



HAL
open science

Rechute métastatique des carcinomes mammaires triples négatifs : Identification d'une signature transcriptomique pronostique et nouveau rôle de SHISA3

Noura Khaled

► **To cite this version:**

Noura Khaled. Rechute métastatique des carcinomes mammaires triples négatifs : Identification d'une signature transcriptomique pronostique et nouveau rôle de SHISA3. Cancer. Université Clermont Auvergne, 2021. Français. NNT : 2021UCFAC062 . tel-03622477

HAL Id: tel-03622477

<https://theses.hal.science/tel-03622477>

Submitted on 29 Mar 2022

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.

Thèse pour obtenir le grade de **DOCTEUR D'UNIVERSITE**

Préparée à l'Université Clermont Auvergne

Spécialité de doctorat : Biologie moléculaire et cellulaire, Oncologie

École doctorale n°65 Sciences de la vie, santé, agronomie, & environnement

Rechute métastatique des carcinomes mammaires triples négatifs : Identification d'une signature transcriptomique pronostique et nouveau rôle de SHISA₃

Présentée par **Noura KHALED**

Le 03 Février 2021

Composition du Jury

Mme Emmanuelle CHARAFE-JAUFFRET, PU-PH, CRCM, Marseille	Rapporteuse
Mme Pascale COHEN, PU, Université Lyon 1, Lyon	Rapporteuse
M Thierry DUBOIS, HDR, Institut Curie, Paris	Rapporteur
M Ludovic LACROIX, PharmD, PhD, Institut Gustave Roussy, Paris	Examinateur
Mme Frédérique PENAULT-LIORCA, PU-PH, CJP, Clermont-Ferrand	Examinatrice
M Yannick BIDET, MCU-HDR, UCA, Clermont Ferrand	Directeur de thèse



Thèse effectuée sous la direction du Dr. Yannick BIDET

Université Clermont Auvergne, Centre Jean Perrin

Unité de recherche : INSERM U1240 – Imageries Moléculaires et Stratégies
Théranostiques (IMoST)

Equipe 2: RoBust

Recherche translationnelle en imagerie fonctionnelle, radiopharmaceutiques
et biomarqueurs théranostiques

58 Rue Montalembert

63 000 Clermont-Ferrand

Thèse financée dans le cadre du projet Epicure CPER 2015 - 2020 ainsi que par
l'association La Ligue Contre le Cancer



Liste des figures

FIGURE 1| ÉTAPES DE LA CANCEROGENESE.

FIGURE 2| LES CARACTERISTIQUES DU CANCER « HALLMARKS OF CANCER ».

FIGURE 3| LES CARACTERISTIQUES DU CANCER « HALLMARKS OF CANCER ».

FIGURE 4| IMPLICATIONS PHYSIOLOGIQUES ET PATHOLOGIQUES DE LA TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE.

FIGURE 5| PERTE DE L'INTEGRITE EPITHELIALE ET ACQUISITION DE STRUCTURES DE MIGRATION ET D'INVASION.

FIGURE 6| LES DIFFERENTS TYPES DE TEM.

FIGURE 7| MODELE D'IMPLICATION DE LA TEM DANS LA PROGRESSION METASTATIQUE DES CARCINOMES.

FIGURE 8| MARQUEURS CELLULAIRES EPITHELIAUX ET MESENCHYMATEUX.

FIGURE 9| DIFFERENTS STIMULUS EXTERIEURS INDUISANT LA TEM.

FIGURE 10| REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA VOIE DE SIGNALISATION TGF-B.

FIGURE 11| REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA VOIE DE SIGNALISATION WNT.

FIGURE 12| REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA VOIE DE SIGNALISATION NOTCH.

FIGURE 13| REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA VOIE DE SIGNALISATION RTK DANS LA TEM.

FIGURE 14| REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA VOIE DE SIGNALISATION D'HYPOXIE.

FIGURE 15| REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA VOIE DE SIGNALISATION NF KB.

FIGURE 16| REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA VOIE DE SIGNALISATION HEDGEHOG.

FIGURE 17| LE ROLE DE LA VOIE DE SIGNALISATION DES INTEGRINES.

FIGURE 18| VUE D'ENSEMBLE DES VOIES DE REGULATION DE LA TEM.

FIGURE 19| ROLES ET REGULATION DES PRINCIPAUX FACTEURS DE TRANSCRIPTION DE LA TEM.

FIGURE 20| NOMBRE DE NOUVEAUX CAS ET DE DECES DES CANCERS DU SEIN EN 2018.

FIGURE 21| ANATOMIE DU SEIN.

FIGURE 22| COMPARAISON ENTRE LES CARCINOMES IN SITU ET INFILTRANTS.

FIGURE 23 | REPRESENTATION GRAPHIQUE DU STADE ET DE LA CLASSIFICATION DU CANCER DU SEIN

FIGURE 24| CLASSIFICATION MOLECULAIRE A SIX SOUS-TYPES DE CARCINOMES MAMMAIRES.

FIGURE 25| COURBES DE SURVIE GLOBALE ET SURVIE SANS RECHUTE EN FONCTION DU SOUS-TYPE.

FIGURE 26| CLASSIFICATION ANATOMO-HISTOPATHOLOGIQUE DU CANCER DU SEIN.

FIGURE 27| CLASSIFICATION DES CSTNS SELON LEHMANN ET AL., 2011 ET 2016.

FIGURE 28| INTERSECTIONS DES SOUS-CLASSIFICATIONS DE LEHMANN ET AL. ET BURSTEIN ET AL.

FIGURE 29| COURBES DE SURVIE DES PATIENTES ATTEINTES DE CSTNS D'APRES LA CLASSIFICATION DE BURSTEIN ET AL.

FIGURE 30| SUGGESTION DE THERAPIES PROMETTEUSES POUR CHAQUE SOUS-TYPE DE CSTNS AVEC UNE PRESENTATION DES TAUX VARIABLES DE REPOSE PATHOLOGIQUE COMPLETE A LA CHIMIOETHERAPIE (OMARINI ET AL.).

FIGURE 31|DIAGRAMME SCHEMATIQUE DEMONTRANT LA DIFFERENCE ENTRE LA THERAPIE CONVENTIONNELLE ET LA THERAPIE DE PRECISION.

FIGURE 32| CLASSIFICATION DES DIFFERENTS TYPES DE BIOMARQUEUR.

FIGURE 33| OBJECTIF DE LA THESE

FIGURE 34| MECANISME D'ACTION PROPOSE POUR SHISA3.

FIGURE 35| VALIDATION INDEPENDANTE DE LA SIGNATURE PRONOSTIQUE

Liste des tableaux

TABLEAU 1| CLASSIFICATION CLINIQUE TNM DU CANCER DU SEIN.

TABLEAU 2| STADIFICATION TNM DES CANCERS DU SEIN. AJCC 8EME EDITION.

TABLEAU 3| GRADE HISTOLOGIQUE SBR DU CANCER DU SEIN.

TABLEAU 4| DIFERENTS CARACTERISTIQUES DES SOUS-TYPES DU CANCER DU SEIN.

TABLEAU 5| SOUS-TYPES DE CSTNs ET POTENTIELS CIBLES THERAPEUTIQUES.

TABLEAU 6| AUTRES BIOMARQUEURS TRANSCRIPTOMIQUES IMPLIQUES DANS LA PROGRESSION DES CSTNs.

TABLEAU 7| RESUME DES BIOMARQUEURS PROTEIQUES IMPLIQUES COMME BIOMARQUEURS POTENTIELS DE LA TUMORIGENESE DU CSTN.

TABLEAU 8| RESUME DES LNCARNS IMPLIQUES COMME BIOMARQUEURS POTENTIELS DE LA TUMORIGENESE DU CSTN.

TABLEAU 9| RESUME DES MIARNs IMPLIQUES COMME BIOMARQUEURS POTENTIELS DE LA TUMORIGENESE DU CSTN.

TABLEAU 10| RESUME DES ARNs CIRCULAIRES IMPLIQUES COMME BIOMARQUEURS POTENTIELS DE LA TUMORIGENESE DU CSTN.

TABLEAU 11| LES PRINCIPALES SIGNATURES MOLECULAIRES PRONOSTIQUES DEVELOPPEES DANS LE CANCER DU SEIN.



Titre : Rechute métastatique des carcinomes mammaires triple négatifs : Identification d'une signature transcriptomique pronostique et nouveau rôle de SHISA3

Mots clés : Cancer du sein triple négatif, Métastases, Signature moléculaire, Biomarqueur, Pronostic.

Résumé : Les cancers du sein triple négatifs (CSTN) représentent 10 à 20% des diagnostics de cancer du sein. Ils sont caractérisés par l'absence d'expression des récepteurs aux œstrogènes, à la progestérone et au facteur de croissance épidermique humain 2. Compte tenu de l'absence de thérapie ciblée spécifique, la chimiothérapie reste leur seul traitement. Malgré une bonne réponse initiale, près de la moitié des patientes n'obtiennent pas de réponse pathologique complète et développent une chimiorésistance puis une rechute tumorale rapide, souvent dans les 3 ans. De multiples études ont cherché à identifier des stratégies thérapeutiques efficaces au cours des dernières années, mais aucune ne s'est avérée efficace sur l'ensemble de ces patientes. Il s'avère en effet que le CSTN est lui-même un sous-groupe particulièrement hétérogène. La stratification des patientes CSTNs est donc une étape essentielle pour améliorer le parcours de soins. Des biomarqueurs prédictifs de la récurrence métastatique sont donc cruciaux. Ainsi, l'objectif général de cette thèse était de caractériser l'expression génique des carcinomes mammaires triple négatifs capables de métastaser, afin de contribuer à comprendre les mécanismes mis en jeu et créer des outils pour les identifier.

26 échantillons de CSTN ont été sélectionnés au Centre Jean Perrin pour la complétude de leur suivi clinique sur 5 ans. Leur profil d'expression génique a été analysé par RNA-Seq. Parmi les 1309 gènes différentiellement exprimés entre les tumeurs qui ont évolué en métastases et celles qui ont répondu à la chimiothérapie, le rôle de SHISA3 a été étudié *in vitro* et *in vivo*. Nos résultats font de lui un gène suppresseur de tumeur, candidat pour servir de cible thérapeutique.

En combinant ces données à 39 profils d'expression supplémentaires issus du programme TCGA, nous avons développé une signature moléculaire pronostique, prédictive du risque métastatique avec une valeur clinique, qui permet de classer les patientes atteintes de CSTN en faible et haut risque de rechute métastatique.

Dans son ensemble, notre travail ouvre la voie au développement de traitements personnalisés du CSTN afin d'améliorer la prise en charge des patientes.

Title: Metastatic relapse of triple negative mammary carcinomas: Identification of a prognostic transcriptomic signature and new role of SHISA3

Keywords: Triple negative breast cancer, Metastases, Molecular signature, Biomarker, Prognosis.

Summary: Triple-negative breast cancers (TNBC), representing 10% to 20% of breast cancer diagnoses, are characterized by the lack of estrogen, progesterone, and human epidermal growth factor 2 receptor expression. Due to the absence of specific targeted therapy, chemotherapy remains their standard treatment. Despite a good initial response, nearly half of patients do not obtain a complete pathological response and develop drug resistance followed by rapid tumor relapse, often within 3 years. Multiple studies have sought to identify effective therapeutic strategies over the past few years, but none have been shown to be effective for all these patients. It turns out that TNBC itself is a particularly heterogeneous subgroup. Stratifying TNBC patients is therefore an essential step in improving the care pathway. Biomarkers prediction of metastatic recurrence is therefore crucial. Thus, the general objective of this thesis is to characterize the gene expression profile of metastatic TNBC, in order to understand the involved mechanisms and to create tools to identify them.

26 TNBC samples were selected at the Jean Perrin Center for their completed clinical follow-up over 5 years. Their gene expression profile was analyzed by RNA-Seq. Among the 1309 genes differentially expressed between tumors that progressed to metastasize and those that responded to chemotherapy, the role of SHISA3 was studied *in vitro* and *in vivo*. Our results define SHISA3 as a tumor suppressor gene, a candidate to serve as a therapeutic target.

By combining JPC data with 39 additional expression profiles from the TCGA dataset, we have developed a molecular prognostic signature, predictive of metastatic risk with high clinical value. This signature allows the classification of TNBC patients into low- and high-risk groups of metastatic relapse.

Overall, our work paves the way for the development of personalized treatments for TNBC in order to improve patient care.

Sommaire

SOMMAIRE	7
I. CANCER	11
A. LA CANCEROGENESE : UN PROCESSUS EN PLUSIEURS ETAPES	11
B. HALLMARKS OF CANCER :	12
II. LA TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE TEM	17
A. HISTORIQUE ET DEFINITION :	17
B. LES TYPES DE TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE :	18
1. TEM de type 1 - Développement embryonnaire et organogénèse.....	18
2. TEM de type 2 - Réparation Tissulaire et Fibrose.....	19
3. TEM de type 3 - Contribution à la progression tumorale.....	19
C. LES MARQUEURS CELLULAIRES DE LA TEM.....	20
D. REGULATION DE LA TEM	21
1. Stimulus extérieurs de la TEM.....	21
2. Les voies de signalisation régulant la TEM :	22
3. Les facteurs de transcription impliqués dans la TEM :.....	27
4. L'épigénétique :.....	29
III. CANCER DU SEIN	31
A. DEFINITION	31
B. EPIDEMIOLOGIE	31
C. ANATOMIE DU SEIN	31
D. CLASSIFICATION DU CANCER DU SEIN :	32
1. Classification anatomo-histopathologique :.....	32
2. Classification transcriptomique / moléculaire du cancer du sein :.....	34
3. Classification immunohistochimique du cancer du sein :.....	38
IV. CANCER DU SEIN TRIPLE NEGATIF	40
A. CLASSIFICATION DES CSTNS	40
B. TRAITEMENTS DES CSTNS	42
1. La chirurgie	43
2. La chimiothérapie	43
3. La radiothérapie.....	44
4. Les thérapies ciblées	44
V. LES BIOMARQUEURS DANS LES CSTNS	48

A. DEFINITION	48
B. CLASSIFICATION EN FONCTION DE L'APPLICATION CLINIQUE POTENTIELLE :	50
1. <i>Les biomarqueurs diagnostiques</i> :	50
2. <i>Les biomarqueurs pronostiques</i> :	50
3. <i>Les biomarqueurs prédictifs</i> :	51
C. BIOMARQUEURS VISIBLES DIRECTEMENT SUR LE TISSU TUMORAL :	51
1. <i>Des biomarqueurs génétiques</i> :	51
2. <i>Des biomarqueurs transcriptomiques</i> :	53
4. <i>Des biomarqueurs protéiques</i> :	56
5. <i>Des biomarqueurs épigénétiques</i> :	56
6. <i>Les cellules souches biomarqueurs des CSTNs</i>	58
D. BIOMARQUEURS EXTRA-TUMORAUX :	59
V. SIGNATURES MOLECULAIRES	62
A. ONCOTYPE DX™ :	62
B. MAMMAPRINT (AGENDIA) :	63
C. ENDOPREDICT® :	64
D. PAM50 (PROSIGNA™) :	64
VI. SIGNATURES MOLECULAIRES DES CSTNS.....	66
OBJECTIFS DE LA THESE	70
ARTICLE N°1 :	72
RNA SEQUENCING REVEALS THE DIFFERENTIALLY EXPRESSION PROFILES IN METASTATIC TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER AND IDENTIFIED SHISA₃ AS AN EFFICIENT TUMOR SUPPRESSOR GENE	72
ARTICLE N°2 :	75
TRANSCRIPTOME PROFILING REVEALS A METASTATIC RELAPSE PROGNOSTIC SIGNATURE IN TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER	75
DISCUSSION	80
A. SHISA3 COMME NOUVEAU GENE SUPPESSEUR DE TUMEUR DANS LE CSTN.....	80
B. IDENTIFICATION D'UNE SIGNATURE PRONOSTIQUE DE RECHUTE METASTATIQUE DU CSTN	82
CONCLUSION	86
RÉFÉRENCES	88
ABSTRACT.....	115

INTRODUCTION GENERALE

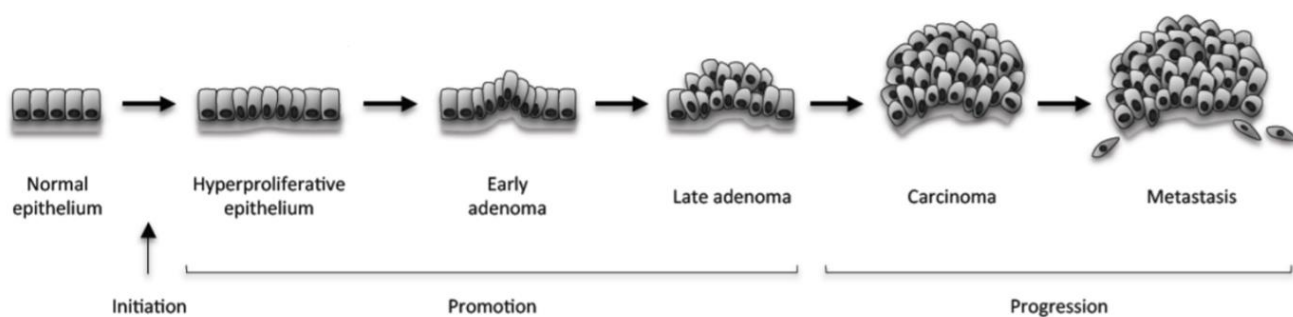


Figure 1 | Étapes de la cancérogénèse.

La cellule normale est affectée par différents agents initiant la cancérogénèse. L'entrée en phase de promotion tumorale est marquée par une prolifération aberrante. Ces cellules entrent ensuite en phase de progression, qui peut être très rapide ou durer des années, aboutissant à la formation d'un cancer diagnostiqué. Dans certains cas le cancer développe des métastases à distance.

I. Cancer

Le cancer est une cause majeure de décès dans le monde, avec près de 10 millions par an (Globocan 2018). Le terme "cancer" englobe plus de 100 maladies différentes, toutes caractérisées par une prolifération incontrôlée de cellules et la propagation anarchique de cellules anormales dans l'organisme. La maladie évoluant le plus souvent rapidement, des outils efficaces, sensibles et robustes favorisant le dépistage, la détection précoce, le diagnostic, le pronostic et le traitement du cancer sont indispensables à une prise en charge optimale des patients. Le développement du cancer au sein de l'organisme ne se fait cependant pas de manière instantanée. Une combinaison d'évènements cellulaires incontrôlés induit un long processus conduisant à la transformation d'un tissu physiologique en un tissu cancéreux. Une exposition à des agents carcinogènes externes (chimiques, physiques, viraux, ...), éventuellement combinée à une prédisposition héréditaire, constituent le point de départ du mécanisme de carcinogenèse. Des cellules normales vont alors acquérir des capacités distinctives et se transformer en cellules cancéreuses développant ainsi une tumeur. L'évolution de ces tumeurs peut les conduire à s'échapper de leur site primaire et à former des métastases dans différents organes de l'organisme. Dans le cadre de cette thèse, nous nous concentrerons plus particulièrement sur le cas du cancer du sein, et notamment sur la caractérisation du mécanisme d'échappement métastatique, dans le but d'améliorer la prise en charge des patientes.

A. La cancérogenèse : un processus en plusieurs étapes

La cancérogenèse nécessite de multiples changements au sein de la cellule. La cellule transite par trois phases principales avant de devenir cancéreuse : une phase d'initiation, une phase de promotion et une phase de progression, chacune divisée en plusieurs étapes impliquant de nombreux changements génétiques (Figure 1).

L'initiation implique l'induction d'altérations stables et irréversibles dans une cellule, qui sont souvent des événements mutationnels. Les agents chimiques, les virus, les rayonnements sont les facteurs d'initiation tumorale somatiques. Les prédispositions génétiques conduisent à une initiation constitutionnelle. Cette étape aboutit à la production d'une cellule initiée. Les gènes cibles sont des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeur. La plupart du temps, les mécanismes de réparation cellulaire sont capables de corriger l'erreur. Mais en cas d'altération de ces mécanismes, la cellule reste endommagée et passe à l'étape suivante.

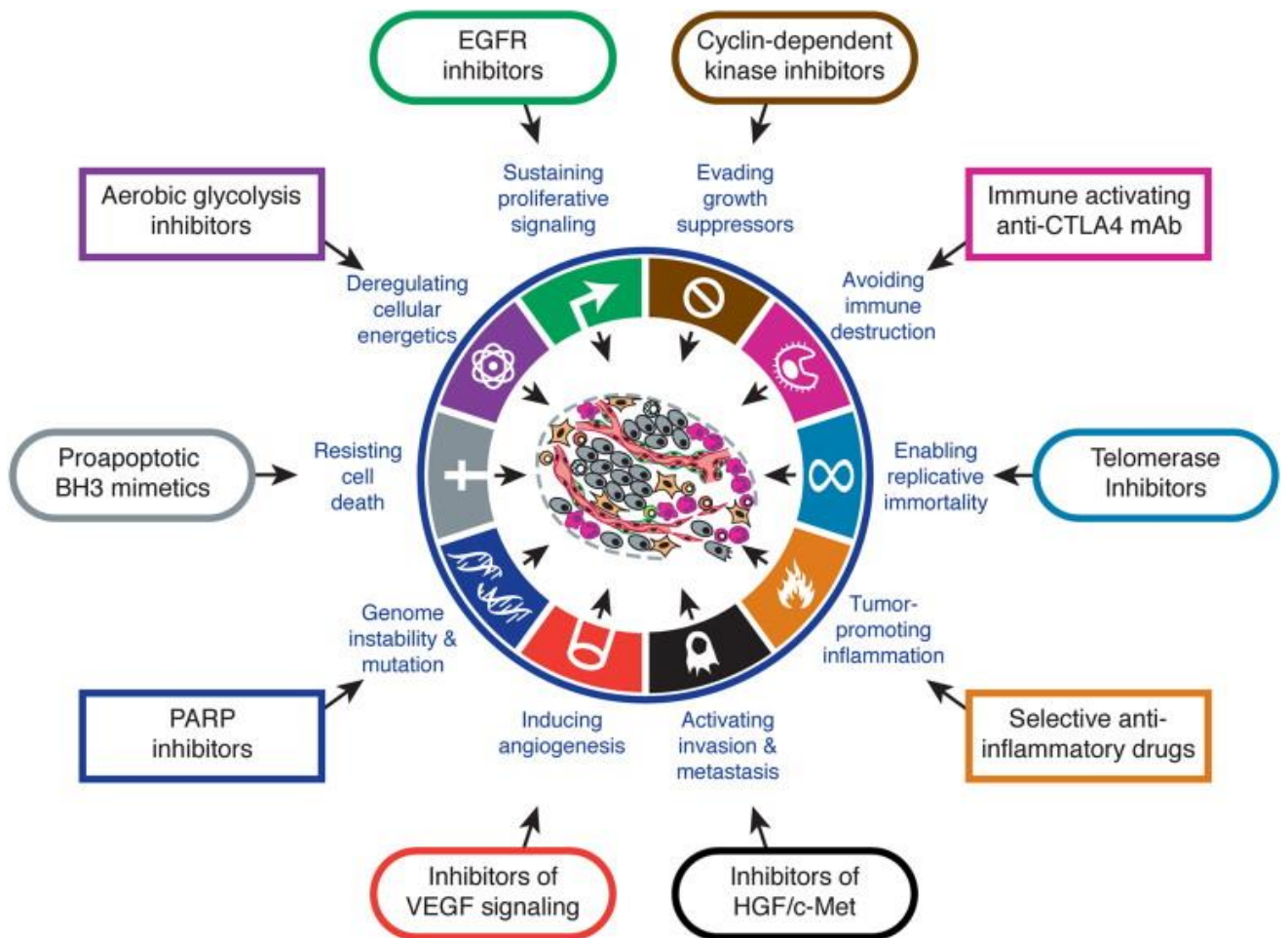


Figure 2 | Les caractéristiques du cancer « Hallmarks of cancer ».

