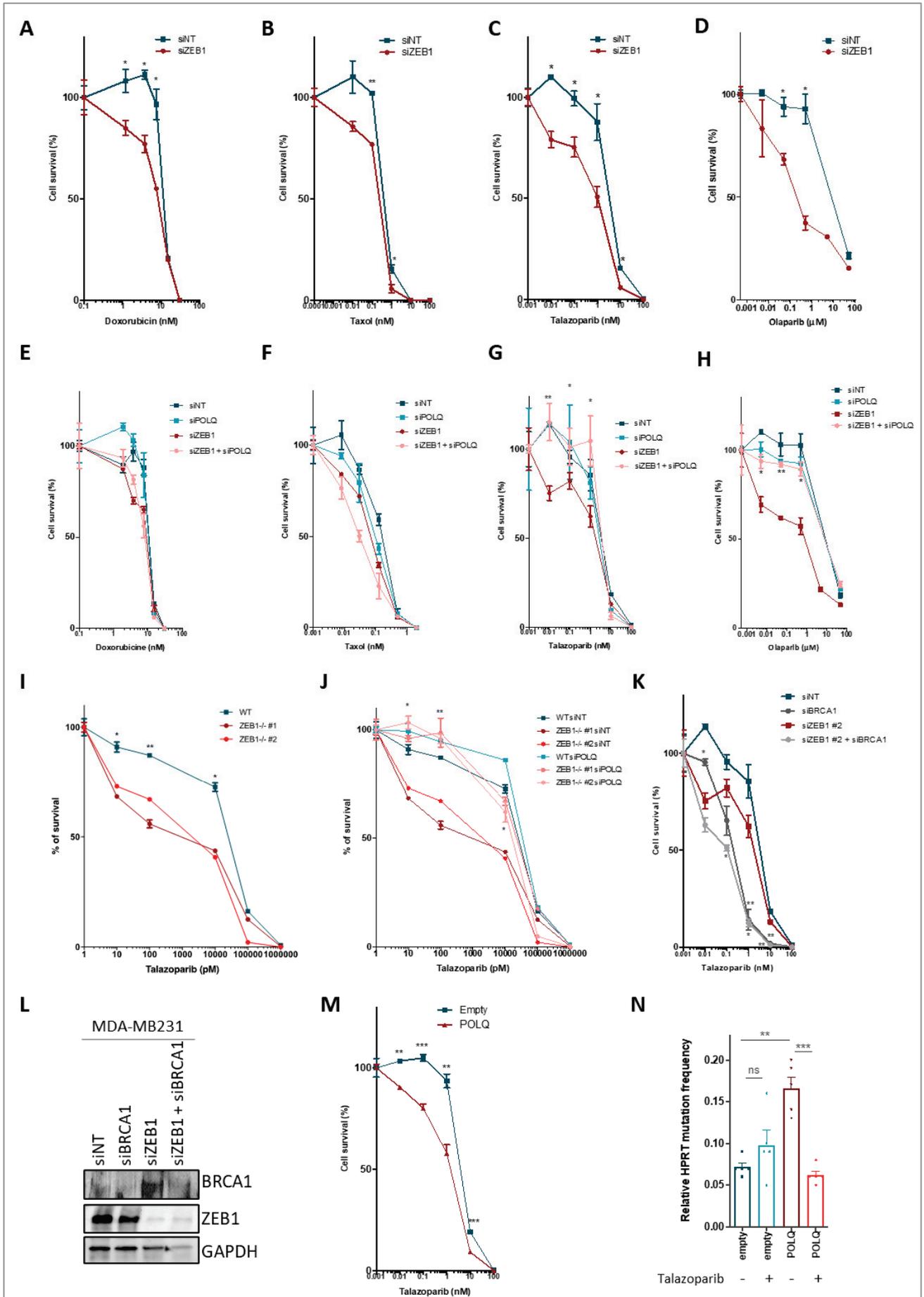
**A**, Pourcentage de cellule contenant plus de 10 foyers  $\gamma$ H2AX par noyau dans différentes lignées Basal-like et Claudin-low avec ou sans traitement à la Doxorubicine (300nM, 1h). **B**, Pourcentage de cellule contenant plus de 10 foyers  $\gamma$ H2AX par noyau dans les MDA-MB231 déplétées pour ZEB1 (CRISPR-cas9 ZEB1) avec ou sans traitement à la Doxorubicine (300nM, 1h). **C**, Pourcentage de cellules contenant plus de 10 foyers  $\gamma$ H2AX par noyau dans les MDA-MB231 sur-exprimant *POLQ* avec ou sans traitement à la Doxorubicine (300nM, 1h). En rose ou rouge : les cellules exprimant *POLQ* mais n'exprimant pas ZEB1. En bleu : les cellules exprimant ZEB1 et donc, n'exprimant pas *POLQ*. n= 3 expériences indépendantes

*4. La perte de ZEB1 sensibilise les claudin-low aux inhibiteurs de PARP grâce à la réexpression de POL $\theta$*

De nombreuses études montrent que ZEB1 confère une résistance aux thérapies anticancéreuses *via* de multiples mécanismes tels que l'acquisition d'un phénotype de type cellules souches ou encore par l'activation de la réponse aux dommages à l'ADN (Caramel, Ligier, and Puisieux 2018; P. Zhang, Sun, and Ma 2015).

Nos données confirment que la perte de l'expression de ZEB1, par siARN dans les cellules MDA-MB-231, conduit à une diminution de la résistance aux chimiothérapies telles que la doxorubicine et le taxol (Figure 44 A et 44 B), traitements conventionnels des TNBC, comme décrit précédemment (Meidhof et al. 2015; P. Zhang et al. 2014). Ces deux chimiothérapies bloquent la croissance cellulaire par des mécanismes très différents. La doxorubicine exerce ses effets anticancéreux et toxiques selon plusieurs mécanismes, dont l'inhibition de la topoisomérase II, l'intercalation avec les polymérase de l'ADN et de l'ARN, et la formation de radicaux libres. Ces mécanismes conduisent à la formation de cassures simple et double-brin et donc à la mort cellulaire. Le taxol, quant à lui, n'est pas un agent génotoxique à proprement parlé mais plutôt un agent qui stabilise la formation de microtubule. La présence anormale de faisceaux de microtubules pendant toute la durée du cycle cellulaire, perturbent ainsi celui-ci et conduisent à terme à la mort cellulaire.

De façon originale, nous avons identifié une résistance, jusqu'à ce jour non caractérisée, des cellules exprimant ZEB1 envers deux inhibiteurs de PARP : le talazoparib et l'olaparib (Figure 44 C et 44 D). Les PARPi tels que le talazoparib ou l'olaparib agissent sur les systèmes de réparation de l'ADN en synergie avec la perte de la fonction de BRCA1/2 par les cellules tumorales, provoquant ainsi une perte de l'intégrité génétique qui conduit à la mort de la cellule. En piégeant PARP1/2 à l'ADN, les PARPi réduisent la survie non seulement des cellules déficientes en BRCA1/2, mais également, dans une moindre mesure, des cellules compétentes en BRCA1/2 par le biais de 2 mécanismes : 1- L'inhibition de l'activité catalytique de PARP (la PARylation), activité principale de l'olaparib, ou 2- par le piégeage de certaines PARP à l'ADN, le talazoparib est l'inhibiteur présentant à ce jour la plus forte activité de capture (trapping) de PARP1. Dans ce dernier cas, la protéine PARP1 se lie au talazoparib et reste prise au piège au niveau du site de la lésion, ce qui empêche la réparation de l'ADN en créant localement un nouvel obstacle, sa réplication et sa transcription et enfin conduit à la mort cellulaire. La perte de l'activité de la voie HR par la mutation des gènes BRCA1/2 renforce cette incapacité de réparation des lésions à l'ADN (Murai and Pommier 2019).



**Figure 44: La perte de ZEB1 sensibilise les *claudin-low* aux inhibiteurs de PARP grâce à la réexpression de POLQ**

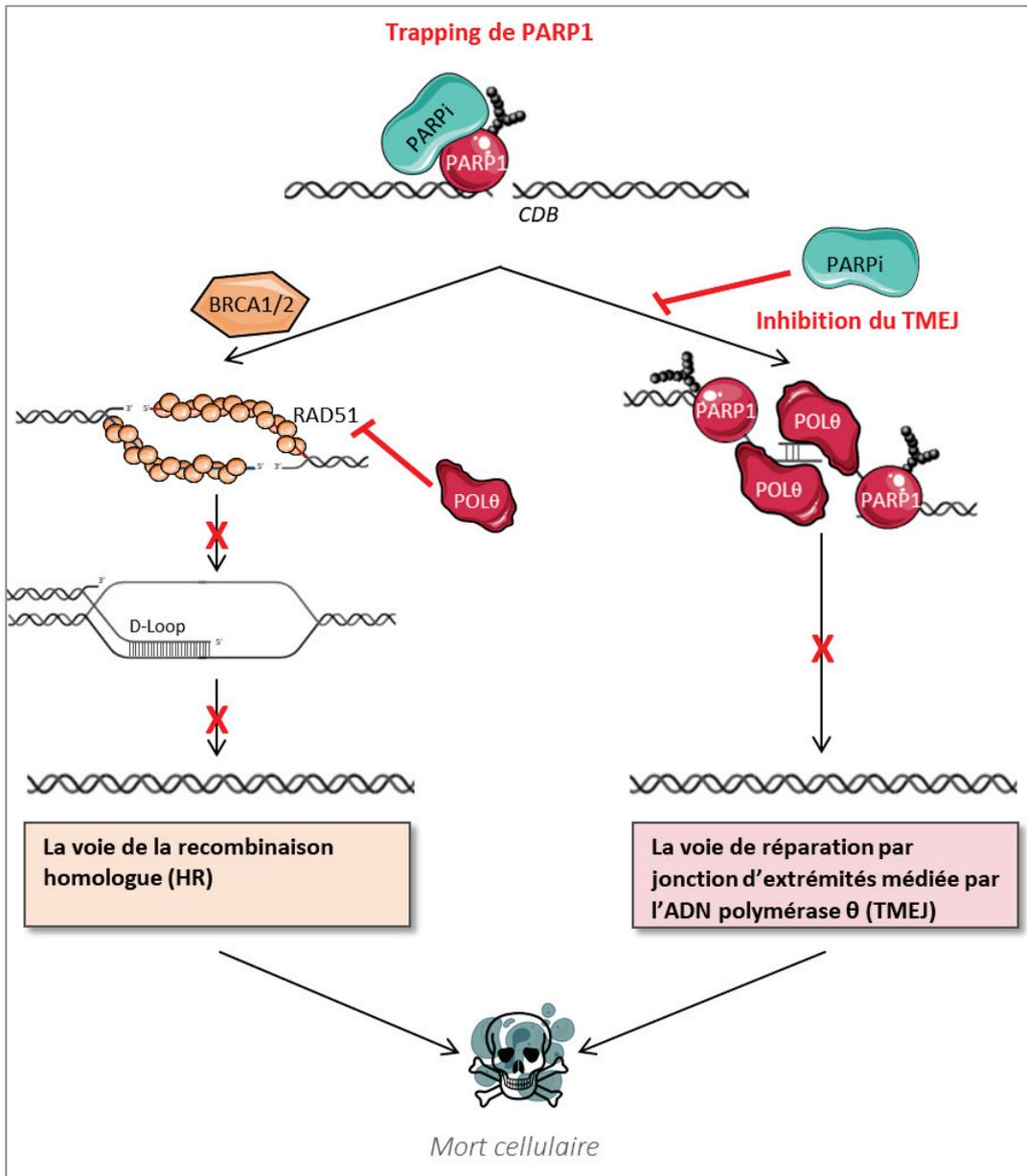
**A**, Test de survie clonale des MDA-MB-231 à la suite d'un traitement par siRNA contre *ZEB1* et du traitement par l'agent génotoxique la doxorubicine, ou le taxol (**B**), ou le talazoparib (**C**) ou encore l'olaparib (**D**). En bleu sont répertoriées les lignées *claudin-low* traité par un *siNT* et en rouge les lignées *claudin-low* traité par un *siZEB1*. Les tests statistiques sont réalisés pour les cellules traitées par le *siNT* contre celles traitées par le *siZEB1*. **E**, Test de survie clonale des cellules MDA-MB-231 à la suite d'une double déplétion par siRNA contre *ZEB1* et/ou *POLQ* ainsi que du traitement par l'agent génotoxique la doxorubicine, ou le taxol (**F**), ou le talazoparib (**G**) ou encore l'olaparib (**H**). En bleu foncé sont répertoriées les lignées *claudin-low* traitées par un *siNT*, en bleu claire sont répertoriées les lignées *claudin-low* traitées par un *siPOLQ*, en rouge sont répertoriées les lignées *claudin-low* traitées par un *siZEB1* et en rose les lignées *claudin-low* traitées par un *siZEB1* et par un *siPOLQ*. Les tests statistiques sont réalisés pour les cellules traitées par le *siZEB1* contre celles traitées par la combinaison des *siZEB1* et *siPOLQ*. **I**, Test de survie clonale des MDA-MB-231 CRISPR cas9 à la suite d'un traitement par le PARPi talazoparib. En bleu sont répertoriées les cellules WT pour *ZEB1* et en rouge les cellules KO pour *ZEB1*. Les tests statistiques sont réalisés pour les cellules WT pour *ZEB1* contre celles KO pour *ZEB1*. **J**, Test de survie clonale des MDA-MB-231 CRISPR cas9 à la suite d'un traitement par un *siPOLQ* et par le PARPi talazoparib. En bleu sont répertoriées les cellules WT pour *ZEB1* et en rouge/rose les cellules KO pour *ZEB1*. Les tests statistiques sont réalisés pour les cellules KO pour *ZEB1* avec *siNT* contre celles KO pour *ZEB1* *siPOLQ*. **K**, Test de survie clonale des MDA-MB-231 à la suite d'un traitement par siRNA contre *ZEB1* et *BRCA1* ainsi que du traitement par le PARPi talazoparib. En bleu sont répertoriées les lignées *claudin-low* traitées par un *siNT*, en rouge les lignées *claudin-low* traitées par un *siZEB1* et en gris les cellules traitées par *siBRCA1*. Les tests statistiques sont réalisés pour les cellules traité par le *siNT* contre celles traitées par le *siBRCA1* par rapport à leurs homologues *siNT/siZEB1*. **L**, Immunoblot correspondant à l'inhibition de *BRAC1* par siARN, montrant les différents niveaux d'expression protéiques de *ZEB1*, *BRCA1*. TOP1 servant de contrôle de charge. **M**, Test de survie clonale des MDA-MB-231 surexprimant *POLQ* ainsi que du traitement par le PARPi talazoparib. En bleu sont répertoriées les cellules contrôles, en rouge les cellules surexprimant. Les tests statistiques sont réalisés pour les cellules contrôles contre celles surexprimant *POLQ*. **N**, Fréquence de mutation HPRT relative après traitement par le PARPi talazoparib dans le modèle MDA-MB-231 surexprimant *POLQ* infecté par la cas9-WT ciblant l'exon 2 du gène HPRT.

Moyenne  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; ns, non significatif, test t bilatéral de Student non apparié avec correction de Welch.  $n=3$  expériences indépendantes.

En raison du rôle essentiel de PARP1 dans la voie du TMEJ, nous nous sommes demandé si la résistance des cellules exprimant ZEB1 aux agents de chimiothérapies pourrait potentiellement être expliquée par l'absence d'activité de la voie du TMEJ par l'intermédiaire de la perte de POL $\theta$ . Afin de vérifier, le rôle de *POLQ* dans la résistance aux traitements chimiothérapeutiques, les cellules exprimant ZEB1 ont subi une double déplétion par siARN de *ZEB1* et de *POLQ*. Alors qu'aucun effet n'est observé de la double déplétion après traitement par la doxorubicine ou par le taxol (Figure 44 E et 44 F), suggérant un mécanisme de résistance indépendant de l'activité du TMEJ, la perte de *POLQ* permet néanmoins de restaurer la résistance des cellules déplétées en *ZEB1* au talazoparib (Figure 44 G) et à l'olaparib (Figure 44 H). La sensibilité des cellules aux PARPi semble donc être liée à l'expression de *POLQ* et donc probablement à l'activité du TMEJ. Ces résultats ont été confirmés dans le modèle CRISPR-Cas9 inactivé pour *ZEB1* dans les MDA-MB-231 (Figure 44 I et 44 J). La perte d'expression de *BRCA1* dans le modèle MDA-MB-231 permet de sensibiliser d'autant plus les cellules exprimant ZEB1 ou non aux PARPi comme montré dans la littérature (Figure 44 K et 44 L) (Leung et al. 2011; Lord and Ashworth 2017; Rottenberg et al. 2008). La perte simultanée de l'activité du TMEJ et de l'expression de *BRCA1* permet donc aux cellules exprimant ZEB1 d'être sensibilisé aux PARPi (Figure 44 K). De plus, la surexpression ectopique de POL $\theta$ , indépendante donc du contrôle transcriptionnel de *ZEB1*, confère une sensibilité accrue au PARPi même en présence de ZEB1 (Figure 44 M). Ce dernier résultat semble contradictoire avec plusieurs études qui ont montré que les cellules déficientes en HR, par la perte d'expression de *BRCA1/2* ou de *FANCD2*, étaient d'autant plus sensibles au PARPi, le rucaparib

## Résultats

notamment, lorsque ces mêmes cellules étaient déplétées pour POL $\theta$  (Ceccaldi et al. 2015; Kais et al. 2016; Mateos-Gomez et al. 2015). En effet, ces dernières années, il a été démontré que l'inhibition de *POLQ* dans les cellules mutantes BRCA1 entraîne une augmentation des aberrances chromosomiques et une réduction de la survie cellulaire conduisant à une relation de létalité synthétique entre la voie HR et celle du TMEJ (Ceccaldi et al. 2015; Mateos-Gomez et al. 2015). Ce lien étroit entre ces deux voies est notamment expliqué par le rôle inhibiteur de POL $\theta$  sur la formation du filament de RAD51, étape essentielle au bon déroulement de la voie de HR (Ceccaldi et al. 2015), rôle de POL $\theta$  indépendant de l'activité du TMEJ. Compte tenu de ces informations, ainsi que du mécanisme de résistance aux PARPi par la réactivation de la formation du filament de RAD51 indépendante de BRCA1 (Cruz et al. 2018; Yajing Liu et al. 2017; Nacson et al. 2018), la sensibilité aux PARPi peut-être hypothétiquement expliquée par: 1- les PARPi sont efficaces sur les cellules BRCA1/2 sauvages et surexprimant POL $\theta$  par la co-occurrence de l'inhibition du TMEJ, par l'inhibition de PARP1 par les PARPi, et par l'inhibition du HR engendrée par l'expression de POL $\theta$  (Figure 45); 2- les PARPi sont efficaces sur les cellules BRCA1/2 mutées et déficientes en POL $\theta$  par l'action de trapping des PARPi produisant un dommage qui ne peut probablement pas être résolu à cause de l'inhibition conjointe de la HR (par la mutation de BRCA1/2) et du TMEJ (par l'absence d'expression de POL $\theta$ ). Si cette hypothèse s'avère exacte, cela expliquerait en quoi les cellules exprimant ZEB1 sont résistantes aux PARPi. Leur perte d'activité du TMEJ par ZEB1 ainsi que de l'efficacité de la réparation du trapping par la voie de la HR engendrent donc une résistance aux PARPi. Cette hypothèse permet donc d'expliquer la contradiction apparentes des études citées précédemment lors de la surexpression de *POLQ*. Dans un contexte où BRCA1/2 sauvages dans les *claudin-low*, la voie de la HR devient naturellement inactive lors de la surexpression de *POLQ*. Les PARPi ont alors un rôle majeur dans l'inactivation du TMEJ (Figure 44 M).



**Figure 45: Hypothèse pour la sensibilité aux PARPi observée chez les claudin-low surexprimant POLQ**

Les inhibiteurs de PARP piègent PARP1 à l'ADN (trapping) et inhibent son activité de PARylation. L'inhibition de l'activité de PARP1 inhibe alors l'activité de réparation dans la voie du TMEJ. POLθ surexprimé inhibe la formation du filament de RAD51, inhibant par la même occasion la voie du HR. La cassure double-brin (CDB) n'étant pas réparée, la cellule va activer le processus de mort cellulaire.

## Résultats

Afin de tester cette hypothèse dans le contexte BRCA1/2 sauvage, nous avons utilisé le test d'évaluation de la fréquence de mutations du gène HPRT. Dans cette hypothèse, la sensibilité aux PARPi serait alors dépendante de l'expression de POL $\theta$  et donc dépendante de la voie du TMEJ pour réparer les dommages. Le traitement par le talazoparib n'a aucun effet significatif sur la fréquence de mutation HPRT des cellules n'exprimant pas POL $\theta$  (Figure 44 N). Comme démontré précédemment (Figure-Article 4 C page 173), la surexpression de POLQ entraîne une augmentation significative de la fréquence de mutation, mais après traitement au talazoparib, celui-ci limite l'activité mutagène du TMEJ en présence de POL $\theta$ . Comme proposé par le groupe du Dr Pommier (Murai et al. 2012), les lignées tumorales exprimant ZEB1, en absence de mutation BRCA1/2 ne sont pas résistantes aux PARPi mais insensibles/immunes du fait de l'absence d'activité de la voie TMEJ.

La sensibilité aux PARPi a été largement décrite comme reposant sur la perte du mécanisme de réparation par BER (Dantzer et al. 2000; Murai and Pommier 2019) mais aussi *via* la perte de protéines de la voie 53BP1 (Mirman and de Lange 2020) pour les cellules déficientes en BRCA1/2. Nos résultats proposent également que la perte de l'activité du TMEJ jouerait un rôle dans la non-sensibilité aux PARPi des lignées *claudin-low*. Bien que cette hypothèse reste à être vérifiée, nous proposons qu'un des effets des PARPi pourrait donc être d'inhiber le TMEJ en plus du BER dans les lignées BRCA1/2 déficientes ou non. De plus, les voies du HR et TMEJ sont des mécanismes en compétition. L'expression de POL $\theta$  empêche l'assemblage du nucléofilament RAD51 sur l'ADN et limite donc l'activité HR (Ceccaldi et al. 2015). Par conséquent, la surexpression de *POLQ* dans le cancer pourrait être associée à un phénotype de déficit en HR (Konstantinopoulos et al. 2015). La restauration de la sensibilité aux PARPi par la perte de l'expression de ZEB1, renforçant en outre le déficit HR par la réexpression de *POLQ*, permet ainsi de proposer l'inhibition de ZEB1 comme traitement pour potentialiser l'efficacité clinique des PARPi des patientes *claudin-low*.

### 5. ZEB1 semble réprimer l'activité de PARylation

La résistance des cellules *claudin-low* exprimant ZEB1 aux PARPi est beaucoup plus importante que les cellules *basal-like* n'exprimant pas ZEB1 (Figure 46 A). Comme les IC50 le montrent, les cellules *basal-like* semblent plus sensibles aux PARPi indépendamment de leur statut BRCA1 (Figure 46 B). En effet, parmi l'ensemble des cellules testées, seules les HCC1937 sont mutées pour BRCA1. Compte tenu de ces données et des résultats présentés dans le chapitre I de la partie résultats, nous nous sommes demandés si un autre facteur du TMEJ, tel que PARP1, pouvait être modulé par ZEB1. En effet, comme montré par l'oncoprint, l'expression de *PARP1* et de *ZEB1* semblent inversement corrélées dans les tumeurs (Figure 46 C). De même que pour *POLQ*, il semblerait que *PARP1* soit aussi faiblement exprimé en présence de *ZEB1*, résultat en accord avec la littérature (Aleix Prat and Perou 2011). Afin de valider cette hypothèse, le niveau d'expression protéique de PARP1 dans divers modèles et lignées cellulaires a été vérifié. Malheureusement, que ce soit dans les lignées TNBC (Figure-Article 1 F et S1 page 162 et 163) ou dans le modèle MDA-MB231 CRISPR-cas9 pour ZEB1, l'expression de PARP1 varie très peu en fonction de ZEB1 (Figure 46 D). Cependant, l'activité endogène de PARylation, elle semble varier énormément. La perte de ZEB1 dans le modèle MDA-MB231 CRISPR-cas9 entraîne une très forte augmentation de la PARylation pour les deux clones CRISPR. Le second modèle de surexpression de ZEB1 induit au cours du temps par la Doxycycline dans un contexte oncogénique en présence du mutant *HRAS*<sup>G12V</sup>, induit par le Tamoxifène, montre que l'induction de ZEB1 bloque l'activité de PARylation alors que le niveau d'expression protéique de PARP1 ne semble pas varier (Figure 46 E).

L'ensemble de ces résultats suggère que l'EMT et plus particulièrement ZEB1 modulent l'activité de PARP1 ou la stabilité du PAR, en plus des résultats obtenus pour la transcription de *POLQ*. Ces deux acteurs du TMEJ sont donc régulés à la baisse par ZEB1, renforçant l'hypothèse que les tumeurs *claudin-low* n'utilisent pas la voie du TMEJ afin de réparer les dommages causés par un stress oncogénique. Cette perte d'activité du TMEJ explique pourquoi les cellules exprimant ZEB1 ne semblent pas sensibles au PARPi.

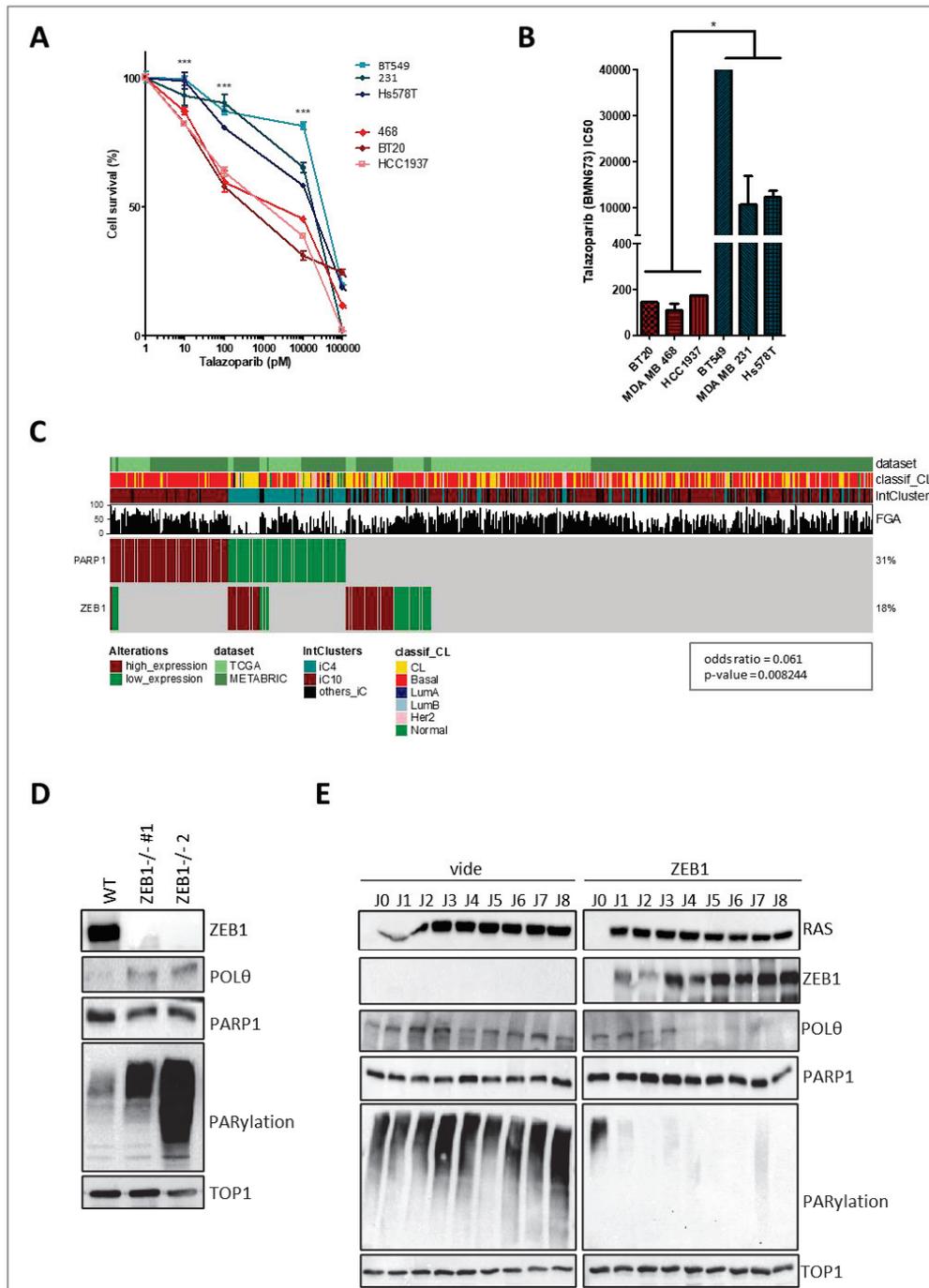


Figure 46 : ZEB1 module l'activité de PARylation

**A**, Test de survie clonale des lignées TNBC à la suite du traitement par le PARPi Talazoparib. En bleu sont répertoriées les lignées *claudin-low* et en rouge les lignées *basal-like*. Les tests statistiques sont réalisés pour l'ensemble des lignées *claudin-low* contre des lignées *basal-like*. Moyenne  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; ns, non significatif, test t bilatéral de Student non apparié avec correction de Welch. **B**, IC50 correspondant. **C**, OncoPrint d'expression haute et basse pour les gènes PARP1 et ZEB1. OncoPrint fournit un aperçu des altérations génomiques (légende : FGA) pour des gènes particuliers (lignes) affectant des échantillons tumoraux individuels (colonnes). L'expression génique de PARP1 et ZEB1 est mutuellement exclusive dans TNBC comme en témoigne l'odds ratio. Le sous-type de cancer du sein moléculaire, les altérations du nombre de copies génomiques (FGA) ainsi que les IntClusters pour chaque échantillon sont représentés. N = 3 083. **D**, Immunoblot montrant les différents niveaux d'expression protéiques de ZEB1, POLθ, PARP1 et de l'activité de PARylation dans le modèle cellulaire MDA-MB231 CRISPR-cas9 pour ZEB1. TOP1 servant de contrôle de charge. n=3 expériences indépendantes. **E**, Immunoblot montrant les différents niveaux d'expression protéiques au cours du temps (sur 8 jours) de HRAS, ZEB1, POLθ, PARP1 et de l'activité de PARylation dans le modèle cellulaire HMEC-hTERT inducible pour RAS<sup>G12V</sup> (Tamoxifène) et ZEB1 (Doxycycline). TOP1 servant de contrôle de charge. n=2 expériences indépendantes

### III. Conclusion

En conclusion, ce travail propose un nouveau mécanisme de régulation du TMEJ par le facteur de transcription ZEB1 inducteur de l'EMT et l'impact de ce dernier sur la stabilité du génome, l'intégrité du génome et la résistance aux traitements contre le cancer.

Nos résultats montrent que l'expression de *POLQ*, acteur potentiel de l'instabilité génomique, est élevée dans le sous-type de tumeur TNBC *basal-like* très instable. Ce résultat corrobore les travaux antérieurs démontrant qu'environ 70% des cancers du sein avec des niveaux élevés de CIN surexpriment *POLQ* (Lemée et al. 2010). Inversement, l'expression de *POLQ* est plus faible dans les tumeurs *claudin-low* exprimant ZEB1, tumeurs caractérisées par un paysage génomique sub-normal. Cette différence de niveau d'instabilité est notamment expliquée par le rôle répresseur de ZEB1 sur l'expression de *POLQ*.

Ce travail souligne la nécessité de ZEB1 pour modérer l'apparition de l'instabilité chromosomique et préserver le génome de l'accumulation d'altérations. Précédemment, il a été montré que ZEB1 protège le génome en résistant à une activation oncogénique en contrôlant un programme anti-oxydant (A.-P. Morel et al. 2017). De même, il a été suggéré que ZEB1 soit nécessaire pour la réparation des dommages à l'ADN médiée par recombinaison homologue et l'élimination des cassures d'ADN (P. Zhang et al. 2014). Nos travaux renforcent ces résultats en montrant que ZEB1 possède un rôle primordial dans la réparation de l'ADN en empêchant l'activité du TMEJ hautement mutagène indépendamment du cycle cellulaire.

Dans l'ensemble, nos résultats fournissent de nouvelles informations sur le rôle de ZEB1 dans la progression du cancer en protégeant le génome contre l'instabilité générée lors du développement tumoral. Cependant, la réduction de l'activité TMEJ a un coût, à savoir l'augmentation spontanée du nombre de cellules présentant des micronoyaux pour les cellules *claudin-low*. Nous proposons que le TMEJ minimise la formation de micronoyaux. Dans les cellules cancéreuses, le TMEJ serait donc une voie de réparation à part entière, c'est-à-dire un facteur facilitant la survie des cellules cancéreuses pour supporter notamment le stress réplcatif (W. Feng et al. 2019).