Les caractéristiques des cellules cancéreuses sont des capacités acquises. À l'origine, six caractéristiques ont été définies : l'autosuffisance en signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance, la perte d'apoptose, le potentiel de réplication illimité, l'induction de l'angiogenèse, la capacité à former des métastases. Deux caractéristiques supplémentaires ont été décrites plus récemment : la dérégulation du métabolisme énergétique cellulaire et la résistance à la destruction immunitaire. Deux caractéristiques habilitantes ont également été ajoutées : l'instabilité du génome et l'inflammation (*Hanahan et Weinberg ; 2011*).

La cellule entre alors en phase de **promotion** durant laquelle la cellule initiée se multiplie de manière clonale en une tumeur visible. L'étape de promotion concerne des agents qui vont agir sur des mécanismes de prolifération cellulaire, sur la signalisation inter-cellulaire, et sur les mécanismes de cytotoxicité. Ces agents sont nommés promoteurs et incluent la nutrition, l'alcool, le tabagisme, les infections, l'âge et les hormones.

La dernière phase est l'étape de **progression** durant laquelle les cellules prolifèrent. C'est à cette étape de croissance tumorale que des symptômes comme la fatigue ou les douleurs commencent à apparaître. La tumeur modifie alors son microenvironnement par remodelage de la matrice extracellulaire (MEC) et développement d'une vascularisation alimentant la tumeur. Dans certains cas, certaines cellules tumorales peuvent quitter la tumeur primaire pour envahir des sites secondaires et former des métastases. Suite à ces différentes étapes, les tumeurs ont acquis des changements phénotypiques caractéristiques.

B. Hallmarks of cancer :

Au cours des deux dernières décennies, de nombreuses études ont été réalisées dans le but d'améliorer la compréhension de la biologie du cancer et des événements moléculaires impliqués dans son développement. En 2000, Hanahan et Weinberg ont proposé six caractéristiques distinctives et majeures du cancer permettant à une cellule normale de se transformer en une cellule maligne (Figure 2). Ces caractéristiques ouvrent la voie à l'identification de nouveaux biomarqueurs et à une meilleure optimisation des stratégies thérapeutiques. Ces caractéristiques ont été actualisées en 2011 avec l'identification de deux capacités distinctives émergentes supplémentaires : la reprogrammation du métabolisme énergétique cellulaire et l'échappement à la destruction immunitaire. Les auteurs ont également ajouté deux caractéristiques habilitantes : l'instabilité du génome et l'inflammation (Figures 2 et 3). Chacune de ces caractéristiques représente différentes cibles thérapeutiques potentielles, limitant la croissance et la progression tumorale et plusieurs d'entre elles sont en cours d'évaluation à l'occasion d'essais cliniques. Certains médicaments interférant avec une voie particulière peuvent avoir un effet sur plusieurs caractéristiques de cancer ¹.

1. L'autosuffisance en signaux de croissance

Contrairement aux cellules normales qui contrôlent soigneusement leur cycle de croissance et division cellulaire, les cellules tumorales maîtrisent leur propre destin en acquérant une capacité de prolifération exceptionnelle. La compréhension de la dérégulation de la production

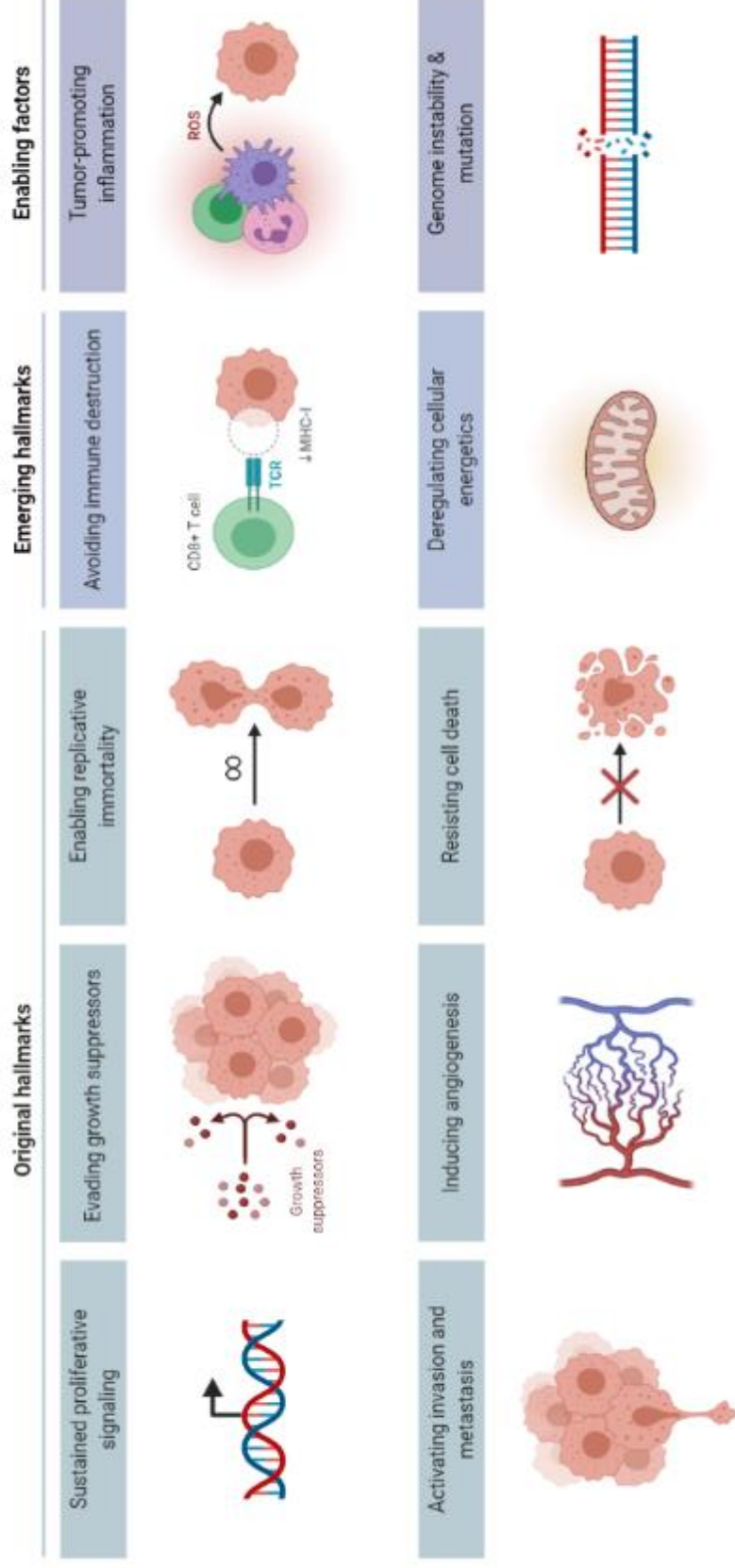


Figure 3 | Les caractéristiques du cancer « Hallmarks of cancer ».

Les caractéristiques des cellules cancéreuses sont des capacités acquises. À l'origine, six caractéristiques ont été définies : l'autosuffisance en signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance, la perte d'apoptose, le potentiel de réplication illimité, l'induction de l'angiogenèse, la capacité à former des métastases. Deux caractéristiques supplémentaires ont été décrites plus récemment : la dérégulation du métabolisme énergétique et la résistance à la destruction immunitaire. Deux caractéristiques habilitantes ont également été ajoutées : l'instabilité du génome et l'inflammation (Hanahan et Weinberg ; 2011). *Illustration BioRender*

et de la libération des signaux promoteurs de la croissance cellulaire responsable de ce pouvoir prolifératif aberrant reste toujours floue. Deux mécanismes peuvent y contribuer, seuls ou en combinaison : une production autonome incontrôlée de facteurs de croissance par les cellules tumorales aboutissant à une stimulation proliférative autocrine ou paracrine ; et une surexpression et/ou altération structurale des récepteurs cellulaires conduisant à une surinterprétation de signaux de prolifération normaux. De plus, des altérations en aval des récepteurs aux facteurs de croissance peuvent également être impliquées. Ces altérations prennent la forme de mutations somatiques induisant l'activation constitutive des voies de signalisation en aval, ou l'inhibition des mécanismes normaux de rétrocontrôle négatif de la prolifération.

2. L'insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance

Afin de continuer à proliférer d'une manière incontrôlée, les cellules cancéreuses doivent échapper aux nombreux signaux antiprolifératifs responsables l'homéostasie tissulaire. Des dizaines de gènes se chargent de bloquer la progression du cycle cellulaire et/ou d'activer l'apoptose. Anti-oncogènes, nombre d'entre eux répondent à la définition de gènes suppresseurs de tumeur. De nombreuses mutations somatiques ou constitutionnelles de ces gènes ont été corrélées au développement de tumeurs. Comme ils partagent souvent leurs voies de signalisation en aval, il est encore une fois important de considérer les altérations en aval de ces gènes.

3. L'inactivation de l'apoptose

L'apoptose est une mort cellulaire programmée, orchestrée par deux classes de composants, capteurs et effecteurs. Les capteurs détectent les anomalies dans l'environnement extra et intracellulaire, telles que les dommages à l'ADN alors que les effecteurs sont responsables d'induire une réponse apoptotique. L'inactivation de ces deux éléments dans les cellules cancéreuses leur permet d'éviter l'initiation de l'apoptose. L'inactivation de la protéine suppresseur de tumeur p53 est l'exemple le plus fréquemment observé dans cette catégorie car il s'agit d'un composant clé, au carrefour du système de détection des dommages à l'ADN et de la régulation appropriée de l'apoptose. Les recherches ont confirmé que les cellules cancéreuses disposent de mécanismes anti-apoptotiques leur permettant d'échapper à l'apoptose ou de réduire la production et/ou les effets des protéines pro-apoptotiques.

4. Le potentiel de réplication illimité

Les cellules différenciées normales disposent d'un nombre limité et programmé de cycles de croissance et de divisions cellulaires, constituant une barrière efficace à la prolifération anarchique. Cette barrière s'appuie sur deux mécanismes principaux : la sénescence et l'apoptose. Le "décompte" des divisions déjà réalisées par une cellule se base sur le raccourcissement des télomères qui intervient à chaque réplication de l'ADN. Lorsque les télomères atteignent une taille minimale, ils enclenchent alors la sénescence. L'immortalisation observée chez les cellules cancéreuses peut être attribuée au maintien de la longueur des télomères par une forte ré-expression des télomérases habituellement inactives dans les cellules différenciées ou par un mécanisme de recombinaison des télomères.

5. L'induction de l'angiogénèse

L'angiogénèse se définit par un processus complexe en plusieurs étapes conduisant à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins destinés à répondre aux besoins métaboliques importants de la tumeur. Comme toutes les cellules de l'organisme, les cellules cancéreuses nécessitent un approvisionnement abondant en oxygène et en nutriments pour leur croissance ainsi qu'une filière d'évacuation des déchets. La prolifération excessive des cellules tumorales induit des besoins métaboliques supplémentaires. De ce fait, de nouveaux vaisseaux sanguins sont nécessaires afin de soutenir la croissance tumorale. Dans ce but, les cellules cancéreuses disposent de deux stratégies d'activation en continu de l'angiogénèse : production des facteurs pro-angiogéniques tels que le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) ou inhibition/séquestration des facteurs anti-angiogéniques tels que l'endostatine ¹.

6. La dérégulation du métabolisme énergétique cellulaire

La reprogrammation du métabolisme énergétique cellulaire, récemment considérée comme une caractéristique centrale du cancer, aboutit à une augmentation de la production d'énergie représentée par l'adénosine triphosphate (ATP). Une cellule saine tire principalement son énergie de la respiration, efficace énergétiquement mais grande consommatrice d'oxygène. La reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses oriente le métabolisme vers la fermentation diminuant ainsi la production totale d'énergie mais favorisant une production en toute circonstance. Cet effet nommé "Warburg" compense le mauvais rendement énergétique de la fermentation par une augmentation de l'entrée de glucose dans la cellule. Ce mécanisme adaptatif s'impose dans le but de soutenir la demande d'énergie accrue et d'alimenter la croissance et la division rapide des cellules cancéreuses.

7. La résistance aux attaques immunitaires

Le système immunitaire est responsable de la défense et de la résistance envers les cellules du "non-soi" reconnues comme anormales. Les cellules cancéreuses acquièrent une septième caractéristique leur permettant d'échapper à cette surveillance immunitaire ou, lorsqu'elles sont ciblées, de limiter l'efficacité de la destruction immunologique. Différentes études ont décrit les mécanismes immunosuppresseurs des cellules cancéreuses. Il peut s'agir de désactiver plusieurs composants immunitaires via la sécrétion de facteurs immunosuppresseurs. Une autre approche passe par le recrutement de cellules inflammatoires activement immunosuppressives : l'inflammation locale devient alors synonyme d'inactivité immunitaire. Des études *in vivo* ont démontré que les cancers se développent plus fréquemment, plus rapidement et avec plus des métastases chez les souris immunodéficientes en lymphocytes NK ou en lymphocytes T cytotoxiques CD8^{1,2}.

8. L'inflammation

Les cellules cancéreuses détournent les mécanismes inflammatoires pour favoriser leur propre croissance et survie. La mission normale d'une réponse inflammatoire est de détruire les envahisseurs étrangers. Pour cela, elles sécrètent des facteurs pro-survie et pro-migration, ainsi que des enzymes de modification de la matrice extracellulaire, afin d'attirer leurs semblables. Dans le cas du cancer, les cellules tumorales détruisent les cellules immunitaires anti-infectieuses. Débarrassées de leur capacité lytique, les cellules inflammatoires deviennent donc des alliés de la tumeur, en leur fournissant des facteurs favorisant la croissance tumorale, l'angiogenèse, l'invasion et *in fine* les métastases. Ainsi, l'inflammation à un stade précoce de cancer peut favoriser la progression tumorale tout en évitant son attaque par le système immunitaire.

9. L'instabilité du génome

Les cellules profitent de systèmes de surveillance et de maintenance complexes permettant la réparation de l'ADN et évitant l'accumulation des mutations. La perte d'un ou plusieurs de ses composants de maintenance génomique augmente considérablement la mutabilité du génome. Cette instabilité est un acteur central dans l'acquisition des caractéristiques du cancer. Bien que les mutations interviennent de manière aléatoire, plus elles sont nombreuses, plus elles ont de chances d'intervenir au niveau de gènes de division cellulaire et de suppresseurs de

tumeur. Leur accumulation dans ces gènes affecte l'homéostasie des cellules cancéreuses et leur procure progressivement une capacité de prolifération incontrôlée.

10. La capacité à former des métastases

Les carcinomes provenant des tissus épithéliaux se caractérisent par des grades de malignité pathologiques plus élevés et des métastases à distance plus fréquentes. Au cours du développement d'un carcinome malin, des cellules pionnières sortent des tumeurs pour coloniser de nouveaux tissus dans lesquels l'espace et les nutriments ne sont pas limitants. Pour les patients, l'apparition de métastases est associée à un mauvais pronostic et une survie réduite. Ces cellules cancéreuses migrantes développent des altérations dans leur forme leur permettant de s'échapper de leur emplacement principal pour envahir les tissus adjacents ou distants. Ce processus d'invasion complexe se déroule en plusieurs étapes engendrant des modifications cellulaires, altérant les adhésions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire (MEC). Ce mécanisme d'échappement métastatique se base sur une reprogrammation cellulaire et un remodelage des structures épithéliales en cellules migratrices de type fibroblaste, avec acquisition d'une capacité de locomotion et d'invasion. Ce programme, appelé "transition épithélio-mésenchymateuse" existe dans un grand nombre de types de tumeurs malignes. Il est orchestré par un panel de facteurs de transcription exprimés selon diverses combinaisons.

Ce mécanisme de propagation des cellules cancéreuses, d'une tumeur primaire vers des sites distants dans l'organisme afin de former des tumeurs secondaires, présente des conséquences dévastatrices sur les patients. Désormais, les métastases tumorales représentent en effet plus de 90% des décès liés au cancer. Récemment, la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) a été reconnue comme une étape cruciale dans la cascade métastatique. Bien que plusieurs études *in vitro* aient démontrés l'implication du processus de TEM dans la cancérogenèse, l'intérêt et la pertinence de la TEM pendant la progression des tissus cancéreux humains est resté un sujet de débat jusqu'à ces dernières années. En règle générale, pour qu'une cellule tumorale soit capable d'envahir un nouveau tissu, il faut qu'elle acquière des propriétés migratoires, en plus des caractéristiques listées ci-dessus. Ces nouvelles propriétés incluent la perte de l'expression des molécules d'adhésion cellulaire, la dissociation des cellules épithéliales voisines et la mobilité. Le chapitre suivant décrit le mécanisme de la TEM ainsi que son implication dans la progression tumorale.

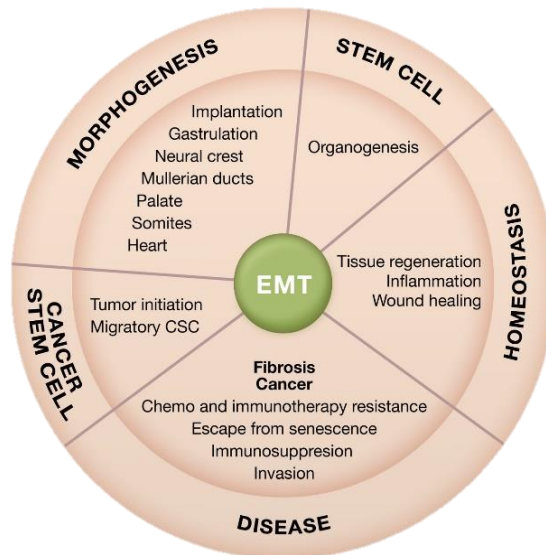


Figure 4 | Implications physiologiques et pathologiques de la transition épithélio-mésenchymateuse.

La TEM (EMT en anglais) joue un rôle majeur au cours du développement embryonnaire et de la régénération tissulaire. La réactivation ectopique de la TEM est impliquée dans diverses pathologies tels que le cancer et la fibrose (Thierry, J.P. et al. ; 2009).

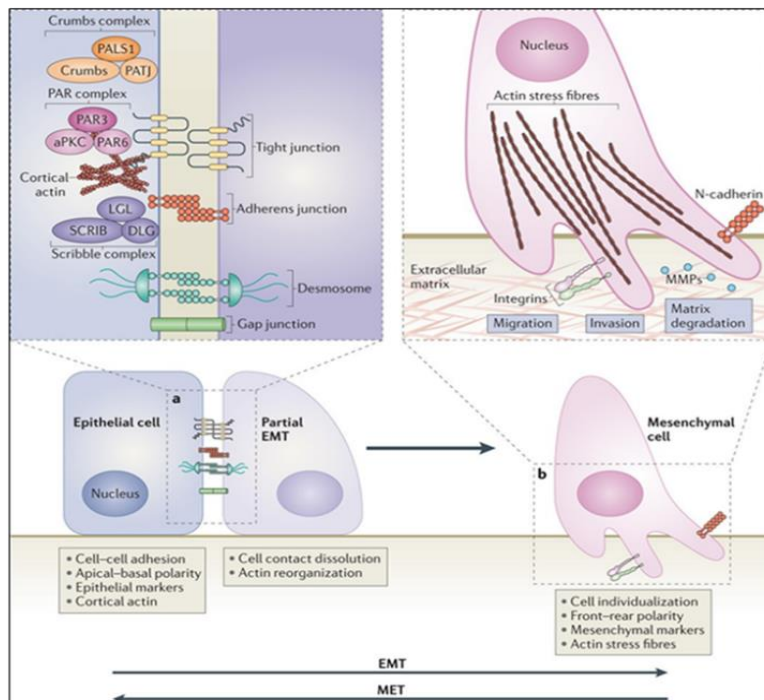


Figure 5 | Perte de l'intégrité épithéliale et acquisition de structures de migration et d'invasion.

(a) Les cellules épithéliales établissent des contacts étroits avec leurs voisines grâce à des complexes jonctionnels spécialisés : jonctions serrées, jonctions adhérentes, desmosomes ainsi que des complexes de jonction lacunaire. Tous maintiennent une communication globale au sein de la couche épithéliale. Ces cellules présentent une polarité apico-basale, une actine corticale et des marqueurs épithéliaux.

(b) Lors de l'initialisation de la TEM, ces protéines sont relocalisées et dégradées. Le cytosquelette d'actine forme des fibres de stress propices à la migration. Le profil d'expression des intégrines est modifié, modifiant ainsi l'adhésion des cellules à la MEC. La migration et l'invasion est possible grâce aux métalloprotéases sécrétées par les lamellipodes, filopodes et invadosomes (lamouille et al. ; 2014).

II. La transition épithélio-mésenchymateuse TEM

A. Historique et Définition :

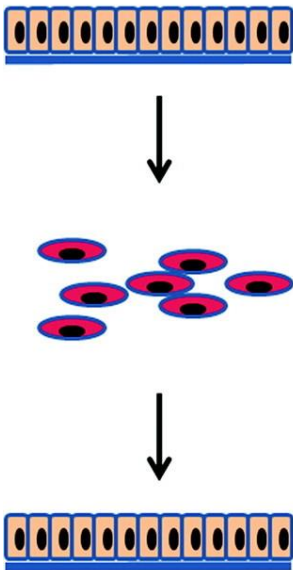
"*Omnis cellula e cellula*", a déclaré Rudolf Virchow en 1863 dans son livre "Cellular Pathology" présentant son idée de conversion des cellules chacune à partir d'une autre cellule. Cette théorie a été décrite ultérieurement par Elisabeth Hay en 1960³ dans sa description du processus de la "transformation épithélio- mésenchymateuse" sur un modèle de lignée primitive d'embryon de poulet⁴. La transformation épithélio-mésenchymateuse est décrite comme un processus embryonnaire complexe de différenciation de cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses. Le mécanisme étant réversible, le mot "transformation" a été remplacé par "transition" pour devenir le processus de transition épithélio- mésenchymateuse (TEM)^{5,6}. Dans la plupart des cas physiologiques, la TEM est suivie par le processus inverse de transition mésenchymo-épithéliale (MET).

La transition épithélio-mésenchymateuse est un processus de transdifférenciation cellulaire spécifique, transitoire et réversible, qui joue un rôle capital dans les programmes de développement de nouveaux tissus et organes, mais également dans la placentation, la fonction endométriale et la fibrose (Figure 4)⁷. Cependant, la TEM peut aussi être réactivée de manière ectopique, en condition pathologique. C'est le cas lorsqu'une blessure tissulaire ne peut être réparée correctement et qu'il y a apparition de fibrose. C'est surtout le cas de tous les carcinomes, cancers impliquant la prolifération tumorale de cellules épithéliales. Puisque les carcinomes représentent 90 % des cancers, il est important de comprendre les mécanismes qui conduisent à la transformation tumorale d'un l'épithélium.

La TEM est donc définie comme le processus permettant la transition progressive d'une cellule épithéliale adhérente, jointive, immobile, polarisée et possédant une actine corticale en une cellule mésenchymateuse, dissociée et motile (Figure 5)^{8,9}: Elle se caractérise par :

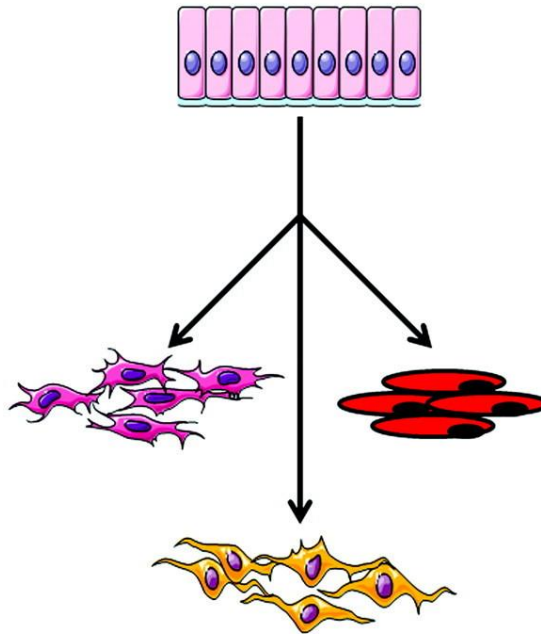
- Une substitution de l'expression des protéines épithéliales spécifiques en protéines mésenchymateuses.
- La perte des jonctions intercellulaires et de la polarité cellulaire apico-basale.
- De profonds remodelages des composants du cytosquelette, une distribution non polarisée des différents organites et une dégradation de la membrane basale support.

Developmental: Type 1 EMT



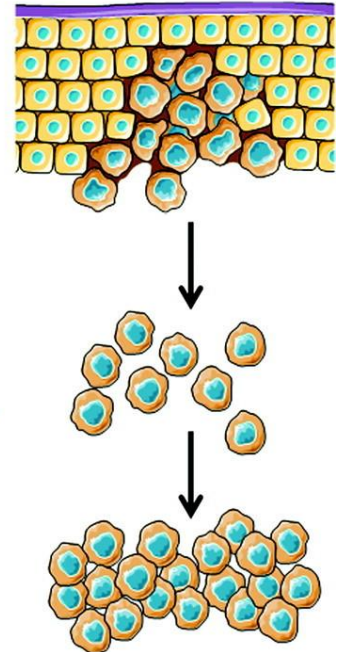
Successive waves of EMT-MET generate embryonic tissues and organs

Chronic (fibrosing) injury: Type 2 EMT



Various mesenchymal cells may be derived in the adult via EMT in the setting of chronic/fibrosing injuries

Malignancy: Type 3 EMT



Epithelial tumors (Carcinoma) acquire malignant features and metastasize via EMT

Figure 6 | Les différents types de TEM.

La TEM de type 1 est associée à l'implantation, à la gastrulation embryonnaire et à la formation d'organes. Cette TEM de type 1 peut être sous-classée en primaire (cellules donnant naissance à la TEM pour la première fois), secondaire et tertiaire. Ces dernières sont impliquées dans les vagues successives des TEM-MET conduisant à la formation définitive d'organes. Les TEM de type 2 sont réengagées dans le contexte de l'inflammation et de la fibrose. Leur implication est reconnue dans un nombre croissant de pathologies adultes chroniques avec développement de fibrose. Enfin, la transformation tumorale des épithéliums secondaires associés à de nombreux organes peut conduire à une TEM de type 3, permettant l'invasion et les métastases (Kovacic Jason C. *et al.*; 2012).

- L'acquisition d'un phénotype "fibroblastoïde" avec une forme aplatie et allongée favorable à la migration cellulaire ¹⁰.

Ces caractéristiques confèrent aux cellules une capacité de migration leur permettant de coloniser l'intérieur des tissus dont elles sont originaires. Elle permet également d'envahir de nouveaux tissus à distance par l'intermédiaire de la circulation sanguine ou lymphatique, soit sous forme individuelle soit sous forme collective en formant une chaîne de cellules en migration ^{5, 11, 12, 9, 13}. Les marqueurs cellulaires spécifiques des états épithéliaux et mésenchymateux des cellules qui ont traversé une TEM sont caractéristiques.

B. Les types de transition épithélio-mésenchymateuse :

La TEM est au cœur de processus physiologiques et pathologiques différents, dont les conséquences fonctionnelles sont très variables. Bien que les gènes et les mécanismes moléculaires impliqués soient majoritairement identiques, les différences fonctionnelles permettent de définir trois types d'EMT (Figure 6) :

1. TEM de type 1 - Développement embryonnaire et organogénèse

La TEM est un élément important des mécanismes complexes capables de former un organisme complet à partir de l'œuf fécondé unicellulaire. La TEM de type 1 est associée à la émergence de divers types de cellules au cours du développement embryonnaire, de l'organogénèse et de la différenciation de multiples tissus et organes. C'est un processus réversible qui permet aux cellules épithéliales de passer dans plusieurs cycles de TEM et de MET afin d'achever la différenciation des tissus épithéliaux secondaires et l'acquisition de la structure tridimensionnelle des organes. C'est cette organisation spatiale qui permet aux cellules épithéliales d'exercer des fonctions spécifiques aux tissus et aux cellules mésenchymateuses de jouer un rôle de soutien. L'existence de différents cycles de TEM poussent à définir 3 sous-types en fonction du nombre de fois auxquelles les cellules ont effectué la transition dans un sens, puis dans l'autre : la TEM primaire comprenant la gastrulation et la formation de la crête neurale, la TEM secondaire qui regroupe la formation de différents organes dont les somites, le pancréas, le tractus génital et le foie, et enfin la TEM tertiaire aboutissant au développement du cœur ^{8, 14}.

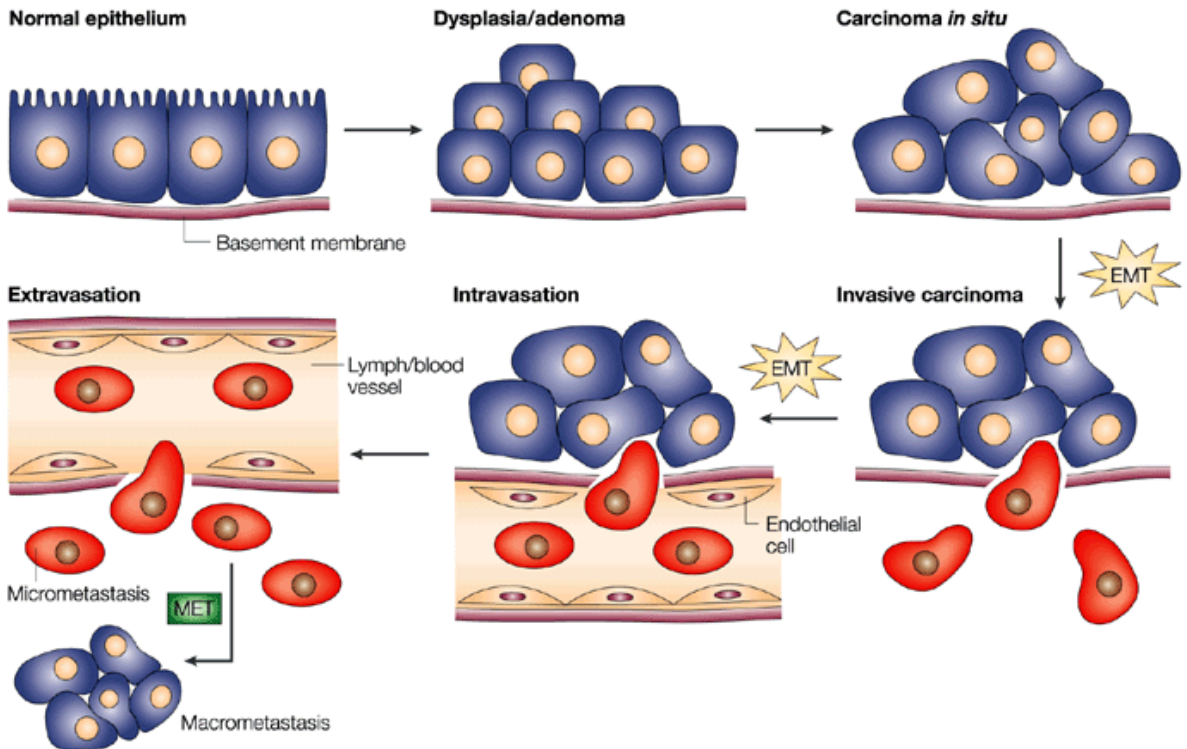


Figure 7 | Modèle d'implication de la TEM dans la progression métastatique des carcinomes.

Les épithéliums normaux bordés d'une membrane basale peuvent proliférer localement pour donner naissance à un adénome. Des changements épigénétiques et des altérations génétiques conduisent à sa transformation en un carcinome *in situ*, toujours délimité par une membrane basale intacte. Certaines cellules tumorales subissent d'autres altérations qui les engagent dans une transition épithélio-mésenchymateuse et induisent la destruction de la membrane basale puis une dissémination locale des cellules de carcinome. Les capacités de déformation de ces cellules leur permettent d'entrer les vaisseaux sanguins ou lymphatiques, dans lesquels elles seront transportées passivement vers des organes distants. Au niveau des sites secondaires, les cellules de carcinome solitaires peuvent s'extravaser et développer un nouveau carcinome par une transition mésenchymateuse-épithéliale (MET) (Thiery, JP ; 2002).

2. TEM de type 2 - Réparation Tissulaire et Fibrose

La TEM de type 2 est associée aux phénomènes de cicatrisation des plaies, de régénération tissulaire et aux pathologies fibreuses. Cette TEM implique la transition de cellules épithéliales secondaires vers des fibroblastes tissulaires résidents ou autres cellules apparentées pour reconstruire les tissus. Des signaux moléculaires pro-inflammatoires sécrétés stimulent la TEM et ses mécanismes de réparation. À la différence de la TEM 1, la TEM 2 est associée à l'inflammation. Elle génère des cellules non multipotentes mais spécifiques du tissu qui reviennent à leur état d'origine une fois le signal inflammatoire levé^{6, 15}.

3. TEM de type 3 - Contribution à la progression tumorale

Le troisième type de TEM est impliqué dans la progression du cancer. Il constitue un point difficile à suivre dans le temps et dans l'espace dans les tumeurs humaines^{16, 11}. La TEM est impliquée dans le mécanisme de conversion progressive de cellules épithéliales néoplasiques en cellules mésenchymateuses invasives. Cette évolution favorise ainsi l'invasion métastatique à travers la cascade invasion-métastase (Figure 7). Cette cascade commence par une étape de prolifération incontrôlée des cellules tumorales. Après rupture de la membrane basale, ces cellules gagnent alors une capacité d'envahissement local de la matrice extracellulaire et du stroma environnant. L'étape suivante nommée intravasation permet aux cellules tumorales de franchir les barrières de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques et de se répandre dans la circulation systémique. Seules quelques cellules cancéreuses circulantes sont capables de survivre dans la circulation et d'extravaser à travers l'endothélium capillaire au niveau des organes cibles. L'étape de colonisation se poursuit après la dégradation et l'invasion de la matrice extracellulaire des organes métastatiques. Les cellules réacquièrent alors leur phénotype épithélial grâce au mécanisme inverse de transition mésenchymo-épithéliale (TME). Cela leur permet de proliférer en micro-métastases puis de donner naissance aux tumeurs secondaires malignes à distance (Figure 7). Preuve du caractère réversible de la TEM, les colonies secondaires établies par les cellules migratrices ressemblent, au niveau histopathologique, à la tumeur primaire dont elles sont issues, sans conserver de traits mésenchymateux^{16, 12, 17, 18, 19}.

Ce type de TEM joue donc un rôle important dans la progression tumorale et la dissémination métastatique en conférant aux cellules le potentiel de migrer et de former des tumeurs secondaires sur d'autres sites par le processus de TME. L'induction d'une TEM "totale" est nécessaire pour la transition complète en un phénotype mésenchymateux et invasif

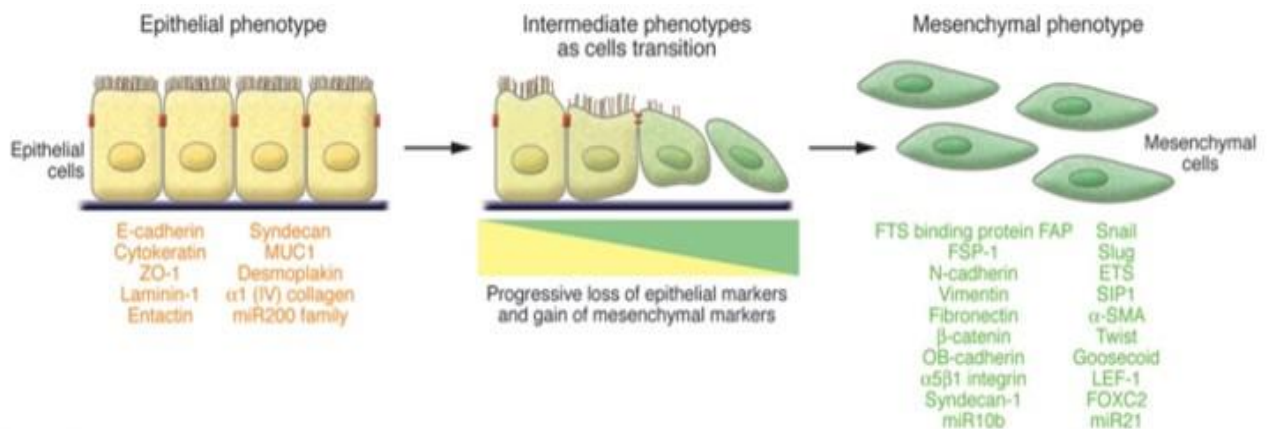


Figure 8 | Marqueurs cellulaires épithéliaux et mésenchymateux.

Les cellules épithéliales expriment des marqueurs spécifiques tels que l'E-cadhérine, la zona occludens 1 (ZO-1) et la mucine 1 (MUC1). Ces marqueurs seront progressivement remplacés par des marqueurs mésenchymateux comme la N-cadhérine et la vimentine. La colocalisation de ces deux ensembles de marqueurs distincts définit un phénotype intermédiaire, indiquant que les cellules n'ont traversé que partiellement une TEM (Kalluri et Weinberg ; 2009)

alors que la TEM "partielle" est à l'origine d'un spectre de phénotypes intermédiaires, appelés états métastables. La co-expression simultanée de marqueurs épithéliaux et mésenchymateux est la caractéristique principale des cellules dans cet état. La TEM est donc un mécanisme crucial dans l'évolution métastatique des cellules cancéreuses. À ce titre, de nombreuses études se concentrent sur la compréhension des caractéristiques de la TEM afin d'incorporer ses éléments clés dans les stratégies thérapeutiques, les classifications des patientes et/ou les prédictions de la survenue de la maladie. La TEM de type 3 est le type que je discuterai plus en détails, en lien avec mon projet doctoral consacré à la compréhension du mécanisme d'échappement métastatique d'un sous-type des cancers du sein.

C. Les marqueurs cellulaires de la TEM

Afin qu'une cellule épithéliale acquière ces capacités exceptionnelles de migration et d'invasion et traverse les différentes étapes de la TEM, plusieurs événements moléculaires clés sont nécessaires pour effectuer une reprogrammation cellulaire massive (Figure 8) ⁹. L'initiation de la TEM commence par une perte des jonctions cellule-cellule (jonctions serrées, adhérentes et desmosomes), liée à la déconstruction et/ou dégradation de ces protéines de jonction. Cette dissolution des jonctions cellulaires s'accompagne d'une diminution de l'expression des claudines et des occludines, une augmentation des zonula occludens 1 (ZO1) ²⁰ et une destruction de la cadhérine épithéliale, E-cadhérine. Cette perte progressive de la E-cadhérine est compensée par une expression accrue de la cadhérine neurale mésenchymateuse (N-cadhérine) et de la fibronectine ^{21, 22}. Cette modification de l'adhésion cellulaire favorise de la capacité migratoire. En parallèle, une réorganisation du cytosquelette permet aux cellules de bénéficier d'un allongement dynamique et d'une motilité directionnelle ^{23, 24, 25}. La composition du filament intermédiaire, caractéristique des cellules épithéliales, change avec la répression des cytokératines et l'activation de l'expression de la vimentine ²¹. Ces changements incluent une augmentation de l'expression de l'actine des muscles lisses (α -SMA) conférant aux cellules de nouvelles projections membranaires riches en actine (les lamellipodes et les filopodes) facilitant ainsi le mouvement cellulaire ^{26, 27}. De plus, une expression *de novo* de la protéine spécifique des fibroblastes FSP-1 dans l'épithélium est associée à une capacité migratoire accrue ²⁸. A noter que des changements dans la composition de la matrice extracellulaire (MEC) sont indispensables à une migration facilitée des cellules. L'initiation et la progression de la TEM nécessite un remodelage de la MEC et des modifications des

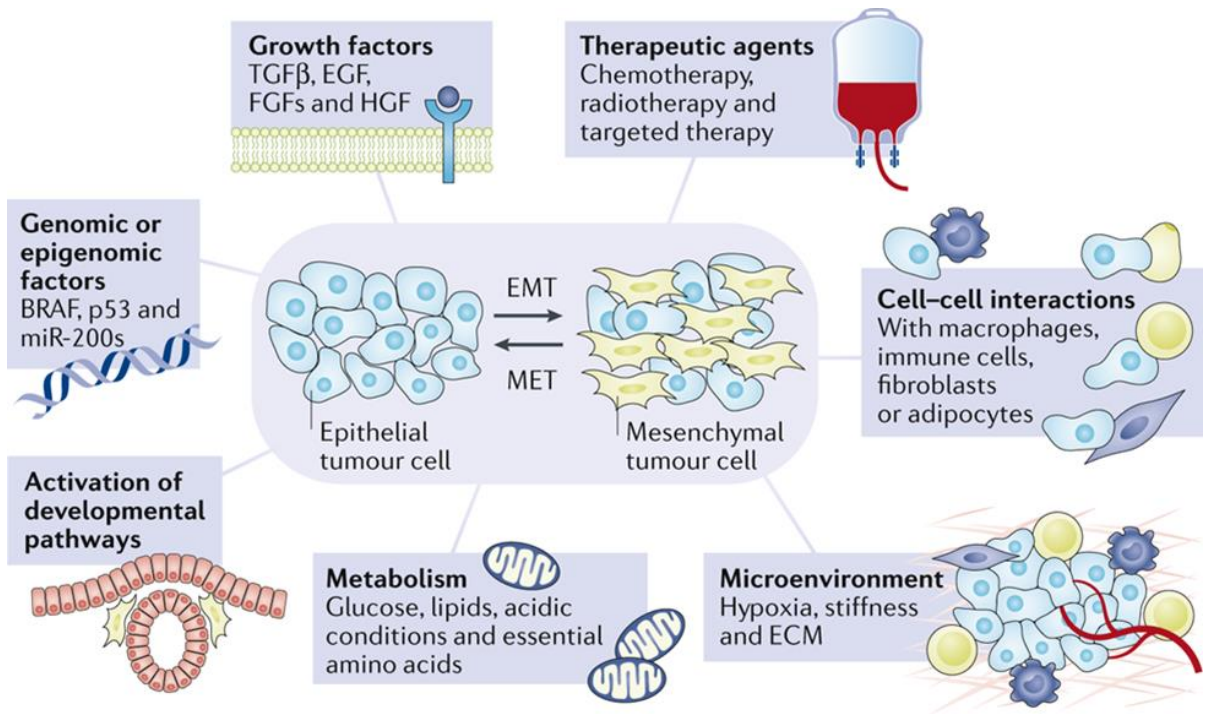


Figure 9 | Différents stimulus extérieurs induisent la TEM

De nombreuses catégories de facteurs sont connues pour induire une TEM et leur inhibition ou élimination pourrait favoriser le processus inverse MET. Les cellules micro-environnementales, les cellules inflammatoires, la croissance rapide de la tumeur primaire, la MEC et l'hypoxie peuvent activer la TEM dans divers types de tumeurs. Les agents thérapeutiques peuvent également favoriser la TEM (*Williams et al; 2019*).

interactions cellulaires avec la MEC. Ceci se déroule par la dégradation localisée de la MEC ainsi que la synthèse des cellules subissant la TEM des composants de la MEC comme la fibronectine et le collagène de type 1 améliorant le remodelage de la MEC en une matrice avec une composition et des propriétés différentes^{24, 29, 30}. De plus, grâce à la TEM, les cellules cancéreuses gagnent une série de propriétés « stem-like », augmentant l'agressivité du cancer.

D. Régulation de la TEM

1. Stimulus extérieurs de la TEM

La source d'un carcinome *in situ* est une prolifération primaire de cellules tumorales épithéliales. Différents programmes de régulation de la TEM ont été décrits dans la littérature orchestrant un réseau complexe des mécanismes. Ces processus sont conservés de manière évolutive avec des caractéristiques moléculaires spécifiques en fonction de conditions biologiques précises. En réponse aux différents éléments, l'activation des voies de signalisation régulatrices confère aux cellules tumorales des caractéristiques invasives affectant leur interaction cellulaire, la dynamique de leur cytosquelette ou leur interaction avec la MEC environnante. Divers déclencheurs extracellulaires s'intègrent dans un "crosstalk" des voies de signalisation intracellulaire contrôlant ainsi la TEM. Généralement, la combinaison de différents signaux est nécessaire pour induire le processus de TEM : un premier signal permet de déclencher le processus qui sera maintenu à l'aide d'autres signaux. Ces régulateurs peuvent être classés en plusieurs catégories (Figure 9). L'absence de l'un ou de plusieurs d'entre eux peut induire le processus inverse la TME.

- Le microenvironnement tumoral joue un rôle pivot dans le comportement biologique et clinique du cancer^{1,31}. Ce stroma tumoral représente un réseau complexe et dynamique nouant d'importantes interactions avec les cellules tumorales^{31,32}. Le microenvironnement tumoral est constitué de plusieurs sous populations cellulaires dont les cellules tumorales, les cellules bénignes, les cellules immunitaires, les macrophages associés aux tumeurs et les fibroblastes, tous en contact avec la matrice extracellulaire³³. Une caractéristique spécifique du microenvironnement tumoral, appelée la réaction stromale, conduit les cellules microenvironnementales à sécréter des facteurs activateurs de la TEM, essentiels à la croissance tumorale et au développement de métastases³⁴.

- Des études ont montré que les gènes d'hypoxie jouent un rôle non seulement dans l'hétérogénéité tumorale mais aussi dans l'activation de la TEM³⁵. En effet, en conditions d'hypoxie et de pH bas, les majeures voies de signalisation de la TEM sont activées par le microenvironnement tumoral et induisent la prolifération cellulaire et la production de métastases.