Enfin, nos résultats montrent que la sensibilisation des lignées cancéreuses *claudin-low* TNBC aux PARPi est dépendante de ZEB1. Comme pour de nombreux autres agents génotoxiques, nous montrons de manière originale que les cellules *claudin-low* sont résistantes aux PARPi, en absence de mutation BRCA1. Cette résistance est associée à la perte d'expression de *POLQ* et donc à la perte de l'activité du TMEJ. Bien que la sensibilité au PARPi a été largement décrite comme reposant sur le défaut de réparation par le BER, nos résultats impliquent également le TMEJ. Nous proposons qu'un

## Résultats

des mécanismes expliquant la faible sensibilité aux PARPi pour les cellules *claudin-low* réside dans le fait qu'un effet majeur des traitements aux PARPi est d'inhiber le TMEJ. Les cellules *claudin-low* présentant peu/pas d'activité TMEJ et/ou de PARylation sont donc insensibles aux PARPi (Murai and Pommier 2019). La restauration de la sensibilité aux PARPi des cellules *claudin-low* a été rendu possible par la perte de l'expression de ZEB1 ou, comme nous le montrons, par la réexpression de POLθ et donc l'activation du TMEJ qui en découle.

Nos résultats ont donc révélé un nouveau mécanisme de résistance aux traitements par les PARPi dépendant de l'activité du TMEJ et de la présence de ZEB1. Ces découvertes encouragent l'application de combinaisons de médicaments inhibant ZEB1 (Meidhof et al. 2015) et des traitements aux PARPi comme stratégie pour cibler les patients atteints de cancers *claudin-low*, un sous-groupe de TNBC agressifs exprimant ZEB1.

## Chapitre II : Sensibilisation des tumeurs *claudin-low* par l'inhibition de la voie canonique de jonction des extrémités non homologues

### I. Introduction

Ce deuxième chapitre consiste à analyser l'impact des inhibiteurs du c-NHEJ, en particulier l'inhibiteur de DNA-PKcs, le Nu7441, sur la sensibilité aux traitements de chimiothérapies de cellules exprimant ZEB1, dans le but d'améliorer la prise en charge des patientes présentant des cancers TNBC de type *claudin-low*. En effet, comme cela a été montré dans le premier chapitre, les tumeurs *claudin-low* n'utilisent pas la voie du TMEJ pour réparer les dommages à l'ADN. De plus, l'utilisation de la voie du HR dans ces cellules semble controversée. Zhang et ses collaborateurs montrent que les cellules activant ZEB1 utilisent la voie du HR afin de réparer les dommages (P. Zhang et al. 2014), même si de nombreuses études amènent à penser que les tumeurs TNBC n'utilisent que très peu la voie du HR (Lips et al. 2013; Lord and Ashworth 2016; Manié et al. 2016). Cependant, il est important de noter que cette diminution de l'activité du HR observée dans les tumeurs TNBC peut sans doute être expliquée par la forte proportion de tumeurs *basal-like*, exprimant fortement *POLQ* responsable alors de l'inhibition du HR par RAD51 (Ceccaldi et al. 2015). Mais indépendamment du statut du HR dans les tumeurs *claudin-low*, la voie du c-NHEJ reste active. L'inhibition de cette voie permettrait donc d'empêcher les cellules de réparer les dommages produits par la chimiothérapie conventionnelle et donc d'induire la mort cellulaire ou la sénescence. En effet, la perte simultanée de l'activité du TMEJ et du c-NHEJ augmente significativement la sensibilité des cellules aux irradiations (Joost Schimmel et al. 2017). Dans cette étude, les auteurs ont réalisé différents CRISPR-cas9 d'acteurs de la réparation de l'ADN tel que *POLθ* pour le TMEJ ou *KU80* pour le c-NHEJ dans des cellules souches embryonnaires de souris. La perte de l'expression de l'un ou l'autre de ces acteurs ne sensibilise pas ou peu les cellules à la radiothérapie alors que la perte simultanée de l'expression de *POLθ* et de *KU80* augmente fortement la sensibilité aux irradiations (Joost Schimmel et al. 2017). L'étude de la fonctionnalité du c-NHEJ, dans les tumeurs exprimant ZEB1, et de leur sensibilité aux inhibiteurs, est donc une nouvelle approche thérapeutique intéressante dans la recherche d'un nouveau traitement pour les tumeurs *claudin-low*.

Nous avons fait le choix de caractériser, au cours de ce travail de thèse, la réponse thérapeutique des inhibiteurs de DNA-PKcs, plutôt que mécanistique de la régulation de la voie du c-NHEJ par l'EMT. Cependant, plusieurs études ont permis de proposer différentes hypothèses concernant l'implication de l'EMT dans la voie de réparation du c-NHEJ. Récemment, l'équipe du Dr Dantzer a notamment mis

en exergue la dépendance à l'activité du c-NHEJ des TNBC exprimant ZEB1 pour leurs survies cellulaires. En effet, les lignées MDA-MB231 et Hs578T ont une survie cellulaire diminuée après traitement par le ME0328, un inhibiteur de PARP1 et de PARP3, acteur du c-NHEJ permettant le recrutement de KU70 et KU80 (C. Beck et al. 2014, 2019). Cette dépendance à l'expression de PARP3 semble être renforcée lors de la perte de l'expression de BRCA1, acteur du HR. Cette perte d'expression de PARP3, et donc de l'activité du c-NHEJ, conduisant à une diminution de la survie cellulaire des TNBC exprimant ZEB1, peut être expliquée par un défaut d'une voie de réparation de l'ADN. De plus, l'implication de l'EMT sur l'activité de PARP3 a elle aussi été démontrée. En 2016, Karicheva et ses collaborateurs ont montré que le TGF $\beta$ , connu pour induire l'EMT et l'expression des EMT-TFs dont ZEB1 et surtout SNAIL, est aussi capable d'induire l'expression de PARP3. L'augmentation de PARP3 par le TGF $\beta$  favorise à la fois l'induction de l'EMT et de ses propriétés migratoires mais permet aussi de renforcer la résistance aux agents de chimiothérapies, tel que l'étoposide dans cette étude (Karicheva et al. 2016). En 2005, des travaux similaires sur XRCC4 ont permis de mettre en évidence que la lignée MDA-MB231 est plus sensible aux radiations ionisantes lors de la surexpression d'une forme tronquée de XRCC4 rendant alors inactive la réparation par le c-NHEJ (Jones et al. 2005). Le lien entre l'EMT et XRCC4 est renforcé par des travaux réalisés en 2016 qui mettent en évidence l'utilisation de la voie c-NHEJ lors d'un stress oncogénique dans des cellules en EMT. En effet, dans cette étude, l'EMT-TF ZNF281 est responsable de l'activation de la transcription de XRCC4, favorisant ainsi la résistance au traitement génotoxique (Pieraccioli et al. 2016).

Finalement, une interaction serait fortement probable entre ZEB1 et KU70/80, codés par les gènes XRCC5 et XRCC6. En effet, en 2016, Zhang et ses collaborateurs démontrent dans leur article l'interaction entre ZEB1, USP7 et ATM notamment *via* analyse d'interaction protéines-protéines TAP-MS (analyse permettant l'enrichissement et l'isolement de complexes protéiques physiologiques (TAP : purification par affinité en tandem), couplé à la spectrométrie de masse (TAP-MS) ; le TAP-MS est une approche puissante pour détecter de nouveaux réseaux d'interaction protéines-protéines). Parmi la liste des protéines identifiées, interagissant avec ZEB1, les protéines KU70 et KU80 sont des potentiels interactants avec une forte probabilité (P. Zhang et al. 2014). En conclusion, de nombreuses preuves, certes indirectes, semblent privilégier l'hypothèse selon laquelle les EMT-TFs favorisent l'utilisation de la voie du c-NHEJ dans les cellules en EMT telles que dans les *claudin-low*.

Dans ce chapitre, seuls les résultats sur l'inhibiteur de DNA-PKcs, le Nu7441, comme nouvelle approche thérapeutique dans le traitement des TNBC *claudin-low* sont présentés.

### II. Résultats

#### a. Expressions différentielles des acteurs du c-NHEJ dans les lignées TNBC

Dans un premier temps, je me suis intéressée à l'expression des acteurs du c-NHEJ dans les tumeurs TNBC afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle l'EMT favoriserait l'utilisation de cette voie. Malheureusement, l'analyse différentielle de l'expression des gènes entre les IntCluster 4 et 10 de tumeurs TNBC ne montre pas de différence, acteurs surexprimés ou inhibés faiblement (Figure 47 A). La répartition entre les différents IntClusters de ces mêmes acteurs (PRKDC, XRCC5, LIG4, POLM et PARP3) ne permettent pas non plus d'apprécier une différence (Figure 47 B-F). Certains acteurs tels que PRKDC (gène codant pour la protéine DNA-PKcs) semblent avoir une transcription diminuée dans l'IntCluster 4 contenant les *claudin-low* en comparaison avec celui des *basal-like* (Figure 47 B). XRCC5 et l'ADN ligase IV (LIG4) ne semblent pas moduler entre ces deux IntClusters (Figure 47 C-D). POLM, codant pour la protéine ADN polymérase  $\mu$ , et PARP3 quant à eux semblent être surexprimés (Figure 47 E-F). L'analyse de ces données de banques de données ne permettent donc pas de valider l'hypothèse d'une augmentation de l'utilisation de cette voie par les tumeurs TNBC *claudin-low*. Ces données corroborent celles déjà présentées montrant qu'entre les données du CCLE et celles de TCGA, les corrélations vont dans des sens opposés mais de façon peu significatives (Figure 40 D, page 135). L'ensemble de ces données nous donnent tout de même l'information selon laquelle les EMT-TFs ne régulent pas la transcription de suffisamment de gènes impliqués dans ce processus pour obtenir un résultat significatif. Cependant, les EMT-TFs sont aussi connus pour leurs interactions protéines-protéines pouvant conduire à une stabilisation ou à une dégradation protéique. Afin de tester cette hypothèse, nous avons vérifié l'expression protéique de différents acteurs du c-NHEJ dans plusieurs lignées *basal-like* et *claudin-low* (Figure 47 G). Une augmentation des niveaux protéiques de 3 acteurs sur les 4 testés a été observée. DNA-PKcs, KU80 et POL $\mu$  ont des niveaux protéiques plus importants dans les lignées exprimant ZEB1. Les EMT-TFs permettraient donc une stabilisation des acteurs de la voie du c-NHEJ favorisant ainsi la réparation des dommages à l'ADN par cette voie.

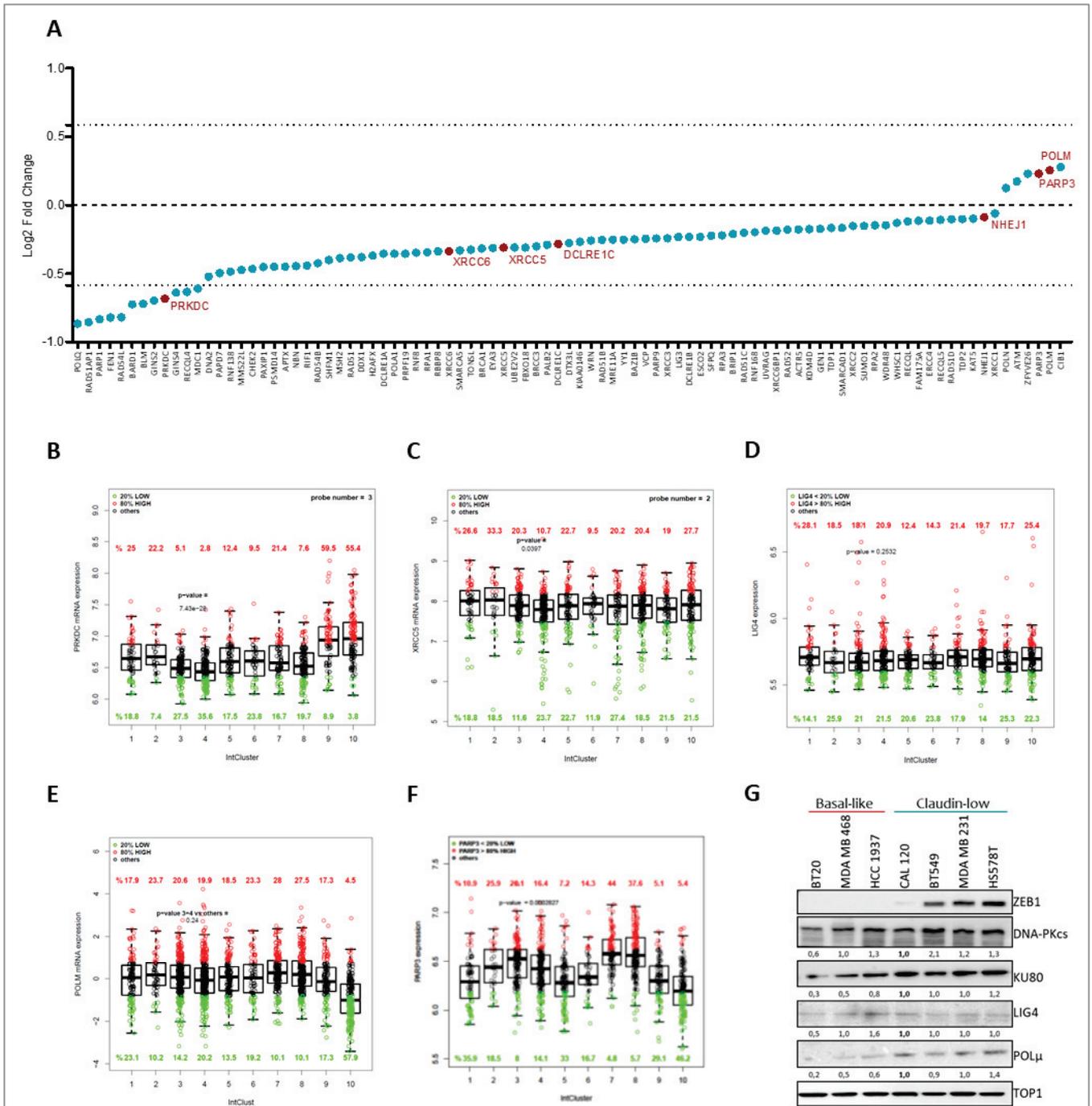


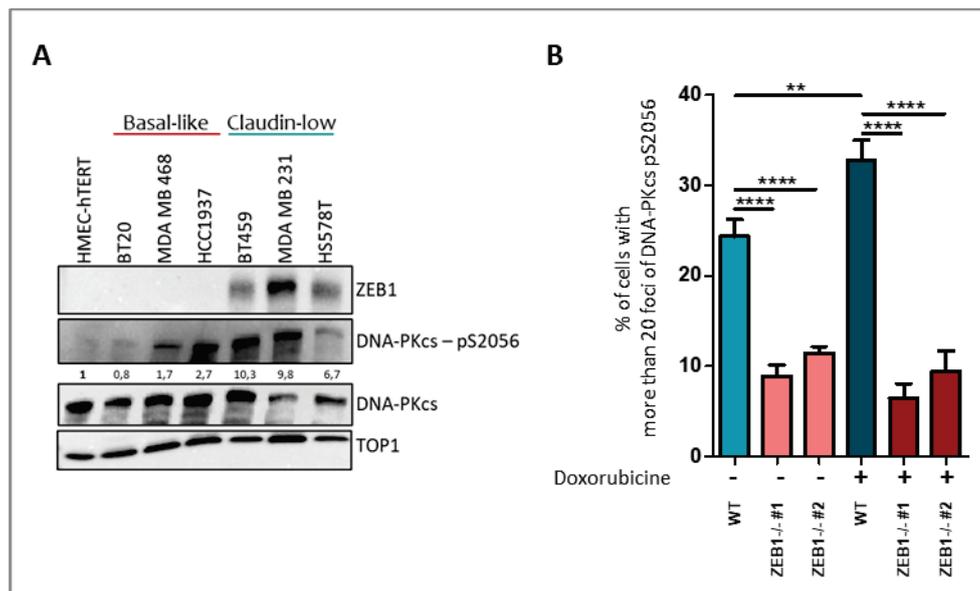
Figure 47 : Expressions différentielles des acteurs du c-NHEJ selon l'expression des acteurs de l'EMT dans les TNBC

**A**, Différentielle d'expression des gènes des voies de réparation entre les tumeurs TNBC de l'IntCluster 4 (integrative cluster exprimant ZEB1 et ayant peu d'instabilité génomique) et 10 (n'exprimant pas ZEB1 mais ayant un fort niveau d'instabilité génomique) de la classification de Curtis et al, 2012. Apparaît en rouge l'expression des gènes des acteurs du c-NHEJ significativement différents. **B-F**, Répartition de l'expression des ARNm des acteurs du c-NHEJ dans les différents IntCluster de la classification de Curtis et al, 2012. : PRKDC (**B**), XRCC5 (**C**), LIG4 (**D**), POLM (**E**) et PARP3 (**F**). La p-value correspond aux valeurs de l'intclusters 3 et 4 (les deux plus fort pour ZEB1) contre les autres. **G**, Immunoblot montrant les différents niveaux protéiques de ZEB1, de DNA-PKcs (codé par le gène PKRDC), de KU80 (codé par le gène XRCC5), de l'ADN ligase IV (LIG4) et de l'ADN polymérase  $\mu$  (POL $\mu$ ) dans les lignées cellulaires TNBC. L'ADN topoisomérase I (TOP1) servant de contrôle de charge ; n = 3 expériences indépendantes

### b. Modification de l'activité de DNA-PKcs dans les cellules exprimant ZEB1

Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle les cellules *claudin-low* exprimant ZEB1, utilisent préférentiellement le c-NHEJ pour réparer les CDBs en comparaison aux cellules *basal-like*, nous avons étudié la capacité de ces cellules à produire la forme phosphorylée de DNA-PKcs, marqueur de l'activation de la voie du c-NHEJ. En effet, DNA-PKcs s'autophosphoryle sur la sérine 2056 afin de permettre la formation du complexe DNA-PK actif, composé des protéines KU70/80 et de la sous-unité DNA-PKcs phosphorylée, conduisant alors à l'activation des autres acteurs de la voie (Jiang et al. 2015; Meek et al. 2007; Uematsu et al. 2007). J'ai réalisé l'étude de l'activité de la voie du c-NHEJ par deux expériences distinctes.

La première consiste en la vérification de l'expression endogène des niveaux protéiques de DNA-PKcs phosphorylée dans les lignées *basal-like* et *claudin-low*. Dans un premier temps, dans les HMEC-hTert, lignée du sein immortalisée mais non transformée, les cellules présentent un très faible niveau spontané de phosphorylation de DNA-PKcs sur le résidu S2056 en comparaison de l'ensemble des lignées TNBC étudiées. Cette phosphorylation est augmentée pour pratiquement l'ensemble des lignées tumorales par rapport aux lignées HMEC-hTERT, probablement en conséquence du stress oncogénique. Cependant, le niveau de phosphorylation est encore plus élevé pour les 3 lignées *claudin-low* par rapport aux lignées *basal-like* (Figure 48 A). Ces résultats préliminaires sont confirmés par une deuxième expérience permettant de visualiser le recrutement de DNA-PKcs phosphorylée sur les sites de dommage. L'analyse de ces foyers de réparation c-NHEJ dans le modèle CRISPR-cas9 de ZEB1 dans les MDA-MB231 est la première preuve de l'influence de ZEB1 dans l'activation de DNA-PKcs. En effet, la perte de l'expression de ZEB1 induit une diminution d'environ 50% de la quantité spontanée de cellules présentant des foyers de DNA-PKcs pS2056 (Figure 48 B). De plus, le traitement par un agent génotoxique tel que la Doxorubicine renforce cet écart entre les cellules exprimant ZEB1 et celles ne l'exprimant plus, passant d'environ 32% à 9% chez les ZEB1<sup>-/-</sup>. Il est intéressant de noter que le traitement à la Doxorubicine entraîne une augmentation significative du nombre de foyers de réparation pour la forme phosphorylée de DNA-PKcs. L'ensemble de ces résultats permet donc de suggérer que les cellules exprimant ZEB1 présentent une activité du c-NHEJ accrue en comparaison avec les cellules dépourvues en ZEB1.



**Figure 48 : ZEB1 favorise l'activité de DNA-PKcs et donc du c-NHEJ**

**A**, Immunoblot montrant les niveaux protéiques de ZEB1, de DNA-PKcs, de la forme active phosphorylée de DNA-PKcs sur la serine 2056 dans les lignées cellulaires TNBC. DNA-PKcs pS2056 a été normalisé à la fois par la quantité totale de DNA-PKcs et par l'ADN topoisomérase I (TOP1), les cellules HMEC-hTERT servant de référence. TOP1 est utilisé de contrôle de charge. (Résultats préliminaires n=1) **B**, Pourcentage de cellules avec plus de 20 foyers DNA-PKcs pS2056 dans les MDA-MB231 déplétées pour ZEB1 (CRISPR-cas9 ZEB1) avec ou sans traitement à la doxorubicine (300nM, 1h). n= 3 expériences indépendantes

### c. Sensibilisation des tumeurs ZEB1 positives à la chimiothérapie par l'inhibiteur de DNA-PKcs

L'inhibiteur de DNA-PKcs, le Nu7441, empêche la phosphorylation de DNA-PKcs et donc l'activation de la voie du c-NHEJ (Cowell, Durkacz, and Tilby 2005; Dong et al. 2018). L'utilisation de cet inhibiteur a permis dans de nombreuses études de renforcer la sensibilité des cellules à la radiothérapie ou à la chimiothérapie (Ciszewski et al. 2014; Zhao et al. 2006). L'inhibition de DNA-PKcs par le Nu7441 semble avoir une action sur les cellules exprimant ZEB1 mais n'agit pas sur les cellules dépourvues d'expression de ZEB1 même après traitement par un stress génotoxique. En effet, les résultats préliminaires obtenus par immunoblot montrent que les cellules exprimant ZEB1 activent plus fortement DNA-PKcs que les cellules appauvries en ZEB1. Cette augmentation de la phosphorylation de DNA-PKcs est d'autant plus forte lors d'un stress génotoxique comme par le traitement à la Doxorubicine. L'inhibiteur Nu7441 empêche l'activation de DNA-PKcs dans ce contexte et son niveau de phosphorylation se retrouve à des niveaux similaires à celui observé dans les cellules n'exprimant pas ZEB1 (modèles MDA-MB231 CRISPR-cas9 ZEB1) (Figure 49 A). Lorsqu'une cellule exprimant ZEB1 est traitée par une combinaison de chimiothérapie (Doxorubicine) et de l'inhibiteur de DNA-PKcs (Nu7441), celle-ci devient plus sensible à l'agent génotoxique de près d'un facteur de 10 (Figure 49 B). La perte de l'expression de ZEB1 dans une lignée *claudin-low*, ici Hs578T, par shARN contre ZEB1, module aussi la réponse au traitement par la combinaison du Nu7441 et de la Doxorubicine, passant d'un facteur de sensibilisation d'environ 25 à 2 (Figure 49 C). L'utilisation d'un test de survie clonale renforce les résultats précédemment obtenus par l'analyse de la viabilité (test MTT basé sur l'activité mitochondriale). Ce test de survie clonale sur le modèle MDA-MB231 CRISPR-cas9 ZEB1 confirme la sensibilité accrue des cellules exprimant ZEB1 à la chimiothérapie après traitement par l'inhibiteur de DNA-PKcs (Figure 49 D). En effet, la perte de l'expression de ZEB1 par la méthode CRISPR-cas9 permet certes de sensibiliser les MDA-MB231 à la Doxorubicine mais seulement d'un facteur 2 en comparaison aux cellules exprimant ZEB1. Lorsque la chimiothérapie est combinée à l'inhibiteur de DNA-PKcs, les cellules déplétées en ZEB1 sont sensibilisées aux traitements d'un facteur 2,5 contre un facteur de 10 pour les cellules exprimant ZEB1.

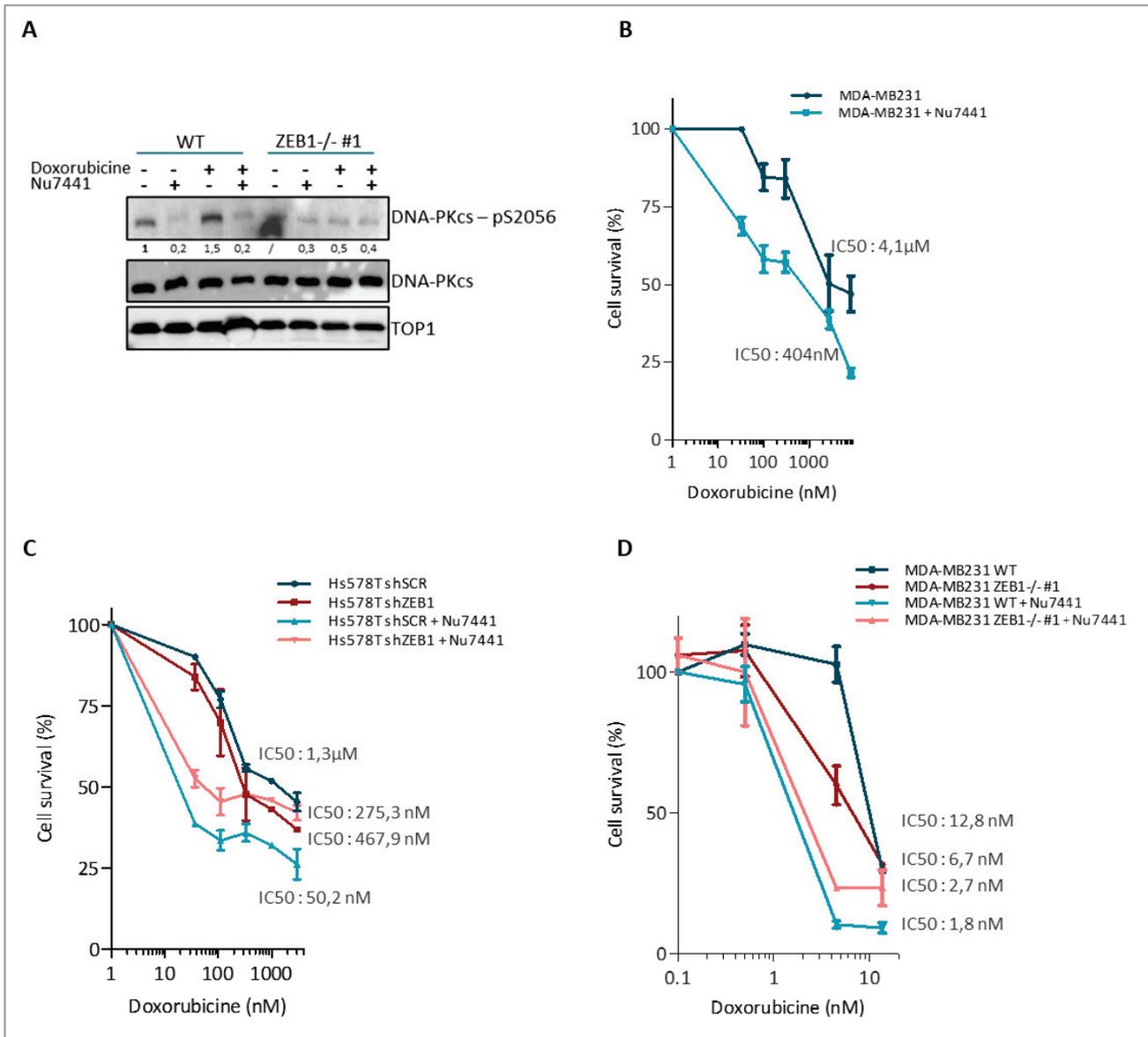


Figure 49 : L'inhibiteur de DNA-PKcs sensibilise les tumeurs ZEB1 positives à la chimiothérapie

**A**, Immunoblot montrant les niveaux protéiques de ZEB1, de DNA-PKcs, de la forme active phosphorylé de DNA-PKcs sur la serine 2056 dans le modèle MDA-MB231 +/- déplétées pour ZEB1 (CRISPR-cas9 ZEB1) après traitement à l'inhibiteur Nu7441 (inhibiteur de DNA-PKcs ; 1µM pendant 1h) avant le traitement à la Doxorubicine (300nM pendant 1h). DNA-PKcs pS2056 a été normalisée à la fois par la quantité totale de DNA-PKcs et par l'ADN topoisomérase I (TOP1), TOP1 servant de contrôle de charge. (Résultats préliminaires n=1) **B**, Survie cellulaire des MDA-MB231 évaluée à l'aide d'un test métabolique (MTT, test de survie sur 3 jours) traitée ou non avec une dose fixe de 1µM de Nu7441 (inhibiteur de DNA-PKcs) et traitée avec des concentrations croissantes de Doxorubicine. La survie est indiquée par rapport à l'échantillon non traité (Doxorubicine 0 mM). **C**, Survie cellulaire des Hs578T shSCR ou shZEB1 évaluée à l'aide d'un test métabolique (MTT, test de survie sur 3 jours) traitée ou non avec une dose fixe de Nu7441 (inhibiteur de DNA-PKcs) et traitée avec des concentrations croissantes de Doxorubicine. La survie est indiquée par rapport à l'échantillon non traité (Doxorubicine 0 mM). **D**, Survie cellulaire des MDA-MB231 +/- déplétées pour ZEB1 (CRISPR-cas9 ZEB1) évaluée à l'aide d'un test de survie clonale (test de survie sur 15 jours) traitée ou non avec une dose fixe de Nu7441 (inhibiteur de DNA-PKcs) et traitée avec des concentrations croissantes de doxorubicine. La survie est indiquée par rapport à l'échantillon non traité (doxorubicine 0 mM). n= 3 expériences indépendantes

### III. Conclusion

L'ensemble de ces données montrent clairement que le traitement par l'inhibiteur de DNA-PKcs, le Nu7441, en combinaison avec la chimiothérapie semble être une bonne piste thérapeutique dans le traitement des tumeurs TNBC *claudin-low*. Bien que l'influence de l'EMT, et plus particulièrement de ZEB1, sur le c-NHEJ reste encore à démontrer, il semblerait qu'utiliser ZEB1 comme marqueur prédictif de réponse au traitement à la combinaison du Nu7441 avec la chimiothérapie pourrait aider dans le traitement des tumeurs TNBC *claudin-low*.

## *Discussion générale et perspectives*

Les résultats présentés dans ce chapitre sont souvent encore préliminaires et sont présentés afin d'étayer la discussion.

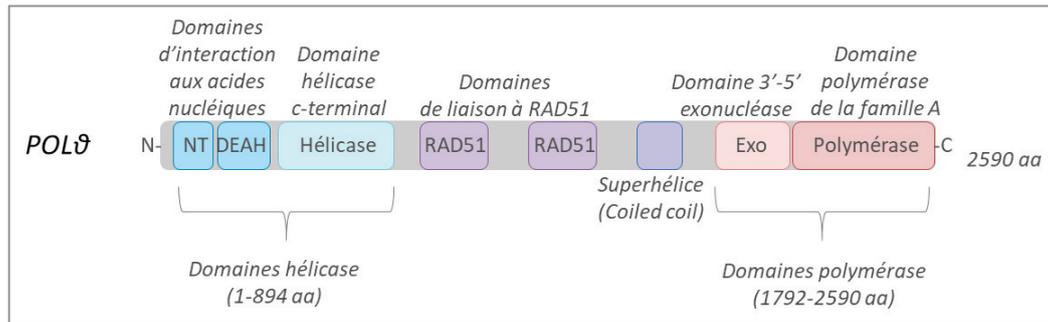


## Chapitre I : ZEB1 réprime la voie mutagène du TMEJ

### I. POL $\theta$ préserve l'intégrité du génome au prix d'une forte instabilité

L'ensemble de ce projet a contribué à montrer qu'une fonction majeure du TMEJ, et donc de POL $\theta$ , est de protéger l'ADN contre la persistance des cassures double-brin et de préserver l'intégrité du génome même si cette protection doit se faire au dépend de la stabilité. En effet, un défaut dans l'expression ou dans l'activité de POL $\theta$  peut conduire à une absence de réparation par le TMEJ et donc à une perte d'intégrité.

Ceci a précédemment été démontré lors de l'isolement des souris *chaos1* (chromosome aberrations occurring spontaneously 1) après un criblage d'animaux présentant une augmentation des fréquences spontanées de micronoyaux dans les réticulocytes du sang périphérique (Shima, Munroe, and Schimenti 2004). Les mutants *chaos1* sont génétiquement associés à une mutation faux-sens dans *POLQ*, codant l'ADN polymérase  $\theta$ . Dans ce cas, l'acide aminé serine en position 1932 de POL $\theta$  est remplacé par une proline, près du début du domaine polymérase (Figure 50). L'effet sévère de ce changement d'acide aminé pourrait être responsable de l'instabilité de la protéine qui empêche alors son expression efficace et abolie complètement son activité. POL $\theta$  n'est donc plus présente. La majorité, environ 90%, des souris homozygotes décède pendant la période néonatale. Les mutants survivants présentent des phénotypes particuliers tels qu'un retard de croissance sévère et une instabilité chromosomique accrue avec apparition de micronoyaux. Les micronoyaux sont de petits corps de chromatine extranucléaires entourés d'une enveloppe nucléaire. Les micronoyaux observés chez ces mutants proviennent principalement de fragments de chromosomes, pouvant résulter de la persistance d'une cassure double-brin lors de la mitose. Depuis de nombreuses études ont confirmé que la génération de micronoyaux est due notamment à la perte de l'expression de *POLQ* et plus précisément à la perte de l'activité polymérase (Goff et al. 2009; Yousefzadeh et al. 2014). Cependant, aucune explication mécanistique ne montre encore l'importance de POL $\theta$  dans la résolution et/ou dans la survenue de ces micronoyaux.