- Les cellules inflammatoires jouent un rôle majeur dans la sécrétion de facteurs d'activation. Par exemple, NF-κB, un régulateur clé de la réponse inflammatoire, est un activateur fort des facteurs de transcription de la TEM^{36,37,38}. Il a également été suggéré que les macrophages apportent un soutien particulier aux cellules individualisés post-TEM facilitant leur passage dans la circulation sanguine. L'influence de la voie NF-κB sur la TEM sera décrite dans le paragraphe suivant.

- Une autre caractéristique du microenvironnement tumoral stimulant le processus de la TEM est la rigidité de la matrice extracellulaire MEC. Plusieurs études ont démontré que cette rigidité tissulaire joue un rôle important dans la progression tumorale. La composition en différentes fibres de collagène, ainsi que leur organisation, régulent par exemple la progression du cancer du sein^{39,40,41,86}.

- La croissance rapide d'une tumeur primaire engendre des contraintes mécaniques et métaboliques du microenvironnement qui pourraient participer à l'induction de la TEM^{42,43,44}.

- Un dernier stimulus externe pourrait venir des agents thérapeutiques utilisés pour limiter la progression des tumeurs et améliorer la survie des malades⁴⁵. Des études ont montré un avantage de croissance sélective en présence de médicaments pour une population de cellules cancéreuses hétérogènes disposant la TEM⁴⁶. Toutes les cellules résistantes au traitement ne présentent pas un phénotype de TEM mais la disparition de certaines populations semble favoriser la transition d'autres populations. Dans divers cancers, notamment celui du sein, la résistance aux agents thérapeutiques s'accompagne fréquemment de la TEM^{47,48,49,50,51,52}.

2. Les voies de signalisation régulant la TEM :

Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans la régulation de la TEM. Ces voies signalent à travers des cascades de kinases intracellulaires pour induire des facteurs de transcription qui activent l'expression des gènes effecteurs de la TEM. D'autres voies régulent la TEM en assurant le remodelage du cytosquelette et l'organisation des jonctions cellulaires.

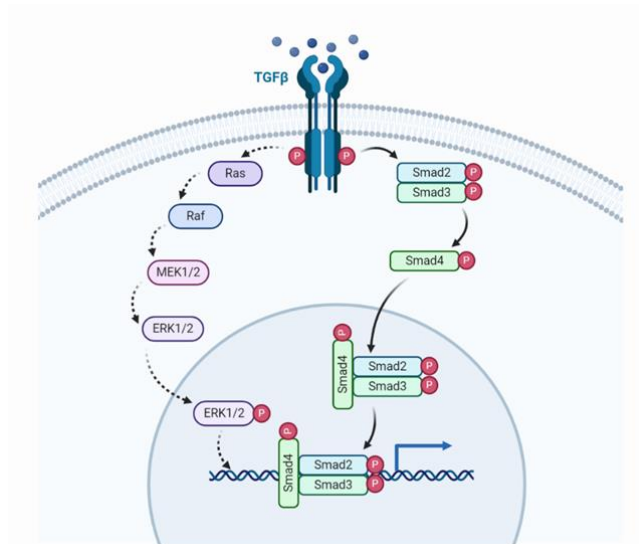


Figure 10 | Représentation schématique de la voie de signalisation TGF- β .

La liaison des ligands du TGF- β aux récepteurs TGF- β R active diverses voies de signalisation, y compris celles médiées par SMAD2/3, Ras et PI3K. Ces voies de signalisation activent des facteurs de transcription qui induisent l'expression de gènes codant pour des facteurs de transcription induisant la TEM. *Illustration BioRender*

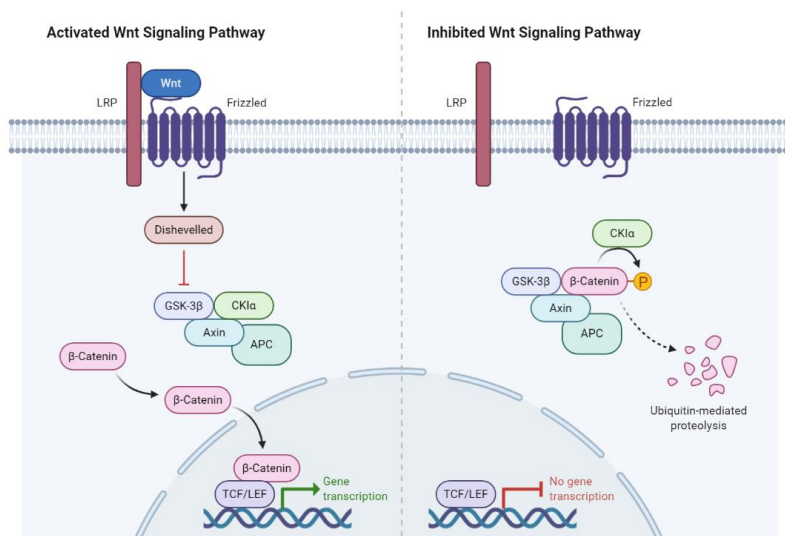


Figure 11 | Représentation schématique de la voie de signalisation Wnt.

Côté droit: La signalisation Wnt est inactive en l'absence de ligand Wnt sur le récepteur Frizzled. Le complexe de destruction peut ainsi être formé et phosphoryle la β -caténine cytosolique constitutivement, conduisant à une dégradation protéasomale. Ceci implique une activité de répression des facteurs de transcription TCF / Lef et ainsi l'expression du gène cible est restreinte. Côté gauche: La signalisation Wnt est activée lors de la liaison du ligand Wnt au récepteur Frizzled et du recrutement du co-récepteur LPR5 / 6. Axin, GSK3- β et DVL (Dishevelled) sont recrutés dans le complexe récepteur membranaire, perturbant le complexe de destruction. La β -caténine cytosolique se déplace vers le noyau pour se lier au facteur de transcription TCF / Lef, conduisant à l'expression du gène cible. *Illustration BioRender*

Des signaux spécifiques sont indispensables à certaines étapes précises de la reprogrammation cellulaire induisant la TEM. D'autres signaux sont cellules- ou tissus-spécifiques et démontrent le rôle essentiel du microenvironnement sur les réponses cellulaires aux signaux^{53,54}. A noter que les voies de signalisation et les régulateurs des TEMs pathologiques sont très similaires à ceux des TEMs physiologiques.

a. La voie TGF- β

Le rôle de la voie TGF- β est le mieux caractérisé dans la tumorigenèse et la TEM. Le TGF- β est une cytokine multifonctionnelle appartenant à la superfamille des Transforming Growth Factors. Son rôle est de contrôler la prolifération et la différenciation cellulaire. Les ligands TGF- β se lient à TGF β RII, un récepteur transmembranaire à activité sérine/thréonine kinase constitutivement actif. Cette liaison provoque le recrutement et la phosphorylation du récepteur de type I (TGF- β RI) pour former un complexe hétérodimérique. La transduction du signal jusqu'au noyau est médiée par la phosphorylation des SMAD2 et SMAD3 qui s'associent en complexe avec SMAD4. La translocation de ce complexe dans le noyau active la transcription de très nombreux gènes effecteurs de la TEM. A noter que SMAD6 et SMAD7 régulent négativement cette voie en se liant au récepteur I⁵⁵. La signalisation TGF β partage des facteurs avec d'autres voies de signalisation et contribue donc à leur activation : les voies MAPK (Mitogen activated protein kinase), RhoA, PI3K, p38MAPK, et JNK. En réponse au TGF β , la protéine adaptatrice ShcA est phosphorylée par TGF β RI recrutant ainsi GRB2 et SOS1. Ce complexe induit alors l'activation de la voie de signalisation RAF-MEK1/2-ERK1/2 via la protéine RAS⁵⁶. Un mécanisme unique permet à TGF β d'induire les voies p38MAPK, et JNK en interagissant avec l'ubiquitine ligase TRAF6 qui active la TAK1 (TGF β activated kinase)⁵⁷. De plus, une inhibition de la voie PI3K/AKT bloque la TEM induite par TGF β démontrant le rôle majeur de ce "crosstalk"⁵⁸. TGF β est aussi capable d'activer la voie RhoA régulateur principal de la polarité cellulaire et de l'organisation du cytosquelette⁵⁹. Dans de nombreux types de cancer, il a été démontré que la TEM pouvait être déclenchée par la seule activation de la voie TGF β (Figure 10).

b. La voie Wnt / β -caténine

Dans le cancer, la voie de signalisation canonique Wnt / β -caténine joue un rôle critique dans l'apoptose, la prolifération ainsi que dans la régulation de la carcinogenèse. Son rôle dans le développement embryonnaire fait de cette voie un acteur évident de la TEM^{60, 61, 62, 63}. Plusieurs voies de signalisation sont activées suite à la liaison des ligands WNT sur leurs

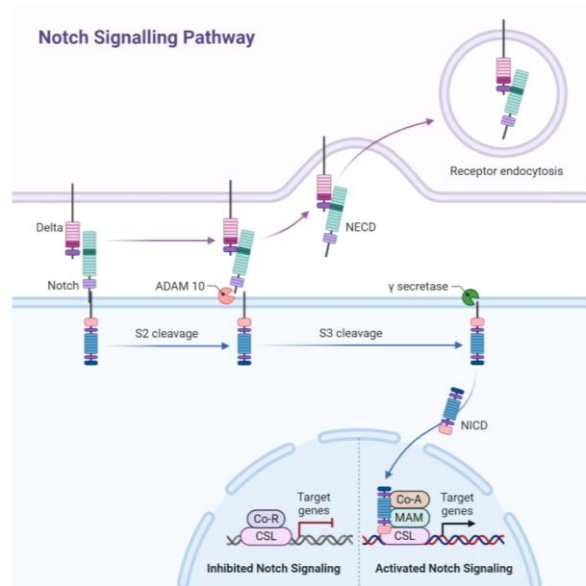


Figure 12 | Représentation schématique de la voie de signalisation Notch.

La signalisation Notch est activée par un ligand de type Delta ou une expression de ligand Jagged sur une cellule voisine qui se lie au récepteur Notch. Il existe deux types de clivage de récepteurs, le premier au niveau extracellulaire réalisé par la metalloprotéinase ADAM10 et le deuxième par la γ -sécrétase clivant le domaine intracellulaire du récepteur Notch (NICD), qui se déplace ensuite vers le noyau pour former un complexe d'activation transcriptionnel. NICD et co-activateur Mastermind (MAML-1) se lie à la protéine de liaison à l'ADN pour initier l'expression du gène cible Notch. *Illustration BioRender*

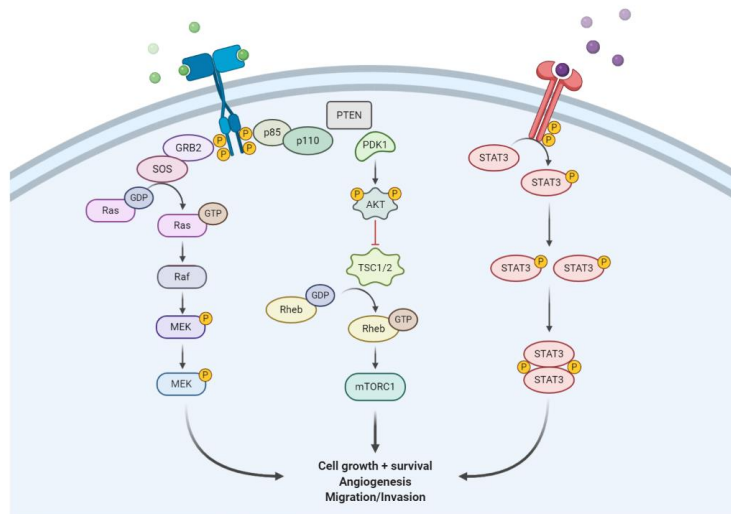


Figure 13 | Représentation schématique de la voie de signalisation RTK dans la TEM.

Les facteurs de croissance (GF), tels que FGF, EGF, PDGF ou IGF, stimulent les récepteurs tyrosines kinases RTK, qui activent diverses voies de signalisation, y compris celles médiées par Ras, PI3K, Src et ILK. La liaison du facteur de croissance aux RTK induit une dimérisation du récepteur et une trans-phosphorylation des domaines intracellulaires, transduisant ainsi le signal en cascades intracellulaires. Ces cascades de signalisation activent des facteurs de transcription qui se lient aux promoteurs de gènes codant pour des facteurs de transcription induisant la prolifération cellulaire et la TEM. *Illustration BioRender*

récepteurs Frizzled (FZD). En l'absence de ligand WNT extracellulaire, le complexe multiprotéique APC/Axin/GSK-3 active la phosphorylation de la β -caténine cytoplasmique pour conduire à sa dégradation par le complexe protéasome. Lorsque la voie Wnt est stimulée, le récepteur FZD-LRP5/6 phosphoryle Dishevelled (DSH) qui dissocie alors le complexe APC/Axin/GSK-3, empêchant ainsi la phosphorylation de la β -caténine. La β -caténine se trouve donc stabilisée et peut transloquer dans le noyau. Elle y formera un complexe avec les membres de la famille TCF (T-cell factor) et les facteurs de transcription LEF-1 (lymphoid enhancer-binding factor 1), conduisant à la transcription de gènes cibles de la TEM^{64, 65, 12, 66} (Figure 11).

c. La voie Notch

La signalisation Notch est une voie majeure de destinée cellulaire. Elle régule la différenciation, la prolifération et la mort cellulaire grâce à une signalisation directe de cellule à cellule⁶⁷. Différents ligands peuvent agir sur le récepteur Notch et activent deux types de clivages. Le premier, au niveau extracellulaire, est réalisé par la metalloprotéinase ADAM10 alors que le second est effectué au niveau intracellulaire par la γ -sécrétase. Ce dernier libère le domaine intracellulaire de Notch (NIC) dans le cytoplasme qui est transloqué dans le noyau. NIC recrute le co-activateur MAML afin de convertir le complexe répresseur RBPJK/CBF1/Su(H) en un complexe activateur de la transcription des gènes cibles de sa voie. Sa dérégulation dans le cadre du cancer l'implique dans de multiples aspects de la biologie tumorale, de l'angiogenèse au maintien des cellules souches cancéreuses en passant par l'immunité tumorale^{68, 69}. En régulant différents facteurs de transcription impliqués dans la TEM, la signalisation Notch participe également à la progression du cancer et interagit avec la voie TGF- β ⁷⁰ (Figure 12).

d. La voie des récepteurs tyrosine kinase RTK

Les facteurs de croissance se lient à des récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase (RTK) qui transduisent des signaux de survie, de prolifération, de migration, de survie et de différenciation cellulaire en activant des voies de signalisation spécifiques⁷¹. La liaison du ligand induit l'autophosphorylation des récepteurs induisant l'activation des voies PI3K/Akt/mTOR, MAPK et la signalisation Src. Ces facteurs de croissance incluent le facteur de croissance épidermique (EGF), le facteur de croissance des fibroblastes (FGF), le facteur de croissance de l'insuline (IGF), le facteur de croissance hépatocytaire (HGF), le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et le facteur de croissance dérivé des plaquettes

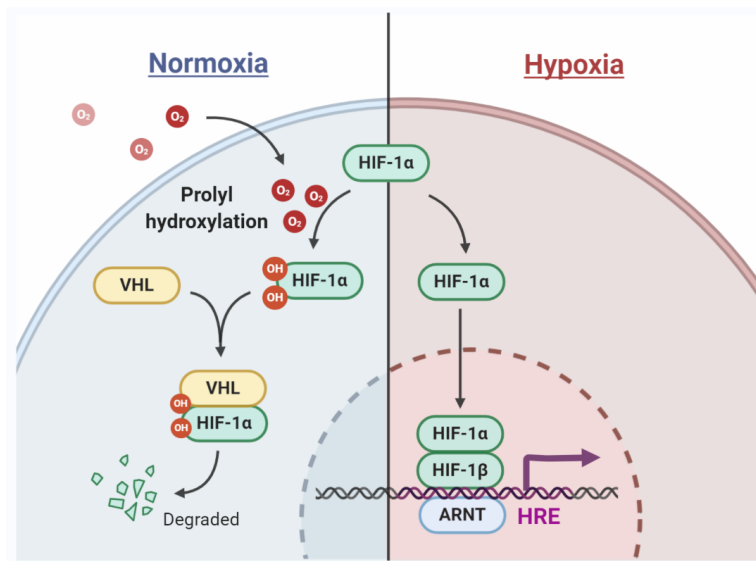


Figure 14 | Représentation schématique de la voie de signalisation d'hypoxie.

Dans des conditions normoxiques, les prolyl hydroxylases (PHD) favorisent la dégradation du facteur de transcription HIF-1α. Dans des conditions hypoxiques, les PHD sont inactivés, permettant ainsi l'accumulation et l'activation fonctionnelle de HIF-1α, qui induit l'expression de gènes associés la TEM. *Illustration BioRender*

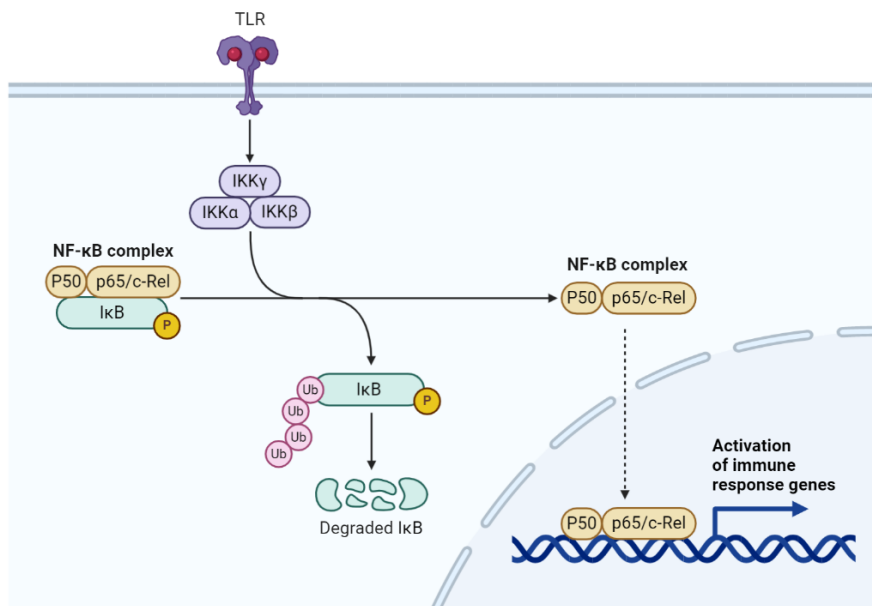


Figure 15 | Représentation schématique de la voie de signalisation NF K β .

En l'absence de stimulation, l'inhibiteur- κ B (I κ B) séquestre les isoformes p50 et p65 de NF- κ B dans le cytoplasme. La fixation du ligand sur le récepteur induit l'activation d'IKK conduisant à l'activation de la voie de NF- κ B. Les complexes I κ B Kinases (IKK) phosphorylent I κ B, libérant p50 et p65. Ces derniers (NF- κ B phosphorylé) entrent dans le noyau et induisent la transcription des gènes cibles. *Illustration BioRender*

(PDGF). Les signaux intracellulaires activés en réponse à ces voies de signalisation activent la prolifération cellulaire et participent à la TEM de différentes manières : régulation de la composition de la matrice extracellulaire, modifications du cytosquelette, de la motilité cellulaire^{9, 62}. Grâce à l'interconnexion de la signalisation RTK avec la voie TGF- β , les facteurs de croissance amplifient la signalisation de cette dernière, notamment avec un rôle sur Ras, PI3K, Src et TAK indépendant des protéines SMAD (Figure 13).

e. La voie d'hypoxie

Une caractéristique commune à de nombreuses tumeurs solides est la faible oxygénation intratumorale en raison d'un tissu compact et d'un apport sanguin insuffisant. Dans des conditions normales d'oxygénation, HIF-1 α , la sous-unité active du facteur inductible de l'hypoxie 1 (HIF-1), est hydroxylée sur les résidus proline par des prolyl-hydroxylases HIF, conduisant à une ubiquitination et à une dégradation par le protéasome. En conditions ischémiques, la faible teneur en oxygène bloque l'hydroxylation et l'ubiquitination et HIF-1 α s'accumule dans les cellules. Le facteur de transcription HIF-1 complet devient alors un élément décisif pour l'activation transcriptionnelle de nombreux gènes de réponse à l'hypoxie. Cette signalisation présente des rôles pléiotropiques dans les cancers, favorisant l'angiogenèse et la progression tumorale. L'accumulation de HIF-1 α en conditions hypoxiques induit fortement la TEM de type 3, grâce à la mise en production de cytokines inflammatoires, de régulateurs épigénétiques et de nouveaux facteurs de transcription, y compris ceux de la TEM canonique décrits au paragraphe suivant^{12, 72, 73, 74, 75} (Figure 14).

f. La voie NF- κ B

À l'état natif, le complexe NF- κ B se localise dans le cytoplasme, inhibé par les protéines constitutives : les facteurs I- κ B. La phosphorylation et l'ubiquitination d'I- κ B conduit à sa dégradation par le protéasome, et la libération du NF- κ B actif. Le complexe peut alors transloquer dans le noyau où il se lie à l'ADN afin d'activer la transcription de près de 150 gènes cibles. Dans la plupart des types tumoraux, NF- κ B est constitutivement actif et joue un rôle pro-oncogénique et pro-inflammatoire comme régulateur critique d'un grand nombre de processus biologiques, comprenant la prolifération cellulaire, la différenciation, les réponses immunitaires et l'inflammation. Récemment, une corrélation positive entre les facteurs de transcription de la TEM et l'activation de NF- κ B a été décrite dans plusieurs cancers humains. Les protéines NF- κ B sont susceptibles de favoriser la survenue de métastases en activant l'expression de marqueurs mésenchymateux, de facteurs angiogéniques, et de molécules

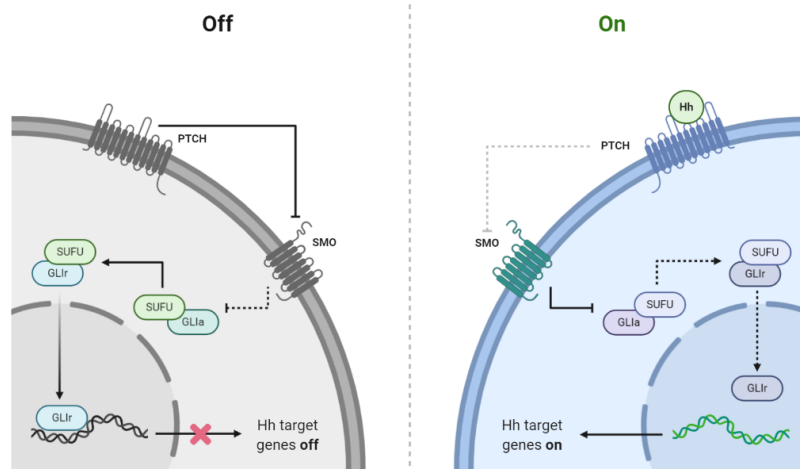


Figure 16 | Représentation schématique de la voie de signalisation Hedgehog.

Côté gauche: La signalisation Hedgehog est inactive en l'absence de ligand Hedgehog sur le récepteur Patched (Ptc) qui empêche l'activité du récepteur Smoothened (SMO). Suppressor of Fused (SUFU) maintient les formes activatrices des facteurs de transcription Gli (Gli A) en dehors du noyau. La forme répressive des facteurs Gli (Gli R) se déplace vers le noyau pour bloquer l'expression du gène cible. Côté droit: La signalisation Hedgehog est activée lors de la liaison des ligands Hedgehog au récepteur Ptc. L'inhibition du SMO est levée, inhibe la formation de Gli R et active Gli A. Gli A se transloque vers le noyau pour diriger l'expression du gène cible comme Ptc et Gli1. *Illustration BioRender*

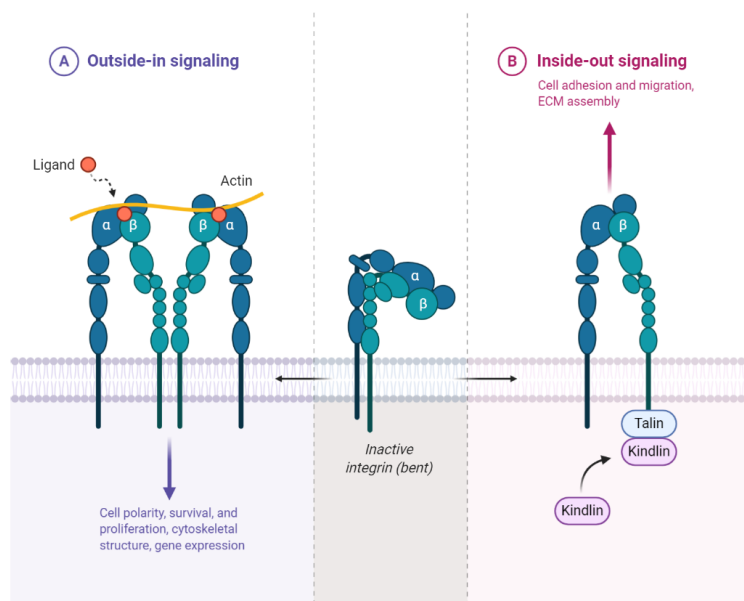


Figure 17 | Le rôle de la voie de signalisation des intégrines.

Les intégrines dans la conformation de repos sont courbées et révèlent une liaison de faible affinité à leurs ligands MEC. La signalisation "Inside-out" implique la perturbation du pont salin intracellulaire, qui est établi entre les sous-unités cytoplasmiques. Cela induit la dissociation des hélices transmembranaires, suivie de la réorganisation et de la génération d'une intégrine de liaison de haute affinité, ainsi que de la multimérisation dans les adhérences focales. La signalisation "Outside-in" nécessite une oligomérisation des intégrines. Suite à la liaison de la MEC aux récepteurs des intégrines, les queues cytoplasmiques des β -intégrines se lient à diverses protéines adaptatrices (Talin, Vinculin, Kindlin et Actine α) qui activent des kinases Src, FAK ou ILK. En cascade, ces kinases activent les voies de transduction cellulaire, y compris les voies MAP kinases, PI3K / Akt et PKC. *Illustration BioRender*

d'adhésion corrélées à l'invasion. Des études ont également montré que l'activation de la voie NF- κ B active la TEM alors que son blocage la réverse en TME, démontrant que la voie joue un rôle dans le maintien de la TEM. NF- κ B est un facteur de transcription qui induit la TEM mais les détails de cette activation ne sont pas clairs à ce jour ⁷⁶ (Figure 15).

g. La voie Hedgehog

La voie de signalisation Hedgehog (Hh), hautement conservée à travers l'évolution, est essentielle pour le développement normal de l'embryon. Elle est initiée par la liaison de l'un des 3 ligands HH au récepteur transmembranaire hétérodimérique Patched (PTCH1/2). Cette liaison libère Smoothed (SMO), captif de PTCH en l'absence du ligand. SMO déstabilise alors le complexe Fused/SUFU (suppressor of protein fused) qui séquestre dans le cytoplasme les membres de la famille des facteurs de transcription associés au gliome (Gli). Libres de transloquer dans le noyau, ces facteurs de transcription activent la transcription de gènes cibles de la voie Hh. Chez l'adulte, la voie Hh est activée après une blessure pour favoriser la réparation et la régénération. Une signalisation Hh aberrante a été détectée dans de nombreux cancers humains, suggérant un rôle important dans la carcinogenèse, les métastases et les cellules souches cancéreuses. Le rôle de la signalisation Hh dans la régulation de la TEM a été décrit dans plusieurs tumeurs malignes. Des études ont démontré que l'expression des marqueurs mésenchymateux et des facteurs de transcription effecteurs de la TEM est directement régulée par GLI1. De plus, la signalisation Hedgehog interagit avec différentes voies de signalisation décrites précédemment pour affecter la TEM : voie de l'hypoxie, induction de la sécrétion de TGF- β 1 ou clivage du domaine intracellulaire de Notch (NICD) ^{62, 77, 78} (Figure 16).

h. La voie des intégrines

La matrice extracellulaire module l'organisation du cytosquelette d'actine et active le réseau de signalisation intracellulaire via son interaction avec les intégrines. Suite à la liaison de la MEC aux récepteurs des intégrines, les queues cytoplasmiques des β -intégrines se lient à diverses protéines adaptatrices (Talin, Vinculin, Kindlin et Actine α) qui activent des kinases Src, FAK ou ILK. En cascade, ces kinases activent les voies de transduction cellulaire, y compris les voies MAP kinases, PI3K / Akt et PKC. Les intégrines jouent ainsi un rôle important dans la survie, la prolifération et la migration des cellules. Elles régulent également la forme et la motilité cellulaire, ce qui fait d'elles des facteurs cruciaux modulant la TEM.

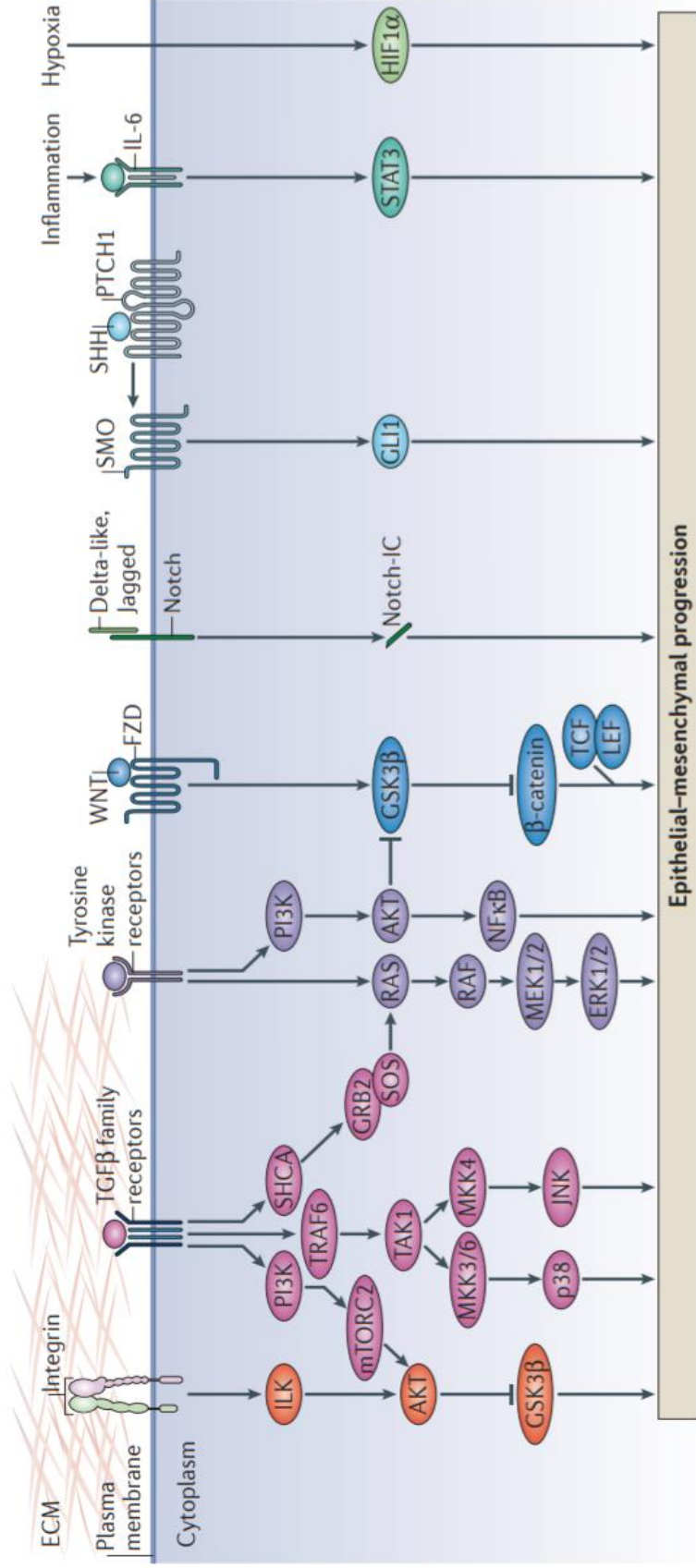


Figure 18 | Vue d'ensemble des voies de régulation de la TEM.

De multiples voies de signalisation régulent la TEM. Une coopération de différentes voies est nécessaire pour induire une TEM complète. Des stimuli extérieurs, et plus spécifiquement issus du microenvironnement tumoral, sont les inducteurs de ces voies. Ces voies de signalisation incluent les voies TGFβ, WNT, Notch, Hedgehog (SHH) et celle des récepteurs à activité tyrosine kinase. L'inflammation et l'hypoxie sont de puissants activateurs de la TEM via les voies NFκB HIF1 respectivement. Les composants de la matrice extracellulaire assurent la régulation de la voie des intégrines. Ces différentes voies sont impliquées dans l'activation, la progression et la maintenance de la TEM (Lamouille et al.; 2014).

Grâce à leur localisation membranaire, les intégrines représentent des cibles thérapeutiques potentielles pour cibler la TEM des cancers ⁷⁹ (Figure 17).

Une coopération entre ces voies de signalisation est indispensable pour induire une TEM complète car toutes interfèrent plus ou moins fortement avec les autres (Figure 18). L'ensemble de ces voies aboutissent à l'activation de l'expression des nombreux facteurs de transcription inducteurs de la TEM. Ces facteurs de transcription ainsi que leur rôle sont décrits dans le paragraphe suivant.

3. Les facteurs de transcription impliqués dans la TEM :

Les voies de signalisation décrites précédemment convergent vers une série de facteurs de transcription, les TEM-TFs, qui modulent l'expression des nombreux gènes cibles de la TEM. Ces régulateurs transcriptionnels sont classifiés comme les "interrupteurs principaux" de la reprogrammation cellulaire à cause de leur rôle capital dans la répression du phénotype épithélial (répression de l'E-cadhérine, des claudines, de la laminine, des cytokératines, des collagènes globulaires...) et dans l'activation du phénotype mésenchymateux (induction des gènes pro-migratoires tels que vimentine, collagènes fibrillaires, fibronectine, métalloprotéinases matricielles...) ^{9,29}. Ces facteurs de transcription sont identifiés soit par leur rôle régulateur de la E-cadhérine (protéine épithéliale majeure codée par le gène CDH1) soit comme des facteurs modulateurs des protéines des jonctions cellulaires et des marqueurs mésenchymateux. La première catégorie est constituée des facteurs de transcription Snail1 et Snail2 (Slug), ZEB1, ZEB2, la seconde inclut TWIST1 et FOXC2 (Figure 19) ⁹. La surexpression de ces principaux facteurs de transcription induit la formation de métastases, démontrant leur implication dans la TEM. Le paragraphe suivant présente brièvement les trois familles de TEM-TFs, SNAIL, TWIST, et ZEB qui sont les mieux décrites dans la littérature. Il est cependant important de noter que la TEM peut également utiliser d'autres facteurs de transcription. C'est par exemple le cas du facteur 1 se liant à l'activateur lymphoïde (LEF-1), un membre de la famille des facteurs de transcription du facteur T (TCF). Il est connu comme un médiateur important de la TEM par sa liaison à la région promotrice des gènes associés à l'adhésion cellule-cellule et la régulation de leur transcription ^{21,25}.

a. La famille SNAIL :

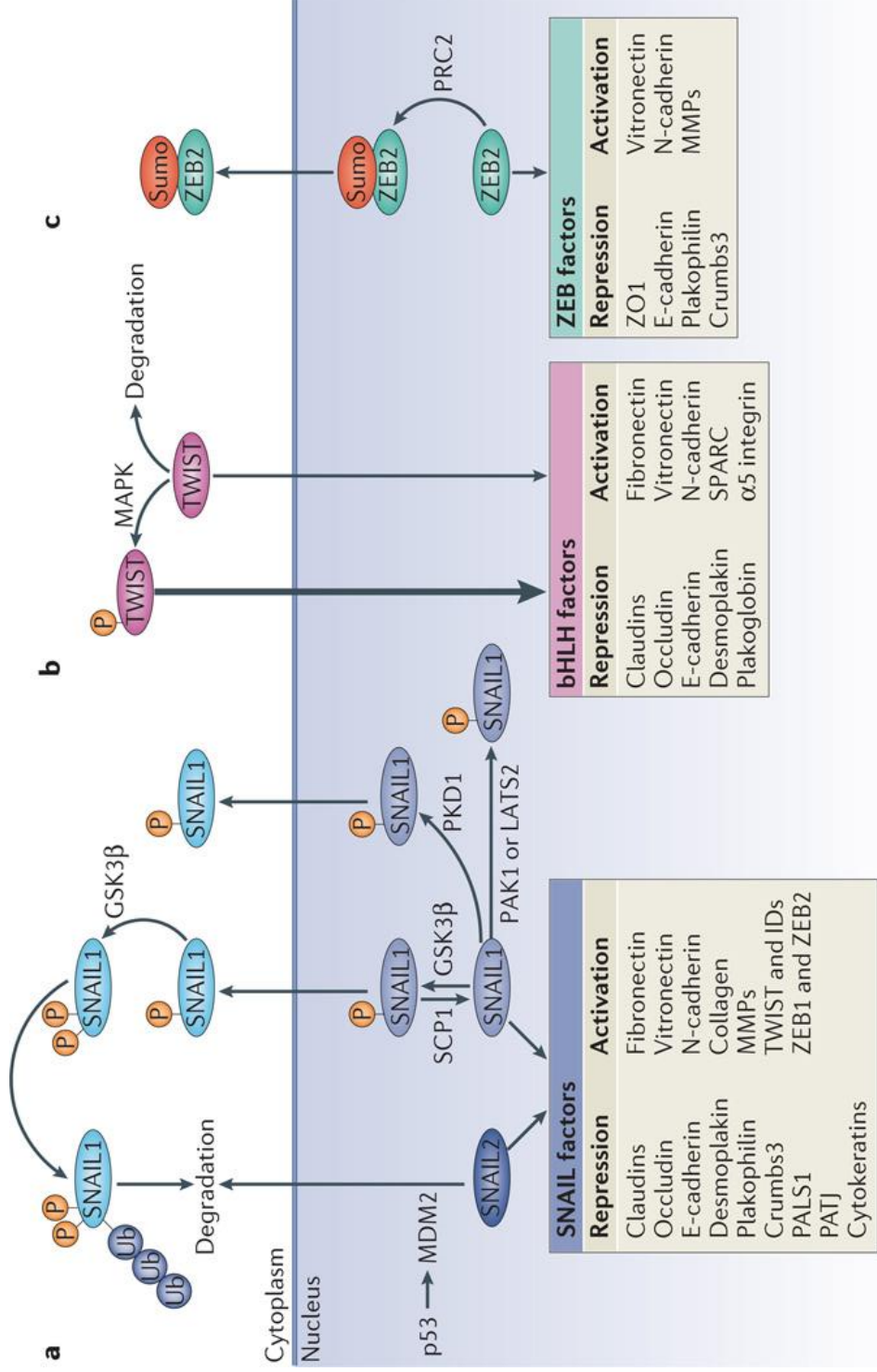


Figure 19 | Rôles et régulation des principaux facteurs de transcription de la TEM

La TEM est pilotée par les facteurs de transcription SNAIL, ZEB et TWIST qui répriment les gènes marqueurs épithéliaux et activent les gènes associés au phénotype mésenchymateux. Les modifications post-traductionnelles régulent leurs activités, leur localisation subcellulaire et leur stabilité; (Lamouille et al.; 2014).

Les répresseurs transcriptionnels Snail1 (SNAIL) et Snail2 (SLUG) se lient à l'ADN par des domaines à doigts de zinc carboxy-terminaux. En reconnaissant l'élément E-box du promoteur de CDH1 codant pour la E-cadhérine, ces facteurs inhibent sa transcription⁹. Cette induction de la TEM par surexpression de la famille Snail est physiologique dans le cadre de l'activation de programmes de développement et de gastrulation⁸⁰. La famille Snail joue un rôle dans la TEM et la progression des cancers⁸¹. L'effet répresseur de SNAIL/SLUG est assuré en coopération avec d'autres facteurs de transcription. C'est par exemple le cas pour le complexe SNAIL/ETS1 contrôlant l'expression de différentes MMP⁸². Au cours de la TEM, l'expression de SNAIL1 est induite en réponse à différentes cytokines, par des protéines de la MEC, ou sous l'effet d'une réponse hypoxique ou inflammatoire⁸¹. Une corrélation a été établie entre la surexpression de Snail2, la déplétion en E-cadhérine et l'augmentation du nombre de métastases chez les cancers pulmonaires⁸³. Facteur de transcription à renouvellement rapide, SLUG est essentiel pour contrôler le destin cellulaire. SLUG est un régulateur important de la TEM favorisant la survie des cellules cancéreuses, l'invasion et les métastases⁸⁴. Une différence du niveau de répression exercé par SNAIL1 et SLUG a été décrite. Ainsi, l'affinité de SNAIL1 sur le site E-box est plus forte que celle de SLUG. Cela conduit à une répression plus efficace de la transcription, du gène CDH1 par exemple, et ainsi à une meilleure dissociation des jonctions^{85, 81}.

b. La famille TWIST :

Les deux facteurs de transcription principaux de la famille à domaine Hélice-Boucle-Hélice basique (bHLH) sont TWIST1 et TWIST2. En complexe homo- ou hétéro-dimérique avec d'autres FTs, TWIST1/2 diminuent l'expression des gènes épithéliaux comme l'E-cadhérine et induisent l'expression de gènes mésenchymateux comme la N-cadhérine⁹. À ce titre, ils jouent un rôle important dans la progression de la TEM. Twist est contrôlé par différentes voies de signalisation dont notamment la voie HIF en conditions hypoxiques⁸⁶. Il induit alors un état de dissémination cellulaire. Chez l'adulte, TWIST jouent un rôle déterminant dans la prolifération, la survie cellulaire et la dispersion métastatique de différents types de cancer incluant les carcinomes mammaires^{87, 72}. Plusieurs fonctions diverses ont été décrites pour TWIST en plus de la progression tumorale tardive. On peut citer une inhibition des gènes suppresseurs à un stade précoce et le maintien de la "pluripotence" cellulaire^{88, 89}. Bien caractérisé lors du développement, ce maintien favoriserait la résistance aux médicaments.

c. La famille ZEB :

ZEB 1 et ZEB 2 (Zinc finger binding E-Box homeobox factors) sont deux facteurs de transcription initialement décrits comme essentiels dans le développement de la crête neurale. Ils sont depuis largement reconnus comme des régulateurs majeurs des gènes effecteurs de la TEM en se fixant sur les séquences de type E-box⁹. Leur activation est complexe, en réponse à de nombreux signaux extra- ou intracellulaires divers facteurs de transcription. En plus de la sous-expression de la E-cadhérine, la famille ZEB est responsable de la dissociation des jonctions adhérentes et donc de la perte du phénotype épithélial induite par la TEM^{90, 91}. ZEB affecte également les mécanismes de remodelage de la matrice extracellulaire associé à la TEM⁹². En réprimant E-cadhérine et activant les marqueurs mésenchymateux, les FTs ZEB jouent un rôle important dans le "switch protéique" provoqué par la TEM et participent au développement métastatique des carcinomes⁹.

4. L'épigénétique :

L'épigénétique est définie comme l'étude des modifications réversibles de l'ADN ou des protéines associées, qui conduisent à des changements dans la régulation de l'expression sans affecter la séquence d'ADN. Les mécanismes épigénétiques les plus connus s'organisent en quatre grands groupes : les longs ARNs non codants, les micro-ARNs, la méthylation de l'ADN, et les modifications post-traductionnelles des histones. Comme toutes les voies décrites auparavant, ces mécanismes jouent un rôle régulateur majeur dans de nombreuses situations physiologiques comme la formation des gamètes ou le contrôle des éléments répétés du génome. Plusieurs études ont signalé l'importance des mécanismes épigénétiques, et des enzymes qui les orchestrent, dans l'acquisition de différentes caractéristiques des cellules cancéreuses et, plus précisément, au cours de la TEM. Les cellules cancéreuses présentent un paysage épigénétique spécifique profitant de tous les mécanismes mentionnés précédemment pour acquérir les caractéristiques malignes caractéristiques, de la transformation à la progression tumorale. Un focus sur le rôle de l'épigénétique dans la TEM des cancers du sein triple négatifs a été rédigé et publié sous forme d'une revue durant ma thèse et est présenté dans le chapitre suivant¹⁹.

En bref, l'EMT de type 3 intervient dans les mécanismes de progression tumorale et d'invasion métastatique des différents types de cancer. Elle survient suite à un stress

oncogénique chez les cellules cancéreuses qui ont échappées aux systèmes de sauvegardes cellulaires. Ces cellules perdent les caractéristiques épithéliales en faveur des marqueurs mésenchymateux, avec une accumulation d'altérations génétiques et épigénétiques. Malgré d'importants progrès dans la compréhension de l'implication de la TEM dans le mécanisme de rechute métastatique, les différents rôles de la TEM restent actuellement controversés et représentent un point de discussion entre les pathologistes et les chercheurs. Dans le chapitre II, nous nous intéresserons plus particulièrement à comprendre la rechute et les processus métastatiques des carcinomes mammaires dont la TEM est un élément majeur.

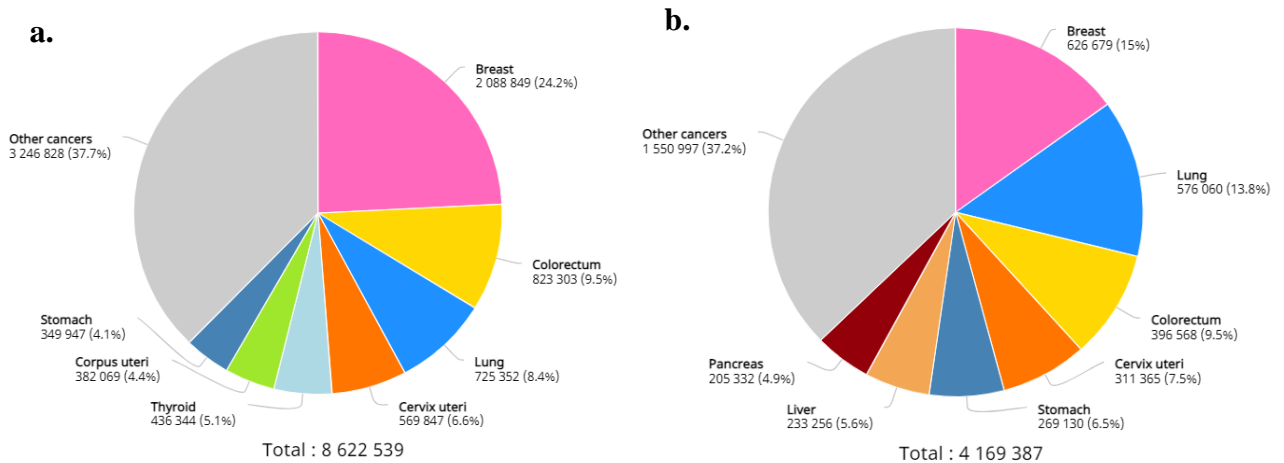


Figure 20 | Nombre de nouveaux cas et de décès des cancers du sein en 2018.