**Figure 50 : Structure protéique de POLθ**

Représentation schématique de la protéine POLθ et de ces domaines d'activités hélicase et polymérase. Le domaine hélicase est constitué de deux domaines d'interaction nucléotidique aux acides aminés très conservés : le domaine NT (nucleotide binding site) et le domaine DEAH (Asp-Glu-Ala-His), ainsi qu'un domaine hélicase c-terminal. Le domaine polymérase est constitué de deux domaines l'un exonucléase 3' vers 5' et l'autre, un domaine polymérase. Dans la partie intermédiaire sont présents deux domaines d'interaction avec RAD51 et un domaine structural de superhélice « coiled coil ».

D'après l'article de Black et al, 2016

A l'inverse, la surexpression de *POLQ* engendre une très forte instabilité chromosomique. Il a été montré que les niveaux d'expression de *POLQ* étaient fortement augmentés dans de nombreux cancers (Allera-Moreau et al. 2012; Kawamura et al. 2004; Lemée et al. 2010; Shinmura et al. 2019). Dans le cancer du poumon, par exemple, lorsque *POLθ* est surexprimée le niveau d'instabilité génomique augmente considérablement (Shinmura et al, 2019), qui ne semble pas être associé avec un fort taux de micronoyaux (Figure-Article 4 D-F page 173).

De même, certaines études montrent que les cellules en EMT développent plus de micronoyaux que les autres cellules (Bakhoun et al. 2018; Comaills et al. 2016; Cornélio et al. 2014) mais ceci ne semble pas avoir de conséquence sur une augmentation de l'instabilité chromosomique (Fougnier et al. 2019; A.-P. Morel et al. 2017; Pommier et al. 2020; Weigman et al. 2012). Ces observations renforcent nos résultats puisque le rôle de ZEB1 sur l'inhibition du TMEJ permet donc de limiter les translocations, les indels, les grandes insertions et délétions (Black et al. 2016; Joost Schimmel et al. 2017).

Il serait intéressant de suivre l'évolution dans le temps de ces micronoyaux. En effet, plusieurs devenir pour les micronoyaux ont été décrits : la dégradation, la réincorporation, l'extrusion et la persistance. Deux autres destinés sont aussi possibles pour les cellules micronucléées : la condensation chromosomique prématurée ou chromothripsie (réarrangement chromosomique pour lequel un minimum de 10 segments d'un seul chromosome sont impliqués dans le remaniement, avec pas plus de deux ou trois niveaux différents d'anomalies du nombre de copies) et l'élimination des cellules micronucléées par apoptose (Hintzsche et al. 2017). Dans le cas de cellules exprimant ZEB1 et en tenant

compte de la faible instabilité de ces cellules, les micronoyaux pourraient être réincorporés ou ces cellules entreraient en apoptose, expliquant alors la faible instabilité chromosomique observée. Dans tous les cas, l'analyse du devenir des cellules exprimant ZEB1 et ayant des micronoyaux permettrait d'expliquer ces observations apparemment contradictoires de faible instabilité pour des cellules présentant de forts taux de micronoyaux.

L'hypothèse, découlant de mes travaux, est que ZEB1 participe à la stabilité du génome au dépend de son intégrité. Quelles seraient les conséquences de ces observations dans les cellules souches mammaires ? Il est généralement accepté que les cellules souches présentent une faible instabilité génomique (X. Fu et al. 2017; Weeden and Asselin-Labat 2018). En réponse à divers agents endommageant l'ADN, les cellules souches embryonnaire humaines (hESC ; human embryonic stem cells) présentent une efficacité plus élevée de la réparation de l'ADN que les cellules somatiques. L'analyse de l'expression génique globale indique que les hESC expriment des niveaux plus élevés d'un certain nombre de gènes de la réparation de l'ADN impliqués dans la réparation du BER et des CDBs que leurs homologues différenciés. Par exemple, lorsque les hESC et les cellules différenciées sont traitées avec des stress oxydatifs, les niveaux de lésions 8-oxoG sont beaucoup plus faibles dans les hESC que dans les fibroblastes en raison d'une réparation plus efficace des lésions générées par oxydation (Maynard et al. 2008) et nous pouvons proposer aussi en raison d'une expression de MSR3 associée à la présence de ZEB1 (A.-P. Morel et al. 2017; Puisieux et al. 2018). Dans le cadre de la réparation des CDBs, les hESC expriment des niveaux plus élevés de protéines de réparation de l'ADN impliquées dans la recombinaison homologue (MRE11, NBS1 et RAD52) et la jonction d'extrémités non homologues (XRCC4 et ligase IV) que les cellules différenciées (Momcilovic et al. 2010). Conformément à ces résultats, les hESC peuvent réparer les dommages des CDBs plus efficacement que les cellules homologues différenciées. Alors que le c-NHEJ est la voie dominante pour réparer les dommages de l'ADN CDBs dans les cellules somatiques, la HR semble être la voie de réparation de l'ADN préférée dans les hESC, conduisant à une plus grande fidélité dans la réparation des dommages ADN (Schneider et al. 2013; Tichy and Stambrook 2008; Vitale et al. 2017; Zalzman et al. 2010). Malheureusement, bon nombre de ces études sont antérieures à la découverte de la voie du TMEJ. Il serait donc intéressant de vérifier, dans des cellules souches normales, le niveau de l'activité du TMEJ.

En se basant sur des récents résultats publiés par notre équipe, il a été démontré que les tumeurs *claudin-low* pouvaient être classées en 3 sous-groupes : les *claudin-low* 1, 2 et 3 (Pommier et al. 2020). Dans cet article, les *claudin-low* 1 (CL\_1) correspondent aux tumeurs ayant les taux d'expression de ZEB1 le plus important (Figure 51 A) et celles présentant le moins d'instabilité génomique. Pour ces tumeurs CL\_1, les résultats de l'article montrent que les cellules d'origine sont les cellules MaSC, les cellules souches mammaires les plus indifférenciées. L'analyse de l'expression des gènes du TMEJ permet de mettre en évidence que les CL\_1 sont les tumeurs dans lesquelles le niveau d'expression de *POLQ* est le plus bas alors que *PARP1* et *PARG* ne semblent pas varier entre les différents sous-groupes de *claudin-low* (Figure 51 B-D) (Roxane Pommier, personal communication). Ces données confirment les données présentées dans la partie résultats.

En conclusion, l'ensemble de ces données suggèrent un rôle unique de *POLQ* dans le maintien de l'intégrité et de ZEB1 dans le maintien de la stabilité génomique. Les deux protéines opèreraient chacune sur les plateaux d'une balance entre, d'un côté, préserver l'intégrité du génome et donc le bon fonctionnement des processus cellulaires et, de l'autre côté, créer une instabilité génomique responsable de dérégulations plus ou moins importantes dans les processus cellulaires. Dans le cancer, cet équilibre est dérégulé et la surexpression de *POLQ* engendre une instabilité du génome. L'acquisition de cette instabilité participe au développement tumoral, permettant ainsi de survivre au stress oncogénique et à terme conduire à des cancers agressifs notamment dû à leurs résistances aux traitements génotoxiques (Shinmura et al. 2019; Yousefzadeh et al. 2014). Ces données suggèrent que *POLQ* et par conséquent le TMEJ sont responsables de la réparation d'un dommage spécifique qu'aucune autre voie ne peut prendre en charge. *POLQ* fait donc partie intégrante des mécanismes fondamentaux de la maintenance du génome.

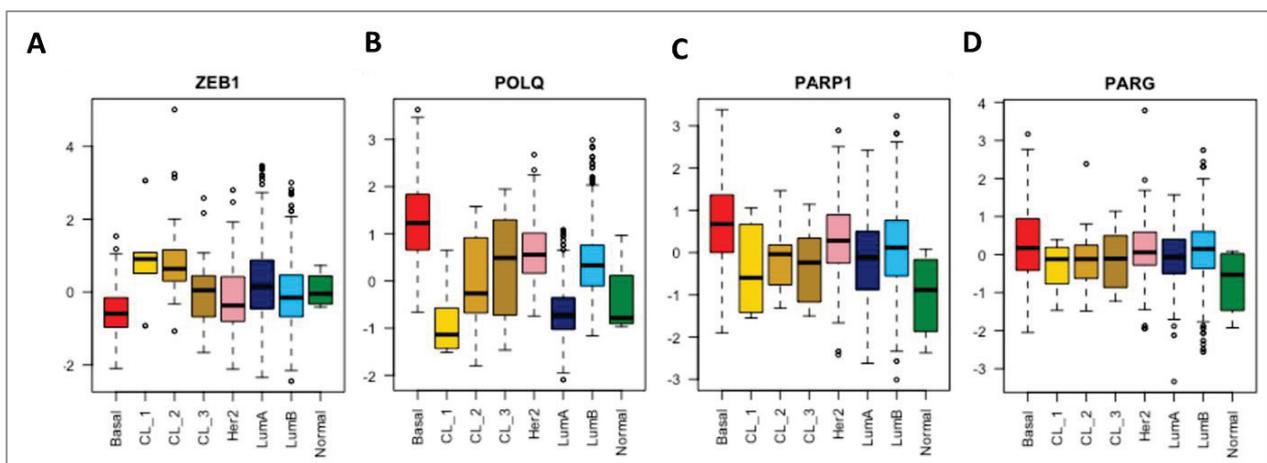


Figure 51 : Répartitions des acteurs de la réparation parmi les différents sous-types du cancer du sein

Roxane Pommier, personal communication, d'après l'article Pommier et al. 2020

## II. ZEB1 module l'activité d'un second acteur du TMEJ : PARP1

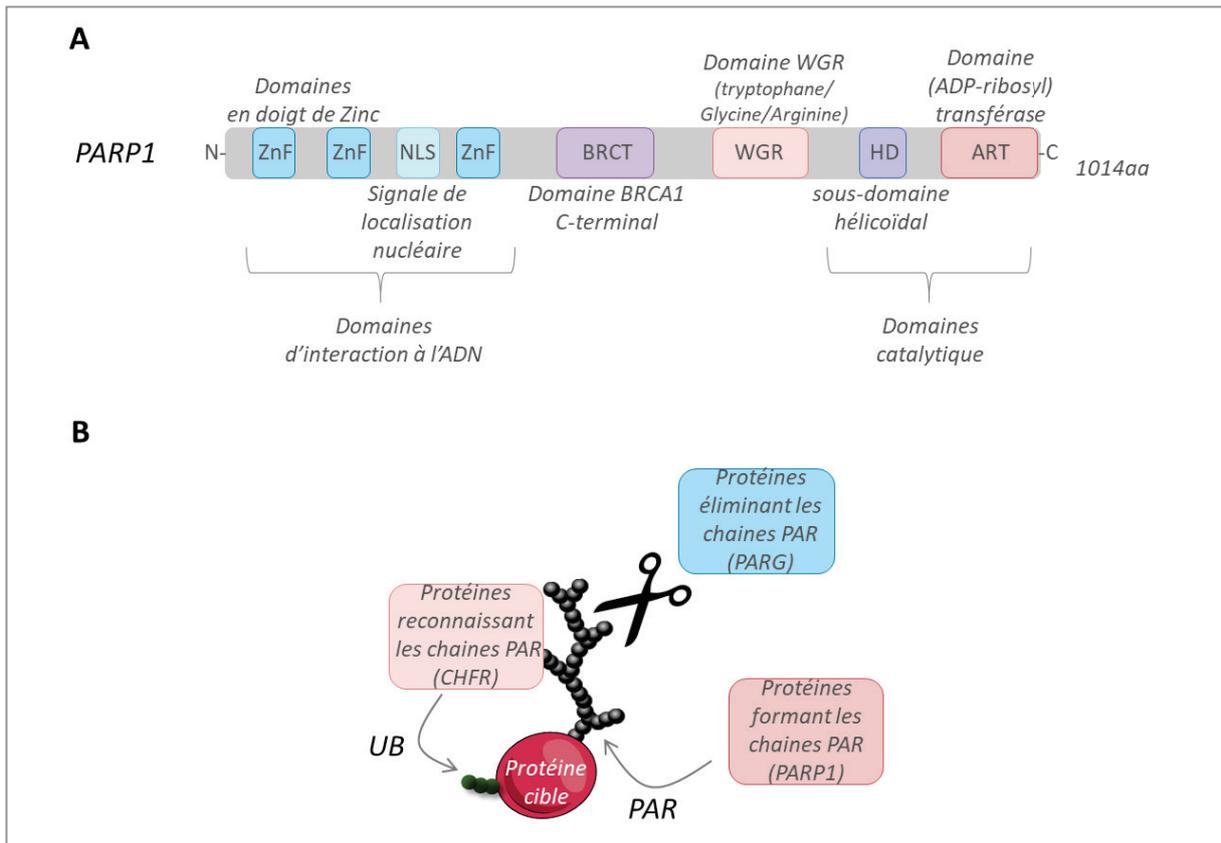
Afin de réguler certaines fonctions biologiques, de nombreuses protéines subissent une modification post-traductionnelle par des (ADP-ribose)transférases telles que les PARPs. Les chaînes de poly(ADP-ribose) (PAR) ainsi formées sont reconnues par diverses protéines telles que les facteurs agissant dans la voie de la DDR ou dans les voies de la réparation. À ce jour, plusieurs classes distinctes de protéines responsables de la modulation des chaînes PAR ont été identifiées. Ceux-ci incluent les protéines ayant un domaine en doigt de zinc de liaison au polymère PAR (PBZ ; interaction protéique entre une chaîne PAR et l'ADN), un Macro domaine (reconnaissance des chaînes PAR), le domaine WWE (interaction entre une protéine ubiquitinée et une protéine PARylée), le domaine BRCT (BRCA1 C-terminal ; interaction avec des protéines phosphorylées), le domaine FHA (Forkhead associated ; interaction avec des protéines phosphorylées) ou le domaine OB-fold (Oligonucleotide/Oligosaccharide-Binding (OB) fold ; reconnaissance des acides nucléiques) (Alemasova and Lavrik 2019; Wei and Yu 2016). Ces acteurs permettent la régulation de l'activité de PARylation par le biais de l'un ou plusieurs de ces domaines. De nombreux effecteurs interviennent donc dans la dynamique intracellulaire de la formation, l'interaction et l'élimination des chaînes PAR. Les PARPs, et plus principalement PARP1, permettent d'adjoindre des chaînes PAR aux protéines cibles par le biais de son domaine catalytique (Figure 52 A). La régulation des protéines PARylées peut se faire directement par dégradation de la chaîne PAR, ou indirectement par des protéines induisant une autre modification post-traductionnelle de PARP1 (Figure 52 B). Ces dernières peuvent être des protéines contenant des domaines Macro, WWE ou PBZ dont notamment la protéine CHFR (ou Checkpoint with forkhead and ring finger domains), une ubiquitine ligase E3. L'élimination des chaînes PAR est quant à elle assurée par des enzymes tel que PARG (Gupte, Liu, and Kraus 2017). CHFR et PARG sont donc deux régulateurs identifiés de l'activité de PARylation et de PARP1.

CHFR est recrutée très tôt lors d'un dommage. Il permet par l'ubiquitination de PARP1 de réguler son activité lors des premières étapes de la réparation en facilitant par exemple sa dissociation de l'ADN endommagé et sa dégradation par le protéasome (Kashima et al. 2012; C. Liu et al. 2013, 2017). Le lien entre EMT et CHFR est aujourd'hui peu connu. Zhang et ses collaborateurs ont mis en évidence que ZEB1 pouvait potentiellement interagir avec CHFR (P. Zhang et al. 2014), permettant hypothétiquement de favoriser la dissociation ou la dégradation de PARP1. Plus récemment, CHFR a été montré comme étant très abondante dans les cancers de l'estomac de mauvais pronostic, provoquant entre autres une augmentation de métastases. Dans cette étude, la modulation de l'expression de CHFR a permis de montrer que la présence de cette protéine favorise l'activation de l'EMT et du facteur de transcription SNAIL (S. Yang et al. 2019). Cependant, dans le cas du cancer du

sein, nous n'observons pas de diminution du taux de la protéine PARP1. Dans un contexte ZEB1 dépendant, il est peu probable que ZEB1 régule l'activité de PARP1 par le biais de CHFR puisque celui-ci conduit à la dégradation protéique par ubiquitination.

Tout comme pour CHFR, peu de données sont aujourd'hui disponibles concernant le lien entre PARG et l'EMT. L'article de Marques et ses collaborateurs a été l'un des rares à montrer un lien potentiel entre PARG et l'EMT. Ici, lorsque PARG est inhibé l'EMT semble lui aussi diminué (Marques et al. 2019). La perte de PARG engendre une diminution du nombre de métastases, limite l'invasion cellulaire et même l'expression du facteur SNAIL.

Dans cette partie nous nous intéresserons donc à diverses hypothèses de la régulation de la PARylation dépendante ou indépendante de ZEB1 dans les TNBC notamment par le biais de POLθ et de PARG.



**Figure 52: PARP1 et les régulateurs de la PARylation**

**A**, Représentation schématique de la structure de la protéine PARP1. PARP1 présente plusieurs domaines d'interaction avec l'ADN : 3 domaines en doigt de zinc (ZnF). PARP1 possède aussi des domaines particuliers aux acides aminés conservés : BRCT et WGR. Le domaine BRCT permet en autres l'interaction avec des protéines phosphorylés. Après un domaine hélicoïdal permettant l'activité catalytique de PARP1, le domaine ART (ADP-ribose transférase), commune a toutes les protéines ayant une activité de transfère d'ADP-ribose, permet l'activité de PARylation. **B**, Représentation schématique des effecteurs régulant la PARylation. Les protéines PARPs, dont PARP1, transfèrent l'ADP-ribose sur la protéine cible formant ainsi des chaînes PAR. Ces chaînes PAR sont régulées de deux manières différentes : par les protéines détruisant les chaînes PAR, tel que PARG, et les protéines interagissant avec les chaînes PAR pour réguler la protéine cible, tel que CHFR ubiquitinant PARP1 PARylé.

D'après les articles : Kashima et al, 2012 ; Liu et al, 2013 ; Liu et al, 2017

a. La répression de *POLQ* par ZEB1 semble être responsable de la modulation de l'activité de PARylation

Afin de déterminer si la régulation de l'activité de PARylation par ZEB1 est directe ou la conséquence de la perte d'expression de *POLQ*, différents modèles cellulaires, où l'expression de *POLQ* a été modulée, ont été réalisés. Après avoir transfecté le modèle MDA-MB231 CRISPR-cas9 pour ZEB1 avec un siRNA contre *POLQ*, l'activité de PARylation diminue fortement en même temps que la diminution des niveaux d'expression protéiques de *POLQ* et ce même en absence de ZEB1 (Figure 53 A). Dans ce contexte, l'expression protéique de PARP1 ne semble toujours pas varier. Afin de savoir si cette modulation de l'activité de PARylation est indépendante de ZEB1, ou, autrement dit, si l'activité de PARylation est indirectement due au rôle régulateur de la transcription de ZEB1 sur le promoteur de *POLQ*, deux modèles cellulaires ont été générés. Le premier modèle est celui de la surexpression de *POLQ* dans la lignée MDA-MB231. Dans ce modèle cellulaire, la surexpression de *POLQ* à elle seule suffit à augmenter l'activité de PARylation (Figure 53 B). Ici, la présence endogène de ZEB1 ne semble avoir aucun impact. Le second modèle consiste en la transfection de siRNA contre *POLQ* dans la lignée *basal-like* BT-20. Dans ce modèle, ne présentant aucune expression de ZEB1, la diminution des niveaux d'expression de *POLQ* suffit à diminuer l'activité de PARylation sans affecter les niveaux de PARP1 (figure 3 C). L'ensemble de ces résultats suggère que *POLQ* et la PARylation interagissent fonctionnellement, probablement au sein de l'activité du TMEJ dans son ensemble. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées.

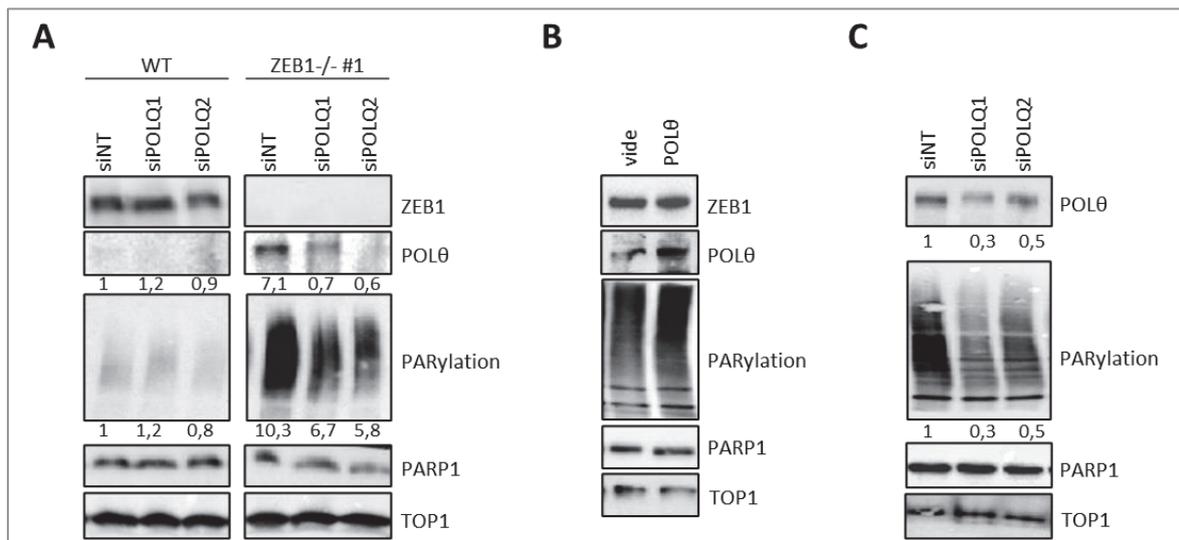
Dans un premier temps, l'interaction fonctionnelle de *POLQ* et de la PARylation peut être directe. Une hypothèse serait que l'activité de PARylation permette à *POLQ* d'être plus facilement recrutée aux différents sites de dommages afin d'activer le TMEJ. En effet, il a été démontré que PARP1 active sa propre PARylation ainsi que celle de nombreux autres acteurs tel que XRCC1, pour favoriser ainsi son recrutement au site de dommage (Hoch et al. 2017; Polo et al. 2019). A l'inverse, une trop forte accumulation de PARylation limite la fixation de RPA à l'ADN ainsi que la formation du filament de RAD51 (Illuzzi et al. 2014). La PARylation peut donc à la fois favoriser certain mécanisme et en inhiber d'autres, nécessitant alors une régulation précise de cette activité principalement réalisée par PARP1. Il serait donc intéressant de proposer que *POLQ* agisse comme un régulateur positif de l'activité de PARylation. *POLQ* permettrait donc de favoriser ou de stabiliser la PARylation. Une perte de l'activité de *POLQ* induirait donc une diminution de l'activité PARylation. Cette perte d'activité de *POLQ* conduirait à terme à la perte de l'activité globale du TMEJ. A l'inverse, la perte de l'activité de PARylation de PARP1 pourrait sans doute limiter le recrutement de *POLQ* au niveau du dommage. Des expériences de recrutement séquentielles des protéines PARP1 puis *POLQ* taggées différenciellement après irradiation localisée permettraient dans un premier temps de valider cette hypothèse.

## Discussion générale et perspectives

Deuxièmement, une interaction directe entre POL $\theta$  et PARP1 par l'intervention de ZEB1 pourrait de même expliquer la diminution de la PARylation. ZEB1 peut, directement ou indirectement, déstabiliser le complexe protéique dans lequel PARP1 et POL $\theta$  interagiraient. ZEB1 peut aussi, potentiellement, interagir directement avec PARP1 bloquant ainsi son activité de PARylation. Dans leur article, Zhang et ses collaborateurs évoque la possibilité que ZEB1 puisse directement interagir avec PARP1 (P. Zhang et al. 2014). POL $\theta$  et ZEB1 pourraient donc entrer alors en compétition pour se lier à PARP1. L'un favoriserait l'activité de PARylation de PARP1 alors que le second empêcherait cette activité. ZEB1 pourrait même, par cette interaction, empêcher PARP1 de se lier à l'ADN. Si cette hypothèse s'avère exacte, ZEB1, par ce biais, limite définitivement l'activité du TMEJ en faveur d'une autre voie.

Enfin, la perte de l'expression de *POLQ* suffit à empêcher l'activité de PARylation de PARP1 et donc du TMEJ indépendamment de ZEB1 (Figure 53 C), hypothétiquement en déstabilisant ainsi un complexe protéique. De nouvelles études récentes permettent de proposer de tisser un réseau d'interactions protéiques entre les acteurs du TMEJ. En particulier, le complexe RPA pourrait jouer un rôle important (Maltseva et al. 2018; Mateos-Gomez et al. 2017b). POL $\theta$  et PARP1 interagissent tous les deux avec le complexe RPA. POL $\theta$  et PARP1 pourraient interagir par l'intermédiaire de RPA permettant à PARP1 d'amplifier la signalisation de la DDR par la PARylation des autres acteurs de la réparation (Dungrawala et al. 2015). De plus, il est intéressant de noter que l'interaction RPA-PARP1 joue un rôle sur la synthèse du PAR. Cette synthèse de la chaîne PAR dépend du type de dommage à l'ADN. Lors d'une CSB, RPA limite la synthèse de PAR alors qu'en présence d'une CDB RPA stimule la synthèse de PAR (Maltseva et al. 2018).

Finalement ZEB1, par son action sur la transcription de *POLQ*, permet donc, directement ou indirectement, de réguler l'activité de PARP1, deuxième acteur du TMEJ. L'ensemble des hypothèses évoquées expliquerait comment les cellules *claudin-low* inhiberaient l'activité de deux acteurs du TMEJ, afin de bloquer totalement l'activité de cette voie.



**Figure 53 : POLQ influence l'activité de PARylation indépendamment de ZEB1**

**A**, Immunoblot montrant les différents niveaux d'expression protéiques de ZEB1, POLθ, PARP1 et de l'activité de PARylation dans le modèle cellulaire MDA-MB231 CRISPR-cas9 pour ZEB1 après traitement par le siRNA contre *POLQ* notifié. TOP1 servant de control de charge. n=1 expériences indépendantes. **B**, Immunoblot montrant les différents niveaux d'expression protéiques de ZEB1, POLθ, PARP1 et de l'activité de PARylation dans le modèle cellulaire MDA-MB231 surexprimant *POLQ*. TOP1 servant de control de charge. n=3 expériences indépendantes. **C**, Immunoblot montrant les différents niveaux d'expression protéiques de POLθ, PARP1 et de l'activité de PARylation dans la lignée cellulaire BT-20 après traitement par le siRNA contre *POLQ* notifié. TOP1 servant de control de charge. n=2 expériences indépendantes.

### b. ZEB1 semble favoriser l'expression de PARG, régulant ainsi la PARylation

L'activité de PARylation de PARP1 est connue pour être modulée par l'activité de l'enzyme poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG). PARG engendre une dégradation des chaînes PAR, présent chez diverses protéines, dont les PARPs elles-mêmes (X. Feng and Koh 2013; Malanga and Althaus 2005). La PARylation a un rôle essentiel dans le maintien de la stabilité du génome et sa régulation par ZEB1 peut potentiellement être due à une augmentation de l'activité de PARG. Pour vérifier l'impact de ZEB1 sur PARG et la PARylation, les taux protéiques de ces dernières ont été vérifiés dans diverses lignées mammaires, une lignée normale immortalisée, les HMEC-hTERT, une lignée luminaire MCF7, 4 lignées *basal-like* TNBC et 6 lignées *claudin-low* TNBC. Seules les lignées *claudin-low* présentent une forte expression à la fois de ZEB1 et de PARG mais à l'inverse ont des niveaux de PARylation beaucoup plus faibles que les autres lignées n'exprimant pas ZEB1 (Figure 54 A). Cependant, l'expression de l'ARNm de PARG ne semble pas varier entre les cellules exprimant ZEB1 et celles ne l'exprimant pas (Figure 54 B). ZEB1 ne semble donc pas réguler la transcription du gène PARG. La régulation de PARG par ZEB1 pourrait alors être post-traductionnelle. Cependant la PARylation reste modulable dans les cellules indépendamment de la présence de ZEB1 (Figure 54 C). En effet, l'inhibiteur de PARG permet d'augmenter l'activité de PARylation alors que l'inhibiteur de PARP1 l'inhibe dans les deux types

cellulaires. De même après traitement par un agent génotoxique, ici la Doxorubicine, l'activité de PARylation augmente comme attendue. Cependant, il est intéressant de remarquer que les cellules MDA-MB468 n'exprimant pas ZEB1 présentent une activité de PARylation toujours plus élevée que les MDA-MB231 exprimant ZEB1. Cela pouvant être expliqué par la présence toujours plus élevée de PARG dans ces dernières.

Les cellules exprimant ZEB1 semblent donc inhiber l'activité du TMEJ par 2 mécanismes différents : l'inhibition de la transcription de *POLQ* et la diminution de l'activité de PARylation qui pourrait être expliquée par l'augmentation des niveaux protéiques de PARG. Il serait intéressant de vérifier si PARP1 en tant que facteur de transcription (Kraus 2008) serait en mesure de contrôler la transcription de *PARG*.

Ces résultats restent très préliminaires, mais il ne fait aucun doute que *POLθ*, PARG et PARP1 agissent ensemble dans la même voie du TMEJ. En effet, comme expliqué précédemment *POLθ* et PARP1 interagissent tous les deux avec le complexe RPA (Maltseva et al. 2018; Mateos-Gomez et al. 2017a). A l'inverse, PARG a été identifié dans des foyers de réparation d'immunofluorescence de RPA afin de limiter le recrutement de ce dernier et la formation du filament de RPA au niveau de la cassure double-brin de l'ADN (W. Bae et al. 2020). Dans cet article, les auteurs montrent aussi que PARG limite l'activité de résection d'EXO1, réduit l'activité de *POLθ* et par conséquent du TMEJ. De plus, PARG semble étroitement lié à l'EMT. Récemment, il a été montré que PARG favorise l'EMT et l'activation des EMT-TFs par le biais de la voie des SMADs (SMAD2/3) (Marques et al. 2019). En effet, PARP1 par son activité de PARylation interagit avec la voie des SMADs et réduit ainsi l'activité transcriptionnelle des SMADs, et ce même sous l'influence du TGFβ (Lönn et al. 2010). PARP1 ici limite donc l'EMT (Masutani and Fujimori 2013; Pu et al. 2014). PARG est lui aussi capable sous l'influence du TGFβ d'interagir avec la voie des SMADs afin d'activer la transcription (Dahl et al. 2014). Dans cet article, PARG a un rôle essentiel, celui de limiter l'activité de PARP1, favorisant ainsi le processus d'EMT. On peut imaginer que PARG par cette action, favorise la transcription de ZEB1 qui lui-même peut alors le stabiliser afin de bloquer l'activité du TMEJ, limitant ainsi l'instabilité génomique.

ZEB1 semble donc être un puissant régulateur négatif du TMEJ. Il inhibe cette voie en perturbant à différents niveaux, les interactions entre PARG, *POLθ/POLQ*, et PARP1, montrant ainsi l'importance cruciale, pour les *claudin-low*, d'inhiber la voie du TMEJ.