Le cancer du sein est le premier cancer féminin dans le monde avec environ 2 millions de nouveaux cas et environ 600 000 décès en 2018 (*GLOBOCAN 2018*).

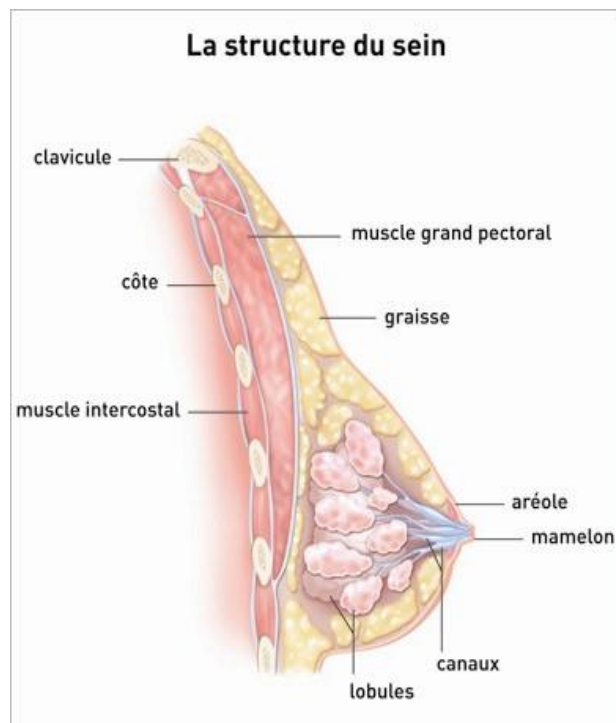


Figure 21 | Anatomie du sein

La glande mammaire est une glande exocrine hormono-dépendante composée de deux compartiments cellulaires différents : le compartiment épithélial (des lobes, des canaux, de graisse, et du tissu conjonctif) et le compartiment mésenchymateux (des vaisseaux sanguins et lymphatiques). (*Institut national du cancer*)

III. Cancer du sein

A. Définition

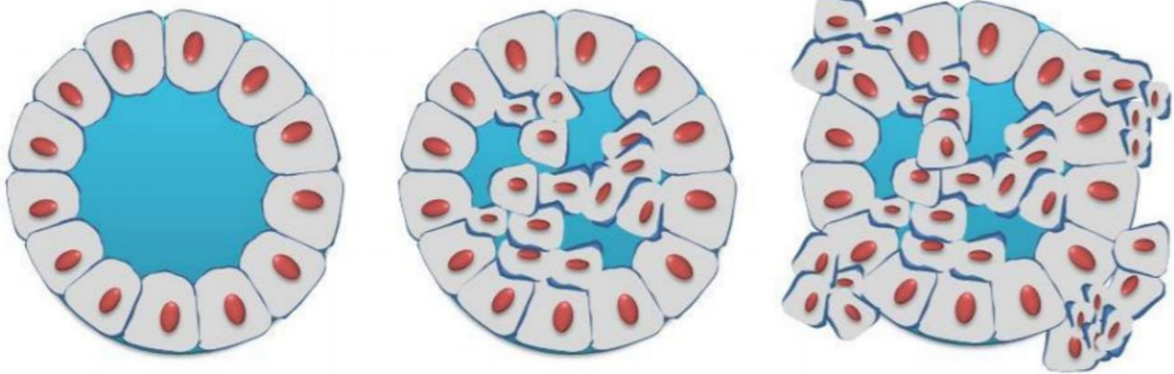
Le cancer du sein (CS) est une tumeur maligne qui se développe au niveau du sein à partir des cellules mammaires. C'est une maladie durant laquelle des cellules anormales des canaux ou des lobules se multiplient de façon incontrôlée et forment une masse tumorale maligne. Ces cellules peuvent rester stables dans le sein ou se développer progressivement et se répandre dans le corps *via* les vaisseaux sanguins ou lymphatiques et former des tumeurs secondaires.

B. Epidémiologie

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme et est considérée comme la première cause de mortalité féminine dans le monde. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), qui qualifie le cancer comme "un fardeau mondial", 2.1 millions de nouveaux cas et 627 000 décès ont été révélés en 2018 à travers le monde (Figure 20). En France métropolitaine, selon le rapport de l'Institut National du Cancer (INCa), 58 459 nouveaux cas de cancer du sein sont diagnostiqués pour 12 146 décès en 2018. À ce titre, le cancer du sein, considéré comme une priorité mondiale, est la tumeur maligne la plus étudiée au monde. Le cancer du sein est guérissable chez environ 70 à 80% des patientes atteintes d'une maladie non métastatique à un stade précoce. Malgré les progrès du dépistage, du diagnostic et du traitement du cancer du sein, près de 12% des patientes diagnostiquées pour un cancer du sein développent finalement une maladie métastatique. Le cancer du sein avancé avec métastases d'organes distants est associé à un mauvais pronostic et est considéré comme incurable avec les thérapies actuellement disponibles. Ces métastases à distances, dues à la propagation de cellules du sein cancéreuses vers des sites distants, conduisent à une mortalité élevée avec un taux de survie à 5 ans de 26% ⁹⁴.

C. Anatomie du sein

La glande mammaire est une glande exocrine hormono-dépendante dont la fonction principale est la lactation. Deux compartiments cellulaires différents constituent la glande mammaire : le compartiment épithélial essentiellement composé des lobes, des canaux, de graisse, et de tissu conjonctif. Principalement constitué d'une peau enveloppant le tissu graisseux, la glande mammaire comporte 15 à 20 lobes glandulaires formés de tissu conjonctif, chaque lobe se divise en 20 à 40 lobules pour former les alvéoles sécrétoires ou acini. Ces acini



Cellules normales

Carcinome canalaire
in situ

Carcinome canalaire
infiltrant

Figure 22 | Comparaison entre les carcinomes *in situ* et infiltrants

Les carcinomes *in situ* sont caractérisés par une prolifération des cellules malignes circonscrite aux structures normales, canaux ou lobules, sans franchir la membrane basale et les carcinomes infiltrants ou invasifs présentent des cellules cancéreuses qui franchissent la membrane basale des canaux ou lobules.

fabriquent le lait qui se jette dans un canal galactophore pour être conduit jusqu'au mamelon. Le deuxième compartiment est le compartiment mésenchymateux constitué des vaisseaux sanguins et lymphatiques qui parcourent le sein. Ces vaisseaux lymphatiques assurent le transport de la lymphe du sein aux ganglions lymphatiques de drainage du sein. Il existe des ganglions axillaires, sus-claviculaires, sous-claviculaires et mammaires internes, qui se situent au niveau de l'aisselle, de la clavicule et du thorax respectivement. Ce système de drainage axillaire est impliqué dans le combat des infections par le système immunitaire et le processus cicatriciel (Figure 21).

D. Classification du cancer du sein :

Maladie hautement complexe et hétérogène, le cancer du sein englobe différentes entités dont les caractéristiques cliniques, phénotypiques et moléculaires varient considérablement⁹⁵. Ces critères morphologiques et biologiques d'évaluation sont associés à la précocité du diagnostic, au type histologique de la tumeur, à son examen anatomopathologique et à ses caractéristiques moléculaires. Trois différentes catégories de classifications peuvent être donc appliqués aux cancers du sein afin de définir différents sous-types.

1. Classification anatomo-histopathologique :

L'examen anatomopathologique est l'étape indispensable au diagnostic d'une masse au niveau mammaire afin de différencier une lésion bénigne d'une lésion maligne. Cet examen morphologique et histologique simple est réalisé au moment de la biopsie et reconfirmé lors de la chirurgie de la tumeur. En effet, c'est la présence de cellules tumorales malignes ou non dans les prélèvements qui permet de qualifier les lésions. Les atteintes bénignes comprennent les fibroadénomes et les lésions apparentées, le kyste et les changements fibrokystiques, les adénoses et l'hyperplasie épithéliale mammaire. Différents types histologiques malins ont été décrits en fonction du type des caractéristiques cellulaires observées et de leur localisation mammaire :

- Les adénocarcinomes représentent 95% des cancers du sein et sont issus de cellules épithéliales de la glande mammaire. Ces adénocarcinomes se développent soit à partir des cellules des canaux, donnant naissance à des adénocarcinomes canaux, les plus fréquents, soit au niveau des lobules pour créer des adénocarcinomes lobulaires. Ces adénocarcinomes sont ensuite distingués en deux groupes selon la morphologie des lésions tumorales : a) les carcinomes *in situ* (CIS) caractérisés par une prolifération des cellules malignes circonscrite

Tableau 1 | Classification clinique TNM du cancer du sein.
8ème édition de l'Union Internationale Contre le Cancer

T - tumeur primitive	
Tx	Tumeur primitive non évaluable
T0	Pas de signe de tumeur primitive (non palpable)
Tis	Tumeur in situ (intra-épithéliale): carcinome intra-canalair ou lobulaire in situ
T1	Tumeur limitée à la muqueuse ou à la sous-muqueuse de ≤ 2 cm
T2	Tumeur > 2 cm et ≤ 5 cm
T3	Tumeur > 5 cm
T4	Quelque soit la taille de la tumeur, présente une extension directe soit à la paroi thoracique (T4a), soit à la peau (T4b). Le tumeur est T4c si T4a + T4b et T4d si le cancer est inflammatoire
N - Ganglion	
Nx	Appréciation impossible de l'atteinte ganglionnaire
N0	Absence d'envahissement ganglionnaire
N1	1 à 3 ganglions régionaux métastatiques
N2	4 à 9 ganglions régionaux métastatiques
N3	plus de 10 ganglions régionaux métastatiques
M - Métastase	
Mx	Détermination impossible de l'extension métastatique
M0	Absence de métastases à distance
M1	Présence de métastases à distance

Tableau 2 | Stadification TNM des cancers du sein. AJCC 8ème édition.

Stade	Tumeur (T)	Ganglions (N)	Métastase (M)
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	
IIA	T0	N1	
	T1	N1	
	T2	N0	
IIB	T2	N1	
	T3	N0	
IIIA	T0	N2	
	T1	N2	
	T2	N2	
	T3	N1	
	T4	N2	
IIIB	T4	N0	
	T4	N1	
	T4	N2	
IIIC	Tout T	N3	
IV	Tout T	Tout N	M1

aux structures normales, canaux ou lobules, sans franchir la membrane basale et b) les carcinomes infiltrants ou invasifs (CI) lorsque les cellules cancéreuses franchissent la membrane basale des canaux ou lobules (Figure 22). Ce type est associé à un mauvais pronostic car ces cellules se propagent généralement vers les ganglions lymphatiques et peuvent envahir d'autres organes à distance.

- Au-delà des adénocarcinomes canaux ou lobulaires, il existe plusieurs types rares de cancers mammaires et qui présentent des caractéristiques morphologiques spécifiques. On peut citer les carcinomes médullaires, papillaires, mucineux, tubuleux, métaplasiques, les tumeurs phyllodes et les sarcomes.

Une fois le diagnostic de cancer confirmé, plusieurs facteurs complémentaires sont testés afin de caractériser la tumeur et guider la stratégie thérapeutique. L'évaluation histologique des carcinomes mammaires décrit le cancer en se basant sur l'anomalie des cellules tumorales par rapport aux cellules normales permettant d'attribuer un grade numérique d'agressivité à la tumeur (Grade SBR, Scarff, Bloom et Richardson, de I à III). En fonction de l'étendue du cancer, la stratification TNM (Tumor, Nodes, Metastasis) évalue le statut du cancer et attribue également des valeurs à trois catégories : T pour la taille de tumeur, N reflète l'invasion des ganglions lymphatiques et M exprime la présence ou l'absence de métastases (Tableaux 1 et 2). Ces deux analyses reflètent non seulement la taille du cancer mais aussi son agressivité et son avancée métastatique. Ces classifications des tumeurs permettent d'améliorer le pronostic et de favoriser les résultats cliniques. Ces éléments constituent donc d'importants facteurs pronostiques et/ou prédictifs pour guider et adapter le choix des traitements.

a. La classification TNM

Une fois le type de cancer du sein identifié, un autre moyen de classification est d'évaluer l'avancée de la tumorigenèse avec la classification TNM de l'IUCC (International Union of Cancer Control). Trois critères morphologiques sont évalués : T pour la taille de la tumeur et son niveau d'infiltration dans les tissus adjacents, avec une valeur allant de 0 à 4. N pour l'atteinte ou non des ganglions lymphatiques par des cellules cancéreuses disséminées. C'est un indicateur du degré de propagation de la tumeur avec un nombre allant de 0 à 3 accompagné de la localisation des éventuels ganglions lymphatiques envahis. Enfin, l'absence ou la présence de métastases à distance est désignée par M et simplement noté 0 ou 1 respectivement. Les poumons, les os, le cerveau et le foie représentent les organes les plus touchés par les métastases mammaires. Une valeur est attribuée à chacune de ces caractéristiques donnant un score de 0 à 5 permettant de suivre le degré d'évolution du cancer du sein et d'estimer le

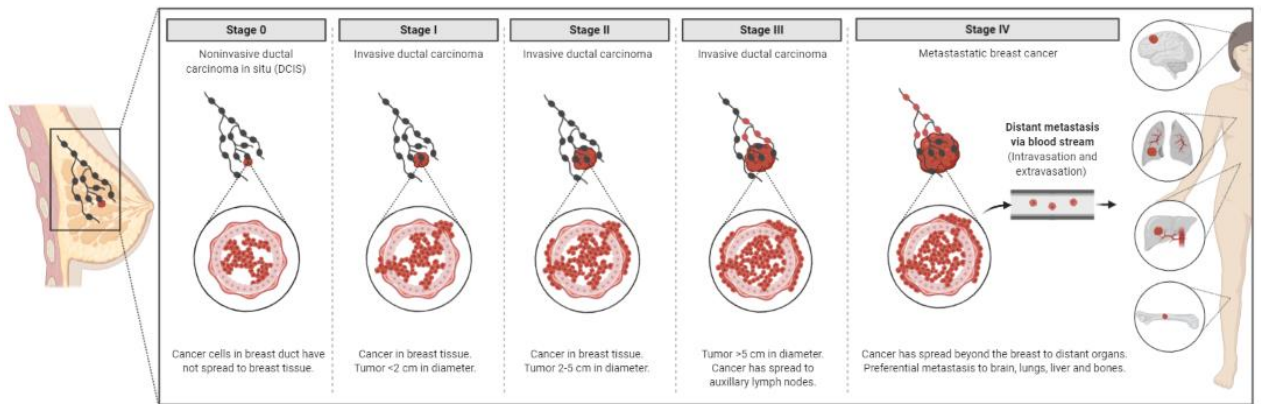


Figure 23 | Représentation graphique du stade et de la classification du cancer du sein

Tableau 3 | Grade histologique SBR du cancer du sein
(Elston et Allis; 1991)

Architecture tumorale	Score
Proportion de formation de canaux ou glandes dans la tumeur (en % de surface tumorale)	
> 75%: Tumeur majoritaire bien différenciée	1
10-75 %: Tumeur modérée moyennement différenciée	2
<10%: Tumeur faible peu différenciée	3
Pléomorphisme nucléaire	
Atypies= Forme et taille du noyau (apprécié sur la population tumorale prédominante)	
Variations très discrètes: noyaux petits, réguliers, uniformes	1
Variation smodérées: pléomorphisme modéré	2
Variations importantes de taille, de forme, avec nucléoles proéminents	3
Activité mitotique	
Compter 10 champs au grossissement x400	
Moins de 10 mitoses	1
Entre 10 à 12 mitoses	2
Plus de 12 mitoses	3
Grade tumoral total	
Somme des différents scores obtenus avec un total de 3 à 9 classée en 3 grades	
Grade I: Tumeurs bien différencuées, de bon pronostic	3, 4, 5
Grade II: Tumeurs moyennement différenciées, pronostic moyen	6, 7
Grade III: Tumeurs peu différenciées, mauvais pronostic	8, 9

pronostic de ce cancer. Le pronostic est favorable quand le stade est bas : les cellules cancéreuses sont limitées à leur localisation d'origine sans aucun envahissement du tissu voisin. Plus le stade s'élève, plus le pronostic et la survie deviennent défavorables, jusqu'aux tumeurs métastatiques (Figure 23, Tableaux 1 et 2).

b. Le grade histologique SBR ou MSBR

Trois caractéristiques morphologiques principales sont utilisées par les pathologistes afin de définir le type et le grade histologique d'un cancer du sein selon la classification SBR (Scarff, Bloom et Richardson) :

- L'architecture tumorale décrit le degré de différenciation des cellules tumorales. Les diverses modifications d'une cellule tumorale lui font perdre ses caractéristiques initiales jusqu'à les rendre indifférenciées. L'état de dédifférenciation des cellules prédit le degré d'agressivité de la tumeur et guide le choix thérapeutique de l'hormonothérapie pour les tumeurs différenciées et de la chimiothérapie pour les moins différenciées.

- Le pléomorphisme nucléaire ou l'atypie nucléaire décrit la forme et la taille des noyaux des cellules tumorales comparés aux noyaux des cellules saines.

- L'index mitotique est un indice de l'activité mitotique des cellules tumorales. Il reflète donc la vitesse de prolifération tumorale et une forme d'agressivité.

Après l'attribution d'un score de 1 à 3 pour chacun de ces critères, un score total de 3 à 9 est calculé pour chaque tumeur. En se basant sur ce score, trois grades ont été décrits : grade I (score ≤ 5), grade II (score 6 ou 7) et grade III (score 8 ou 9). Plus le grade est haut, plus la tumeur est agressive, plus le pronostic est défavorable. On parle alors de "tumeur de haut grade". Un deuxième grade histologique modifié a été proposé par Le Doussal et al. dans le but d'améliorer l'effet pronostique des patientes. Ce grade nommé MSBR (SBR modifié) exclu l'architecture tumorale de son analyse et se base seulement sur le pléomorphisme nucléaire et l'index mitotique pour classer les tumeurs selon 5 grades. Le grade MSBR est plus orienté vers le pronostic des patientes. Deux groupes principaux sont définis par le grade MSBR. Le groupe 1 (grades I à III) rassemble les patientes à risque métastatique faible alors que le groupe 2 (grades IV et V) présente un risque métastatique élevé (Tableau 3).

2. Classification transcriptomique / moléculaire du cancer du sein :

Au tout début du XXI^e siècle, les progrès exponentiels de la génomique fonctionnelle, les puces à ADNs et le profilage transcriptomique ont largement amélioré notre compréhension de la biologie du cancer du sein. L'analyse moléculaire grâce au profilage de l'expression génique

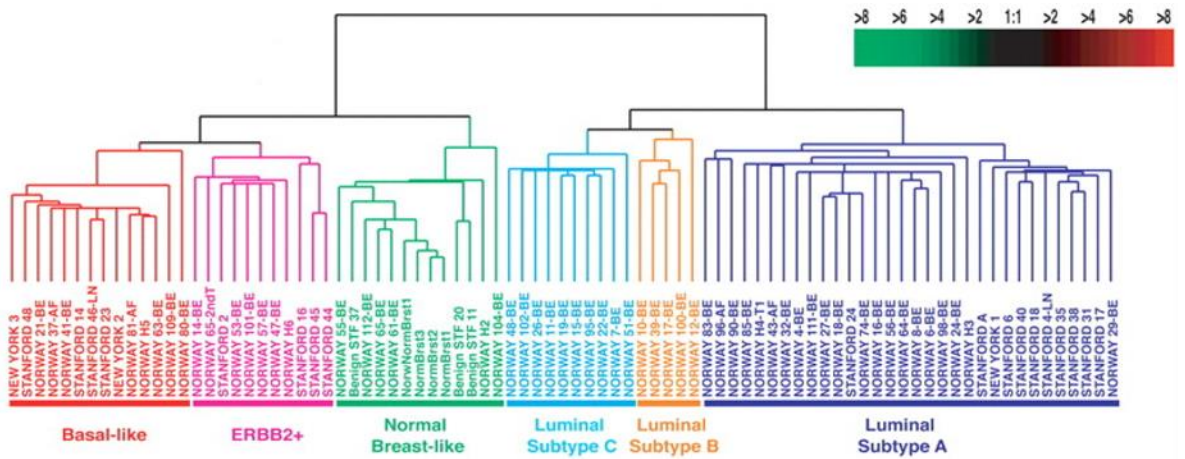


Figure 24 | Classification moléculaire à six sous-types de carcinomes mammaires.

Une clustérisation hiérarchique basée sur les différences d'expression génique identifie différents sous-types de cancers du sein : trois sont dits luminaux et expriment ESR1, un groupe surexprime le récepteur HER2, un groupe basal-like et un groupe normal breast-like. Les groupes Luminal B et C ont finalement été regroupés en un seul sous-type Luminal B.

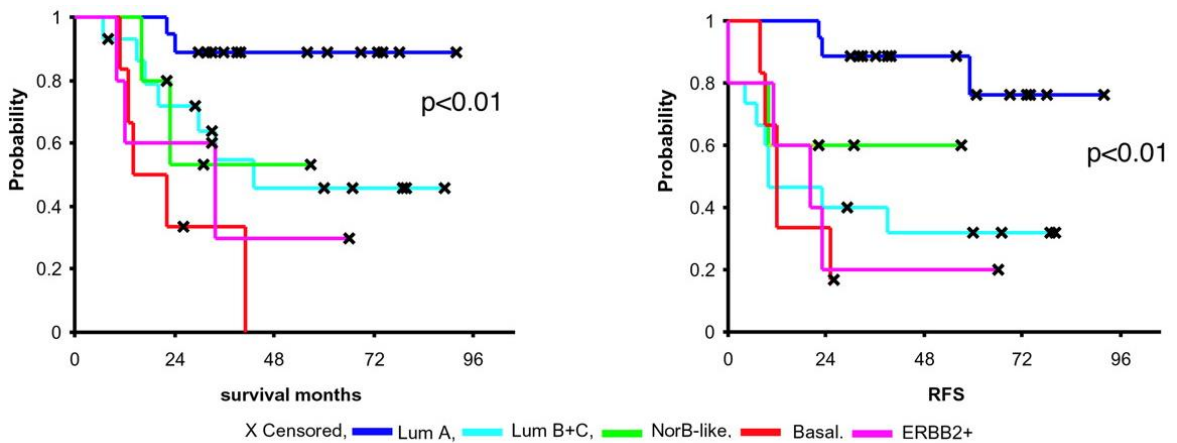


Figure 25 | Courbes de survie globale et survie sans rechute en fonction du sous-type.

Les patientes qui ont développé une tumeur classée Luminal A présentent les meilleures survies globale et sans rechute. À l'inverse, les sous-types Basal-like et HER2-enrichi ont été associés à la plus mauvaise survie globale et survie sans rechute (Sørli *et al.* 2001).

a révélé une hétérogénéité importante parmi les cancers du sein. Une simplification de cette hétérogénéité s'est imposée comme moyen de mieux classer les carcinomes mammaires et ainsi d'améliorer les concepts de traitement. La classification doit assurer une bonne corrélation avec les caractéristiques connues des tumeurs, les marqueurs d'agressivité, le pronostic de survie globale et de survie sans métastase et la sensibilité à la thérapie^{96,97,98,99}. Pérou et Sørli ont construit une classification moléculaire intrinsèque, basée sur les profils d'expression, qui ordonne les cancers du sein en cinq sous-types. Ces sous-types comprennent : les cancers du sein Luminaux A et B, HER2-enrichi, Basal-like et normal breast-like (Figure 24). Ces sous-types ont été associés avec une différence très significative de survie globale entre les sous-types. Les tumeurs Basal-like et HER2-enrichies ont été associées avec la survie globale et survie sans rechute la plus défavorable (Figure 25, tableau 4)¹⁰⁰.

a. Le sous-type Luminal A :

Les cancers mammaires luminaux A représentent 30 à 40 % des cancers invasifs du sein. Le sous-type Luminal A, comme le sous-type Luminal B, expriment les récepteurs hormonaux, et en particulier ceux des œstrogènes et de la progestérone. Ils expriment aussi les gènes associés aux cellules épithéliales luminales du tissu mammaire normal, notamment les cytokératines 8 et 18. Plus que les Luminales B, ces tumeurs sont caractérisées par une expression forte des récepteurs aux œstrogènes (RE) et des gènes régulés par les RE comme GATA3. Leur statut HER-2 est négatif et elles présentent peu de mutation de TP53. Considéré comme le cancer du sein le moins agressif, le sous-type luminal A présente la plus faible expression des gènes associés à la prolifération. Les patientes atteintes des tumeurs luminales A bénéficient du meilleur taux de survie et d'un bon pronostic et profitent d'une thérapie anti-œstrogénique^{101,102}. Le profil génomique des cancers luminaux A se caractérise par des mutations PIK3CA, MAP3KI et FOXA1, une expression élevée de XBP1 et ESR1, et un gain de 1q, 8q, et une perte de 8p, 16q.

b. Le sous-type Luminal B :

Les cancers mammaires luminaux B représentent 20 à 30 % des cancers du sein invasifs. La comparaison des cancers luminaux B avec les cancers luminaux A révèlent une expression moins élevée des RE et une expression plus élevée des gènes liés à la prolifération. On retrouve un taux élevé de mutation de TP53¹⁰³. Les tumeurs Luminales B sont plus agressives, associées à un pronostic défavorable et à un taux de survie diminué ressemblant plutôt aux deux autres sous-types de cancer du sein : HER2-enrichi et basal-like¹⁰⁴. L'hormonothérapie est le traitement de référence mais son association avec la chimiothérapie est recommandée pour les

Tableau 4 | Différents caractéristiques des sous-types du cancer du sein.

	Représentation de l'expression génique	Représentation immunophénotypique	Caractéristiques histologiques associées	Caractéristiques cliniques associées
Luminal A	ESR1, facteurs de transcription associés à ESR1	ER+ et/ou PR+, HER2-, faible Ki-67	Grade bas	Sensitive au traitement endocrinienne, Réponse variable à la chimiothérapie Bon pronostic
Luminal B	ESR1, facteurs de transcription associés à ESR1	ER+ et/ou PR+, HER2+	Grade plus haut que les luminaux A	Sensitive au traitement endocrinienne, Réponse variable à la chimiothérapie Pronostic plus mauvais que les luminaux A
Basal-like	Kératine 5 et 17 Laminine $\delta 2$	ER-, PR-, HER-, CK5/6+, et EGFR +	Grade haut	Sensitive au traitement endocrinienne, Réponse variable à la chimiothérapie, Mauvais pronostic
HER positive	ERBB2	ER-, PR-, HER2+	Grade haut	Sensitive au traitement biologique (trastuzumab) Réponse variable à la chimiothérapie, Mauvais pronostic

patientes atteintes du cancer du sein Luminal B. Un traitement anti-HER2, le trastuzumab, peut être proposé en complément alternatif à la chimiothérapie aux patientes porteuses de tumeurs Luminales B positives pour HER2¹⁰⁴. Le profil génétique de ces tumeurs montre une instabilité génomique accrue, une perte fréquente du gène ATM, une amplification MDM2 et Cycline D1 et une activation des voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR et IGF-1R⁹⁷.

c. Le sous-type HER2 enrichi :

La protéine HER2 est une protéine membre de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase codée par le gène ERBB2. Elle est impliquée dans différents mécanismes cellulaires telles que la croissance cellulaire, le réarrangement du cytosquelette, la différenciation, la survie et la prolifération cellulaires^{105, 106}. Les tumeurs HER2 enrichi représentent 12 à 20 % des cancers du sein invasifs associés à un mauvais pronostic et un important pouvoir de rechute¹⁰⁷. Ces tumeurs sont le plus souvent négatives pour ER et PR avec une forte expression de HER2, des gènes associés aux voies de signalisation HER2, des gènes associés à la prolifération. Par contre, ils présentent une faible expression des gènes luminaux ainsi que des mutations TP53, PIK3CA, et APOBEC^{108, 109, 110}. La suppression de l'activité du récepteur HER2 est le traitement qui a permis d'améliorer la pronostic et le taux de survie des patientes¹¹¹. Différents laboratoires ont développé des inhibiteurs spécifiques tels que le trastuzumab ou le lapatinib. Il est cependant important de noter que le traitement par trastuzumab peut inverser le statut d'expression de HER2 dans certains cas. Ces tumeurs redevenues HER2 négatives sont associées à un faible taux de survie sans rechute¹¹².

d. Le sous-type Normal-like :

Le sous-type Normal-like a été trouvé dans environ 5 à 10 % des cancers mammaires¹⁰⁸. Le profil d'expression génique de ces tumeurs de caractériser par des niveaux hauts pour les gènes exprimés dans les cellules épithéliales basales et les cellules adipeuses et des niveaux faibles pour les gènes exprimés dans les cellules épithéliales luminales et liés à la prolifération^{113, 114}. Le cancer du sein de type normal-like est positif pour les récepteurs hormonaux et négatif pour HER2. Son indice de prolifération est faible, témoin d'une vitesse de progression tumorale limitée. Les cancers Normal-like ne répondent pas au traitement néoadjuvant, mais uniquement au protocole de chimiothérapie adjuvante. La ressemblance de ce sous-type avec le tissu mammaire normal a longtemps fait débat. Il semble aujourd'hui que l'existence de ce sous-type moléculaire soit artificiel, peut-être due à des contaminations d'échantillons ou des échantillons non représentatifs¹¹⁵. Il a été exclu dans les versions récentes de classifications des cancers du sein.

e. Le sous-type basal-like :

Le sous-type Basal-like présente une similitude avec les cellules myoépithéliales ou basales normales. Son profil d'expression inclut les cytokératines de haut poids moléculaire (CK 5, 6, et 17), la laminine, l'intégrine- β 4, la vimentine, la protéine de liaison aux acides gras, le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) ainsi que l'actine musculaire lisse. Il se caractérise également par l'absence d'expression des récepteurs aux estrogènes, à la progestérone et HER2-, ^{113, 116, 117}. Il représente 10 à 20 % des carcinomes mammaires, les plus agressifs. Les carcinomes basal-like sont caractérisés par le plus mauvais pronostic et le plus haut risque de récurrence et de rechute métastatique à distance des cancers du sein. En l'absence de cibles thérapeutiques précises, de multiples stratégies thérapeutiques ont été appliquées aux patientes atteintes du cancer du sein basal-like. Ces thérapies ciblent la Poly (ADP-ribose) polymérase 1 (PARP1), la protéine kinase activée par un mitogène (MAPK), l'EGFR, et les voies AKT ^{118, 119}. Malheureusement, le sous-groupe basal-like est très hétérogène, aussi bien au niveau diagnostique, pronostic, morphologique, génétique, qu'au niveau la sensibilité au traitement ¹⁰⁸.

f. Le sous-type Claudin-low

Non présent dans la classification moléculaire initiale, un nouveau sous-type moléculaire a été ajouté par Herschkowitz et al. en 2007 nommé "Claudin-low". Comme son nom indique, ce sous-type est caractérisé par la faible expression des gènes impliqués dans les jonctions serrées et l'adhésion cellulaire, y compris les claudines 3, 4, 7, l'occludine et la cadhérine E. Associé avec un mauvais pronostic, les tumeurs claudin-low sont des carcinomes canauxiers invasifs de grade II ou III avec une fréquence élevée de différenciation métaplasique ou médullaire. Les tumeurs claudin-low sont aussi caractérisées par un enrichissement de gènes marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse (ZEB1/2, SNAIL1/2, TWIST1/2, et vimentine), et présentent des caractéristiques semblables aux cellules souches cancéreuses avec un enrichissement fort des marqueurs CD44+/CD24- et une expression élevée de gènes du stroma notamment de type lymphoïde T CD8+. Ces tumeurs montrent également une faible expression des marqueurs de différenciation luminale. Sur le plan clinique, les patientes atteintes de tumeurs claudin-low présentent un taux faible de réponse à la chimiothérapie néoadjuvante à base d'anthracyclines et de taxanes, intermédiaire entre celui des tumeurs basales et lumineales ^{120, 121, 122}.

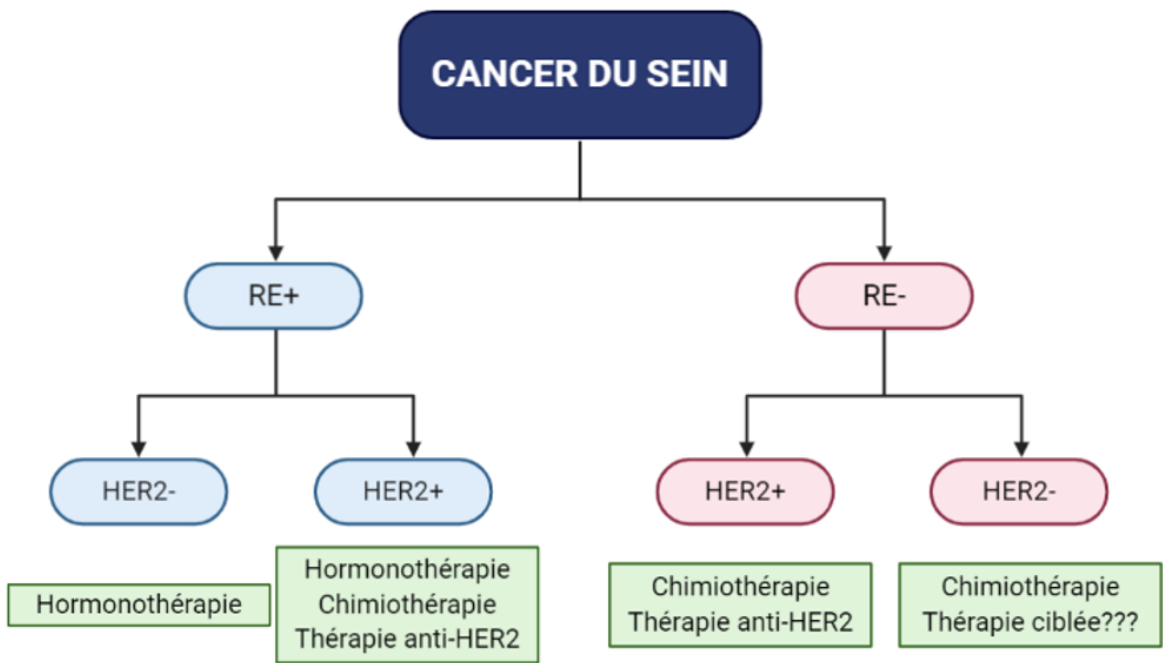


Figure 26 | Classification anatomo-histopathologique du cancer du sein.

La présence ou l'absence de ces 3 marqueurs définissent quatre sous-groupes de cancer du sein : RH+/HER2+, RH+/HER2-, RH-/HER2+ et RH-/HER2. Cette classification à base des RH a une implication thérapeutique majeure en permettant l'application des traitements anti-hormonaux ou pas.

3. Classification immunohistochimique du cancer du sein :

Malgré sa puissance, la classification moléculaire par analyse du transcriptome complet n'est pas accessible aux laboratoires de routine. En complément des critères anatomo- et histopathologiques classiques, les pathologistes ont donc mis au point une approximation de cette classification par évaluation de l'intensité du marquage immunohistochimique de trois marqueurs moléculaires. Ces trois marqueurs sont les deux récepteurs hormonaux (RH) aux œstrogènes (ER) et à la progestérone (PR) ainsi que le récepteur de type 2 à l'EGF (HER2). La présence ou l'absence de ces 3 marqueurs définissent quatre sous-groupes de cancer du sein : RH+/HER2+, RH+/HER2-, RH-/HER2+ et RH-/HER2 (Figure 26). Bien que cela diffère parfois d'un laboratoire à l'autre, un marquage RH est considéré positif si son expression cellulaire cancéreuse est supérieure ou égale à 10%. Cette classification à base des RH a une implication thérapeutique majeure en permettant l'application des traitements anti-hormonaux pour les tumeurs positives. ER est exprimé dans environ 70% des cancers mammaires permettant l'utilisation des molécules anti-œstrogéniques à base de Tamoxifène ou d'inhibiteurs d'aromatase. Considérant les PR, aucune thérapie anti-progestative n'est appliquée mais son importante valeur clinique provient de son rôle pronostic de la fonctionnalité des ERs. Pour les groupes n'exprimant pas les RHs mais positifs pour HER2, un pronostic défavorable est associé à cause de son rôle dans la prolifération cellulaire. Représentant environ 15 % des cancers mammaires, ces tumeurs sont éligibles au traitement par Trastuzumab, un anticorps monoclonal bloquant le fonctionnement de HER2 et inhibant ainsi la croissance tumorale. Les tumeurs n'exprimant aucun des trois récepteurs sont nommées "Triple Négatives". Privées par définition de thérapie ciblée, elles constituent le sous-groupe de plus mauvais pronostic.

De par leur négativité des récepteurs hormonaux, les cancers du sein triple négatifs (CSTN) sont souvent assimilés aux carcinomes Basal-like décrits dans la classification moléculaire^{123, 124}. Les deux types présentent en effet un taux élevé de mutations BRCA1, une forte instabilité génomique, un grade histologique élevé et un pronostic moins favorable par rapport aux autres sous-types décrites. Le chevauchement entre ces deux populations n'est cependant pas parfait, ce qui ajoute encore à l'hétérogénéité de ces sous-groupes^{100,125}. On peut par exemple signaler que la majorité des tumeurs claudin-low sont triple-négatives. À l'inverse, certaines tumeurs identifiées comme Triple Négatives au niveau protéique ne couvrent pas l'étendue de la définition Basal-like transcriptomique. Si la classification moléculaire est probablement la classification qui permet de mieux comprendre les mécanismes et les réseaux d'interactions

moléculaires de chaque type de cancer du sein, la classification immunohistochimique est la plus utilisée afin de personnaliser la prise en charge et le traitement des patientes. Dans ce projet, nous nous intéressons au sous-type CSTN qui va être décrit plus en détails dans le chapitre suivant.

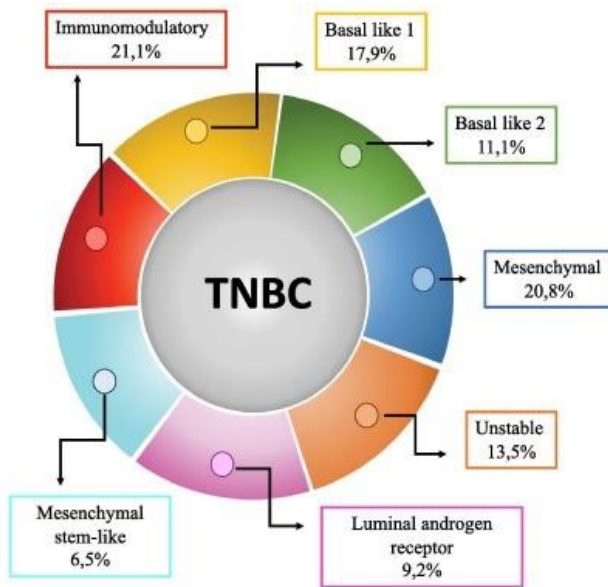
IV. Cancer du sein triple négatif

Au moment du diagnostic, les patientes CSTNs présentent fréquemment une tumeur plus avancée, de plus grande taille, un ou plusieurs ganglions lymphatiques axillaires cliniquement positifs et des frontières envahies, mais n'expriment pas forcément les marqueurs des cellules basales. Un carcinome canalaire infiltrant présentant une nécrose géographique, une frontière d'invasion développée et une réponse lymphocytaire stromale représente l'histologie de haut grade des tumeurs CSTNs. Ces caractéristiques donnent un mauvais pronostic, un faible taux de survie globale et de survie sans rechute et un pouvoir métastatique élevé, principalement vers les poumons ¹²⁶. L'absence des trois récepteurs est responsable de ce pronostic défavorable dû au manque des thérapies ciblés. La prise en charge thérapeutique du CSTN est donc basée sur la chimiothérapie conventionnelle ¹²⁷. Bien que les tumeurs soient initialement sensibles à la thérapie, environ 40% des CSTN développent une chimiorésistance favorisant la mise en place des mécanismes d'échappement métastatique à distance. Cette observation met en évidence l'hétérogénéité du sous-groupe CSTN, défini uniquement par une absence de marqueurs. Cette hétérogénéité est confirmée au niveau morphologique, génétique et clinique et est avancée comme principale raison des disparités de réponse aux traitements traditionnels, de rechute ou de survie. Désormais, beaucoup d'efforts sont donc consacrés à la définition de sous-classifications moléculaires des CSTN, afin de mieux comprendre leur cancérogenèse, d'identifier des cibles moléculaires appropriées, de développer de nouvelles approches thérapeutiques et *in fine* d'améliorer le pronostic de ces patientes.

A. Classification des CSTNs

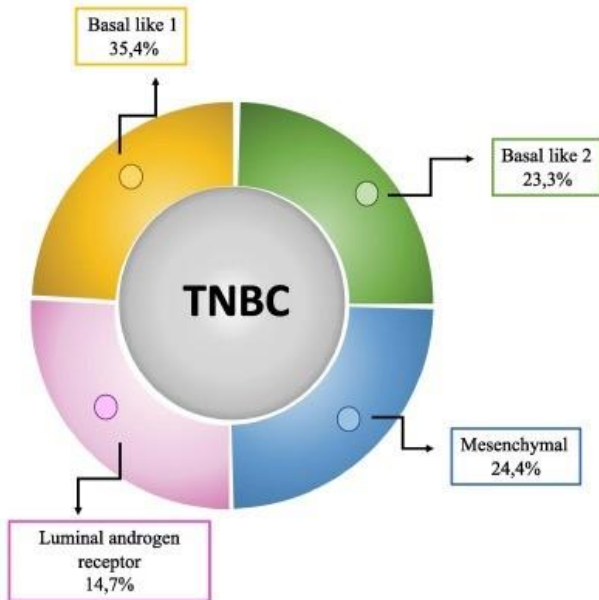
Depuis quelques années, les cancers du sein triple négatifs font l'objet de recherches fondamentales et cliniques à la recherche d'algorithmes de stratification des patientes possédant un impact favorable sur leur prise en charge cliniques et leur qualité de vie. Morphologiquement, la plupart des CSTNs se manifestent par un carcinome canalaire invasif sans type spécifique. Pourtant, ils peuvent aussi prendre la forme de plusieurs sous-groupes rares tels que les carcinomes médullaires, les carcinomes apocrines, les carcinomes sécrétoires, les carcinomes adénoïdes kystiques et les carcinomes métaplasiques ¹²⁸.

A



Sub-types	Characteristics	Molecular Target
BL1	Proliferation drivers such as cell cycle, cell division and DNA replication	PARP1, RAD51, PLK1, TTK, CHEK1, AURKA/B
BL2	Growth factor and metabolic signaling with myoepithelial markers	EGFR, mTOR, MET, EPHA2
M	Epithelial-to-mesenchymal transition and differentiation	PI3K, mTOR, IGF1R, SRC, PDGFR, FGFR
UNS	DNA damage responses and cell proliferation	PARP1, RAD51, PLK1, TTK, CHEK1, AURKA/B
LAR	Hormonale-mediated signaling-androgen receptor	AR, Hsp90, PI3K, FGFR4
MSL	Epithelial-to-mesenchymal transition, differentiation, angiogenesis, stemness, growth factor	SRC, PI3K, MEK1/2, mTOR, PDGFR, NFkB, FGFR, IGF1R, TGFBRIII
IM	Immunemediated signaling	JAK 1/2, LYN, STATs, IRF1/7/8, BTK, NFkB

B



Sub-types	Characteristics	Treatment
BL1	Cell cycle control, DNA damage response and high cell proliferation	Antimitotic agents such as platinum salts and PARP inhibitors
BL2	Expression of EGFR, TP63, MET and activation of glycolysis and gluconogenesis pathways	Antimitotic agents such as platinum salts and PARP inhibitors
M	Pathways involved in cell motility, extracellular matrix interaction, EMT, growth factor. Mutation of PIK3CA or PTEN deficiency.	TKI, mTOR inhibitor, eribulin mesylate
LAR	Hormonale-mediated signaling-androgen receptor	Anti-androgen therapies

Figure 27 | Classification des CSTNS selon Lehmann et al., 2011 et 2016.

A. Les cancers du sein triple-négatifs (CSTNs) ont été classés en six sous-groupes principaux: deux sous-types basal-like (BL1 et BL2), un immunomodulateur (IM), un mésenchymateux (M), un mesenchymal stem-like (MSL) et le luminal-AR (LAR).

B. La classification des cancers du sein triple négatifs a ensuite été affinée et une classification en quatre sous-groupes majeurs a été proposée : deux sous-types basal-like (BL1 et BL2), un mésenchymateux (M), et le luminal-AR (LAR) (Gerratana et al., 2018).

Avec l'évolution des approches transcriptomiques, l'hétérogénéité des CSTNs a été mieux caractérisée et une classification transcriptomique a émergé, subdivisant les CSTNs en différents sous-types aux pronostics significativement différents. Les sous-types moléculaires de CSTN les mieux caractérisés sont désormais le type basal 1 (BL1), le type basal 2 (BL2), l'immunomodulatory (IM), le mesenchymal-like (M), le mésenchymateux stem-like (MSL), le luminal androgen receptor (LAR) ¹²⁹. Une dernière catégorie regroupe les tumeurs "non stables".