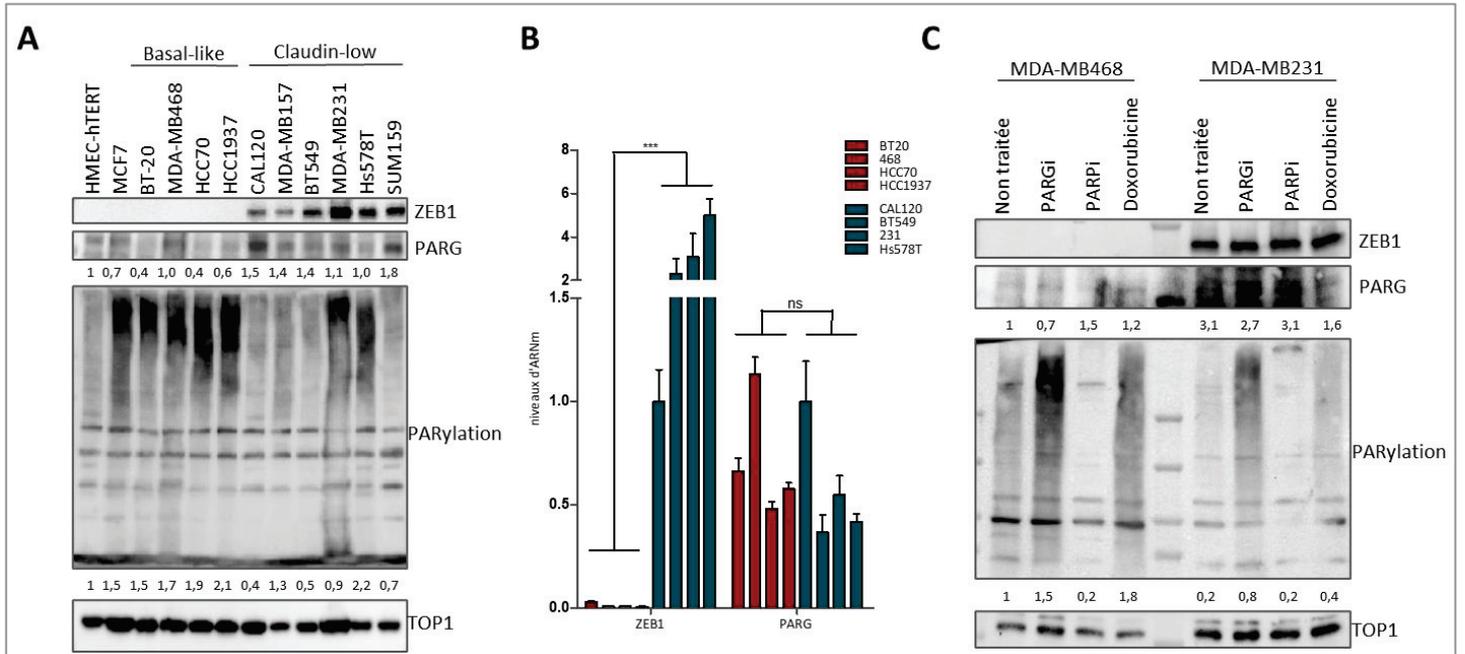


Figure 54 : ZEB1 favorise l'expression de PARG afin de limiter l'activité de PARYlation de PARP1

**A**, Immunoblot montrant les différents niveaux d'expression protéiques de ZEB1, PARG et de l'activité de PARYlation dans 10 lignées cellulaires mammaires normales immortalisées (HMEC-hTERT), luminaire (MCF7), *basal-like* et *claudin-low*. Toutes exprimant des niveaux protéiques de ZEB1 différentes. TOP1 servant de control de charge. n=3 expériences indépendantes. **B**, Niveaux d'ARNm de ZEB1 et PARG pour ces mêmes lignées cellulaires. Moyenne  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; ns, non significatif, test t bilatéral de Student non apparié avec correction de Welch. **C**, Immunoblot montrant les différents niveaux d'expression protéiques de ZEB1, PARG et de l'activité de PARYlation dans les lignées cellulaires MDA-MB468 (*basal-like*) et MDA-MB231 (*claudin-low*) après traitement de 30min au PARGi (PDD00017273, 10 $\mu$ M), PARPi (talazoparib ; 100nM) et à la doxorubicine (300nM). TOP1 servant de control de charge. n=2 expériences indépendantes.

## Chapitre II : Nouvelles approches thérapeutiques dans le traitement des tumeurs *claudin-low* TNBC

La résistance à la radiothérapie et à la chimiothérapie conventionnelle, ainsi qu'aux nouvelles thérapies ciblées, est un problème clinique majeur en médecine du cancer et crucial pour la rechute et la progression de la maladie. Par conséquent, le besoin clinique de surmonter la résistance au traitement, en particulier pour les types de tumeurs très agressifs, tels que les cancers du sein triple-négatifs, est très élevé. Il existe divers mécanismes moléculaires qui mènent à une résistance au traitement et, d'une manière générale, bon nombre d'entre eux ont été liés à un phénotype de survie associé aux propriétés des cellules souches tel que la réexpression des EMT-TFs dont ZEB1 (Holoohan et al. 2013). L'activation de l'EMT, considérée comme un processus majeur de l'invasion du cancer et des métastases, est ainsi souvent associée à la résistance au traitement (Floor et al. 2011; Thiery et al. 2009).

L'ensemble des données présenté dans ce manuscrit tend donc à montrer que les tumeurs *claudin-low* exprimant ZEB1 n'utilisent pas la voie du TMEJ, leur conférant ainsi un mécanisme original de résistance au traitement. La perte de l'activité de la voie de réparation la plus mutagène accorde aux cellules une efficacité de réparation fidèle plus importante et donc une résistance à l'ensemble des traitements génotoxiques.

L'EMT et plus particulièrement l'expression de l'EMT-TF ZEB1 semble favoriser l'utilisation du c-NHEJ lors de la réparation des CDBs (C. Beck et al. 2014, 2019; Jones et al. 2005; Karicheva et al. 2016). L'inhibition de la voie du c-NHEJ par le biais du Nu7441, l'inhibiteur de DNA-PKcs (DNA-PKi), semble être une nouvelle approche thérapeutique prometteuse et permettrait donc de sensibiliser les tumeurs *claudin-low* à la chimiothérapie ou à la radiothérapie. En effet, la perte simultanée de l'activité du TMEJ et du c-NHEJ augmente significativement la sensibilité des cellules aux irradiations (Joost Schimmel et al. 2017). Le traitement des cellules *claudin-low* au Nu7441 semble aussi permettre une bonne sensibilisation à la chimiothérapie doxorubicine. Des études cliniques de phase 1 sont actuellement en cours sur un inhibiteur similaire : le nedisertib (MSC2490484A ou M3814), en combinaison avec la radiothérapie (ClinicalTrials.gov Identifier : NCT02516813).

Une autre approche thérapeutique prometteuse dans la recherche d'un nouveau traitement pour les tumeurs *claudin-low* consiste en l'utilisation des inhibiteurs de PARG. Les inhibiteurs PARG (PARGi), bien que pour le moment peu nombreux, font l'objet de beaucoup d'attention quant à leur possible intérêt thérapeutique dans des stratégies anticancéreuses. Il est donc nécessaire de mieux comprendre comment PARG contribue à la régulation dynamique de la PARylation pour permettre un contrôle précis des processus cellulaires tel que la réparation de l'ADN, la réplication de l'ADN et la

transcription. Récemment, Houli et ses collaborateurs ont mis en évidence que la lignée *claudin-low* MDA-MB231 serait sensible aux PARGi (JA2131) d'un facteur 10 par rapport au contrôle (Houli et al. 2019). La combinaison d'un inhibiteur de PARG et de DNA-PKcs permettrait d'en renforcer les effets. Les cellules, alors privées de c-NHEJ, par le DNA-PKi pour réparer, auraient une brutale augmentation du TMEJ, conduisant à une forte augmentation de l'instabilité chromosomique pouvant conduire à la mort cellulaire. L'inhibition de PARG conduit déjà, à elle seule, à une augmentation de l'instabilité génomique dans les cancers ovariens (Coulson-Gilmer et al. 2020).

Enfin, mes travaux montrent aussi que l'inhibition de ZEB1 permettrait de sensibiliser les tumeurs à la chimiothérapie, radiothérapie et finalement aux PARPi. Malheureusement aucun inhibiteur direct de ZEB1 n'est actuellement disponible. Cependant l'inhibiteur des HDACs de classe I, le mocétinostat, semble avoir un effet non négligeable sur les cellules exprimant ZEB1 (Meidhof et al. 2015). En effet, étant donné le rôle de ZEB1 dans la résistance à différents types de médicaments anticancéreux, la surexpression de l'un de ses principaux inhibiteurs naturels, tel que miR-203, peut restaurer efficacement la sensibilité aux traitements. L'inhibiteur de HDACs (HDACi), le mocétinostat apparaît alors comme un candidat prometteur par son action de ré-activateur de la transcription des miR-200 dont miR-203 (Brabletz and Brabletz 2010). Le mocétinostat est entre autre un inhibiteur des HDAC1 et HDAC2. L'efficacité du traitement au mocétinostat sur les cellules exprimant ZEB1 peut aussi être expliquée par l'inhibition direct des HDACs responsables de l'activation de la voie du c-NHEJ. En effet, les HDAC1 et 2 participent aussi de manière surprenante à la stimulation de l'activité du c-NHEJ (Miller et al. 2010). L'action du mocétinostat serait donc double. Le traitement par un HDACi permettrait à la fois d'inhiber l'activité du c-NHEJ et d'inhiber l'expression de ZEB1 conduisant alors à une augmentation du TMEJ et donc de l'instabilité génomique sans doute trop importante pour maintenir la survie cellulaire (Chao and Goodman 2014). Cette augmentation d'instabilité génomique serait encore renforcée par l'inhibition de nombreux acteurs de la voie du HR par les HDACi (Konstantinopoulos et al. 2014). L'efficacité de cet inhibiteur reposerait donc sur une augmentation de l'instabilité génomique brutale conduisant à la mort cellulaire de la tumeur traitée (Eot-Houllier et al. 2009; West et al. 2014). Actuellement, des études cliniques de phase I et II sont en cours afin d'évaluer l'efficacité des inhibiteurs des HDACs sur les tumeurs du sein TNBC métastatiques (ClinicalTrials.gov Identifiant : NCT02393794 et NCT04315233). L'une de ces études est tout particulièrement intéressante car elle combine l'HDACi, le vorinostat, avec l'olaparib, un PARPi. L'idée de bloquer à la fois l'EMT, la voie du c-NHEJ et du HR par l'HDACi ne laissant que la voie du TMEJ pour réparer elle-même bloquée par le PARPi, semble très prometteuse (Konstantinopoulos et al. 2014; ClinicalTrials.gov Identifiant : NCT03742245). Le recrutement pour cette étude ne faisant que commencer, il faudra donc attendre encore afin de savoir si cette combinaison thérapeutique peut être la meilleure solution dans le

traitement des tumeurs *claudin-low* TNBC. Cependant, les résultats précliniques semblent prometteurs. En effet, l'HDACi et l'olaparib inhibent de manière synergique la prolifération d'un panel de 8 lignées cellulaires TNBC *in vitro*, dont les MDA-MB231, et de souris hébergeant des xénogreffes TNBC *in vivo* (Marijon et al. 2018). Ainsi, combiner un HDACi avec un PARPi permet de réduire l'efficacité de réparation de l'ADN dans les TNBC et sensibiliser ces tumeurs agressives à l'inhibition de PARP. Cependant, même si les résultats obtenus par le traitement aux HDACi sont prometteurs, il ne faut pas oublier qu'en tant qu'inhibiteur d'HDAC, il est fortement probable que ces inhibiteurs possèdent de nombreux effets moléculaires encore inconnus potentiellement pertinents pour son efficacité dans la restauration de la sensibilité aux traitements mais pouvant sûrement aussi conduire à des résistances thérapeutiques importantes et non contrôlées. L'élaboration d'un inhibiteur spécifique de ZEB1 serait donc une approche thérapeutique novatrice et essentielle dans le traitement des tumeurs *claudin-low* TNBC.

L'ensemble de ces différentes approches thérapeutiques montre que le contrôle de l'activité du TMEJ par ZEB1 est le point central de la résistance des *claudin-low* aux traitements actuels. Ainsi, la réactivation aberrante du TMEJ ou l'inhibition synergique de ZEB1 et du TMEJ sont donc des éléments clés dans le traitement futur des tumeurs *claudin-low* TNBC résistantes à la chimiothérapie.



## *Matériels et méthodes*

La majorité des informations de la partie du matériels et méthodes se trouve dans l'article « The EMT transcription factor ZEB1 represses the mutagenic POL $\theta$ -mediated end-joining pathway in breast cancer » dans la partie résultats (page 137). Ici ne sont disponibles que les données relatives aux résultats complémentaires (partie résultats) et préliminaires (partie discussion générale et perspectives).



### I. Cellules et modèles cellulaires

#### a. Entretien des lignées cellulaires

Les SUM159 ont été cultivées dans un milieu Ham-F12 avec GlutaMAX™ (GIBCO -Thermo Fisher Scientifique) supplémenté par 5% de sérum de veau fœtal (Eurobio), de la pénicilline – streptomycine (100 µg/ml, 100 U/ml, respectivement, GIBCO -Thermo Fisher Scientifique), gentamycine (GIBCO -Thermo Fisher Scientifique), 5mg/mL insuline (Actrapid, Novonordisk) et 2mg/mL hydrocortisone (Sigma Aldrich).

Les MCF7 ont été cultivées dans un milieu DMEM avec GlutaMAX™ (GIBCO -Thermo Fisher Scientifique) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (Eurobio), de la pénicilline – streptomycine (100 µg/ml, 100 U/ml, respectivement, GIBCO -Thermo Fisher Scientifique), 1X NEAA 100X (GIBCO -Thermo Fisher Scientifique) et 10mg/mL insuline (Actrapid, Novonordisk).

Les MDA-MB157 (cellules de carcinome médullaire mammaire humain, ATCC) ont été maintenues en DMEM avec GlutaMAX™ (GIBCO -Thermo Fisher Scientifique) avec 10% de sérum de veau fœtal (Eurobio) et de la pénicilline – streptomycine (100 µg/ml, 100 U/ml, respectivement, GIBCO -Thermo Fisher Scientifique).

Toutes les lignées cellulaires ont été cultivées à 37 ° C dans un incubateur à 5% CO<sub>2</sub> / 95% d'air.

#### b. Génération des modèles cellulaires

Pour le dosage de la luciférase, les cellules dérivées de MDA-MB231 sont infectées avec 5 différents plasmides lentiviraux GLuc-ON Promoter Reporter pEZX-LvPG04 (GeneCopeia) avec le promoteur *POLQ* contenant 1280 pb du promoteur de *POLQ* (HPRM54321-LvPG04), ou avec seulement 691 pb de promoteur *POLQ* (pEZX-LvPG04-691), et avec le promoteur *CDH1* (HPRM45458-LvPG04) et le promoteur négatif comme contrôle (NEG-LvPG04). L'étude du polymorphisme c.-1060G>A a pu être réalisée avec les plasmides suivants : polymorphisme G (HPRM54321-LvPG04-01, réalisé sur mesure) et le polymorphisme A (HPRM54321-LvPG04). Le plasmide pEZX-LvPG04-691 a été généré à partir du plasmide promoteur pEZX-LvPG04 / *POLQ* par une digestion avec l'enzyme *EcoR1* et *SpeI* (New England Biolabs). Ce plasmide contient les 691 premiers nucléotides du promoteur *POLQ*. Les cellules ont été sélectionnées avec de la puromycine à 1pg/ml 48 h après l'infection.

Les MDA-MB468 sont infectées par un vecteur d'expression rétroviral pBABE contenant ZEB1. Les cellules ont été sélectionnées avec de la puromycine à 1pg/ml 48 h après l'infection

## Matériels et méthodes

Pour le modèle Hs578T shARN précédemment décrit (MOREL et al, 2017), les cellules ont été infectées par les lentivirus pGIPz-puro-shRNA ZEB1 (clone V2LHS-116659, RHS4430-98484699, OpenBiosystem) ou pGIPz-puro-shRNA scrambled (RHS4346, OpenBiosystem). Les cellules ont été sélectionnées avec de la puromycine à 1 µg/ml 48 h après l'infection.

Pour générer des cellules HME, des cellules épithéliales mammaires humaines primaires (HMEC) (laboratoire de R. Weinberg) ont été immortalisées avec hTERT comme décrit précédemment (MOREL et al, 2017). Les cellules HMEC-hTERT ont été infectées par un vecteur pTRIPZ inducible de ZEB1 par la Doxycycline qui sont comparées au contrôle de plasmides vides. Ces cellules sont aussi infectées par un vecteur d'expression rétroviral pBABE contenant une forme oncogène de HRAS<sup>G12V</sup> inducible par l'activation de la forme HRAS<sup>G12V</sup>-ER par un traitement au tamoxifène (HRAS-ER; activation par 4-hydroxytamoxifène). Les cellules ont été sélectionnées avec de la puromycine à 0,5 µg/ml (ZEB1), de la néomycine à 100 µg/ml (HRAS-ER), 48 h après chaque infection.

## II. SiRNA, drogues et inhibiteurs

Les siRNA contre *POLQ* sont pour le siPOLQ.1 : 5'-CCUUAAGACUGUAGGUACU-3', et pour le siPOLQ.2 : 5'-ACACAGUAGGCGAGAGUAU-3'.

Les inhibiteurs de réparation de l'ADN sont :

- DNA-PKi : NU7441 concentration finale 1µM dans du DMSO (Selleckchem; S2638)
- PARGi : PDD00017273 concentration finale 10µM dans du DMSO (Selleckchem; S8862)
- PARPi : BMN 673/talazoparib : concentration initiale à 10mM dans du DMSO ; concentration finale 100nM (Selleckchem; S7048)
- PARPi : olaparib : concentration initiale à 10mM dans du DMSO ; concentration finale 10µM (Selleckchem; S1060)

Les agents de chimiothérapies sont :

- Doxorubicine : concentration initiale à 3.7mM dans de l'eau ; concentration finale 300nM (Sigma)
- Taxol : concentration initiale à 2.3mM dans de l'eau (Sigma; T7191)

## III. Western blot et Anticorps

Les protéines ont été étudiées par Western Blot en utilisant les anticorps suivants : anti-DNA Ligase 4 (H300, Santa Cruz), anti-KU80 (611360, BD transduction Laboratories), anti-POLµ (sc398666 clone E8, Santa Cruz), anti-DNA-PKcs (sc5282 clone G4, Santa Cruz), anti-DNA-PKcs-pS2056 (Ab124618, Abcam), anti-PARG (MABS61 clone D8B10, Millipore), anti-HRAS (sc32024 clone N18, Santa Cruz) et anti-PAR (10H, Enzo).

### IV. RT-QPCR

Les RT-qPCR, concernant les ARNm de PARG, ont été réalisées par la méthode Taqman précédemment décrite (voir le matériels et méthodes de l'article page 143). Les amorces utilisées sont : 5'-ATGGCCAAGGCATGCTAC-3' (forward) et 5'-TTCTTGCACAAGTCCTGCAC-3' (reverse) avec la sonde UPL #10 (réalisée par Universal Probe Library, Roche life science).

### V. Séquençage du promoteur de *POLQ*

Le séquençage du promoteur de *POLQ* pour le polymorphisme c.-1060G>A a été réalisé par la méthode de Sanger avec les amorces suivantes pour l'amplification : 5'-TCCTTGAGGAATTATCACAGACAA-3' (sens) et 5'-CCCGGAACCATAGAGTTCTCC-3' (anti-sens) ; et pour le séquençage : 5'-TCACTACAACCACCGCCTCC-3' (sens) et 5'-TTCTAAGTTCCACGAGATGGCG-3' (anti-sens).

### VI. Cycle cellulaire

Les cellules sontensemencées pour atteindre entre 60% et 80% de confluence lors du FACS (soit entre 2 à 5 millions de cellules pour les MDA-MB231). Avant le FACS, les cellules sont synchronisées par un double blocage à la thymidine. Les cellules subissent un premier traitement de 2nM de thymidine (T1895, Sigma Aldrich) pendant 18h. Après une pause de 9h dans du milieu sans thymidine, les cellules subissent un second traitement de 17h. Un pulse de 5 Bromo-2'-Deoxyuridine (BrdU, B5002, Sigma Aldrich) utilisé à 30µM est ensuite réalisé pendant 30 min à 37°C. Après une succession de lavages, les cellules sont fixées avec 2mL d'Ethanol à 70° conservé à -20°C. Après les lavages, 2mL HCL 2N (Sigma Aldrich) est ajouté aux cellules puis incubées pendant 20 min à RT. Les cellules sont ensuite lavées avec un mélange de PBS 1X (Eurobio), BSA 0.5% (Sigma Aldrich) et Tween 0.5% (Sigma Aldrich). Les cellules sont marquées par l'anticorps Anti-BrdU conjugué FITC (BD Biosciences) au 1/20 pendant 30 min. Après une incubation de 30 min avec de la RNase A à 100µg/mL (R4875, Sigma Aldrich), le iodure de propidium à 20µg/mL (P4864, Sigma Aldrich) est ajouté. Les échantillons sont analysés par le FACSCalibur instrument (Becton Dickinson) et par le logiciel FlowJo 7.5.5.

### VII. Immunofluorescence

## Matériels et méthodes

### a. Les foyers de réparation

Les cellules ont étéensemencées sur une lame de chambre IBIDI à 12 puits avec 25 000 cellules/puits. Après 48h de cultures, les cellules pour les tests de foyers ont été traitées avec 300 nM de doxorubicine (CAS 25316-40-9, Calbiochem, Sigma Aldrich) pendant 1 heure puis fixées selon la méthode suivante.

Pour les foyers  $\gamma$ H2A.X, les cellules ont été fixées dans 4% de formaldéhyde (ThermoScientific) à température ambiante pendant 15 min. Les cellules ont ensuite été lavées 2 fois avec du PBS1X et 1% de BSA. La perméabilisation réalisée avec 0,1% de Triton 100X (Sigma Aldrich) et 1% de BSA (Sigma Aldrich) dans du PBS 1X. Après 2 lavages en PBS/BSA, les cellules ont ensuite été incubées sur la nuit à 4°C avec 1/200 de l'anticorps anti- $\gamma$ H2AX (Ser139, ref 25775, Cell Signaling).

Pour les foyers de la forme phosphorylé de DNA-PKcs (DNA-PKcs-pS2056), les cellules ont été prétraitées par pendant 5 min à 0,3% de triton 100X (Sigma Aldrich) puis fixées dans 4% de formaldéhyde (ThermoScientific) à température ambiante pendant 15 min. Les cellules sont ensuite incubées sur la nuit à 4°C avec 1/200 de l'anticorps anti-DNA-PKcs-pS2056 (Ser2056, ref ab124918, Abcam).

Les IgG anti-souris de chèvre Alexa Fluor® 555 (Life Technologies) ou IgG anti-lapin de chèvre Alexa Fluor® 555 (Life Technologies) ont été utilisés comme anticorps secondaires. Les noyaux sont marqués avec 5 mg/ml de Hoechst pendant 10 min et montés avec Fluoromount-G (SouthernBiotech). Tous les échantillons ont été photographiés à l'aide d'un microscope à fluorescence (Nikon Elipse Ni). Des analyses d'immunofluorescence comparatives ont été effectuées avec des paramètres d'acquisition identiques pour toutes les images à l'aide du logiciel Image-J.

### b. Les micronoyaux

Les cellules ont étéensemencées sur une lame de chambre IBIDI à 12 puits avec 10 000 cellules/puits. Les cellules pour les tests des micronoyaux ont été traitées pendant 48 h avec 3  $\mu$ g/mL de cytochalasine B (Sigma Aldrich). Les cellules ont ensuite été fixées dans 4% de formaldéhyde (ThermoScientific) à température ambiante pendant 15 min. Les cellules sont marquées par la Phalloïdine-TRITC utilisée au 1/500 afin d'observer la morphologie de la cellule. Les noyaux ont été colorés avec 5 mg/ml de Hoechst pendant 10 min et montés avec Fluoromount-G (SouthernBiotech).

## VIII. Tests de survie (MTT et clonale)

## Matériels et méthodes

Pour les tests de viabilité à court terme (test MTT), 2 000 et 4 000 cellules sontensemencées dans des plaques à 96 puits traitées avec les médicaments indiqués pendant 72 h dans un volume final de 100 µL. Après 72h et après avoir retiré le milieu de culture, le bromure de thiazolyl bleu tétrazolium (MTT; Roche) est ajouté à 5 mg/mL dans du PBS et incubé pendant au moins 2 heures à 37 °. Après 2 heures et une élimination minutieuse du milieu, un solvant MTT (HCl 0,1 N dans de l'isopropanol) a été ajouté et la luminescence a été mesurée à une longueur d'onde de 590 nm avec un filtre de référence de 620 nm (Tekan).

Pour les tests de viabilité à long terme (survie clonale), les cellules ont étéensemencées avec 500 ou 5 000 cellules dans des boîtes de 10 cm en triplicata ou quadruplicata en présence ou en l'absence siARN. Après 48 h, de la doxorubicine, du taxol, de l'olaparib ou du talazoparib ont été ajoutés et les cellules ont été cultivées pendant 2 semaines. Les cellules ont été fixées et colorées avec une solution contenant : 50% d'éthanol, 5% d'acide acétique et 0,5% de bleu brillant R (B7920; Sigma) pendant 30 minutes. L'efficacité de la formation des colonies a été déterminée par comptage des colonies et normalisée par rapport au témoin non traité avec la drogue. Chaque point de données représente un triplicata ou un quadruplicata de cellulesensemencées dans chaque répliquât biologique.

## IX. Logiciels

Les illustrations et représentations schématiques ont été réalisées avec l'aide du site internet BioRender.com ainsi que le logiciel PowerPoint.



## Références



## Références

- Aghdassi, Ali et al. 2012. "Recruitment of Histone Deacetylases HDAC1 and HDAC2 by the Transcriptional Repressor ZEB1 Downregulates E-Cadherin Expression in Pancreatic Cancer." *Gut* 61(3): 439–48.
- Aguilar-Quesada, Rocío et al. 2007. "Interaction between ATM and PARP-1 in Response to DNA Damage and Sensitization of ATM Deficient Cells through PARP Inhibition." *BMC Molecular Biology*.
- Aguilera, Andrés, and Tatiana García-Muse. 2013. "Causes of Genome Instability." *Annual Review of Genetics*.
- Ahrabi, Sara et al. 2016. "A Role for Human Homologous Recombination Factors in Suppressing Microhomology-Mediated End Joining." *Nucleic Acids Research* 44(12): 5743–57.
- Aigner, K. et al. 2007. "The Transcription Factor ZEB1 ( $\Delta$ EF1) Promotes Tumour Cell Dedifferentiation by Repressing Master Regulators of Epithelial Polarity." *Oncogene* 26(49): 6979–88.
- Akhurst, Rosemary J, Rik Derynck, and Rosemary J Akhurst. 2001. "Pii: S0962-8924(01)02130-4." 11(11): 44–51. <http://tcb.trends.com>.
- Al-Hajj, Muhammad et al. 2003. "Prospective Identification of Tumorigenic Breast Cancer Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Al-Hajj, Muhammad, and Michael F. Clarke. 2004. "Self-Renewal and Solid Tumor Stem Cells." *Oncogene*.
- Aladjem, Mirit I. et al. 1998. "ES Cells Do Not Activate P53-Dependent Stress Responses and Undergo P53-Independent Apoptosis in Response to DNA Damage." *Current Biology*.
- Alemasova, Elizaveta E., and Olga I. Lavrik. 2019. "Poly(ADP-Ribosyl)ation by PARP1: Reaction Mechanism and Regulatory Proteins." *Nucleic Acids Research* 47(8): 3811–27.
- Ali, Hamid R. et al. 2015. "PD-L1 Protein Expression in Breast Cancer Is Rare, Enriched in Basal-like Tumours and Associated with Infiltrating Lymphocytes." *Annals of Oncology*.
- Allera-Moreau, C. et al. 2012. "DNA Replication Stress Response Involving PLK1, CDC6, POLQ, RAD51 and CLASPIN Upregulation Prognoses the Outcome of Early/Mid-Stage Non-Small Cell Lung Cancer Patients." *Oncogenesis* 1(10): e30-10. <http://dx.doi.org/10.1038/oncsis.2012.29>.
- Alles, Julia et al. 2019. "An Estimate of the Total Number of True Human MiRNAs." *Nucleic Acids Research* 47(7): 3353–64.
- Amrouche, Lucile, and Dany Anglicheau. 2012. "Micro-ARN et Inflammation : Ce Que l' Étude Du Rejet Aigu Du Greffon Rénal Peut Nous Apprendre." XII: 22–27.
- Anglana, Mauro, Françoise Apiou, Aaron Bensimon, and Michelle Debatisse. 2003. "Dynamics of DNA Replication in Mammalian Somatic Cells: Nucleotide Pool Modulates Origin

## Références

- Choice and Interorigin Spacing." *Cell*.
- Angrand, P.O. 1993. "Les Domaines de Liaison à l'ADN Des Facteurs de Transcription Eucaryotes." *Médecine/Sciences* 9(6-7): 725.
- Ansieau, Stéphane et al. 2008. "Early Origin of Cancer Metastases: Dissemination and Evolution of Premalignant Cells." *Cell Cycle* 7(23): 3659-63.
- Aomatsu, Keiichi et al. 2012. "Slug Is Upregulated during Wound Healing and Regulates Cellular Phenotypes in Corneal Epithelial Cells." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 53(2): 751-56.
- APHP, Assistance Publique des Hopitaux de Paris. 2016. "Referentiel Des Cancers Du Sein."
- Araki, Shinako et al. 2010. "Correlates with Late-Stage Metastatic Breast Cancer Find the Latest Version : TGF-  $\beta$  1 – Induced Expression of Human Mdm2 Correlates with Late-Stage Metastatic Breast Cancer." *Journal of Clinical Investigation* 120(1): 290-302.
- Arana, Mercedes E. et al. 2008. "Low-Fidelity DNA Synthesis by Human DNA Polymerase Theta." *Nucleic Acids Research* 36(11): 3847-56.
- Arana, Mercedes E., and Thomas A. Kunkel. 2010. "Mutator Phenotypes Due to DNA Replication Infidelity." *Seminars in Cancer Biology*.
- Armitage, P., and R. Doll. 1954. "The Age Distribution of Cancer and a Multi-Stage Theory of Carcinogenesis." *British Journal of Cancer*.
- Armstrong, Lyle et al. 2004. "Phenotypic Characterization of Murine Primitive Hematopoietic Progenitor Cells Isolated on Basis of Aldehyde Dehydrogenase Activity." *Stem Cells* 22(7): 1142-51.
- Arnoux, Valérie et al. 2005. "Cutaneous Wound Reepithelialization: A Partial and Reversible EMT." In *Rise and Fall of Epithelial Phenotype: Concepts of Epithelial-Mesenchymal Transition*,.
- Assani, Ganiou, and Yunfeng Zhou. 2019. "Effect of Modulation of Epithelial-Mesenchymal Transition Regulators Snail1 and Snail2 on Cancer Cell Radiosensitivity by Targeting of the Cell Cycle, Cell Apoptosis and Cell Migration/Invasion (Review)." *Oncology Letters* 17(1): 23-30.
- Audebert, Marc, Bernard Salles, and Patrick Calsou. 2004. "Involvement of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 and XRCC1/DNA Ligase III in an Alternative Route for DNA Double-Strand Breaks Rejoining." *Journal of Biological Chemistry* 279(53): 55117-26.
- Auerbach, A. D. 1993. "Fanconi Anemia Diagnosis and the Diepoxybutane (DEB) Test." *Experimental Hematology*.
- Auerbach, Arleen D. 2009. "Fanconi Anemia and Its Diagnosis." *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*.
- Bae, S. H., and Y. S. Seo. 2000. "Characterization of the Enzymatic Properties of the Yeast Dna2 Helicase/Endonuclease Suggests a New Model for Okazaki Fragment Processing." *Journal of Biological Chemistry*.
- Bae, Sung Ho et al. 1998. "Dna2 of *Saccharomyces Cerevisiae* Possesses a Single-Stranded

## Références

- DNA- Specific Endonuclease Activity That Is Able to Act on Double-Stranded Dna in the Presence of ATP." *Journal of Biological Chemistry*.
- Bae, Woori et al. 2020. "Hypersensitivity to DNA Double-Strand Breaks Associated with PARG Deficiency Is Suppressed by Exo-1 and Polq-1 Mutations in *Caenorhabditis Elegans*." *FEBS Journal* 287(6): 1101–15.
- Bai, J. W. et al. 2017. "The Zinc-Finger Transcriptional Factor Slug Transcriptionally Downregulates ER $\alpha$  by Recruiting Lysine-Specific Demethylase 1 in Human Breast Cancer." *Oncogenesis* 6(5).
- Bakhoum, Samuel F et al. 2018. "HHS Public Access." 553(7689): 467–72.
- Bakhshayesh, Masoomah, Mansooreh Soleimani, Mehdi Mehdizadeh, and Majid Katebi. 2012. "Effects of TGF- $\beta$  and b-FGF on the Potential of Peripheral Blood-Borne Stem Cells and Bone Marrow-Derived Stem Cells in Wound Healing in a Murine Model." *Inflammation*.
- Bakr, Ali et al. 2016. "Impaired 53BP1/RIF1 DSB Mediated End-Protection Stimulates CtIP-Dependent End Resection and Switches the Repair to PARP1- Dependent End Joining in G1." *Oncotarget* 7(36): 57679–93.
- Balaban, Robert S., Shino Nemoto, and Toren Finkel. 2005. "Mitochondria, Oxidants, and Aging." *Cell*.
- Baldacci, Giuseppe, Jean Sebastien Hoffmann, and Jean Charles Cadoret. 2015. "Impact of the DNA Polymerase Theta on the DNA Replication Program." *Genomics Data* 3: 90–93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gdata.2014.11.014>.
- Barnes, Ralston M., and Anthony B. Firulli. 2009. "A Twist of Insight - The Role of Twist-Family BHLH Factors in Development." *International Journal of Developmental Biology* 53(7): 909–24.
- Barrallo-Gimeno, Alejandro, and M. Angela Nieto. 2005. "The Snail Genes as Inducers of Cell Movement and Survival: Implications in Development and Cancer." *Development* 132(14): 3151–61.
- . 2009. "Evolutionary History of the Snail/Scratch Superfamily." *Trends in Genetics* 25(6): 248–52.
- Barretina, Jordi et al. 2012. "The Cancer Cell Line Encyclopedia Enables Predictive Modelling of Anticancer Drug Sensitivity." *Nature*.
- Baselga, José et al. 2012. "Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor-Positive Advanced Breast Cancer." *New England Journal of Medicine* 366(6): 520–29.
- Bastien, Roy RI et al. 2012. "PAM50 Breast Cancer Subtyping by RT-QPCR and Concordance with Standard Clinical Molecular Markers." *BMC Medical Genomics* 5.
- Bauer, Katrina R. et al. 2007. "Descriptive Analysis of Estrogen Receptor (ER)-Negative, Progesterone Receptor (PR)-Negative, and HER2-Negative Invasive Breast Cancer, the so-called Triple-Negative Phenotype: A Population-Based Study from the California Cancer Registry." *Cancer*.
- Baum, Christian L., and Christopher J. Arpey. 2005. "Normal Cutaneous Wound Healing:

## Références

- Clinical Correlation with Cellular and Molecular Events." *Dermatologic Surgery*.
- Beck, Benjamin et al. 2015. "Different Levels of Twist1 Regulate Skin Tumor Initiation, Stemness, and Progression." *Cell Stem Cell*.
- Beck, Carole et al. 2014. "PARP3 Affects the Relative Contribution of Homologous Recombination and Nonhomologous End-Joining Pathways." *Nucleic Acids Research* 42(9): 5616–32.
- . 2019. "PARP3, a New Therapeutic Target to Alter Rictor/MTORC2 Signaling and Tumor Progression in BRCA1-Associated Cancers." *Cell Death and Differentiation* 26(9): 1615–30. <http://dx.doi.org/10.1038/s41418-018-0233-1>.
- Beckman, Kenneth B., and Bruce N. Ames. 1998. "The Free Radical Theory of Aging Matures." *Physiological Reviews*.
- Bell, Christine E., and Andrew J. Watson. 2009. "SNAI1 and SNAI2 Are Asymmetrically Expressed at the 2-Cell Stage and Become Segregated to the TE in the Mouse Blastocyst." *PLoS ONE* 4(12): 1–8.
- Benitez, Anaid et al. 2018. "FANCA Promotes DNA Double-Strand Break Repair by Catalyzing Single-Strand Annealing and Strand Exchange." *Molecular Cell*.
- Bennardo, Nicole, Anita Cheng, Nick Huang, and Jeremy M. Stark. 2008. "Alternative-NHEJ Is a Mechanistically Distinct Pathway of Mammalian Chromosome Break Repair." *PLoS Genetics* 4(6).
- BESSMAN, M. J., A. KORNBERG, I. R. LEHMAN, and E. S. SIMMS. 1956. "Enzymic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid." *Biochimica et biophysica acta*.
- Bessonnard, Sylvain, Daniel Mesnard, and Daniel B. Constam. 2015. "PC7 and the Related Proteases Furin and Pace4 Regulate E-Cadherin Function during Blastocyst Formation." *Journal of Cell Biology* 210(7): 1185–97.
- Bester, Assaf C. et al. 2011. "Nucleotide Deficiency Promotes Genomic Instability in Early Stages of Cancer Development." *Cell*.
- Bétermier, Mireille, Pascale Bertrand, and Bernard S. Lopez. 2014. "Is Non-Homologous End-Joining Really an Inherently Error-Prone Process?" *PLoS Genetics* 10(1).
- Bhangu, A. et al. 2014. "The Role of Epithelial Mesenchymal Transition and Resistance to Neoadjuvant Therapy in Locally Advanced Rectal Cancer." *Colorectal Disease*.
- Bian, Xing, and Wenchu Lin. 2019. "Targeting DNA Replication Stress and DNA Double-Strand Break Repair for Optimizing SCLC Treatment." *Cancers* 11(9): 1–15.
- Black, Samuel J. et al. 2019. "Molecular Basis of Microhomology-Mediated End-Joining by Purified Full-Length Pol $\theta$ ." *Nature Communications* 10(1).
- Black, Samuel J., Ekaterina Kashkina, Tatiana Kent, and Richard T. Pomerantz. 2016. "DNA Polymerase  $\theta$ : A Unique Multifunctional End-Joining Machine." *Genes* 7(9).
- Blow, J. Julian, and Anindya Dutta. 2005. "Preventing Re-Replication of Chromosomal DNA." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.

## Références

- Blows, Fiona M. et al. 2010. "Subtyping of Breast Cancer by Immunohistochemistry to Investigate a Relationship between Subtype and Short and Long Term Survival: A Collaborative Analysis of Data for 10,159 Cases from 12 Studies." *PLoS Medicine*.
- Bluteau, Dominique et al. 2016. "Biallelic Inactivation of REV7 Is Associated with Fanconi Anemia." *Journal of Clinical Investigation*.
- Bonner, Melissa et al. 2012. "DNA Damage Response Pathway and Replication Fork Stress during Oligonucleotide Directed Gene Editing." *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 1(4): e18.
- Botaille, Frauke et al. 2008. "Evidence for a Role of Epithelial Mesenchymal Transition during Pathogenesis of Fistulae in Crohn's Disease." *Inflammatory Bowel Diseases*.
- Bothmer, Anne et al. 2010. "53BP1 Regulates DNA Resection and the Choice between Classical and Alternative End Joining during Class Switch Recombination." *Journal of Experimental Medicine* 207(4): 855–65.
- Bouard, Charlotte et al. 2014. "Interhelical Loops within the BHLH Domain Are Determinant in Maintaining TWIST1-DNA Complexes." *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 32(2): 226–41.
- Boulton, S. J., and S. P. Jackson. 1996. "Saccharomyces Cerevisiae Ku70 Potentiates Illegitimate DNA Double-Strand Break Repair and Serves as a Barrier to Error-Prone DNA Repair Pathways." *The EMBO Journal* 15(18): 5093–5103.
- Brabletz, Simone, and Thomas Brabletz. 2010. "The ZEB/MiR-200 Feedback Loop-a Motor of Cellular Plasticity in Development and Cancer?" *EMBO Reports* 11(9): 670–77.
- Brambati, Alessandra, Raymond Mario Barry, and Agnel Sfeir. 2020. "DNA Polymerase Theta (Pol $\theta$ ) – an Error-Prone Polymerase Necessary for Genome Stability." *Current Opinion in Genetics and Development*.
- Brandalize, Ana Paula Carneiro et al. 2014. "A DNA Repair Variant in POLQ (c.-1060A > G) Is Associated to Hereditary Breast Cancer Patients: A Case-Control Study." *BMC Cancer* 14(1): 1–7.
- Branzei, Dana, and Marco Foiani. 2010. "Maintaining Genome Stability at the Replication Fork." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
- Breast Cancer Linkage Consortium. 1997. "Pathology of Familial Breast Cancer: Differences between Breast Cancers in Carriers of BRCA1 or BRCA2 Mutations and Sporadic Cases." *Lancet*.
- Brisken, Cathrin, and Bert O'Malley. 2010. "Hormone Action in the Mammary Gland." *Cold Spring Harbor perspectives in biology*.
- Bronner, ME, and NM LeDouarin. 2012. "Evolution and Development of the Neural Crest: An Overview." *Developmental biology*.
- Brufsky, Adam et al. 2012. "Second-Line Bevacizumab-Containing Therapy in Patients with Triple-Negative Breast Cancer: Subgroup Analysis of the RIBBON-2 Trial." *Breast Cancer Research and Treatment* 133(3): 1067–75.

## Références

- Bruneel, Kenneth, Jeroen Versteppe, Niels Vandamme, and Geert Berx. 2020. "Intrinsic Balance between Zeb Family Members Is Important for Melanocyte Homeostasis and Melanoma Progression." *Cancers* 12(8): 1–25.
- Bruschi, Carlo V., John N. McMillan, Maristella Coglievina, and Michael S. Esposito. 1995. "The Genomic Instability of Yeast Cdc6-1/Cdc6-1 Mutants Involves Chromosome Structure and Recombination." *MGG Molecular & General Genetics*.
- Buijs, Jeroen T., Nico V. Henriquez, Petra G.M. Van Overveld, Geertje Van Der Horst, Ivo Que, et al. 2007. "Bone Morphogenetic Protein 7 in the Development and Treatment of Bone Metastases from Breast Cancer." *Cancer Research* 67(18): 8742–51.
- Buijs, Jeroen T., Niek V. Henriquez, Petra G.M. Van Overveld, Geertje Van Der Horst, Peter Ten Dijke, et al. 2007. "TGF- $\beta$  and BMP7 Interactions in Tumour Progression and Bone Metastasis." *Clinical and Experimental Metastasis* 24(8): 609–17.
- Buis, Jeffrey, Trina Stoneham, Elizabeth Spehalski, and David O. Ferguson. 2012. "Mre11 Regulates CtIP-Dependent Double-Strand Break Repair by Interaction with CDK2." *Nature Structural and Molecular Biology*.
- Bulun, Serdar E. et al. 2005. "Regulation of Aromatase Expression in Estrogen-Responsive Breast and Uterine Disease: From Bench to Treatment." *Pharmacological Reviews* 57(3): 359–83.
- Bunting, Samuel F. et al. 2010. "53BP1 Inhibits Homologous Recombination in Brca1-Deficient Cells by Blocking Resection of DNA Breaks." *Cell*.
- Bunting, Samuel F., and Andre Nussenzweig. 2013. "End-Joining, Translocations and Cancer." *Nature Reviews Cancer*.
- Burk, Ulrike et al. 2008. "A Reciprocal Repression between ZEB1 and Members of the MiR-200 Family Promotes EMT and Invasion in Cancer Cells." *EMBO Reports* 9(6): 582–89.
- Burma, Sandeep et al. 2001. "ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-Strand Breaks." *Journal of Biological Chemistry*.
- Burrell, Rebecca A. et al. 2013. "Replication Stress Links Structural and Numerical Cancer Chromosomal Instability." *Nature*.
- Byun, Tony S. et al. 2005. "Functional Uncoupling of MCM Helicase and DNA Polymerase Activities Activates the ATR-Dependent Checkpoint." *Genes and Development*.
- Camenisch, Todd D. et al. 2002. "Temporal and Distinct TGF $\beta$  Ligand Requirements during Mouse and Avian Endocardial Cushion Morphogenesis." *Developmental Biology* 248(1): 170–81.
- Canas-Marques, Rita, and Stuart J. Schnitt. 2016. "E-Cadherin Immunohistochemistry in Breast Pathology: Uses and Pitfalls." *Histopathology* 68(1): 57–69.
- Cano, Amparo et al. 2000. "The Transcription Factor Snail Controls Epithelial-Mesenchymal Transitions by Repressing E-Cadherin Expression." *Nature Cell Biology* 2(2): 76–83.
- Caramel, Julie, Maud Ligier, and Alain Puisieux. 2018. "Pleiotropic Roles for ZEB1 in Cancer." *Cancer research* 78(1): 30–35.

## Références

- Carter, Rachel J., and Jason L. Parsons. 2016. "Base Excision Repair, a Pathway Regulated by Posttranslational Modifications." *Molecular and Cellular Biology* 36(10): 1426–37.
- Casas, Esmeralda et al. 2011. "Snail2 Is an Essential Mediator of Twist1-Induced Epithelial Mesenchymal Transition and Metastasis." *Cancer Research* 71(1): 245–54.
- Castanon, Irinka, and Mary K. Baylies. 2002. "A Twist in Fate: Evolutionary Comparison of Twist Structure and Function." *Gene*.
- Cayrou, Christelle et al. 2011. "Genome-Scale Analysis of Metazoan Replication Origins Reveals Their Organization in Specific but Flexible Sites Defined by Conserved Features." *Genome Research*.
- Ceccaldi, Raphael et al. 2015. "Homologous-Recombination-Deficient Tumours Are Dependent on Pol $\theta$  -Mediated Repair." *Nature*.
- Chan, Doug W. et al. 2002. "Autophosphorylation of the DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit Is Required for Rejoining of DNA Double-Strand Breaks." *Genes and Development*.
- Chan, Sze Ham, Amy Marie Yu, and Mitch McVey. 2010. "Dual Roles for DNA Polymerase Theta in Alternative End-Joining Repair of Double-Strand Breaks in *Drosophila*." *PLoS Genetics* 6(7): 1–16.
- Chao, Olivia S., and Oscar B. Goodman. 2014. "Synergistic Loss of Prostate Cancer Cell Viability by Coinhibition of HDAC and PARP." *Molecular Cancer Research* 12(12): 1755–66.
- Charafe-Jauffret, Emmanuelle et al. 2008. "Cancer Stem Cells in Breast: Current Opinion and Future Challenges." *Pathobiology* 75(2): 75–84.
- Chatterjee, N., Walker, G. C. 2017. "Mechanisms of DNA Damage, Repair, and Mutagenesis. Environmental and Molecular Mutagenesis." *Physiology & behavior* 58(5): 235–63.
- Chehab, Nabil H., Asra Malikzay, Michael Appel, and Thanos D. Halazonetis. 2000. "Chk2/Hcfs1 Functions as a DNA Damage Checkpoint in G1 by Stabilizing P53." *Genes and Development*.
- Chen, Longchuan, Christian J. Nievera, Alan Yueh Luen Lee, and Xiaohua Wu. 2008. "Cell Cycle-Dependent Complex Formation of BRCA1-CtIP-MRN Is Important for DNA Double-Strand Break Repair." *Journal of Biological Chemistry*.
- Chen, Qike K., Kang Ae Lee, Derek C. Radisky, and Celeste M. Nelson. 2013. "Extracellular Matrix Proteins Regulate Epithelial-Mesenchymal Transition in Mammary Epithelial Cells." *Differentiation* 86(3): 126–32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diff.2013.03.003>.
- Chen, Qun et al. 2003. "Production of Reactive Oxygen Species by Mitochondria: Central Role of Complex III." *Journal of Biological Chemistry*.
- Chen, San Chi, Tsai Tsen Liao, and Muh Hwa Yang. 2018. "Emerging Roles of Epithelial-Mesenchymal Transition in Hematological Malignancies." *Journal of Biomedical Science*.
- Chen, Tong, Yanan You, Hua Jiang, and Zack Z. Wang. 2017. "Epithelial–Mesenchymal Transition (EMT): A Biological Process in the Development, Stem Cell Differentiation, and Tumorigenesis." *Journal of Cellular Physiology* 232(12): 3261–72.

## Références

- Chen, Xuefeng et al. 2011. "Cell Cycle Regulation of DNA Double-Strand Break End Resection by Cdk1-Dependent Dna2 Phosphorylation." *Nature Structural and Molecular Biology*.
- Chen, Zhou Feng, and Richard R. Behringer. 1995. "Twist Is Required in Head Mesenchyme for Cranial Neural Tube Morphogenesis." *Genes and Development*.
- Cheng, Fang et al. 2016. "Vimentin Coordinates Fibroblast Proliferation and Keratinocyte Differentiation in Wound Healing via TGF- $\beta$ -Slug Signaling." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(30): E4320–27.
- Cheng, K. C. et al. 1992. "8-Hydroxyguanine, an Abundant Form of Oxidative DNA Damage, Causes G  $\rightarrow$  T and A  $\rightarrow$  C Substitutions." *Journal of Biological Chemistry*.
- Ciccia, Alberto et al. 2007. "Identification of FAAP24, a Fanconi Anemia Core Complex Protein That Interacts with FANCM." *Molecular Cell*.
- Cimprich, Karlene A., Tae Bum Shin, Curtis T. Keith, and Stuart L. Schreiber. 1996. "cDNA Cloning and Gene Mapping of a Candidate Human Cell Cycle Checkpoint Protein." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Ciszewski, Wojciech M., Michele Tavecchio, Jarosław Dastyk, and Nicola J. Curtin. 2014. "DNA-PK Inhibition by NU7441 Sensitizes Breast Cancer Cells to Ionizing Radiation and Doxorubicin." *Breast Cancer Research and Treatment* 143(1): 47–55.
- Clauson, Cheryl, Orlando D. Schärer, and Laura Niedernhofer. 2013. "Advances in Understanding the Complex Mechanisms of DNA Inter Strand Cross-Link Repair." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3(10): 1–26.
- Cliby, William A. et al. 1998. "Overexpression of a Kinase-Inactive ATR Protein Causes Sensitivity to DNA-Damaging Agents and Defects in Cell Cycle Checkpoints." *EMBO Journal*.
- Cohn, Martin A., and Alan D. D'Andrea. 2008. "Chromatin Recruitment of DNA Repair Proteins: Lessons from the Fanconi Anemia and Double-Strand Break Repair Pathways." *Molecular Cell*.
- Collis, Spencer J. et al. 2008. "FANCM and FAAP24 Function in ATR-Mediated Checkpoint Signaling Independently of the Fanconi Anemia Core Complex." *Molecular Cell*.
- Comaills, Valentine et al. 2016. "Genomic Instability Is Induced by Persistent Proliferation of Cells Undergoing Epithelial-to-Mesenchymal Transition." *Cell Reports* 17(10): 2632–47.
- Côme, Christophe et al. 2006. "Snail and Slug Play Distinct Roles during Breast Carcinoma Progression." *Clinical Cancer Research* 12(18): 5395–5402.
- Cook, H. Terence. 2010. "The Origin of Renal Fibroblasts and Progression of Kidney Disease." *American Journal of Pathology*.
- Cooke, Marcus S., Mark D. Evans, Miral Dizdaroglu, and Joseph Lunec. 2003. "Oxidative DNA Damage: Mechanisms, Mutation, and Disease." *The FASEB Journal*.
- Cornélio, Déborah Afonso et al. 2014. "Cytokinesis-Block Micronucleus Assay Adapted for Analyzing Genomic Instability of Human Mesenchymal Stem Cells." *Stem Cells and Development* 23(8): 823–38.

## Références

- Corneo, Barbara et al. 2007. "Rag Mutations Reveal Robust Alternative End Joining." *Nature* 449(7161): 483–86.
- Coulson-Gilmer, C. et al. 2020. "PARG Inhibition Induces Replication Catastrophe in Ovarian Cancer Cells with Down-Regulated DNA Replication Genes."
- Coussy, Florence et al. 2019. "A Large Collection of Integrated Genomically Characterized Patient-Derived Xenografts Highlighting the Heterogeneity of Triple-Negative Breast Cancer." *International Journal of Cancer* 145(7): 1902–12.
- Coverley, Dawn, and Ronald A. Laskey. 1994. "Regulation of Eukaryotic DNA Replication." *Annual Review of Biochemistry*.
- Cowell, Ian G., Barbara W. Durkacz, and Michael J. Tilby. 2005. "Sensitization of Breast Carcinoma Cells to Ionizing Radiation by Small Molecule Inhibitors of DNA-Dependent Protein Kinase and Ataxia Telangiectasia Mutated." *Biochemical Pharmacology* 71(1–2): 13–20.
- Craxton, Andrew et al. 2018. "PAXX and Its Paralogs Synergistically Direct DNA Polymerase  $\lambda$  Activity in DNA Repair." *Nature Communications* 9(1). <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-06127-y>.
- Cruz, C. et al. 2018. "RAD51 Foci as a Functional Biomarker of Homologous Recombination Repair and PARP Inhibitor Resistance in Germline BRCA-Mutated Breast Cancer." *Annals of Oncology*.
- Cuadrado, Myriam, Barbara Martinez-Pastor, and Oscar Fernandez-Capetillo. 2006. "ATR Activation in Response to Ionizing Radiation: Still ATM Territory." *Cell Division*.
- Curtis, Christina et al. 2012. "The Genomic and Transcriptomic Architecture of 2,000 Breast Tumours Reveals Novel Subgroups." *Nature* 486(7403): 346–52.
- D'Andrea, Alan D. 2010. "Susceptibility Pathways in Fanconi's Anemia and Breast Cancer." *New England Journal of Medicine*.
- Dady, Alwyn, Cedrine Blavet, and Jean Loup Duband. 2012. "Timing and Kinetics of E- to N-Cadherin Switch during Neurulation in the Avian Embryo." *Developmental Dynamics*.
- Dahl, Markus et al. 2014. "Fine-Tuning of Smad Protein Function by Poly(ADP-Ribose) Polymerases and Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase during Transforming Growth Factor  $\beta$  Signaling." *PLoS ONE* 9(8).
- Dahmann, Christian, John F.X. Diffley, and Kim A. Nasmyth. 1995. "S-Phase-Promoting Cyclin-Dependent Kinases Prevent Re-Replication by Inhibiting the Transition of Replication Origins to a Pre-Replicative State." *Current Biology*.
- Dai, Chun Hua et al. 2016. "Co-Inhibition of Pol  $\theta$  and HR Genes Efficiently Synergize with Cisplatin to Suppress Cisplatin-Resistant Lung Cancer Cells Survival." *Oncotarget* 7(40): 65157–70.
- Daley, J. M., and P. Sung. 2014. "53BP1, BRCA1, and the Choice between Recombination and End Joining at DNA Double-Strand Breaks." *Molecular and Cellular Biology* 34(8): 1380–88.

## Références

- Dantzer, Françoise et al. 2000. "Base Excision Repair Is Impaired in Mammalian Cells Lacking Poly(ADP- Ribose) Polymerase-1." *Biochemistry*.
- Davies, Adelina A. et al. 2001. "Role of BRCA2 in Control of the RAD51 Recombination and DNA Repair Protein." *Molecular Cell*.
- Davies, Christina et al. 2013. "Long-Term Effects of Continuing Adjuvant Tamoxifen to 10 Years versus Stopping at 5 Years after Diagnosis of Oestrogen Receptor-Positive Breast Cancer: ATLAS, a Randomised Trial." *The Lancet*.
- Davies, Helen et al. 2017. "HRDetect Is a Predictor of BRCA1 and BRCA2 Deficiency Based on Mutational Signatures." *Nature Medicine* 23(4): 517–25. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4292>.
- Davies, Owen Richard, and Luca Pellegrini. 2007. "Interaction with the BRCA2 C Terminus Protects RAD51-DNA Filaments from Disassembly by BRC Repeats." *Nature Structural and Molecular Biology*.
- Debnath, Jayanta, and Joan S. Brugge. 2005. "Modelling Glandular Epithelial Cancers in Three-Dimensional Cultures." *Nature Reviews Cancer* 5(9): 675–88.
- Deisenroth, Chad, Derek A. Franklin, and Yanping Zhang. 2016. "The Evolution of the Ribosomal Protein–MDM2–P53 Pathway." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*.
- Dejosez, Marion, Hiroki Ura, Vicky L. Brandt, and Thomas P. Zwaka. 2013. "Safeguards for Cell Cooperation in Mouse Embryogenesis Shown by Genome-Wide Cheater Screen." *Science*.
- Delacôte, Fabien, and Bernard S. Lopez. 2008. "Importance of the Cell Cycle Phase for the Choice of the Appropriate DSB Repair Pathway, for Genome Stability Maintenance: The Trans-S Double-Strand Break Repair Model." *Cell Cycle*.
- Denecker, G. et al. 2014. "Identification of a ZEB2-MITF-ZEB1 Transcriptional Network That Controls Melanogenesis and Melanoma Progression." *Cell Death and Differentiation* 21(8): 1250–61.
- Dent, Rebecca et al. 2007. "Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence." *Clinical Cancer Research*.
- Desmouliere, A., A. Geinoz, F. Gabbiani, and G. Gabbiani. 1993. "Transforming Growth Factor-B1 Induces  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin Expression in Granulation Tissue Myofibroblasts and in Quiescent and Growing Cultured Fibroblasts." *Journal of Cell Biology*.
- Desmoulière, Alexis, Christine Chaponnier, and Giulio Gabbiani. 2005. "Tissue Repair, Contraction, and the Myofibroblast." *Wound Repair and Regeneration*.
- Desmoulière, Alexis, and Giulio Gabbiani. 1988. "The Role of the Myofibroblast in Wound Healing and Fibrocontractive Diseases." In *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*.
- Dhasarathy, Archana et al. 2011. "The Transcription Factors Snail and Slug Activate the Transforming Growth Factor-Beta Signaling Pathway in Breast Cancer." *PLoS ONE* 6(10).
- Dianov, Grigory L., Rajendra Prasad, Samuel H. Wilson, and Vilhelm A. Bohr. 1999. "Role of

## Références

- DNA Polymerase  $\beta$  in the Excision Step of Long Patch Mammalian Base Excision Repair." *Journal of Biological Chemistry* 274(20): 13741–43.
- Dias, Kay et al. 2017. "Claudin-Low Breast Cancer; Clinical & Pathological Characteristics." *PLoS ONE* 12(1): 1–17.
- Díaz, V. M., R. Viñas-Castells, and A. García De Herreros. 2014. "Regulation of the Protein Stability of EMT Transcription Factors." *Cell Adhesion and Migration*.
- Diffley, John F.X. 2004. "Regulation of Early Events in Chromosome Replication." *Current Biology*.
- Dong, Jun et al. 2018. "Inactivation of DNA-PK by Knockdown DNA-PKcs or NU7441 Impairs Non-Homologous End-Joining of Radiation-Induced Double Strand Break Repair." *Oncology Reports* 39(3): 912–20.
- Dongre, Anushka, and Robert A. Weinberg. 2019. "New Insights into the Mechanisms of Epithelial–Mesenchymal Transition and Implications for Cancer." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20(2): 69–84. <http://dx.doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4>.
- Duband, Jean Loup. 2010. "Diversity in the Molecular and Cellular Strategies of Epithelium-to-Mesenchyme Transitions: Insights from the Neural Crest." *Cell Adhesion and Migration* 4(3): 458–82.
- Dudley, Andrew T., Karen M. Lyons, and Elizabeth J. Robertson. 1995. "A Requirement for Bone Morphogenetic Protein-7 during Development of the Mammalian Kidney and Eye." *Genes and Development* 9(22): 2795–2807.
- Dungrawala, Huzefa et al. 2015. "The Replication Checkpoint Prevents Two Types of Fork Collapse without Regulating Replisome Stability." *Molecular Cell*.
- Duquette, Michelle L. et al. 2012. "CtIP Is Required to Initiate Replication-Dependent Interstrand Crosslink Repair." *PLoS Genetics*.
- Dykxhoorn, Derek M. et al. 2009. "MiR-200 Enhances Mouse Breast Cancer Cell Colonization to Form Distant Metastases." *PLoS ONE*.
- Dynan, William S., and Sunghan Yoo. 1998. "Interaction of Ku Protein and DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit with Nucleic Acids." *Nucleic Acids Research*.
- Eggermont, Alexander M.M. et al. 2018. "Adjuvant Pembrolizumab versus Placebo in Resected Stage III Melanoma." *New England Journal of Medicine* 378(19): 1789–1801.
- Eheman, Christie R. et al. 2009. "The Changing Incidence of in Situ and Invasive Ductal and Lobular Breast Carcinomas: United States, 1999-2004." *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*.
- Eisemann, Travis, and John M. Pascal. 2020. "Poly(ADP-Ribose) Polymerase Enzymes and the Maintenance of Genome Integrity." *Cellular and Molecular Life Sciences*.
- Eming, Sabine A., Paul Martin, and Marjana Tomic-Canic. 2014. "Wound Repair and Regeneration: Mechanisms, Signaling, and Translation." *Science Translational Medicine*.
- Englund, P. T. et al. 1968. "Structural and Functional Properties of Escherichia Coli DNA Polymerase." *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*.

## Références

- Eot-Houllier, Grégory, Géraldine Fulcrand, Laura Magnaghi-Jaulin, and Christian Jaulin. 2009. "Histone Deacetylase Inhibitors and Genomic Instability." *Cancer Letters* 274(2): 169–76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2008.06.005>.
- Esposito, Nicole N., Mamatha Chivukula, and David J. Dabbs. 2007. "The Ductal Phenotypic Expression of the E-Cadherin/Catenin Complex in Tubulolobular Carcinoma of the Breast: An Immunohistochemical and Clinicopathologic Study." *Modern Pathology* 20(1): 130–38.
- Fanning, Ellen, Vitaly Klimovich, and Andrew R. Nager. 2006. "A Dynamic Model for Replication Protein A (RPA) Function in DNA Processing Pathways." *Nucleic Acids Research*.
- Fata, Jimmie E., Zena Werb, and Mina J. Bissell. 2004. "Regulation of Mammary Gland Branching Morphogenesis by the Extracellular Matrix and Its Remodeling Enzymes." *Breast Cancer Research* 6(1): 1–11.
- Feng, Wanjuan et al. 2019. "Genetic Determinants of Cellular Addiction to DNA Polymerase Theta." *Nature Communications* 10(1): 4286.
- Feng, Xiaoxing, and David W. Koh. 2013. "Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 or Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase Individually, but Not in Combination, Leads to Improved Chemotherapeutic Efficacy in HeLa Cells." *International Journal of Oncology*.
- Fernandez-Vidal, Anne et al. 2014. "A Role for DNA Polymerase  $\delta$  in the Timing of DNA Replication." *Nature Communications* 5.
- Flach, Johanna et al. 2014. "Replication Stress Is a Potent Driver of Functional Decline in Ageing Haematopoietic Stem Cells." *Nature*.
- Fleck, Oliver, and Olaf Nielsen. 2004. "DNA Repair." *Journal of Cell Science*.
- Floor, S. et al. 2011. "Cancer Cells in Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Tumor-Propagating-Cancer Stem Cells: Distinct, Overlapping or Same Populations." *Oncogene*.
- Fong, Peter C. et al. 2009. "Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase in Tumors from BRCA Mutation Carriers." *New England Journal of Medicine*.
- Foubert, Ellen, Bram De Craene, and Geert Berx. 2010. "Key Signalling Nodes in Mammary Gland Development and Cancer. The Snail1-Twist1 Conspiracy in Malignant Breast Cancer Progression." *Breast Cancer Research* 12(3): 1–11.
- Fougner, Christian et al. 2019. "Claudin-Low-like Mouse Mammary Tumors Show Distinct Transcriptomic Patterns Uncoupled from Genomic Drivers." *Breast Cancer Research* 21(1): 1–13.
- Fougner, Christian, Helga Bergholtz, Jens Henrik Norum, and Therese Sørli. 2020. "Re-Definition of Claudin-Low as a Breast Cancer Phenotype." *Nature Communications*.
- Fouquin, Alexis et al. 2017. "PARP2 Controls Double-Strand Break Repair Pathway Choice by Limiting 53BP1 Accumulation at DNA Damage Sites and Promoting End-Resection." *Nucleic Acids Research* 45(21): 12325–39.
- Friedel, Anna M., Brietta L. Pike, and Susan M. Gasser. 2009. "ATR/Mec1: Coordinating Fork Stability and Repair." *Current Opinion in Cell Biology*.

## Références

- Fu, Nai Yang, Emma Nolan, Geoffrey J. Lindeman, and Jane E. Visvader. 2020. "Stem Cells and the Differentiation Hierarchy in Mammary Gland Development." *Physiological Reviews*.
- Fu, Naiyang, Geoffrey J. Lindeman, and Jane E. Visvader. 2014. "The Mammary Stem Cell Hierarchy." In *Current Topics in Developmental Biology*,.
- Fu, Rong et al. 2019. "A ZEB1/P53 Signaling Axis in Stromal Fibroblasts Promotes Mammary Epithelial Tumours." *Nature Communications* 10(1). <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-11278-7>.
- Fu, Xuemei et al. 2017. "DNA Repair Mechanisms in Embryonic Stem Cells." *Cellular and Molecular Life Sciences* 74(3): 487–93.
- Furusawa, Takashi, Hiroki Moribe, Hisato Kondoh, and Yujiro Higashi. 1999. "Identification of CtBP1 and CtBP2 as Corepressors of Zinc Finger-Homeodomain Factor  $\Delta$ EF1." *Molecular and Cellular Biology* 19(12): 8581–90.
- Gabbiani, Giulio. 2003. "The Myofibroblast in Wound Healing and Fibrocontractive Diseases." *Journal of Pathology*.
- . 2004. "The Evolution of the Myofibroblast Concept: A Key Cell for Wound Healing and Fibrotic Diseases." *Giornale di Gerontologia*.
- Galant, Christine, M. Berlière, Isabelle Leconte, and E. Marbaix. 2010. "Overview of Histopathological Prognostic Factors in Breast Cancer, Including Newcomers." *Imagerie de la Femme* 20(1): 9–17.
- Galiè, Mirco. 2019. "RAS as Supporting Actor in Breast Cancer." *Frontiers in Oncology* 9(November): 1–9.
- Gawronska-Kozak, Barbara, Anna Grabowska, Anna Kur, and Marta Kopcewicz. 2016. "Foxn1 Transcription Factor Regulates Wound Healing of Skin through Promoting Epithelial-Mesenchymal Transition." *PLoS ONE* 11(3): 1–21.
- Gelot, Camille, Indiana Magdalou, and Bernard S. Lopez. 2015. "Replication Stress in Mammalian Cells and Its Consequences for Mitosis." *Genes*.
- Gibbons, Don L. et al. 2009. "Contextual Extracellular Cues Promote Tumor Cell EMT and Metastasis by Regulating MiR-200 Family Expression." *Genes and Development* 23(18): 2140–51.
- Gillespie, Peter J., Anatoliy Li, and J. Julian Blow. 2001. "Reconstitution of Licensed Replication Origins on Xenopus Sperm Nuclei Using Purified Proteins." *BMC Biochemistry*.
- Ginestier, Christophe 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(5): 555–67.
- Goedecke, Wolfgang, Petra Pfeiffer, and Walter Vielmetter. 1994. "Nonhomologous DNA End Joining in Schizosaccharomyces Pombe Efficiently Eliminates DNA Double-Strand-Breaks from Haploid Sequences." *Nucleic Acids Research*.
- Goff, Julie P. et al. 2009. "Lack of DNA Polymerase  $\theta$  (POLQ) Radiosensitizes Bone Marrow Stromal Cells in Vitro and Increases Reticulocyte Micronuclei after Total-Body

## Références

- Irradiation." *Radiation Research*.
- Goodarzi, Aaron A. et al. 2006. "DNA-PK Autophosphorylation Facilitates Artemis Endonuclease Activity." *EMBO Journal*.
- Gorgoulis, Vassilis G. et al. 2005. "Activation of the DNA Damage Checkpoint and Genomic Instability in Human Precancerous Lesions." *Nature*.
- Gourley, Charlie et al. 2019. "Moving from Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibition to Targeting DNA Repair and DNA Damage Response in Cancer Therapy." *Journal of Clinical Oncology* 37(25): 2257–69.
- Gown, Allen M. 2008. "Current Issues in ER and HER2 Testing by IHC in Breast Cancer." *Modern Pathology*.
- Grabarz, Anastazja et al. 2013. "A Role for BLM in Double-Strand Break Repair Pathway Choice: Prevention of CtIP/Mre11-Mediated Alternative Nonhomologous End-Joining." *Cell Reports*.
- Gralewska, Patrycja, Arkadiusz Gajek, Agnieszka Marczak, and Aneta Rogalska. 2020. "Participation of the ATR/CHK1 Pathway in Replicative Stress Targeted Therapy of High-Grade Ovarian Cancer." *Journal of Hematology and Oncology* 13(1): 1–16.
- Grau, Y., C. Carteret, and P. Simpson. 1984. "Mutations and Chromosomal Rearrangements Affecting the Expression of Snail, a Gene Involved in Embryonic Patterning in *Drosophila Melanogaster*." *Genetics*.
- Gravel, Serge, J. Ross Chapman, Christine Magill, and Stephen P. Jackson. 2008. "DNA Helicases Sgs1 and BLM Promote DNA Double-Strand Break Resection." *Genes and Development* 22(20): 2767–72.
- Gregory, Philip A., Cameron P. Bracken, Andrew G. Bert, and Gregory J. Goodall. 2008. "MicroRNAs as Regulators of Epithelial-Mesenchymal Transition." *Cell Cycle*.
- Gross, Kayla M. et al. 2019. "Loss of Slug Compromises DNA Damage Repair and Accelerates Stem Cell Aging in Mammary Epithelium." *Cell Reports* 28(2): 394-407.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.043>.
- Van Grunsven, Leo A. et al. 2006. "ΔEF1 and SIP1 Are Differentially Expressed and Have Overlapping Activities during *Xenopus* Embryogenesis." *Developmental Dynamics* 235(6): 1491–1500.
- Guilbaud, Guillaume et al. 2011. "Evidence for Sequential and Increasing Activation of Replication Origins along Replication Timing Gradients in the Human Genome." *PLoS Computational Biology*.
- Guirouilh-Barbat, Josée et al. 2004. "Impact of the KU80 Pathway on NHEJ-Induced Genome Rearrangements in Mammalian Cells." *Molecular Cell*.
- Guo, Wenjun et al. 2012. "Slug and Sox9 Cooperatively Determine the Mammary Stem Cell State." *Cell* 148(5): 1015–28.
- Gupta, Piyush B. et al. 2009. "Identification of Selective Inhibitors of Cancer Stem Cells by High-Throughput Screening." *Cell* 138(4): 645–59.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.034>.

- Gupte, Rebecca, Ziyang Liu, and W. Lee Kraus. 2017. "Parps and Adp-Ribosylation: Recent Advances Linking Molecular Functions to Biological Outcomes." *Genes and Development* 31(2): 101–26.
- Haber, James E., and Wai Ying Leung. 1996. "Lack of Chromosome Territoriality in Yeast: Promiscuous Rejoining of Broken Chromosome Ends." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Haensel, Daniel, and Xing Dai. 2018. "Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cutaneous Wound Healing: Where We Are and Where We Are Heading." *Developmental Dynamics*.
- Hahn, William C., and Robert A. Weinberg. 2002. "Rules for Making Human Tumor Cells." *New England Journal of Medicine*.
- Haince, Jean François et al. 2008. "PARP1-Dependent Kinetics of Recruitment of MRE11 and NBS1 Proteins to Multiple DNA Damage Sites." *Journal of Biological Chemistry*.
- Halazonetis, Thanos D., Vassilis G. Gorgoulis, and Jiri Bartek. 2008. "An Oncogene-Induced DNA Damage Model for Cancer Development." *Science (New York, N.Y.)* 319(5868): 1352–55.
- Hammond, Scott M. 2015. "An Overview of MicroRNAs." *Advanced Drug Delivery Reviews*.
- Hampton, Tracy. 2006. "Cancer Genome Atlas." *Jama* 296(16): 1958.
- Han, Jinhua et al. 2017. "BRCA2 Antagonizes Classical and Alternative Nonhomologous End-Joining to Prevent Gross Genomic Instability." *Nature Communications* 8(1). <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-01759-y>.
- Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2011. "Hallmarks of Cancer: The Next Generation." *Cell* 144(5): 646–74.
- Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2000. "The Hallmarks of Cancer." *Cell*.
- Hara, Johji et al. 2014. "Mesenchymal Phenotype after Chemotherapy Is Associated with Chemoresistance and Poor Clinical Outcome in Esophageal Cancer." *Oncology Reports*.
- Harman, Denham. 2003. "The Free Radical Theory of Aging." *Antioxidants and Redox Signaling*.
- Hassiotou, Foteini, and Donna Geddes. 2013. "Anatomy of the Human Mammary Gland: Current Status of Knowledge." *Clinical Anatomy*.
- Hastings, P. J., James R. Lupski, Susan M. Rosenberg, and Grzegorz Ira. 2009. "Mechanisms of Change in Gene Copy Number." *Nature Reviews Genetics*.
- Heeres, James T., and Paul J. Hergenrother. 2007. "Poly(ADP-Ribose) Makes a Date with Death." *Current Opinion in Chemical Biology*.
- Hegde, Muralidhar L., Tapas K. Hazra, and Sankar Mitra. 2008. "Early Steps in the DNA Base Excision/Single-Strand Interruption Repair Pathway in Mammalian Cells." *Cell Research*.
- Helleday, Thomas, Saeed Eshtad, and Serena Nik-Zainal. 2014. "Mechanisms Underlying

## Références

- Mutational Signatures in Human Cancers." *Nature Reviews Genetics*.
- Hennighausen, Lothar, and Gertraud W. Robinson. 2001. "Signaling Pathways in Mammary Gland Development." *Developmental Cell* 1(4): 467–75.
- Herschkowitz, Jason I. et al. 2007. "Identification of Conserved Gene Expression Features between Murine Mammary Carcinoma Models and Human Breast Tumors." *Genome Biology*.
- Heyer, Wolf Dietrich, Kirk T. Ehmsen, and Jie Liu. 2010. "Regulation of Homologous Recombination in Eukaryotes." *Annual Review of Genetics*.
- Hintzsche, Henning et al. 2017. "Fate of Micronuclei and Micronucleated Cells." *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*.
- Hinz, Boris, and Giulio Gabbiani. 2003. "Cell-Matrix and Cell-Cell Contacts of Myofibroblasts: Role in Connective Tissue Remodeling." *Thrombosis and Haemostasis* 90(6): 993–1002.
- Hoch, Nicolas C. et al. 2017. "XRCC1 Mutation Is Associated with PARP1 Hyperactivation and Cerebellar Ataxia." *Nature*.
- Hochegger, Helfrid et al. 2006. "Parp-1 Protects Homologous Recombination from Interference by Ku and Ligase IV in Vertebrate Cells." *EMBO Journal* 25(6): 1305–14.
- Hoeijmakers, Jan H.J. 2009. "DNA Damage, Aging, and Cancer." *New England Journal of Medicine*.
- Holliday, Robin. 1964. "A Mechanism for Gene Conversion in Fungi." *Genetical Research*.
- Holohan, Caitriona, Sandra Van Schaeybroeck, Daniel B. Longley, and Patrick G. Johnston. 2013. "Cancer Drug Resistance: An Evolving Paradigm." *Nature Reviews Cancer*.
- Houl, Jerry H. et al. 2019. "Selective Small Molecule PARG Inhibitor Causes Replication Fork Stalling and Cancer Cell Death." *Nature Communications* 10(1): 1–15.
- Howard, Sean M., Diana A. Yanez, and Jeremy M. Stark. 2015. "DNA Damage Response Factors from Diverse Pathways, Including DNA Crosslink Repair, Mediate Alternative End Joining." *PLoS Genetics* 11(1): 1–25. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1004943>.
- Hudson, Laurie G. et al. 2009. "Cutaneous Wound Reepithelialization Is Compromised in Mice Lacking Functional Slug (Snai2)." *Journal of Dermatological Science* 56(1): 19–26.
- Humphreys, Benjamin D. et al. 2010. "Fate Tracing Reveals the Pericyte and Not Epithelial Origin of Myofibroblasts in Kidney Fibrosis." *American Journal of Pathology*.
- Hustedt, Nicole, and Daniel Durocher. 2017. "The Control of DNA Repair by the Cell Cycle." *Nature Cell Biology*.
- Iliakis, G. et al. 2004. "Mechanisms of DNA Double Strand Break Repair and Chromosome Aberration Formation." *Cytogenetic and Genome Research* 104(1–4): 14–20.
- Illuzzi, Giuditta et al. 2014. "PARG Is Dispensable for Recovery from Transient Replicative Stress but Required to Prevent Detrimental Accumulation of Poly(ADP-Ribose) upon Prolonged Replicative Stress." *Nucleic Acids Research*.

## Références

- Inca. 2019. "Les Cancers En France l'essentiel Des Faits et Chiffres." *E-Cancer.Fr*.
- INCa. 2008. "Les Rayonnements En Radiothérapie." *INCa - Institut National du Cancer*. <http://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Les-rayonnements-en-radiotherapie%0A>.
- . 2013a. *e-cancer.fr Les Cancers En France*.
- . 2013b. "Les Traitements Des Cancers Du Sein, Collection Guide Patients." *Cancer info, INCA 27(146)*: 15–17.
- . 2014. "Les Cancers En France : Les Données." *Ors*.
- . 2016. "Les Cancers En France, Les Données, INCa, Édition 2015." : 240. <http://www.e-cancer.fr/content/download/148692/1867381/file/Les-cancers-en-France-edition-2015.pdf>.
- . 2019. "Les Cancers En France L'Essentiel." *L'Institut National du Cancer*: 1–28. [https://www.oncorif.fr/wp-content/uploads/2019/02/Cancers\\_en\\_France-Essentiel\\_Faits\\_et\\_chiffres-2018.pdf](https://www.oncorif.fr/wp-content/uploads/2019/02/Cancers_en_France-Essentiel_Faits_et_chiffres-2018.pdf).
- Institut Gustave Roussy et Institut Curie. 2019. "Référentiel Diagnostique et Thérapeutique SEIN - REMAGUS 2019-2021 : CANCERS ET PATHOLOGIES DU SEIN ATTITUDES DIAGNOSTIQUES ET THERAPEUTIQUES, PROTOCOLES DE TRAITEMENT 2019-2020."
- Isono, Mayu et al. 2017. "BRCA1 Directs the Repair Pathway to Homologous Recombination by Promoting 53BP1 Dephosphorylation." *Cell Reports*.
- Iwano, Masayuki et al. 2002. "Evidence That Fibroblasts Derive from Epithelium during Tissue Fibrosis Find the Latest Version : Evidence That Fibroblasts Derive from Epithelium during Tissue Fibrosis." *J. Clin. Invest.* 110(3): 341–50.
- Jares, Pedro, Anne Donaldson, and J. Julian Blow. 2000. "The Cdc7/Dbf4 Protein Kinase: Target of the S Phase Checkpoint?" *EMBO Reports*.
- Jasin, Maria, and Rodney Rothstein. 2013. "Repair of Strand Breaks by Homologous Recombination." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5(11): 1–18.
- Jemal, A. et al. 2009. "Cancer Statistics, 2009." *CA: A Cancer Journal for Clinicians*.
- Jiang, Wenxia et al. 2015. "Differential Phosphorylation of DNA-PKcs Regulates the Interplay between End-Processing and End-Ligation during Nonhomologous End-Joining." *Molecular Cell* 58(1): 172–85. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2015.02.024>.
- Jiricny, Josef. 2006. "MutLα: At the Cutting Edge of Mismatch Repair." *Cell*.
- . 2013. "Postreplicative Mismatch Repair." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.
- Johnston, Stephen R.D. et al. 2018. "Phase III, Randomized Study of Dual Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) Blockade with Lapatinib plus Trastuzumab in Combination with an Aromatase Inhibitor in Postmenopausal Women with HER2-Positive, Hormone Receptor-Positive Metastatic Breast." *Journal of Clinical Oncology* 36(8): 741–48.
- Jones, Kara R. et al. 2005. "Radiosensitization of MDA-MB-231 Breast Tumor Cells by

## Références

- Adenovirus-Mediated Overexpression of a Fragment of the XRCC4 Protein." *Molecular Cancer Therapeutics* 4(10): 1541–47.
- Joose, Simon A. et al. 2009. "Prediction of BRCA1-Association in Hereditary Non-BRCA1/2 Breast Carcinomas with Array-CGH." *Breast Cancer Research and Treatment*.
- . 2011. "Genomic Signature of BRCA1 Deficiency in Sporadic Basal-like Breast Tumors." *Genes Chromosomes and Cancer*.
- Jordan, V. Craig. 2015a. "Proven Value of Translational Research with Appropriate Animal Models to Advance Breast Cancer Treatment and Save Lives: The Tamoxifen Tale." *British Journal of Clinical Pharmacology*.
- . 2015b. "The New Biology of Estrogen-Induced Apoptosis Applied to Treat and Prevent Breast Cancer." *Endocrine-Related Cancer*.
- Kadyrov, Farid A., Leonid Dzantiev, Nicoleta Constantin, and Paul Modrich. 2006. "Endonucleolytic Function of MutL $\alpha$  in Human Mismatch Repair." *Cell*.
- Kais, Zeina et al. 2016. "FANCD2 Maintains Fork Stability in BRCA1/2-Deficient Tumors and Promotes Alternative End-Joining DNA Repair." *Cell Reports*.
- Kakaroukias, A., and P. A. Jeggo. 2014. "DNA DSB Repair Pathway Choice: An Orchestrated Handover Mechanism." *British Journal of Radiology*.
- Kalluri, Raghu, and Robert A. Weinberg. 2009. "The Basics of Epithelial-Mesenchymal Transition." *Journal of Clinical Investigation*.
- Kanao, Rie et al. 2015. "UV-Induced Mutations in Epidermal Cells of Mice Defective in DNA Polymerase  $\eta$  and/or  $\iota$ ." *DNA Repair*.
- Kang, Ga Young et al. 2013. "Inhibition of Snail1-DNA-PKcs Protein-Protein Interface Sensitizes Cancer Cells and Inhibits Tumor Metastasis." *Journal of Biological Chemistry* 288(45): 32506–16.
- Karicheva, Olga et al. 2016. "PARP3 Controls TGF $\beta$  and ROS Driven Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Stemness by Stimulating a TG2-Snail-E-Cadherin Axis." *Oncotarget*.
- Kashima, Lisa et al. 2012. "CHFR Protein Regulates Mitotic Checkpoint by Targeting PARP-1 Protein for Ubiquitination and Degradation." *Journal of Biological Chemistry* 287(16): 12975–84.
- Kawamura, Kiyoko et al. 2004. "DNA Polymerase  $\theta$  Is Preferentially Expressed in Lymphoid Tissues and Upregulated in Human Cancers." *International Journal of Cancer*.
- Kee, Younghoon, and Alan D. D'Andrea. 2010. "Expanded Roles of the Fanconi Anemia Pathway in Preserving Genomic Stability." *Genes and Development*.
- . 2012. "Molecular Pathogenesis and Clinical Management of Fanconi Anemia." *Journal of Clinical Investigation*.
- Kim, Chongtae et al. 2018. "MicroRNA-195 Desensitizes HCT116 Human Colon Cancer Cells to 5-Fluorouracil." *Cancer Letters*.
- Kim, Jung Min, Younghoon Kee, Allan Gurtan, and Alan D. D'Andrea. 2008. "Cell Cycle-

## Références

- Dependent Chromatin Loading of the Fanconi Anemia Core Complex by FANCM/FAAP24." *Blood*.
- Kim, Mi Ra et al. 2015. "TGF $\beta$ 1 Protects Cells from  $\gamma$ -IR by Enhancing the Activity of the NHEJ Repair Pathway." *Molecular Cancer Research* 13(2): 319–29.
- Kim, Ryang Hee et al. 2018. "Vitamin D Facilitates Trophoblast Invasion through Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition." *American Journal of Reproductive Immunology* 79(2): 1–8.
- Knezevic, J. et al. 2015. "Expression of MiR-200c in Claudin-Low Breast Cancer Alters Stem Cell Functionality, Enhances Chemosensitivity and Reduces Metastatic Potential." *Oncogene* 34(49): 5997–6006.
- Knipscheer, Puck et al. 2009. "The Fanconi Anemia Pathway Promotes Replication-Dependent DNA Interstrand Cross-Link Repair." *Science*.
- Konstantinopoulos, Panagiotis A. et al. 2014. "Suberoylanilide Hydroxamic Acid (SAHA) Enhances Olaparib Activity by Targeting Homologous Recombination DNA Repair in Ovarian Cancer." *Gynecologic Oncology* 133(3): 599–606. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.03.007>.
- Konstantinopoulos, Panagiotis A., Raphael Ceccaldi, Geoffrey I. Shapiro, and Alan D. D'Andrea. 2015. "Homologous Recombination Deficiency: Exploiting the Fundamental Vulnerability of Ovarian Cancer." *Cancer Discovery* 5(11): 1137–54.
- Korpai, Manav, Esther S. Lee, Guohong Hu, and Yibin Kang. 2008. "The MiR-200 Family Inhibits Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Cell Migration by Direct Targeting of E-Cadherin Transcriptional Repressors ZEB1 and ZEB2." *Journal of Biological Chemistry*.
- Krajewska, Malgorzata, Rudolf S.N. Fehrmann, Elisabeth G.E. De Vries, and Marcel A.T.M. van Vugt. 2015. "Regulators of Homologous Recombination Repair as Novel Targets for Cancer Treatment." *Frontiers in Genetics*.
- Kraus, W. Lee. 2008. "Transcriptional Control by PARP-1: Chromatin Modulation, Enhancer-Binding, Coregulation, and Insulation." *Current Opinion in Cell Biology* 20(3): 294–302.
- Krebs, Angela M. et al. 2017. "The EMT-Activator Zeb1 Is a Key Factor for Cell Plasticity and Promotes Metastasis in Pancreatic Cancer." *Nature Cell Biology*.
- Kriege, Mieke et al. 2009. "Sensitivity to First-Line Chemotherapy for Metastatic Breast Cancer in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers." *Journal of Clinical Oncology*.
- . 2012. "The Efficacy of Taxane Chemotherapy for Metastatic Breast Cancer in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers." *Cancer*.
- Krokan, Hans E., and Magnar Bjørås. 2013. "Base Excision Repair." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.
- Krokan, Hans E., Rune Standal, and Geir Slupphaug. 1997. "DNA Glycosylases in the Base Excision Repair of DNA." *Biochemical Journal*.
- Kunkel, T. A. 2009. "Evolving Views of DNA Replication (in)Fidelity." In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*,.

## Références

- Kunkel, Thomas A., and Dorothy A. Erie. 2005. "DNA Mismatch Repair." *Annual Review of Biochemistry*.
- Kurimasa, Akihiro et al. 1999. "Requirement for the Kinase Activity of Human DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit in DNA Strand Break Rejoining." *Molecular and Cellular Biology* 19(5): 3877–84.
- Kusewitt, Donna F. et al. 2009. "Slug/Snai2 Is a Downstream Mediator of Epidermal Growth Factor Receptor-Stimulated Reepithelialization." *Journal of Investigative Dermatology* 129(2): 491–95. <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2008.222>.
- Lakhani, Sunil R. et al. 1998. "Multifactorial Analysis of Differences between Sporadic Breast Cancers and Cancers Involving BRCA1 and BRCA2 Mutations." *Journal of the National Cancer Institute*.
- . 2002. "The Pathology of Familial Breast Cancer: Predictive Value of Immunohistochemical Markers Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, HER-2, and P53 in Patients with Mutations in BRCA1 and BRCA2." *Journal of Clinical Oncology* 20(9): 2310–18.
- Lamouille, Samy, Jian Xu, and Rik Derynck. 2014. "Molecular Mechanisms of Epithelial-Mesenchymal Transition." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15(3): 178–96.
- Larkin, J. et al. 2019. "Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma." *New England Journal of Medicine* 381(16): 1535–46.
- Lebleu, Valerie S. et al. 2013. "Origin and Function of Myofibroblasts in Kidney Fibrosis." *Nature Medicine*.
- Lee, S. H. et al. 2009. "P53, Secreted by K-Ras-Snai Pathway, Is Endocytosed by K-Ras-Mutated Cells; Implication of Target-Specific Drug Delivery and Early Diagnostic Marker." *Oncogene*.
- Lehmann, Brian D., and Jennifer A. Pietenpol. 2014. "Identification and Use of Biomarkers in Treatment Strategies for Triple-Negative Breast Cancer Subtypes." *Journal of Pathology* 232(2): 142–50.
- Lehmann, Brian D et al. 2011. "Identification of Human Triple-Negative Breast Cancer Subtypes and Preclinical Models for Selection of Targeted Therapies." *Journal of Clinical Investigation* 121(7): 2750–67.
- Lehmann, Waltraut et al. 2016. "ZEB1 Turns into a Transcriptional Activator by Interacting with YAP1 in Aggressive Cancer Types." *Nature Communications* 7.
- Lemée, Fanny et al. 2010. "DNA Polymerase  $\theta$  Up-Regulation Is Associated with Poor Survival in Breast Cancer, Perturbs DNA Replication, and Promotes Genetic Instability." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(30): 13390–95.
- Lenaz, Giorgio, and Maria Luisa Genova. 2010. "Structure and Organization of Mitochondrial Respiratory Complexes: A New Understanding of an Old Subject." *Antioxidants and Redox Signaling*.
- Lengronne, Armelle, and Etienne Schwob. 2002. "The Yeast CDK Inhibitor Sic1 Prevents

## Références

- Genomic Instability by Promoting Replication Origin Licensing in Late G1." *Molecular Cell*.
- Leopold, Philip L., Jan Vincent, and Hongjun Wang. 2012. "A Comparison of Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Re-Epithelialization." *Seminars in Cancer Biology*.
- Leung, Mary et al. 2011. "Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 Inhibition: Preclinical and Clinical Development of Synthetic Lethality." *Molecular Medicine*.
- Li, Christopher I., Benjamin O. Anderson, Janet R. Daling, and Roger E. Moe. 2003. "Trends in Incidence Rates of Invasive Lobular and Ductal Breast Carcinoma." *Journal of the American Medical Association*.
- Li, Guo Min, and Paul Modrich. 1995. "Restoration of Mismatch Repair to Nuclear Extracts of H6 Colorectal Tumor Cells by a Heterodimer of Human MutL Homologs." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Li, Jinhua, and John F. Bertram. 2010. "Review: Endothelial-Myofibroblast Transition, a New Player in Diabetic Renal Fibrosis." *Nephrology*.
- Li, Jinhua, Xinli Qu, and John F. Bertram. 2009. "Endothelial-Myofibroblast Transition Contributes to the Early Development of Diabetic Renal Interstitial Fibrosis in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice." *American Journal of Pathology*.
- Lieber, Michael R. 2010. "The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway." *Annual Review of Biochemistry*.
- la ligue nationale contre le cancer. 2018. "LES CANCERS DU SEIN Recherche Prévention et Promotion Du Dépistage Actions Pour Les Personnes Malades Société et Politiques de Santé (SPS)." <https://www.ligue-cancer.net/sites/default/files/brochures/cancers-sein-2018-01.pdf>.
- Lim, Ji Seun et al. 2004. "Is Serum  $\gamma$ -Glutamyltransferase Inversely Associated with Serum Antioxidants as a Marker of Oxidative Stress?" *Free Radical Biology and Medicine*.
- Lim, Jormay, and Jean Paul Thiery. 2012. "Epithelial-Mesenchymal Transitions: Insights from Development." *Development (Cambridge)* 139(19): 3471–86.
- Lin, Yiwei, Tiebang Kang, and Binhua P. Zhou. 2014. "Doxorubicin Enhances Snail/LSD1-Mediated PTEN Suppression in a PARP1-Dependent Manner." *Cell Cycle* 13(11): 1708–16.
- Lin, Yu et al. 2018. "Radiation Exposure Triggers the Progression of Triple Negative Breast Cancer via Stabilizing ZEB1." *Biomedicine and Pharmacotherapy*.
- Lindahl, Tomas, and Olle Karlström. 1973. "Heat-Induced Depyrimidination of Deoxyribonucleic Acid in Neutral Solution." *Biochemistry*.
- Lindahl, Tomas, and Barbro Nyberg. 1974. "Heat-Induced Deamination of Cytosine Residues in Deoxyribonucleic Acid." *Biochemistry*.
- Lindley, Linsey E., and Karoline J. Briegel. 2010. "Molecular Characterization of TGF $\beta$ -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Normal Finite Lifespan Human Mammary Epithelial Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 399(4): 659–64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.138>.
- Linn, Sabine C., and Laura J. Van 't Veer. 2009. "Clinical Relevance of the Triple-Negative Breast

## Références

- Cancer Concept: Genetic Basis and Clinical Utility of the Concept." *European Journal of Cancer*.
- Lips, E. H. et al. 2011. "Indicators of Homologous Recombination Deficiency in Breast Cancer and Association with Response to Neoadjuvant Chemotherapy." *Annals of Oncology*.
- . 2013. "Triple-Negative Breast Cancer: BRCAness and Concordance of Clinical Features with BRCA1-Mutation Carriers." *British Journal of Cancer* 108(10): 2172–77.
- Lisby, Michael, Jacqueline H. Barlow, Rebecca C. Burgess, and Rodney Rothstein. 2004. "Choreography of the DNA Damage Response: Spatiotemporal Relationships among Checkpoint and Repair Proteins." *Cell*.
- Litton, Jennifer K. et al. 2018. "Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline BRCA Mutation." *New England Journal of Medicine* 379(8): 753–63.
- Liu, Chao et al. 2013. "CHFR Is Important for the First Wave of Ubiquitination at DNA Damage Sites." *Nucleic Acids Research* 41(3): 1698–1710.
- . 2017. "The Role of Poly ADP-Ribosylation in the First Wave of DNA Damage Response." *Nucleic Acids Research* 45(14): 8129–41.
- Liu, Haipeng et al. 2018. "Nuclear CGAS Suppresses DNA Repair and Promotes Tumorigenesis." *Nature* 563(7729): 131–36. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-018-0629-6>.
- Liu, Jie, Tammy Doty, Bryan Gibson, and Wolf Dietrich Heyer. 2010. "Human BRCA2 Protein Promotes RAD51 Filament Formation on RPA-Covered Single-Stranded DNA." *Nature Structural and Molecular Biology*.
- Liu, Mingyang et al. 2018. "ZIP4 Promotes Pancreatic Cancer Progression by Repressing ZO-1 and Claudin-1 through a ZEB1-Dependent Transcriptional Mechanism." *Clinical Cancer Research* 24(13): 3186–96.
- Liu, Qi et al. 2018. "Subjugation of TGF $\beta$  Signaling by Human Papilloma Virus in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Shifts DNA Repair from Homologous Recombination to Alternative End Joining." *Clinical Cancer Research* 24(23): 6001–14.
- Liu, Yajing et al. 2017. "RAD51 Mediates Resistance of Cancer Stem Cells to PARP Inhibition in Triple-Negative Breast Cancer." *Clinical Cancer Research*.
- Liu, Yiyang et al. 2015. "MiR-134 Functions as a Tumor Suppressor in Cell Proliferation and Epithelial-to-Mesenchymal Transition by Targeting KRAS in Renal Cell Carcinoma Cells." *DNA and Cell Biology*.
- Liu, Yongqing et al. 2014. "The ZEB1 Transcription Factor Acts in a Negative Feedback Loop with MiR200 Downstream of Ras and Rb1 to Regulate Bmi1 Expression." *Journal of Biological Chemistry*.
- Liu, Yuanbin, Gary Fiskum, and David Schubert. 2002. "Generation of Reactive Oxygen Species by the Mitochondrial Electron Transport Chain." *Journal of Neurochemistry*.
- Loc'h, Jérôme et al. 2019. "Structural Evidence for an in Trans Base Selection Mechanism Involving Loop1 in Polymerase  $\mu$  at an NHEJ Double-Strand Break Junction." *Journal of Biological Chemistry* 294(27): 10579–95.

## Références

- Long, David T., Markus Räschle, Vladimir Joukov, and Johannes C. Walter. 2011. "Mechanism of RAD51-Dependent DNA Interstrand Cross-Link Repair." *Science*.
- Lönn, Peter et al. 2010. "PARP-1 Attenuates Smad-Mediated Transcription." *Molecular Cell* 40(4): 521–32.
- Lord, Christopher J., and Alan Ashworth. 2012. "The DNA Damage Response and Cancer Therapy." *Nature*.
- . 2016. "BRCAness Revisited." *Nature Reviews Cancer* 16(2): 110–20.
- . 2017. "PARP Inhibitors: Synthetic Lethality in the Clinic." *Science*.
- Loupart, Marie Louise, Sue Ann Krause, and Margarete M.S. Heck. 2000. "Aberrant Replication Timing Induces Defective Chromosome Condensation in Drosophila ORC2 Mutants." *Current Biology*.
- Luo, Ji, Nicole L. Solimini, and Stephen J. Elledge. 2009. "Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-Oncogene Addiction." *Cell*.
- Luzzi, Keith J. et al. 1998. "Multistep Nature of Metastatic Inefficiency: Dormancy of Solitary Cells after Successful Extravasation and Limited Survival of Early Micrometastases." *American Journal of Pathology* 153(3): 865–73.
- Lyons, J. G. et al. 1993. "Interleukin-1 $\beta$  and Transforming Growth Factor- $\alpha$ /Epidermal Growth Factor Induce Expression of M(r) 95,000 Type IV Collagenase/Gelatinase and Interstitial Fibroblast-Type Collagenase by Rat Mucosal Keratinocytes." *Journal of Biological Chemistry*.
- MacDougall, Christina A. et al. 2007. "The Structural Determinants of Checkpoint Activation." *Genes and Development*.
- Macias, Hector, and Lindsay Hinck. 2012. "Mammary Gland Development." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 1(4): 533–57.
- Madine, M. A., C. Y. Khoo, A. D. Mills, and R. A. Laskey. 1995. "MCM3 Complex Required for Cell Cycle Regulation of DNA Replication in Vertebrate Cells." *Nature*.
- Mak, Joyce P.Y., Hoi Tang Ma, and Randy Y.C. Poon. 2020. "Synergism between ATM and PARP1 Inhibition Involves DNA Damage and Abrogating the G2 DNA Damage Checkpoint." *Molecular Cancer Therapeutics*.
- Makki, Jaafar. 2015. "Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance." *Clinical Medicine Insights: Pathology* 8(1): 23–31.
- Malanga, Maria, and Felix R. Althaus. 2005. "The Role of Poly(ADP-Ribose) in the DNA Damage Signaling Network." *Biochemistry and Cell Biology* 83(3): 354–64.
- Malek, Reem et al. 2017. "TWIST1-WDR5-Hottip Regulates Hoxa9 Chromatin to Facilitate Prostate Cancer Metastasis." *Cancer Research*.
- Maltseva, Ekaterina A. et al. 2018. "Replication Protein A as a Modulator of the Poly(ADP-Ribose)Polymerase 1 Activity." *DNA Repair* 72(July): 28–38. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.09.010>.

## Références

- Mani, Sendurai A. et al. 2008. "The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells." *Cell* 133(4): 704–15.
- Manié, Elodie et al. 2016. "Genomic Hallmarks of Homologous Recombination Deficiency in Invasive Breast Carcinomas." *International Journal of Cancer*.
- Manzanares, Miguel, Annamaria Locascio, and M. Angela Nieto. 2001. "The Increasing Complexity of the Snail Gene Superfamily in Metazoan Evolution." *Trends in Genetics*.
- Mao, Zhiyong, Michael Bozzella, Andrei Seluanov, and Vera Gorbunova. 2008. "DNA Repair by Nonhomologous End Joining and Homologous Recombination during Cell Cycle in Human Cells." *Cell Cycle*.
- Marijon, Hélène et al. 2018. "Co-Targeting Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) and Histone Deacetylase (HDAC) in Triple-Negative Breast Cancer: Higher Synergism in BRCA Mutated Cells." *Biomedicine and Pharmacotherapy* 99(August 2017): 543–51.
- Marión, Rosa M. et al. 2009. "A P53-Mediated DNA Damage Response Limits Reprogramming to Ensure IPS Cell Genomic Integrity." *Nature*.
- Marques, Maud et al. 2019. "Oncogenic Activity of Poly (ADP-Ribose) Glycohydrolase." *Oncogene* 38(12): 2177–91.
- Martin, Paul. 1997. "Wound Healing - Aiming for Perfect Skin Regeneration." *Science*.
- Martincorena, Iñigo et al. 2017. "Universal Patterns of Selection in Cancer and Somatic Tissues." *Cell*.
- Martinez-Ruiz, Haydeliz et al. 2016. "A TGF $\beta$ -MiR-182-BRCA1 Axis Controls the Mammary Differentiation Hierarchy." *Science Signaling* 9(457).
- Masai, Hisao et al. 2010. "Eukaryotic Chromosome DNA Replication: Where, When, and How?" *Annual Review of Biochemistry*.
- Massari, Mark Eben, and Cornelis Murre. 2000. "Helix-Loop-Helix Proteins: Regulators of Transcription in Eucaryotic Organisms." *Molecular and Cellular Biology*.
- Masutani, Mitsuko, and Hiroaki Fujimori. 2013. "Poly(ADP-Ribosyl)ation in Carcinogenesis." *Molecular Aspects of Medicine*.
- Mateos-Gomez, Pedro A. et al. 2015. "Mammalian Polymerase  $\theta$  Promotes Alternative NHEJ and Suppresses Recombination." *Nature* 518(7538): 254–57. <http://dx.doi.org/10.1038/nature14157>.
- . 2017a. "The Helicase Domain of Pol $\theta$  Counteracts RPA to Promote Alt-NHEJ." *Nature Structural and Molecular Biology* 24(12): 1116–23.
- . 2017b. "The Helicase Domain of Pol $\theta$  Counteracts RPA to Promote Alt-NHEJ." *Nature Structural and Molecular Biology* 24(12): 1116–23.
- Mauhin, Viviane, Yves Lutz, Christine Dennefeld, and Audrey Alberga. 1993. "Definition of the DNA-Binding Site Repertoire for the Drosophila Transcription Factor Snail." *Nucleic Acids Research* 21(17): 3951–57.
- Maynard, Scott et al. 2008. "Human Embryonic Stem Cells Have Enhanced Repair of Multiple

## Références

- Forms of DNA Damage." *Stem Cells*.
- McCulley, David J., Ji One Kang, James F. Martin, and Brian L. Black. 2008. "BMP4 Is Required in the Anterior Heart Field and Its Derivatives for Endocardial Cushion Remodeling, Outflow Tract Septation, and Semilunar Valve Development." *Developmental Dynamics* 237(11): 3200–3209.
- McElhinny, Stephanie A. Nick, Grace E. Kissling, and Thomas A. Kunkel. 2010. "Differential Correction of Lagging-Strand Replication Errors Made by DNA Polymerases  $\alpha$  and  $\delta$ ." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- McVey, Mitch, and Sang Eun Lee. 2008. "MMEJ Repair of Double-Strand Breaks (Director's Cut): Deleted Sequences and Alternative Endings." *Trends in Genetics*.
- McVey, Mith, Dora Radut, and Jeff J. Sekelsky. 2004. "End-Joining Repair of Double-Strand Breaks in *Drosophila Melanogaster* Is Largely DNA Ligase IV Independent." *Genetics* 168(4): 2067–76.
- Medina-Aguilar, Rubiceli et al. 2016. "Resveratrol Inhibits Cell Cycle Progression by Targeting Aurora Kinase A and Polo-like Kinase 1 in Breast Cancer Cells." *Oncology Reports*.
- Meek, Katheryn et al. 2007. "Trans Autophosphorylation at DNA-Dependent Protein Kinase's Two Major Autophosphorylation Site Clusters Facilitates End Processing but Not End Joining." *Molecular and Cellular Biology* 27(10): 3881–90.
- Meidhof, Simone et al. 2015. "ZEB 1-associated Drug Resistance in Cancer Cells Is Reversed by the Class I HDAC Inhibitor Mocetinostat ." *EMBO Molecular Medicine* 7(6): 831–47.
- Mendoza-Villanueva, D. et al. 2016. "The C/EBP $\delta$  Protein Is Stabilized by Estrogen Receptor  $\alpha$  Activity, Inhibits SNAI2 Expression and Associates with Good Prognosis in Breast Cancer." *Oncogene* 35(48): 6166–76.
- Mi, Jun, and Gary M. Kupfer. 2005. "The Fanconi Anemia Core Complex Associates with Chromatin during S Phase." *Blood*.
- Michl, Johanna, Jutta Zimmer, and Madalena Tarsounas. 2016. "Interplay between Fanconi Anemia and Homologous Recombination Pathways in Genome Integrity." *The EMBO Journal*.
- Miller, Kyle M. et al. 2010. "Human HDAC1 and HDAC2 Function in the DNA-Damage Response to Promote DNA Nonhomologous End-Joining." *Nature Structural and Molecular Biology* 17(9): 1144–51. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.1899>.
- Mimitou, Eleni P., and Lorraine S. Symington. 2008. "Sae2, Exo1 and Sgs1 Collaborate in DNA Double-Strand Break Processing." *Nature*.
- . 2010. "Ku Prevents Exo1 and Sgs1-Dependent Resection of DNA Ends in the Absence of a Functional MRX Complex or Sae2." *EMBO Journal*.
- Mimura, Satoru, Taro Masuda, Tomoko Matsui, and Haruhiko Takisawa. 2000. "Central Role for Cdc45 in Establishing an Initiation Complex of DNA Replication in *Xenopus* Egg Extracts." *Genes to Cells*.
- Mirman, Zachary, and Titia de Lange. 2020. "53BP1: A DSB Escort." *Genes & development*

## Références

34(1–2): 7–23.

- Momcilovic, Olga et al. 2010. “DNA Damage Responses in Human Induced Pluripotent Stem Cells and Embryonic Stem Cells.” *PLoS ONE*.
- Moore, J K, and J E Haber. 1996. “Cell Cycle and Genetic Requirements of Two Pathways of Nonhomologous End-Joining Repair of Double-Strand Breaks in *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Molecular and Cellular Biology*.
- Morel, Anne-Pierre et al. 2012. “EMT Inducers Catalyze Malignant Transformation of Mammary Epithelial Cells and Drive Tumorigenesis towards Claudin-Low Tumors in Transgenic Mice.” *PLoS Genetics* 8(5): e1002723.
- . 2017. “A Stemness-Related ZEB1-MSRB3 Axis Governs Cellular Pliancy and Breast Cancer Genome Stability.” *Nature medicine* 23(5): 568–78.
- Morel, Anne Pierre et al. 2008. “Generation of Breast Cancer Stem Cells through Epithelial-Mesenchymal Transition.” *PLoS ONE*.
- Morita, Takashi et al. 1993. “A Mouse Homolog of the *Escherichia Coli* RecA and *Saccharomyces Cerevisiae* RAD51 Genes.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Morrow, Dwight M., Carla Connelly, and Philip Hieter. 1997. “‘Break Copy’ Duplication: A Model for Chromosome Fragment Formation in *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Genetics*.
- Moyret-Lalle, Caroline et al. 2016. “Plasticité Des Cellules Cancéreuses et Dissémination Métastatique.” *Médecine/Sciences* 32(8–9): 725–31.
- Moyret-Lalle, Caroline, Emmanuelle Ruiz, and Alain Puisieux. 2014. “Epithelial-Mesenchymal Transition Transcription Factors and MiRNAs: ‘Plastic Surgeons’ of Breast Cancer.” *World Journal of Clinical Oncology* 5(3): 311–22.
- Mudduluru, Giridhar et al. 2015. “A Systematic Approach to Defining the Microrna Landscape in Metastasis.” *Cancer Research* 75(15): 3010–19.
- Muenst, S. et al. 2014. “Expression of Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) Is Associated with Poor Prognosis in Human Breast Cancer.” *Breast Cancer Research and Treatment* 146(1): 15–24.
- Murai, Junko et al. 2012. “Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors.” *Cancer Research*.
- Murai, Junko, and Yves Pommier. 2019. “PARP Trapping beyond Homologous Recombination and Platinum Sensitivity in Cancers.” *Annual Review of Cancer Biology* 3(1): 131–50.
- Nacson, Joseph et al. 2018. “BRCA1 Mutation-Specific Responses to 53BP1 Loss-Induced Homologous Recombination and PARP Inhibitor Resistance.” *Cell Reports*.
- Nakanishi, Koji et al. 2005. “Human Fanconi Anemia Monoubiquitination Pathway Promotes Homologous DNA Repair.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(4): 1110–15.
- Nassour, Mayssa et al. 2012a. “Slug Controls Stem/Progenitor Cell Growth Dynamics during Mammary Gland Morphogenesis.” *PLoS ONE* 7(12).

## Références

- . 2012b. “Slug Controls Stem/Progenitor Cell Growth Dynamics during Mammary Gland Morphogenesis.” *PLoS ONE*.
- Nawshad, Ali, and Elizabeth D. Hay. 2003. “TGF $\beta$ 3 Signaling Activates Transcription of the LEF1 Gene to Induce Epithelial Mesenchymal Transformation during Mouse Palate Development.” *Journal of Cell Biology* 163(6): 1291–1301.
- Newman, Joseph A., Christopher D.O. Cooper, Hazel Aitkenhead, and Opher Gileadi. 2015. “Structure of the Helicase Domain of DNA Polymerase Theta Reveals a Possible Role in the Microhomology-Mediated End-Joining Pathway.” *Structure* 23(12): 2319–30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2015.10.014>.
- Ng, York Hunt, Hua Zhu, and Peter C.K. Leung. 2012. “Twist Modulates Human Trophoblastic Cell Invasion via Regulation of N-Cadherin.” *Endocrinology* 153(2): 925–36.
- Nicolás, A L, and C S Young. 1994. “Characterization of DNA End Joining in a Mammalian Cell Nuclear Extract: Junction Formation Is Accompanied by Nucleotide Loss, Which Is Limited and Uniform but Not Site Specific.” *Molecular and Cellular Biology*.
- Nicolette, Matthew L. et al. 2010. “Mre11gRad50gXrs2 and Sae2 Promote 5’ Strand Resection of DNA Double-Strand Breaks.” *Nature Structural and Molecular Biology*.
- Niedernhofer, Laura J. 2007. “The Fanconi Anemia Signalosome Anchor.” *Molecular Cell*.
- Nieto, M. Angela, Ruby Yun Y.J. Huang, Rebecca A A. Jackson, and Jean Paul P. Thiery. 2016. “Emt: 2016.” *Cell* 166(1): 21–45.
- Nieto, M. Angela. 2009. “Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease: Old Views and New Perspectives.” *International Journal of Developmental Biology* 53(8–10): 1541–47.
- Nieto, M. Angela, and Amparo Cano. 2012. “The Epithelial-Mesenchymal Transition under Control: Global Programs to Regulate Epithelial Plasticity.” *Seminars in Cancer Biology*.
- Nimonkar, Amitabh V. et al. 2011a. “BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN Constitute Two DNA End Resection Machineries for Human DNA Break Repair.” *Genes and Development* 25(4): 350–62.
- . 2011b. “BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN Constitute Two DNA End Resection Machineries for Human DNA Break Repair.” *Genes and Development*.
- Nordberg, Jonas, and Elias S.J. Arnér. 2001. “Reactive Oxygen Species, Antioxidants, and the Mammalian Thioredoxin System.” *Free Radical Biology and Medicine*.
- Nospikel, T. 2009a. “Nucleotide Excision Repair: Variations on Versatility.” *Cellular and Molecular Life Sciences*.
- Nospikel, T. 2009b. “DNA Repair in Mammalian Cells : Nucleotide Excision Repair: Variations on Versatility.” *Cellular and molecular life sciences : CMLS*.
- O’Brien, Catherine Adell, Antonija Kreso, and Catriona H.M. Jamieson. 2010. “Cancer Stem Cells and Self-Renewal.” *Clinical Cancer Research*.
- Ohmori, Haruo et al. 2001. “The Y-Family of DNA Polymerases.” *Molecular Cell*.

## Références

- Ohta, Sho, Gary C. Schoenwolf, and Gen Yamada. 2010. "The Cessation of Gastrulation: BMP Signaling and EMT during and at the End of Gastrulation." *Cell adhesion & migration* 4(3): 440–46.
- Okubo, Tomoharu et al. 2001. "Down-Regulation of Promoter I.3 Activity of the Human Aromatase Gene in Breast Tissue by Zinc-Finger Protein, Snail (Snai1)." *Cancer Research* 61(4): 1338–46.
- Orr Weaver, T. L., and J. W. Szostak. 1983. "Yeast Recombination: The Association between Double-Strand Gap Repair and Crossing-Over." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Osborn, Alexander J., Stephen J. Elledge, and Lee Zou. 2002. "Checking on the Fork: The DNA-Replication Stress-Response Pathway." *Trends in Cell Biology* 12(11): 509–16.
- Paddock, M. N. et al. 2011. "Competition between PARP-1 and Ku70 Control the Decision between High-Fidelity and Mutagenic DNA Repair." *DNA Repair* 10(3): 338–43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.12.005>.
- Papadopoulos, Nickolas et al. 1994. "Mutation of a MutL Homolog in Hereditary Colon Cancer." *Science*.
- Papadopoulou, Vasiliki et al. 2010. "ZEB1 and CtBP Form a Repressive Complex at a Distal Promoter Element of the BCL6 Locus." *Biochemical Journal* 427(3): 541–50.
- Pardo, B, B Gómez-González, and A Aguilera. 2009. "DNA Repair in Mammalian Cells: DNA Double-Strand Break Repair: How to Fix a Broken Relationship." *Cellular and molecular life sciences : CMLS*.
- Park, Sun Mi, Arti B. Gaur, Ernst Lengyel, and Marcus E. Peter. 2009. "The MiR-200 Family Determines the Epithelial Phenotype of Cancer Cells by Targeting the E-Cadherin Repressors (Genes and Development (2008) 22, (894-907))." *Genes and Development* 23(11): 1378.
- Pasero, Philippe, Kenji Shimada, and Bernard P. Duncker. 2003. "Multiple Roles of Replication Forks in S Phase Checkpoints: Sensors, Effectors and Targets." *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*.
- Pásti, Gabriella, and Michel Labouesse. 2014. "Epithelial Junctions, Cytoskeleton, and Polarity." *WormBook : the online review of C. elegans biology*.
- Pattabiraman, Diwakar R., and Robert A. Weinberg. 2014. "Tackling the Cancer Stem Cells-What Challenges Do They Pose?" *Nature Reviews Drug Discovery*.
- Paull, Tanya T. et al. 2000. "A Critical Role for Histone H2AX in Recruitment of Repair Factors to Nuclear Foci after DNA Damage." *Current Biology*.
- Pearson, Gray W. 2019. "Control of Invasion by Epithelial-to-Mesenchymal Transition Programs during Metastasis." *Journal of Clinical Medicine* 8(5): 646.
- Peña-Díaz, Javier, and Josef Jiricny. 2012. "Mammalian Mismatch Repair: Error-Free or Error-Prone?" *Trends in Biochemical Sciences*.
- Peña, Cristina et al. 2006. "The Expression Levels of the Transcriptional Regulators P300 and

## Références

- CtBP Modulate the Correlations between SNAIL, ZEB1, E-Cadherin and Vitamin D Receptor in Human Colon Carcinomas." *International Journal of Cancer* 119(9): 2098–2104.
- Perdigão-Henriques, R. et al. 2016. "MiR-200 Promotes the Mesenchymal to Epithelial Transition by Suppressing Multiple Members of the Zeb2 and Snail1 Transcriptional Repressor Complexes." *Oncogene* 35(2): 158–72.
- Perou, Charles M. 2011. "Molecular Stratification of Triple-Negative Breast Cancers." *The Oncologist*.
- Perou, Charles M et al. 2000. "Molecular Portraits of Human Breast Tumours. Letters to Nature 748." *Nature* 533(May): 747–52. [www.stanford.edu/molecularportraits/](http://www.stanford.edu/molecularportraits/).
- Petermann, Eva, and Thomas Helleday. 2010. "Pathways of Mammalian Replication Fork Restart." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
- Petruseva, I. O., A. N. Evdokimov, and O. I. Lavrik. 2014. "Molecular Mechanism of Global Genome Nucleotide Excision Repair." *Acta Naturae* 6(20): 23–34.
- Phaniendra, Alugoju, Dinesh Babu Jestadi, and Latha Periyasamy. 2015. "Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases." *Indian Journal of Clinical Biochemistry*.
- Phillips, Sarah, and Charlotte Kuperwasser. 2014. "SLUG: Critical Regulator of Epithelial Cell Identity in Breast Development and Cancer [Http://Www.Tandfonline.Com/Doi/Pdf/10.4161/19336918.2014.972740](http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.4161/19336918.2014.972740)." *Cell Adhesion and Migration* 8(6): 578–87.
- Picornell, A. C. et al. 2019. "Breast Cancer PAM50 Signature: Correlation and Concordance between RNA-Seq and Digital Multiplexed Gene Expression Technologies in a Triple Negative Breast Cancer Series." *BMC Genomics* 20(1): 1–11.
- Pieraccioli, M. et al. 2016. "ZNF281 Contributes to the DNA Damage Response by Controlling the Expression of XRCC2 and XRCC4." *Oncogene* 35(20): 2592–2601.
- Pinho, Andreia V., Ilse Rومان, and Francisco X. Real. 2011. "P53-Dependent Regulation of Growth, Epithelial-Mesenchymal Transition and Stemness in Normal Pancreatic Epithelial Cells." *Cell Cycle*.
- Pittenger, Mark F., and Bradley J. Martin. 2004. "Mesenchymal Stem Cells and Their Potential as Cardiac Therapeutics." *Circulation Research*.
- Podlutzky, Andrej Ja et al. 2001. "Human DNA Polymerase  $\beta$  Initiates DNA Synthesis during Long-Patch Repair of Reduced AP Sites in DNA." *EMBO Journal* 20(6): 1477–82.
- Pogozelski, Wendy Knapp, and Thomas D. Tullius. 1998. "Oxidative Strand Scission of Nucleic Acids: Routes Initiated by Hydrogen Abstraction from the Sugar Moiety." *Chemical Reviews*.
- Poli, Jérôme et al. 2012. "DNTP Pools Determine Fork Progression and Origin Usage under Replication Stress." *EMBO Journal*.
- Polo, Luis M. et al. 2019. "Efficient Single-Strand Break Repair Requires Binding to Both

## Références

- Poly(ADP-Ribose) and DNA by the Central BRCT Domain of XRCC1." *Cell Reports* 26(3): 573-581.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.082>.
- Polyak, Kornelia, and Robert A. Weinberg. 2009. "Transitions between Epithelial and Mesenchymal States: Acquisition of Malignant and Stem Cell Traits." *Nature Reviews Cancer* 9(4): 265–73.
- Pommier, Roxane M. et al. 2020. "Comprehensive Characterization of Claudin-Low Breast Tumors Reflects the Impact of the Cell-of-Origin on Cancer Evolution." *Nature Communications*.
- Ponticos, Markella et al. 2004. "Regulation of Collagen Type I in Vascular Smooth Muscle Cells by Competition between Nkx2.5 and  $\Delta$ EF1/ZEB1." *Molecular and Cellular Biology* 24(14): 6151–61.
- Postigo, Antonio A. 2003. "Opposing Functions of ZEB Proteins in the Regulation of the TGF $\beta$ /BMP Signaling Pathway." *EMBO Journal* 22(10): 2443–52.
- Postigo, Antonio A., and Douglas C. Dean. 1997. "ZEB, a Vertebrate Homolog of Drosophila Zfh-1, Is a Negative Regulator of Muscle Differentiation." *EMBO Journal* 16(13): 3935–43.
- . 1999a. "Independent Repressor Domains in ZEB Regulate Muscle and T-Cell Differentiation." *Molecular and Cellular Biology* 19(12): 7961–71.
- . 1999b. "ZEB Represses Transcription through Interaction with the Corepressor CtBP." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(12): 6683–88.
- . 2000. "Differential Expression and Function of Members of the Zfh-1 Family of Zinc Finger/Homeodomain Repressors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(12): 6391–96.
- Postigo, Antonio A., Jennifer L. Depp, Jennifer J. Taylor, and Kristen L. Kroll. 2003. "Regulation of Smad Signaling through a Differential Recruitment of Coactivators and Corepressors by ZEB Proteins." *EMBO Journal* 22(10): 2453–62.
- Potenski, Catherine J., and Hannah L. Klein. 2014. "How the Misincorporation of Ribonucleotides into Genomic DNA Can Be Both Harmful and Helpful to Cells." *Nucleic Acids Research*.
- Prasanth, Supriya G., Kannanganattu V. Prasanth, and Bruce Stillman. 2002. "Orc6 Involved in DNA Replication, Chromosome Segregation, and Cytokinesis." *Science*.
- Prat, A., J. S. Parker, C. Fan, and C. M. Perou. 2012. "PAM50 Assay and the Three-Gene Model for Identifying the Major and Clinically Relevant Molecular Subtypes of Breast Cancer." *Breast Cancer Research and Treatment* 135(1): 301–6.
- Prat, Aleix, H Guo, et al. 2010. "Phenotypic and Molecular Characterization of the Claudin-Low Intrinsic Subtype of Breast Cancer." *Breast Cancer Research* 12(5): 68–86. <http://breast-cancer-research.com/content/12/5/R68%0ARESEARCH>.
- Prat, Aleix, Joel S. Parker, et al. 2010. "Phenotypic and Molecular Characterization of the Claudin-Low Intrinsic Subtype of Breast Cancer." *Breast Cancer Research* 12(5).

## Références

- Prat, Aleix et al. 2013. "Molecular Characterization of Basal-Like and Non-Basal-Like Triple-Negative Breast Cancer." *The Oncologist* 18(2): 123–33.
- . 2015. "Clinical Implications of the Intrinsic Molecular Subtypes of Breast Cancer." *Breast* 24: S26–35.
- Prat, Aleix, and Charles M. Perou. 2009. "Mammary Development Meets Cancer Genomics." *Nature Medicine*.
- . 2011. "Deconstructing the Molecular Portraits of Breast Cancer." *Molecular Oncology* 5(1): 5–23.
- Preston, Christine R., William Engels, and Carlos Flores. 2002. "Efficient Repair of DNA Breaks in *Drosophila*: Evidence for Single-Strand Annealing and Competition with Other Repair Pathways." *Genetics*.
- Pryor, John M. et al. 2015. "Essential Role for Polymerase Specialization in Cellular Nonhomologous End Joining." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(33): E4537–45.
- Pu, Hong et al. 2014. "PARP-1 Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) in Prostate Tumorigenesis." *Carcinogenesis* 35(11): 2592–2601.
- Puisieux, Alain, Thomas Brabletz, and Julie Caramel. 2014. "Oncogenic Roles of EMT-Inducing Transcription Factors." *Nature Cell Biology* 16(6): 488–94. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2976>.
- Puisieux, Alain, Roxane M. Pommier, Anne Pierre Morel, and Fabrice Laval. 2018. "Cellular Pliancy and the Multistep Process of Tumorigenesis." *Cancer Cell* 33(2): 164–72. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.01.007>.
- Pyun, B. J. et al. 2013. "Mutual Regulation between DNA-PKcs and Snail1 Leads to Increased Genomic Instability and Aggressive Tumor Characteristics." *Cell Death and Disease* 4(2): 1–11.
- Qureshi, Hina S., Michael O. Linden, George Divine, and Usha B. Raju. 2006. "E-Cadherin Status in Breast Cancer Correlates with Histologic Type but Does Not Correlate with Established Prognostic Parameters." *American Journal of Clinical Pathology* 125(3): 377–85.
- Radisky, Derek C., Paraic A. Kenny, and Mina J. Bissell. 2007. "Fibrosis and Cancer: Do Myofibroblasts Come Also from Epithelial Cells via EMT?" *Journal of Cellular Biochemistry*.
- Rahman, Mujibur, and Young Rok Seo. 2008. "An Overview on DNA Damage and DNA Repair in Cancer Research." *Cancer Prevention Research* 13(4): 237–46.
- Räschle, Markus et al. 2008. "Mechanism of Replication-Coupled DNA Interstrand Crosslink Repair." *Cell*.
- Rass, Emilie et al. 2009. "Role of Mre11 in Chromosomal Nonhomologous End Joining in Mammalian Cells." *Nature Structural and Molecular Biology*.
- Ray Chaudhuri, Arnab, and André Nussenzweig. 2017. "The Multifaceted Roles of PARP1 in DNA Repair and Chromatin Remodelling." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18(10):

## Références

- 610–21. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm.2017.53>.
- Ray, Heather J., and Lee A. Niswander. 2016. "Grainyhead-like 2 Downstream Targets Act to Suppress Epithelial-to-Mesenchymal Transition during Neural Tube Closure." *Development (Cambridge)* 143(7): 1192–1204.
- Revenco, Tatiana et al. 2019. "Context Dependency of Epithelial-to-Mesenchymal Transition for Metastasis." *Cell Reports* 29(6): 1458-1468.e3.
- Reynolds, Pamela et al. 2012. "The Dynamics of Ku70/80 and DNA-PKcs at DSBs Induced by Ionizing Radiation Is Dependent on the Complexity of Damage." *Nucleic Acids Research*.
- Robson, M. E. et al. 2019. "OlympiAD Final Overall Survival and Tolerability Results: Olaparib versus Chemotherapy Treatment of Physician's Choice in Patients with a Germline BRCA Mutation and HER2-Negative Metastatic Breast Cancer." *Annals of Oncology* 30(4): 558–66.
- Robson, Mark et al. 2017. "Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation." *New England Journal of Medicine* 377(6): 523–33.
- Rodríguez, M. I. et al. 2011. "Poly(ADP-Ribose)-Dependent Regulation of Snail1 Protein Stability." *Oncogene* 30(42): 4365–72.
- Rodriguez, Yacidzohara, Ricardo R Gonzalez-mendez, and Carmen L Cadilla. 2016. "Correction: Evolution of the Twist Subfamily Vertebrate Proteins: Discovery of a Signature Motif and Origin of the Twist1 Glycine-Rich Motifs in the Amino-Terminus Disordered Domain (PLoS ONE (2016) 11:8 (E0161029) DOI: 10.1371/Journal.Pone.0161029)." *PLoS ONE* 11(10).
- Roerink, Sophie F., Robinvan Schendel, and Marcel Tijsterman. 2014. "Polymerase Theta-Mediated End Joining of Replication-Associated DNA Breaks in *C. Elegans*." *Genome Research* 24(6): 954–62.
- Rogakou, Emmy P. et al. 1998. "DNA Double-Stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139." *Journal of Biological Chemistry*.
- Rogakou, Emmy P., Chye Boon, Christophe Redon, and William M. Bonner. 1999. "Megabase Chromatin Domains Involved in DNA Double-Strand Breaks in Vivo." *Journal of Cell Biology*.
- Rogers, Crystal D., Ankur Saxena, and Marianne E. Bronner. 2013. "Sip1 Mediates an E-Cadherin-to-N-Cadherin Switch during Cranial Neural Crest EMT." *Journal of Cell Biology*.
- Romagnoli, Mathilde et al. 2012. "Epithelial-to-Mesenchymal Transition Induced by TGF- $\beta$ 1 Is Mediated by Blimp-1-Dependent Repression of BMP-5." *Cancer Research* 72(23): 6268–78.
- Ronson, George E. et al. 2018. "PARP1 and PARP2 Stabilise Replication Forks at Base Excision Repair Intermediates through Fbh1-Dependent Rad51 Regulation." *Nature Communications* 9(1). <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-03159-2>.
- Rosmaninho, Pedro et al. 2018. "Zeb1 Potentiates Genome-wide Gene Transcription with Lef1 to Promote Glioblastoma Cell Invasion." *The EMBO Journal*.
- Roth, D. B., and J. H. Wilson. 1985. "Relative Rates of Homologous and Nonhomologous

## Références

- Recombination in Transfected DNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Rottenberg, Sven et al. 2008. "High Sensitivity of BRCA1-Deficient Mammary Tumors to the PARP Inhibitor AZD2281 Alone and in Combination with Platinum Drugs." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Rowton, Megan et al. 2013. "Regulation of Mesenchymal-to-Epithelial Transition by PARAXIS during Somiteogenesis." *Developmental Dynamics*.
- Russo, Jose et al. 2006. "The Concept of Stem Cell in the Mammary Gland and Its Implication in Morphogenesis, Cancer and Prevention." *Frontiers in Bioscience*.
- Russo, Jose, and Irma H. Russo. 2011. "The Role of the Basal Stem Cell of the Human Breast in Normal Development and Cancer." In *Advances in Experimental Medicine and Biology*.
- Sachadyn, Paweł. 2010. "Conservation and Diversity of MutS Proteins." *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*.
- Sale, Julian E. 2013. "Translesion DNA Synthesis and Mutagenesis in Eukaryotes." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.
- Sale, Julian E., Alan R. Lehmann, and Roger Woodgate. 2012. "Y-Family DNA Polymerases and Their Role in Tolerance of Cellular DNA Damage." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
- Sallmyr, Annahita, and Alan E. Tomkinson. 2018. "Repair of DNA Double-Strand Breaks by Mammalian Alternative End-Joining Pathways." *Journal of Biological Chemistry* 293(27): 10536–49.
- Sánchez-Tilló, E. et al. 2010. "ZEB1 Represses E-Cadherin and Induces an EMT by Recruiting the SWI/SNF Chromatin-Remodeling Protein BRG1." *Oncogene* 29(24): 3490–3500.
- Sánchez-Tilló, Ester et al. 2011. "β-Catenin/TCF4 Complex Induces the Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT)-Activator ZEB1 to Regulate Tumor Invasiveness." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(48): 19204–9.
- . 2012. "EMT-Activating Transcription Factors in Cancer: Beyond EMT and Tumor Invasiveness." *Cellular and Molecular Life Sciences*.
- Santoro, Massimo M., and Giovanni Gaudino. 2005. "Cellular and Molecular Facets of Keratinocyte Reepithelization during Wound Healing." *Experimental Cell Research*.
- Sarrió, David et al. 2008. "Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer Relates to the Basal-like Phenotype." *Cancer Research* 68(4): 989–97.
- Sartori, Alessandro A. et al. 2007. "Human CtIP Promotes DNA End Resection." *Nature*.
- Sasaki, T. 1992. "The Effects of Basic Fibroblast Growth Factor and Doxorubicin on Cultured Human Skin Fibroblasts: Relevance to Wound Healing." In *Journal of Dermatology*.
- Sauka-Spengler, Tatjana, and Marianne Bronner-Fraser. 2008. "A Gene Regulatory Network Orchestrates Neural Crest Formation." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
- Savagner, Pierre et al. 2005. "Cutaneous Wound Reepithelialization." In *Rise and Fall of*

### *Epithelial Phenotype,*

- Saxena, M., M. A. Stephens, H. Pathak, and A. Rangarajan. 2011. "Transcription Factors That Mediate Epithelial-Mesenchymal Transition Lead to Multidrug Resistance by Upregulating ABC Transporters." *Cell Death and Disease* 2(7): 1–13.
- Schadendorf, Dirk et al. 2015. "Pooled Analysis of Long-Term Survival Data from Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma." *Journal of Clinical Oncology* 33(17): 1889–94.
- Schärer, Orlando D. 2013. "Nucleotide Excision Repair in Eukaryotes." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5(10): 1–19.
- Schimmel, J., R. van Schendel, Johan T. den Dunnen, and Marcel Tijsterman. 2019. "Templated Insertions: A Smoking Gun for Polymerase Theta-Mediated End Joining." *Trends in Genetics* 35(9): 632–44. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2019.06.001>.
- Schimmel, Joost, Hanneke Kool, Robin Schendel, and Marcel Tijsterman. 2017. "Mutational Signatures of Non-homologous and Polymerase Theta-mediated End-joining in Embryonic Stem Cells." *The EMBO Journal* 36(24): 3634–49.
- Schlacher, Katharina et al. 2011. "Double-Strand Break Repair-Independent Role for BRCA2 in Blocking Stalled Replication Fork Degradation by MRE11." *Cell*.
- Schmid, Peter et al. 2018. "Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer." *New England Journal of Medicine* 379(22): 2108–21.
- . 2020. "Atezolizumab plus Nab-Paclitaxel as First-Line Treatment for Unresectable, Locally Advanced or Metastatic Triple-Negative Breast Cancer (IMpassion130): Updated Efficacy Results from a Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial." *The Lancet Oncology* 21(1): 44–59.
- Schneider, Leonid et al. 2013. "DNA Damage in Mammalian Neural Stem Cells Leads to Astrocytic Differentiation Mediated by BMP2 Signaling through JAK-STAT." *Stem Cell Reports*.
- Seifert, Bryce A., Marion Dejosez, and Thomas P. Zwaka. 2017. "Ronin Influences the DNA Damage Response in Pluripotent Stem Cells." *Stem Cell Research*.
- Seigneur, Marie, Vladimir Bidnenko, S. Dusko Ehrlich, and Bénédicte Michel. 1998. "RuvAB Acts at Arrested Replication Forks." *Cell*.
- Senfter, Daniel, Sibylle Madlener, Georg Krupitza, and Robert M. Mader. 2016. "The MicroRNA-200 Family: Still Much to Discover." *Biomolecular Concepts* 7(5–6): 311–19.
- Seol, Ja Hwan, Eun Yong Shim, and Sang Eun Lee. 2018. "Microhomology-Mediated End Joining: Good, Bad and Ugly." *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 809(February): 81–87.
- Serrano, Manuel et al. 1997. "Oncogenic Ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of P53 and P16(INK4a)." *Cell*.
- Shackleton, Mark et al. 2006. "Generation of a Functional Mammary Gland from a Single Stem Cell." *Nature*.

## Références

- Shen, Yuqiao, Mika Aoyagi-scharber, and Bing Wang. 2015. "Minireview Trapping Poly ( ADP-Ribose ) Polymerase." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (June): 446–57.
- Shibata, Atsushi et al. 2011. "Factors Determining DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice in G2 Phase." *EMBO Journal*.
- Shieh, Sheau Yann et al. 2000. "The Human Homologs of Checkpoint Kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) Phosphorylate, P53 at Multiple DNA Damage-Inducible Sites." *Genes and Development*.
- Shima, Naoko et al. 2007. "A Viable Allele of Mcm4 Causes Chromosome Instability and Mammary Adenocarcinomas in Mice." *Nature Genetics*.
- Shima, Naoko, Robert J. Munroe, and John C. Schimenti. 2004. "The Mouse Genomic Instability Mutation Chaos1 Is an Allele of Polq That Exhibits Genetic Interaction with Atm." *Molecular and Cellular Biology* 24(23): 10381–89.
- Shinmura, Kazuya et al. 2019. "POLQ Overexpression Is Associated with an Increased Somatic Mutation Load and PLK4 Overexpression in Lung Adenocarcinoma." *Cancers* 11(5): 1–18.
- Shroff, Robert et al. 2004. "Distribution and Dynamics of Chromatin Modification Induced by a Defined DNA Double-Strand Break." *Current Biology*.
- Sikandar, Shaheen S. et al. 2017. "Role of Epithelial to Mesenchymal Transition Associated Genes in Mammary Gland Regeneration and Breast Tumorigenesis." *Nature Communications* 8(1): 1–9. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-01666-2>.
- Silberstein, Gary B. 2001. "Postnatal Mammary Gland Morphogenesis." *Microscopy Research and Technique* 52(2): 155–62.
- Silver, Daniel P. et al. 2010. "Efficacy of Neoadjuvant Cisplatin in Triple-Negative Breast Cancer." *Journal of Clinical Oncology*.
- Simic, Michael G., David S. Bergtold, and Lisa R. Karam. 1989. "Generation of Oxy Radicals in Biosystems." *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*.
- Simões-Costa, Marcos, and Marianne E. Bronner. 2013. "Insights into Neural Crest Development and Evolution from Genomic Analysis." *Genome Research*.
- Simsek, Deniz, and Maria Jasin. 2010. "Alternative End-Joining Is Suppressed by the Canonical NHEJ Component Xrcc4-Ligase IV during Chromosomal Translocation Formation." *Nature structural & molecular biology* 17(4): 410–16.
- Singh, Kamaljeet et al. 2016. "Updated 2013 College of American Pathologists/American Society of Clinical Oncology (CAP/ASCO) Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) Fluorescent in Situ Hybridization (FISH) Testing Increase HER2 Positive and HER2 E." *Breast Cancer Research and Treatment*.
- Škovierová, Henrieta et al. 2018. "Molecular Regulation of Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Tumorigenesis (Review)." *International Journal of Molecular Medicine* 41(3): 1187–1200.

## Références

- Sleeman, Katherine E. et al. 2005. "CD24 Staining of Mouse Mammary Gland Cells Defines Luminal Epithelial, Myoepithelial/Basal and Non-Epithelial Cells." *Breast Cancer Research*.
- . 2007. "Dissociation of Estrogen Receptor Expression and in Vivo Stem Cell Activity in the Mammary Gland." *Journal of Cell Biology*.
- Smith, Gerald R., Michael N. Boddy, Paul Shanahan, and Paul Russell. 2003. "Fission Yeast Mus81·Eme1 Holliday Junction Resolvase Is Required for Meiotic Crossing over but Not for Gene Conversion." *Genetics*.
- Smith, Ian et al. 2007. "2-Year Follow-up of Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer: A Randomised Controlled Trial." *Lancet*.
- Smogorzewska, Agata et al. 2007. "Identification of the FANCI Protein, a Monoubiquitinated FANCD2 Paralog Required for DNA Repair." *Cell*.
- Sogabe, Yoko, Masatoshi Abe, Yoko Yokoyama, and Osamu Ishikawa. 2006. "Basic Fibroblast Growth Factor Stimulates Human Keratinocyte Motility by Rac Activation." *Wound Repair and Regeneration*.
- Solozobova, Valeriya, Alexandra Rolletschek, and Christine Blattner. 2009. "Nuclear Accumulation and Activation of P53 in Embryonic Stem Cells after DNA Damage." *BMC Cell Biology*.
- Song, Na et al. 2018. "ZEB1 Inhibition Sensitizes Cells to the ATR Inhibitor VE-821 by Abrogating Epithelial–Mesenchymal Transition and Enhancing DNA Damage." *Cell Cycle*.
- Sørli, Therese et al. 2001. "Gene Expression Patterns of Breast Carcinomas Distinguish Tumor Subclasses with Clinical Implications." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(19): 10869–74.
- Sosa, Venus et al. 2013. "Oxidative Stress and Cancer: An Overview." *Ageing Research Reviews*.
- Spike, Benjamin T., and Geoffrey M. Wahl. 2011. "P53, Stem Cells, and Reprogramming: Tumor Suppression beyond Guarding the Genome." *Genes and Cancer*.
- Srinivasan, Seetha V. et al. 2013. "Cdc45 Is a Critical Effector of Myc-Dependent DNA Replication Stress." *Cell Reports*.
- Stefanovie, Barbora et al. 2020. "DSS1 Interacts with and Stimulates RAD52 to Promote the Repair of DSBs." *Nucleic acids research* 48(2): 694–708.
- Stemmler, Marc P, Rebecca L Eccles, Simone Brabletz, and Thomas Brabletz. 2019. "Non-Redundant Functions of EMT-TFs." *Nature Cell Biology* 21(January): 102–12. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0196-y>.
- Stephens, Philip J. et al. 2009. "Complex Landscapes of Somatic Rearrangement in Human Breast Cancer Genomes." *Nature* 462(7276): 1005–10. <http://dx.doi.org/10.1038/nature08645>.
- Stojic, Lovorka, Richard Brun, and Josef Jiricny. 2004. "Mismatch Repair and DNA Damage Signalling." *DNA Repair*.

## Références

- Stoll, Stefan W., Laure Rittié, Jessica L. Johnson, and James T. Elder. 2012. "Heparin-Binding EGF-like Growth Factor Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Keratinocytes." *Journal of Investigative Dermatology*.
- Stone, Rivka C. et al. 2016. "Epithelial-Mesenchymal Transition in Tissue Repair and Fibrosis." *Cell and Tissue Research* 365(3): 495–506. <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-016-2464-0>.
- Storci, G. et al. 2008. "The Basal-like Breast Carcinoma Phenotype Is Regulated by SLUG Gene Expression." *Journal of Pathology*.
- Strobl-Mazzulla, Pablo H., and Marianne E. Bronner. 2012a. "A PHD12-Snail2 Repressive Complex Epigenetically Mediates Neural Crest Epithelial-to-Mesenchymal Transition." *Journal of Cell Biology*.
- . 2012b. "Epithelial to Mesenchymal Transition: New and Old Insights from the Classical Neural Crest Model." *Seminars in Cancer Biology*.
- Sturzenegger, Andreas et al. 2014. "DNA2 Cooperates with the WRN and BLM RecQ Helicases to Mediate Long-Range DNA End Resection in Human Cells." *Journal of Biological Chemistry*.
- Sudhir Ambekar, Shrinivas. 2017. "DNA: Damage and Repair Mechanisms in Humans." *Global Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*.
- Sugasawa, Kaoru et al. 1998. "Xeroderma Pigmentosum Group C Protein Complex Is the Initiator of Global Genome Nucleotide Excision Repair." *Molecular Cell*.
- Sukhanova, Maria, Svetlana Khodyreva, and Olga Lavrik. 2010. "Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Regulates Activity of DNA Polymerase  $\beta$  in Long Patch Base Excision Repair." *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*.
- Sun, Hong, Douglas Treco, and Jack W. Szostak. 1991. "Extensive 3'-Overhanging, Single-Stranded DNA Associated with the Meiosis-Specific Double-Strand Breaks at the ARG4 Recombination Initiation Site." *Cell*.
- Sun, Xiao Xin, Mu Shui Dai, and Hua Lu. 2007. "5-Fluorouracil Activation of P53 Involves an MDM2-Ribosomal Protein Interaction." *Journal of Biological Chemistry*.
- Sung, Patrick, and Hannah Klein. 2006. "Mechanism of Homologous Recombination: Mediators and Helicases Take on Regulatory Functions." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
- Sung, Patrick, and Donald L. Roberson. 1995. "DNA Strand Exchange Mediated by a RAD51-SsDNA Nucleoprotein Filament with Polarity Opposite to That of RecA." *Cell*.
- Swarbrick, Alexander, Emie Roy, Thaddeus Allen, and J. Michael Bishop. 2008. "Id1 Cooperates with Oncogenic Ras to Induce Metastatic Mammary Carcinoma by Subversion of the Cellular Senescence Response." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(14): 5402–7.
- Sweeney, Carol et al. 2014. "Intrinsic Subtypes from PAM50 Gene Expression Assay in a Population-Based Breast Cancer Cohort: Differences by Age, Race, and Tumor Characteristics." *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 23(5): 714–24.

## Références

- Sy, Shirley M.H., Michael S.Y. Huen, and Junjie Chen. 2009a. "MRG15 Is a Novel PALB2-Interacting Factor Involved in Homologous Recombination." *Journal of Biological Chemistry*.
- . 2009b. "PALB2 Is an Integral Component of the BRCA Complex Required for Homologous Recombination Repair." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(17): 7155–60.
- Szostak, Jack W., Terry L. Orr-Weaver, Rodney J. Rothstein, and Franklin W. Stahl. 1983. "The Double-Strand-Break Repair Model for Recombination." *Cell* 33(1): 25–35.
- Takeo, Shinsuke et al. 2004. "E-Cadherin Expression in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma: Promoter Hypermethylation, Snail Overexpression, and Clinicopathologic Implications." *American Journal of Clinical Pathology*.
- Tamez-Peña, Jose Gerardo et al. 2018. "Radiogenomics Analysis Identifies Correlations of Digital Mammography with Clinical Molecular Signatures in Breast Cancer." *PLoS ONE* 13(3): 1–20.
- Tanino, Hirokazu et al. 2016. "BRCAness and Prognosis in Triple-Negative Breast Cancer Patients Treated with Neoadjuvant Chemotherapy." *PLoS ONE* 11(12).
- Taube, Joseph H. et al. 2010. "Core Epithelial-to-Mesenchymal Transition Interactome Gene-Expression Signature Is Associated with Claudin-Low and Metaplastic Breast Cancer Subtypes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(35): 15449–54.
- Taylor, Molly A., Jenny G. Parvani, and William P. Schiemann. 2010. "The Pathophysiology of Epithelial-Mesenchymal Transition Induced by Transforming Growth Factor- $\beta$  in Normal and Malignant Mammary Epithelial Cells." *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 15(2): 169–90.
- Thiery, Jean Paul, Hervé Aclouque, Ruby Y.J. Huang, and M. Angela Nieto. 2009. "Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease." *Cell* 139(5): 871–90.
- Thiery, Jean Paul, and Jonathan P. Sleeman. 2006. "Complex Networks Orchestrate Epithelial-Mesenchymal Transitions." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7(2): 131–42.
- Tichy, Elisia D., and Peter J. Stambrook. 2008. "DNA Repair in Murine Embryonic Stem Cells and Differentiated Cells." *Experimental Cell Research*.
- Toledo, Luis I., Matilde Murga, and Oscar Fernandez-Capetillo. 2011. "Targeting ATR and Chk1 Kinases for Cancer Treatment: A New Model for New (and Old) Drugs." *Molecular Oncology*.
- Tran, P.T. et al. 2014. "A Twist1-MLL-WDR5-HOTTIP Complex Regulates HOXA9 Chromatin to Facilitate Metastasis of Prostate Cancer." *International Journal of Radiation Oncology\*Biography\*Physics*.
- Tran, Phuoc T. et al. 2012. "Twist1 Suppresses Senescence Programs and Thereby Accelerates and Maintains Mutant Kras-Induced Lung Tumorigenesis." *PLoS Genetics*.
- Tripathi, Kiran, and Minal Garg. 2018. "Mechanistic Regulation of Epithelial-to-Mesenchymal Transition through RAS Signaling Pathway and Therapeutic Implications in Human

- Cancer." *Journal of Cell Communication and Signaling*.
- Truong, Lan N. et al. 2013. "Microhomology-Mediated End Joining and Homologous Recombination Share the Initial End Resection Step to Repair DNA Double-Strand Breaks in Mammalian Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(19): 7720–25.
- Tsai, Jeff H., and Jing Yang. 2013. "Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Carcinoma Metastasis." *Genes and Development*.
- Turner, N. C. et al. 2007. "BRCA1 Dysfunction in Sporadic Basal-like Breast Cancer." *Oncogene*.
- Turner, Nicholas C., and Jorge S. Reis-Filho. 2013. "Tackling the Diversity of Triple-Negative Breast Cancer." *Clinical Cancer Research* 19(23): 6380–88.
- Turner, Nicholas, Andrew Tutt, and Alan Ashworth. 2004. "Hallmarks of 'BRCAness' in Sporadic Cancers." *Nature Reviews Cancer*.
- Uchikado, Yasuto et al. 2005. "Slug Expression in the E-Cadherin Preserved Tumors Is Related to Prognosis in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma." *Clinical Cancer Research*.
- Uematsu, Naoya et al. 2007. "Autophosphorylation of DNA-PKCS Regulates Its Dynamics at DNA Double-Strand Breaks." *Journal of Cell Biology* 177(2): 219–29.
- Vaisman, Alexandra, and Roger Woodgate. 2017. "Translesion DNA Polymerases in Eukaryotes: What Makes Them Tick?" *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 52(3): 274–303.
- Valko, Marian et al. 2007. "Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*.
- Valsesia-Wittmann, Sandrine et al. 2004. "Oncogenic Cooperation between H-Twist and N-Myc Overrides Failsafe Programs in Cancer Cells." *Cancer Cell* 6(6): 625–30.
- Vandamme, Niels, and Geert Berx. 2014. "Melanoma Cells Revive an Embryonic Transcriptional Network to Dictate Phenotypic Heterogeneity." *Frontiers in Oncology* 4(NOV): 1–6.
- Vandewalle, C., F. Van Roy, and G. Berx. 2009. "The Role of the ZEB Family of Transcription Factors in Development and Disease." *Cellular and Molecular Life Sciences* 66(5): 773–87.
- Veskoukis, Aristidis S., Aristidis M. Tsatsakis, and Dimitrios Kouretas. 2012. "Dietary Oxidative Stress and Antioxidant Defense with an Emphasis on Plant Extract Administration." *Cell Stress and Chaperones*.
- Visvader, Jane E., and Geoffrey J. Lindeman. 2012. "Cancer Stem Cells: Current Status and Evolving Complexities." *Cell Stem Cell*.
- Visvader, Jane E., and John Stingl. 2014. "Mammary Stem Cells and the Differentiation Hierarchy: Current Status and Perspectives." *Genes and Development* 28(11): 1143–58.
- Di Vita, G. et al. 2005. "Production of Cytokines at the Operation Site." *Il Giornale di chirurgia*.
- Di Vita, Gaetano et al. 2006. "Cytokines and Growth Factors in Wound Drainage Fluid from

## Références

- Patients Undergoing Incisional Hernia Repair." *Wound Repair and Regeneration*.
- Vitale, Ilio et al. 2017. "DNA Damage in Stem Cells." *Molecular Cell*.
- Vogelstein, Bert et al. 2013. "Cancer Genome Landscapes." *Science*.
- Vollebergh, M. A. et al. 2011. "An ACGH Classifier Derived from BRCA1-Mutated Breast Cancer and Benefit of High-Dose Platinum-Based Chemotherapy in HER2-Negative Breast Cancer Patients." *Annals of Oncology*.
- Vollebergh, MA et al. 2009. "Predicting Response to Alkylating Chemotherapy in Breast Cancer Patients Using Array Comparative Genomic Hybridization."
- Vousden, Karen H., and Carol Prives. 2009. "Blinded by the Light: The Growing Complexity of P53." *Cell*.
- Wallace, Douglas C. 2005. "A Mitochondrial Paradigm of Metabolic and Degenerative Diseases, Aging, and Cancer: A Dawn for Evolutionary Medicine." *Annual Review of Genetics*.
- Walter, Johannes, and John Newport. 2000. "Initiation of Eukaryotic DNA Replication: Origin Unwinding and Sequential Chromatin Association of Cdc45, RPA, and DNA Polymerase  $\alpha$ ." *Molecular Cell*.
- Wang, Huichen et al. 2003. "Biochemical Evidence for Ku-Independent Backup Pathways of NHEJ." *Nucleic Acids Research* 31(18): 5377–88.
- Wang, Jun et al. 2009. "The Transcription Repressor, ZEB1, Cooperates with CtBP2 and HDAC1 to Suppress IL-2 Gene Activation in T Cells." *International Immunology* 21(3): 227–35.
- Wang, Xiaozhe et al. 2007. "Chk1-Mediated Phosphorylation of FANCE Is Required for the Fanconi Anemia/BRCA Pathway † Plasmids and Purification of Recombinant Proteins. Human FANCE CDNA (3) (Generously Provided by J. DeWinter And." *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*.
- Wang, Zi et al. 2019. "DNA Polymerase (POLQ) Is Important for Repair of DNA Double-Strand Breaks Caused by Fork Collapse." *Journal of Biological Chemistry* 294(11): 3909–19.
- Ward, Irene M., and Junjie Chen. 2001. "Histone H2AX Is Phosphorylated in an ATR-Dependent Manner in Response to Replicational Stress." *Journal of Biological Chemistry*.
- Ward, Irene M., Kay Minn, Jan van Deursen, and Junjie Chen. 2003. "P53 Binding Protein 53BP1 Is Required for DNA Damage Responses and Tumor Suppression in Mice." *Molecular and Cellular Biology*.
- Weeden, Clare E., and Marie Liesse Asselin-Labat. 2018. "Mechanisms of DNA Damage Repair in Adult Stem Cells and Implications for Cancer Formation." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1864(1): 89–101. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.10.015>.
- Wei, Huiting, and Xiaochun Yu. 2016. "Functions of PARylation in DNA Damage Repair Pathways." *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*.
- Weidenfeld, Keren, and Dalit Barkan. 2018. "EMT and Stemness in Tumor Dormancy and Outgrowth: Are They Intertwined Processes?" *Frontiers in Oncology* 8(SEP): 1–6.

## Références

- Weigman, Victor J. et al. 2012. "Basal-like Breast Cancer DNA Copy Number Losses Identify Genes Involved in Genomic Instability, Response to Therapy, and Patient Survival." *Breast Cancer Research and Treatment* 133(3): 865–80.
- Wellner, Ulrich et al. 2009. "The EMT-Activator ZEB1 Promotes Tumorigenicity by Repressing Stemness-Inhibiting MicroRNAs." *Nature cell biology* 11(12): 1487–95.
- West, Alison C, Ricky W Johnstone, Alison C West, and Ricky W Johnstone. 2014. "New and Emerging HDAC Inhibitors for Cancer Treatment Find the Latest Version : Review Series New and Emerging HDAC Inhibitors for Cancer Treatment." *J Clin Invest.* 124(1): 30–39.
- Weterings, Eric, and Dik C. Van Gent. 2004. "The Mechanism of Non-Homologous End-Joining: A Synopsis of Synapsis." *DNA Repair.*
- Whiteman, E. L., C. J. Liu, E. R. Fearon, and B. Margolis. 2008. "The Transcription Factor Snail Represses Crumbs3 Expression and Disrupts Apico-Basal Polarity Complexes." *Oncogene* 27(27): 3875–79.
- Williams, Elizabeth D., Dingcheng Gao, Andrew Redfern, and Erik W. Thompson. 2019. "Controversies around Epithelial–Mesenchymal Plasticity in Cancer Metastasis." *Nature Reviews Cancer* 19(12): 716–32. <http://dx.doi.org/10.1038/s41568-019-0213-x>.
- Williams, R. Scott et al. 2009. "Nbs1 Flexibly Tethers Ctp1 and Mre11-Rad50 to Coordinate DNA Double-Strand Break Processing and Repair." *Cell.*
- Winterbourn, Christine C. 1995. "Toxicity of Iron and Hydrogen Peroxide: The Fenton Reaction." *Toxicology Letters.*
- Wiseman, Bryony S., and Zena Werb. 2002. "Development: Stromal Effects on Mammary Gland Development and Breast Cancer." *Science* 296(5570): 1046–49.
- Wold, Marc S. 1997. "Replication Protein A: A Heterotrimeric, Single-Stranded DNA-Binding Protein Required for Eukaryotic DNA Metabolism." *Annual Review of Biochemistry.*
- Wood, Richard D., and Sylvie Doublié. 2016. "DNA Polymerase  $\theta$  (POLQ), Double-Strand Break Repair, and Cancer." *DNA Repair* 44: 22–32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.05.003>.
- Wu, Lai Man Natalie et al. 2016. "Zeb2 Recruits HDAC-NuRD to Inhibit Notch and Controls Schwann Cell Differentiation and Remyelination." *Nature Neuroscience* 19(8): 1060–72.
- Wu, Min et al. 2017. "USP19 Deubiquitinates HDAC1/2 to Regulate DNA Damage Repair and Control Chromosomal Stability." *Oncotarget* 8(2): 2197–2208.
- Wu, Wen Shu et al. 2005. "Slug Antagonizes P53-Mediated Apoptosis of Hematopoietic Progenitors by Repressing Puma." *Cell.*
- Wyatt, David W. et al. 2016. "Essential Roles for Polymerase  $\theta$ -Mediated End Joining in the Repair of Chromosome Breaks." *Molecular Cell* 63(4): 662–73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.020>.
- Wynn, Thomas A., and Thirumalai R. Ramalingam. 2012. "Mechanisms of Fibrosis: Therapeutic Translation for Fibrotic Disease." *Nature Medicine.*
- Xia, Wen et al. 2019. "Two-Way Crosstalk between BER and c-NHEJ Repair Pathway Is

## Références

- Mediated by Pol- $\beta$  and Ku70." *FASEB Journal* 33(11): 11668–81.
- Xie, Anyong, Amy Kwok, and Ralph Scully. 2009. "Role of Mammalian Mre11 in Classical and Alternative Nonhomologous End Joining." *Nature Structural and Molecular Biology*.
- Xie, Si et al. 2015. "Timeless Interacts with PARP-1 to Promote Homologous Recombination Repair." *Molecular Cell*.
- Yamakoshi, Sachiko et al. 2012. "Expression of Mesenchymal-Related Genes by the Bovine Trophectoderm Following Conceptus Attachment to the Endometrial Epithelium." *Reproduction* 143(3): 377–87.
- Yan, Zhijiang et al. 2010. "A Histone-Fold Complex and FANCM Form a Conserved DNA-Remodeling Complex to Maintain Genome Stability." *Molecular Cell*.
- Yang, Chao Shun, and Tariq M. Rana. 2013. "Learning the Molecular Mechanisms of the Reprogramming Factors: Let's Start from MicroRNAs." *Molecular BioSystems*.
- Yang, Shangwen et al. 2019. "CHFR Promotes the Migration of Human Gastric Cancer Cells by Inducing Epithelial-to-Mesenchymal Transition in a HDAC1-Dependent Manner." *OncoTargets and Therapy* 12: 1075–84.
- Yang, Wei, and Roger Woodgate. 2007. "What a Difference a Decade Makes: Insights into Translesion DNA Synthesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Yang, Yongfeng et al. 2020. "The Deubiquitinase USP38 Promotes NHEJ Repair through Regulation of HDAC1 Activity and Regulates Cancer Cell Response to Genotoxic Insults." *Cancer Research* 80(4): 719–31.
- Yang, Yun Gui et al. 2005. "The Fanconi Anemia Group A Protein Modulates Homologous Repair of DNA Double-Strand Breaks in Mammalian Cells." *Carcinogenesis* 26(10): 1731–40.
- Yousefzadeh, Matthew J. et al. 2014. "Mechanism of Suppression of Chromosomal Instability by DNA Polymerase POLQ." *PLoS Genetics* 10(10).
- Youssef, Khalil Kass et al. 2010. "Identification of the Cell Lineage at the Origin of Basal Cell Carcinoma." *Nature Cell Biology*.
- Zalzman, Michal et al. 2010. "Zscan4 Regulates Telomere Elongation and Genomic Stability in ES Cells." *Nature*.
- Zeisberg, Michael et al. 2003. "BMP-7 Counteracts TGF-B1-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Reverses Chronic Renal Injury." *Nature Medicine* 9(7): 964–68.
- . 2007. "Fibroblasts Derive from Hepatocytes in Liver Fibrosis via Epithelial to Mesenchymal Transition." *Journal of Biological Chemistry*.
- Zeisberg, Michael, and Raghu Kalluri. 2004. "The Role of Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Renal Fibrosis." *Journal of Molecular Medicine* 82(3): 175–81.
- Zeisberg, Michael, Amish A. Shah, and Raghu Kalluri. 2005. "Bone Morphogenic Protein-7 Induces Mesenchymal to Epithelial Transition in Adult Renal Fibroblasts and Facilitates

## Références

- Regeneration of Injured Kidney." *Journal of Biological Chemistry* 280(9): 8094–8100.
- Zeman, Michelle K., and Karlene A. Cimprich. 2014. "Causes and Consequences of Replication Stress." *Nature Cell Biology*.
- Zeps, Nikolajs et al. 1998. "Estrogen Receptor-Negative Epithelial Cells in Mouse Mammary Gland Development and Growth." *Differentiation* 62(5): 221–26. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1432-0436.1998.6250221.x>.
- Zhang, Peijing et al. 2014. "ATM-Mediated Stabilization of ZEB1 Promotes DNA Damage Response and Radioresistance through CHK1." *Nature Cell Biology* 16(9): 864–75.
- Zhang, Peijing, Yutong Sun, and Li Ma. 2015. "ZEB1: At the Crossroads of Epithelial-Mesenchymal Transition, Metastasis and Therapy Resistance." *Cell Cycle* 14(4): 481–87.
- Zhang, Xiang et al. 2018. "ZEB1 Confers Chemotherapeutic Resistance to Breast Cancer by Activating ATM Article." *Cell Death and Disease*.
- Zhang, Yanming, and Janet D. Rowley. 2006. "Chromatin Structural Elements and Chromosomal Translocations in Leukemia." *DNA Repair*.
- Zhang, Yinghao et al. 2014. "DSSylation, a Novel Protein Modification Targets Proteins Induced by Oxidative Stress, and Facilitates Their Degradation in Cells." *Protein and Cell* 5(2): 124–40.
- Zhang, Yun, and Robert A. Weinberg. 2018. "Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer: Complexity and Opportunities." *Frontiers of Medicine* 12(4): 361–73.
- Zhang, Zhiqian et al. 2011. "Epigenetic Silencing of MiR-203 Upregulates SNAI2 and Contributes to the Invasiveness of Malignant Breast Cancer Cells." *Genes and Cancer* 2(8): 782–91.
- Zhao, Yan et al. 2006. "Preclinical Evaluation of a Potent Novel DNA-Dependent Protein Kinase Inhibitor NU7441." *Cancer Research* 66(10): 5354–62.
- Zhou, Ping, Nan Jiang, Guo Xia Zhang, and Qing Sun. 2016. "MiR-203 Inhibits Tumor Invasion and Metastasis in Gastric Cancer by ATM." *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 48(8): 696–703.
- Zhou, Wei, and Paul W. Doetsch. 1993. "Effects of Abasic Sites and DNA Single-Strand Breaks on Prokaryotic RNA Polymerases." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Zhou, Wenhui, Kayla M. Gross, and Charlotte Kuperwasser. 2019. "Molecular Regulation of Snai2 in Development and Disease." *Journal of Cell Science*.
- Zimmermann, Michal, and Titia De Lange. 2014. "53BP1: Pro Choice in DNA Repair." *Trends in Cell Biology* 24(2): 108–17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2013.09.003>.
- Zou, Lee, and Stephen J. Elledge. 2003. "Sensing DNA Damage through ATRIP Recognition of RPA-SsDNA Complexes." *Science*.









## Résumé

Les cancers du sein constituent la première cause de mortalité par cancer chez la femme. En particulier un des sous-types de cancers du sein triples négatifs, les tumeurs *claudin-low* très agressives présentent l'expression de facteurs impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse. Ce mécanisme complexe de transdifférenciation cellulaire est contrôlé par des facteurs de transcription embryonnaires comme ZEB1.

Au sein de notre équipe, il a été montré que certaines tumeurs *claudin-low* ont évolué sur la base d'une faible instabilité génétique, probablement imputable à la réparation fautive de lésions de l'ADN apparues au cours du processus de progression tumorale.

Les résultats, obtenus au cours de ma thèse, montrent que les cellules *claudin-low* limitent l'utilisation d'une voie de réparation par jonction très mutagène, appelée TMEJ dépendante notamment du gène *POLQ* et de *PARP1*. En effet, les cellules *claudin-low*, exprimant très fortement ZEB1, présentent à l'inverse de très faible niveau d'expression de *POLQ* et une diminution de l'activité de PARylation, conduisant à une réduction de l'utilisation de la voie du TMEJ. Ainsi ce mécanisme original de régulation TMEJ met en évidence ZEB1 comme un acteur clé de la stabilité du génome lors de la progression du cancer, *via* sa répression de *POLQ*.

L'ensemble de ces travaux de thèse a permis en caractérisant le rôle de ZEB1 sur l'utilisation relative des voies de réparation de l'ADN d'exploiter cette modulation en terme thérapeutique pour le traitement ces tumeurs *claudin-low* actuellement résistantes aux chimiothérapies conventionnelles.

## Abstract

Breast cancer is the leading cause of cancer death in women. Particularly one of the triple negative breast cancer subtypes, very aggressive *claudin-low* tumors exhibit the expression of factors involved in the epithelial to mesenchymal transition. This complex mechanism of cellular transdifferentiation is controlled by embryonic transcription factors such as ZEB1.

In our team, it has been shown that some *claudin-low* tumors have evolved on the basis of low genetic instability, probably attributed to faulty repair of DNA lesions that arose during the process of tumor progression.

The results, obtained during my thesis, show that *claudin-low* cells limit the use of a mutagenic junction repair pathway, called TMEJ, dependent in particular on the *POLQ* and *PARP1* genes. Indeed, *claudin-low* cells expressing very strongly ZEB1, conversely, exhibit a very low level of expression of *POLQ* and a decrease in PARylation activity, leading to a reduction in the use of the TMEJ pathway. Thus, this original mechanism of TMEJ regulation highlights ZEB1 as a key player in genome stability during cancer progression, *via* its repression of *POLQ*.

All of this thesis work enabled by characterizing the role of ZEB1 on the relative use of DNA repair pathways to exploit this modulation in therapeutic terms for the treatment of these *claudin-low* tumors currently resistant to conventional chemotherapy.