- Les sous-types Basal 1 et 2 représentent environ 75 % des patientes atteintes de CSTN. Ce sous-type provient de cellules progénitrices épithéliales positives pour la cytokératine 5 (KRT5). Les cancers du sein BL1 sont fortement enrichis en gènes associés au profil basal dont KRT5, aux voies de régulation de la cycle cellulaire, à la réplication d'ADN et aux voies de réponse aux dommages à l'ADN (ATR / BRCA). Leur indice de prolifération Ki67 est élevé ^{130, 129}. Le sous-type BL2 exprime également les gènes basaux tels que différentes cytokératines, mais aussi des marqueurs myoépithéliaux et des gènes impliqués dans la régulation des facteurs de croissance (voies EGF et IGFR1), de la glycolyse et de la néoglucogenèse ^{131, 132}.

- Le sous-type Immunomodulatory (IM) est enrichi en gènes exprimés par cellules immunitaires infiltrant les tumeurs comme les macrophages, les cellules NK et dendritiques et les lymphocytes infiltrant TILs ^{129, 133}.

- Le profil d'expression des sous-types mesenchymal-like et mesenchymal stem-like est riche en gènes de la différenciation cellulaire et des voies de signalisation des facteurs de croissance. Ce sous-type se présente comme des carcinomes métaplasiques avec une forte expression des gènes de la motilité cellulaire et de la TEM. À noter que le type mesenchymal-like se caractérise par une expression forte des gènes associés à l'angiogenèse et aux cellules souches et une faible expression des gènes de prolifération ^{134, 129}.

- Enfin, le sous-type LAR, négatif pour les récepteurs aux œstrogènes présente un profil d'expression génique luminal (FOXA1, KRT1 et KRT7) avec une forte expression des récepteurs aux androgènes ^{135, 136}.

Cette classification initiale a ensuite été redéfinie en quatre sous-types par Lehmann et al ¹³⁷. Cette classification prend en compte le type histologique et des ARNs plus spécifiques des cellules tumorales grâce à l'utilisation de la microdissection au. Cette stratification conserve des sous-types stables et leurs différences au niveau clinique : BL1, BL2, M, et LAR, et affine le choix thérapeutique en fonction du sous-type (Figure 27).

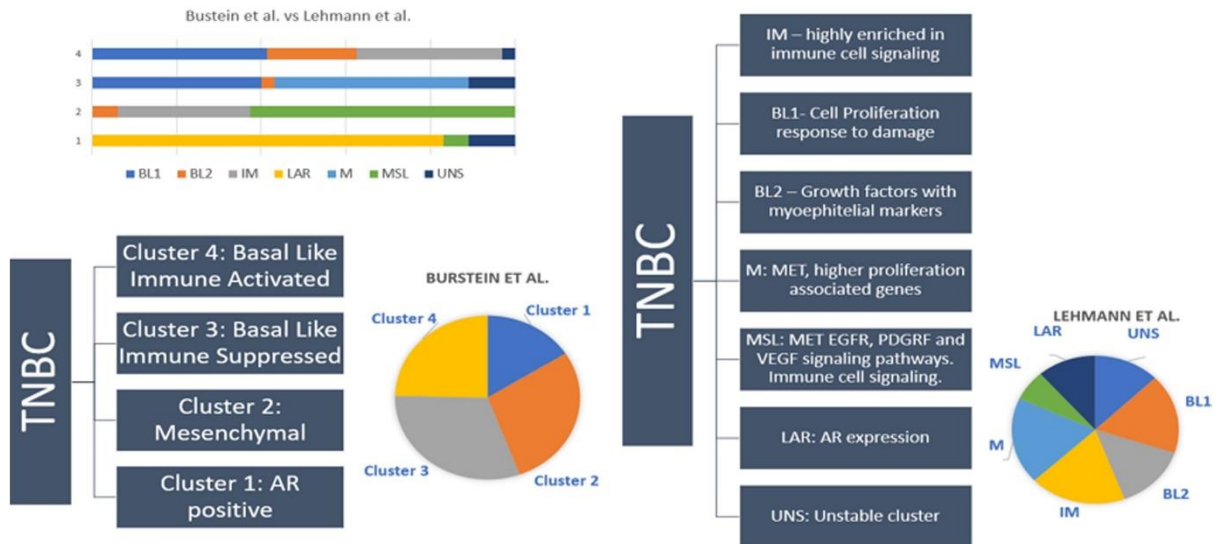


Figure 28 | Intersections des sous-classifications de Lehmann et al. et Burstein et al.

Burstein et al. a identifié 4 clusters pour les CSTNs en 2015: cluster 1: AR luminal (AI), cluster 2: mésenchymateux (MES), cluster 3: basal immunosupprimé (BLIS) et cluster 4: basal immunoactivé (BLIA) . Bien que présentant un nombre différent de catégories, cette classification corrèle assez bien avec celle de Lehmann : le cluster 1 contient les tumeurs (LAR) et le cluster 2 contient la plupart (MSL) de Lehmann. Les tumeurs (BL1 et 2) de Lehmann sont réparties entre les clusters 3 et 4, les tumeurs (M) résident dans le cluster 3, tandis que les tumeurs (IM) sont réparties entre les clusters 2 et 4 (*da Silva et al. ; 2020*).

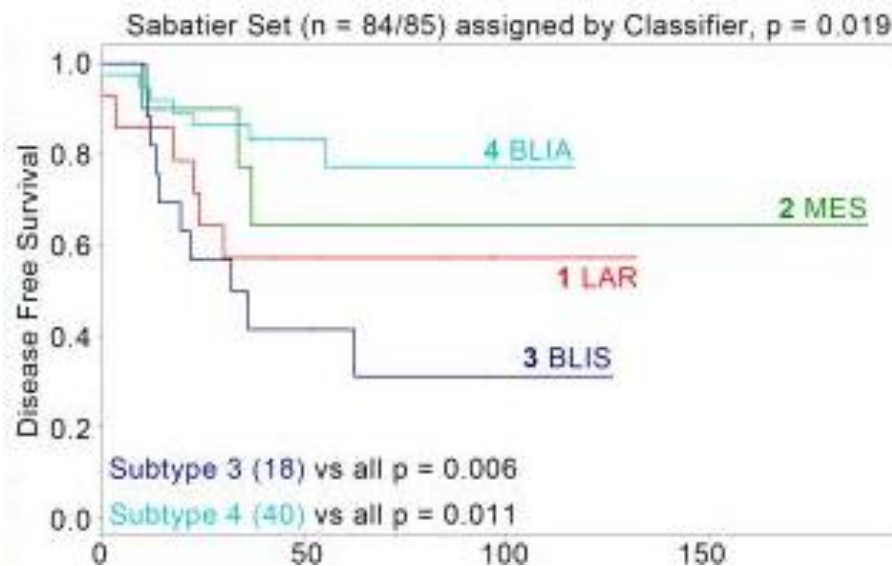


Figure 29 | Courbes de survie des patientes atteintes de CSTNs d'après la classification de Burstein et al.

En accord avec les données classiques sur l'immunité tumorale, le sous-type moléculaire BLIA obtient le meilleur pronostic alors que le plus mauvais est corrélé au sous-type BLIS dans lequel les cellules immunitaires sont inactives. (*Burstein et al. ; 2015*).

Les analyses d'expression géniques ont également été le support d'autres études distinguant les différents phénotypes moléculaires des CSTNs. Burstein et al. ont définis également quatre sous-types pour les CSTNs comprenant le sous-type luminal (LAR), mésenchymateux (MES), basal-like immunosupprimé (BLIS) et basal-like immunoactivé (BLIA) ¹³⁸. La corrélation de ces groupes avec ceux proposés par Lehmann et al. n'est pas parfaite mais témoigne d'une bonne cohérence (Figure 28) ¹³⁹. Le sous-type BLIA caractérisé par une activation importante des voies immunitaires présente le meilleur pronostic et BLIS le pire pronostic, associé à une régulation négative des voies immunitaires (Figure 29).

Une stratification plus restreinte en trois sous-types est aussi proposée : un sous-type LAR, un sous-type basal avec une faible réponse immunitaire riche en macrophages M2, et un sous-type basal avec une réponse immunitaire élevée et des macrophages de type M2 faibles ¹⁴⁰. Ces trois sous-types ressemblent aux sous-types LAR, BLIS, et BLIA de la classification de Burstein et al..

En addition, des études ont suggérés que chaque sous-type soit intrinsèquement hétérogène avec différentes altérations oncogéniques. Wang et al. ont classifiés les sous-types BL1, BL2 et IM en sous-groupes avec haut et faible risque de survie. Une activation élevée de WNT, MYC et RhoA accompagnée d'une perte de RB1 et PTEN et une mutation p53 sont les caractéristiques de BL1 à haut risque, alors qu'un gain de nombre de copies d'AKT1 et une forte expression d'AKT1 a été signalé pour les patientes BL2 à haut risque. Les patientes IM à haut risque présentent une expression élevée du gène PDCD1 (PD1) ¹⁴¹.

Ces classifications en sous-types et sous-groupes toujours plus fins permettent d'identifier les spécificités des tumeurs afin de guider le choix thérapeutique et personnaliser l'agressivité de la thérapie selon les patientes. L'arsenal thérapeutique disponible aujourd'hui n'est pourtant pas infini et les cliniciens ne tirent que peu de profits de ces stratifications détaillées. Cependant, ces identifications suggèrent de nombreuses cibles thérapeutiques pouvant améliorer les futures stratégies thérapeutiques et la gestion des patientes.

B. Traitements des CSTNs

La stratégie thérapeutique appliquée aux patientes atteintes de CSTNs est une combinaison de traitements incluant la chirurgie, chimiothérapie -appliquée avant ou après la chirurgie- et la radiothérapie. Des efforts pour développer de nouveaux traitements afin de favoriser le

Tableau 5 | Sous-types de CSTNs et potentiels cibles thérapeutiques

Sous-types moléculaires	Expression caractéristique	Cibles thérapeutiques potentielles
Basal-like 1 (BL1)	Cycle cellulaire	Carboplatine, Cisplatine
	Réparation ADN (voie ATR–BRCA)	Inhibiteurs PARP
	Prolifération cellulaire	Autres chimiothérapies
Basal-like 2 (BL2)	Voies de signalisation des facteurs de croissance (EGFR, MET, NGF, Wnt/β-caténine, IGF-1R)	Inhibiteurs des facteurs de croissance
	Cycle cellulaire	Inhibiteurs mTOR
	Expression des marqueurs myoépithéliales	
Immunomodulatory (IM)	Processus cellulaire immunitaire	Inhibiteurs PD1/PD-L1
	Voies des chemokines et cytokines	Inhibiteurs de point de contrôle immunitaire
	Présentation des antigènes	Autres thérapies immunitaires
Mesenchymal-like (M)	Mobilité cellulaire	Inhibiteurs AXL
	Différentiation cellulaire	Thérapies anti-TEM
	Voies de signalisation des facteurs de croissance (Notch, PDGFR, FGFR, TGFβ)	Inhibiteurs mTOR
	TEM	
Mesenchymal stem-like (MSL)	Similaire à Mesenchymal-like (M)	Antagoniste Src
	Faible prolifération	Inhibiteurs PI3K
	Angiogenèse	Thérapies anti-angiogéniques
Luminal androgen receptor (LAR)	Récepteur aux androgènes	Blocage anti-androgénique
	Expression génique luminal	Inhibiteurs CDK4/6
	Sous-type moléculaire apocrine	Inhibiteurs de point de contrôle immunitaire

pronostic et la survie des patientes atteintes de CSTNs sont en cours, par exemple sur certaines thérapies ciblées et l'immunothérapie (Figure 30, tableau 5).

1. La chirurgie

La chirurgie est le traitement de référence pour les patientes atteintes de CSTNs. La résection complète de la tumeur avec des marges saines réduit les risques de rechute ; elle est systématiquement vérifiée sur la pièce opératoire. Le type de chirurgie dépend de la taille de la tumeur, de son emplacement, du type de tumeur et de la mono- ou multi-focalité, et de son état de propagation. Deux types de chirurgie sont possibles :

- La chirurgie "conservatrice" consiste à réséquer uniquement la tumeur ou tumorectomie. Elle permet la conservation du sein qui s'applique quand la tumeur est unique et de petite taille ($\leq 2\text{cm}$).
- La chirurgie "non conservatrice", également appelée mastectomie, consiste en une ablation complète du sein si les tumeurs sont multifocales et de grande taille. Des reconstructions mammaires seront proposées aux patientes ultérieurement.

L'exérèse d'un ganglion-sentinel est réalisée pour évaluer l'atteinte ganglionnaire par des cellules tumorales. Elle est suivie d'un curage ganglionnaire si positif.

2. La chimiothérapie

La chimiothérapie est le traitement systémique principal aux stades précoces et tardifs des CSTNs. Son action consiste à tuer les cellules en division. Son action n'est donc pas spécifique des cellules tumorales mais ces dernières sont les principales touchées par le traitement. La chimiothérapie a initialement été utilisée après la chirurgie, pour réduire le taux de récurrence du cancer. Elle a donc été qualifiée d'adjuvante. Elle peut également être prescrite avant la chirurgie afin de diminuer la taille tumorale et de réaliser une chirurgie conservatrice. Dans ce cas elle est appelée néoadjuvante. Plusieurs classes de molécules chimiothérapeutiques existent et qui diffèrent selon leur mode d'action sur le cycle cellulaire. On peut citer les anthracyclines, les taxanes, les sels de platine, l'éribuline, la capécitabine, la gemcitabine, la vinorelbine, l'ixabépilone et le cyclophosphamide. Dans le but d'avoir une efficacité optimale, de nombreux protocoles combinant différentes chimiothérapie ont été élaborés et la plupart ont démontré un meilleur taux de réponse par rapport à un médicament seul ¹⁴². Ainsi, les combinaisons anthracyclines-taxanes ont montrés un taux de réponse pathologique plus important sur les CSTNs en général, en comparaison avec les autres sous-types ¹⁴³.

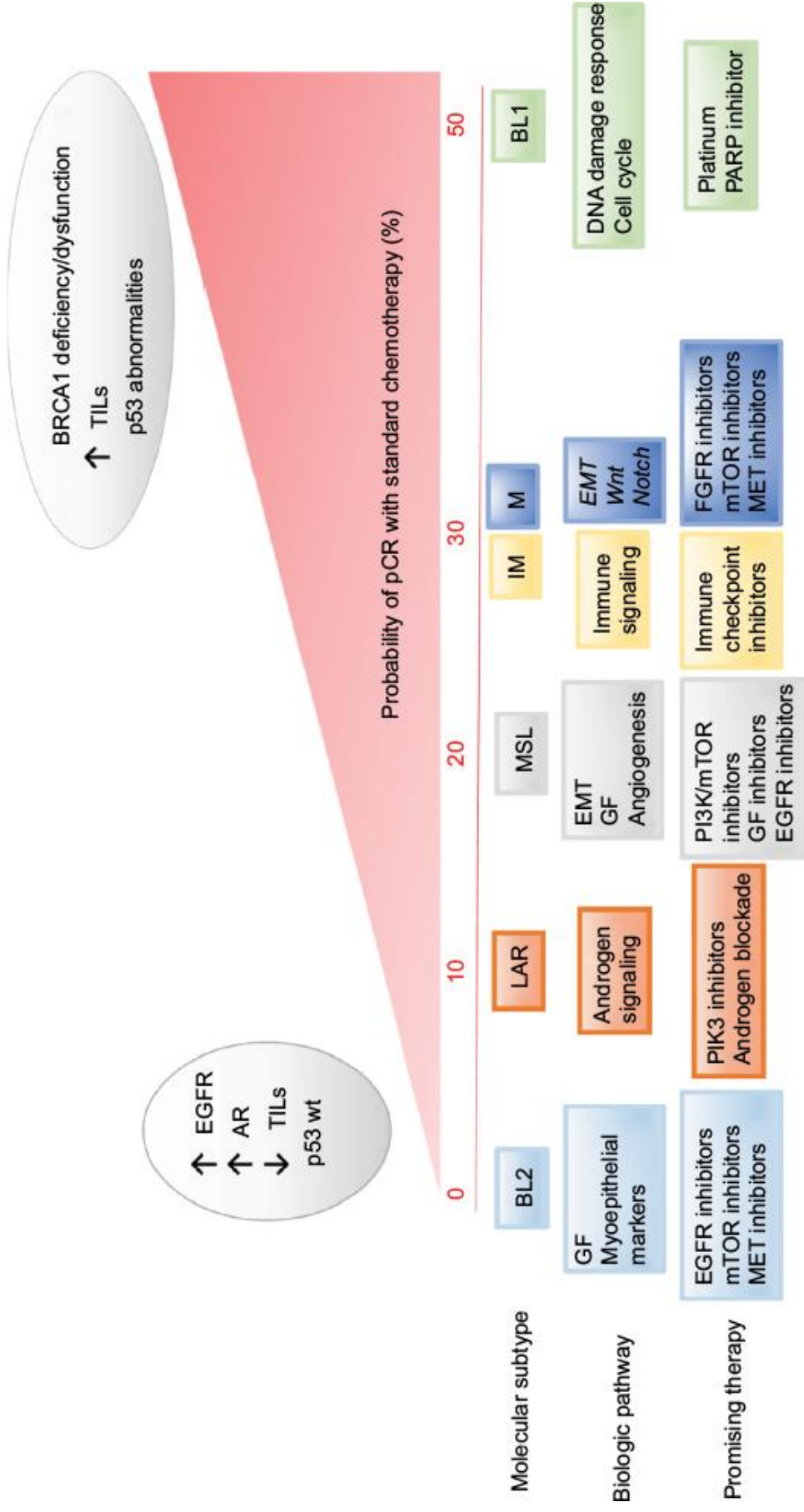


Figure 30 | Suggestion de thérapies prometteuses pour chaque sous-type de CSTNs avec une présentation des taux variables de réponse pathologique complète à la chimiothérapie (Omarini et al.).

Bien que la chimiothérapie soit hautement bénéfique pour les patientes atteintes de CSTN, la réponse pathologique à la chimiothérapie est rarement complète pour ces patientes. À noter que les patientes atteintes de CSTNs présentent une réponse thérapeutique plus complète à la chimiothérapie néoadjuvante, avec une survie globale et sans rechute plus favorable que les autres sous-types de cancer du sein. Par contre, les réponses cliniques deviennent plus graves et défavorables si les tumeurs sont résistantes ¹⁴⁴. De plus, les sous-types présentés dans le paragraphe précédent répondent de manière distincte et leurs taux de réponse pathologique complète diffèrent après une chimiothérapie néoadjuvante. De ce fait, le choix de la chimiothérapie pour chaque sous-type de CSTN reste un sujet de discussion ¹⁴⁵. En se basant sur les caractéristiques attribuées à chaque sous-type par la classification de Lehmann, les patientes atteintes de sous-type BL1 présentent une bonne réponse à l'agent endommageant l'ADN, le cisplatine et aux agents antimétaboliques les taxanes (Paclitaxel ou Docétaxel). Malheureusement, les patientes BL2 caractérisés par un enrichissement des RTKs, gènes de prolifération et de signalisation métabolique atteignent rarement une réponse pathologique complète. La rapamycine (inhibiteur de la voie mTOR) semble avoir des réponses thérapeutiques favorables chez le sous-type MSL. D'autres études cliniques sont en cours afin d'évaluer l'effet de différentes molécules chimiothérapeutiques selon le sous-type.

3. La radiothérapie

La radiothérapie consiste à utiliser des rayonnements ionisants à haute énergie pour détruire les cellules cancéreuses de manière aussi localisée que possible dans le but de minimiser les dommages causés aux cellules normales voisines. Elle est généralement réalisée après une chirurgie et une chimiothérapie dans le but d'éliminer d'éventuelles cellules tumorales résiduelles et de réduire les risques de rechute. Ce type de traitement permet de tuer les cellules cancéreuses et inhiber de leur croissance et prolifération.

4. Les thérapies ciblées

Au contraire de la chimiothérapie, un point fort de la thérapie ciblée est qu'elle présente peu de cytotoxicité envers les cellules saines, dépourvues de l'altération ciblée. Grâce aux techniques récentes d'analyses à haut débit, différentes cibles thérapeutiques ont été identifiées pour les CSTNs, et 3 sont utilisées en routine. Ces thérapies ciblées ont été approuvées la FDA américaine pour deux groupes de patientes ; les autorisations européennes sont en cours d'évaluation. La première application consiste à administrer des inhibiteurs de la poly-ADP-ribose polymérase (Olaparib et Talazoparib) aux patientes porteuses de tumeurs mutées pour

BRCA. Le deuxième groupe concerne les tumeurs qui expriment le ligand de mort programmée 1 (PD-L1) qui peuvent être ciblées par une immunothérapie constituée de l'inhibiteur PD-L1 Atezolizumab en association avec le Nabpaclitaxel. Ces thérapies ciblées ont prouvé leur efficacité sur le contrôle de la maladie et allongent la survie globale.

Environ 20% des cancers triple négatifs présentent une mutation BRCA1 ou BRCA2 et sont donc déficients pour la réparation des cassures double brin de l'ADN ¹⁴⁶. Les enzymes poly ADP-ribose polymérase (PARP) sont essentielles à la réparation des dommages simple brin de l'ADN. Bloquer l'action des PARP dans des cellules mutées pour BRCA empêche toute réparation fidèle de l'ADN et conduit à ce qui a été nommé la létalité synthétique. À côté de l'Olaparib et le Talazoparib, plusieurs inhibiteurs de PARP sont actuellement en cours d'essai clinique comme le Véliparib, le Niraparib, et le Rucaparib.

La quantité d'infiltrat tumoral lymphocytaire corrèle bien au pronostic des CSTNs. Cependant les cellules cancéreuses mettent en œuvre une stratégie d'inhibition du système immunitaire afin d'éviter leur destruction. De ce fait, les inhibiteurs des points de contrôle immunitaire constituent des stratégies thérapeutiques pertinentes ¹⁴⁷. L'antigène lymphocytaire T cytotoxique-4 (CTLA-4), PD1, et PD-L1 sont les points principaux de contrôle immunitaire ciblés dans les CSTNs. En plus de l'Atezolizumab en association avec le Nabpaclitaxel, le Pembrolizumab, un inhibiteur de PD-1 présente des résultats encourageants contre les CSTNs ¹⁴⁸.

En plus de ces deux thérapies ciblées, d'autres recherches ont révélé des résultats prometteurs pour de nouvelles thérapies ciblées. Les essais cliniques dans ce domaine sont donc nombreux, multipliant les cibles moléculaires (voie AKT par exemple), les combinaisons de médicaments (inhibiteurs de PARP, immunothérapie, inhibiteurs de point de contrôle...) et méthodes de ciblage (conjugués anticorps-médicament, nanoparticules...).

Une nouvelle approche thérapeutique du cancer consiste en l'administration d'une molécule complexe composée d'un à un médicament cytotoxique adressé aux cellules cancéreuses grâce à un anticorps. Ces anticorps nommés "Antibody-drug conjugates (ADCs)" reconnaissent spécifiquement des molécules à la surface des cellules tumorales, s'y fixent et concentrent donc le composé toxique près des cellules à détruire. Plusieurs conjugués anticorps-médicaments ont été étudiés dans les CSTNs au niveau clinique. Le Sacituzumab Govitecan et le Ladiratumab Vedotin sont les deux principaux anticorps-médicaments contre les CSTNs ¹⁴⁹. ¹⁵⁰. Le Sacituzumab Govitecan associe un anticorps monoclonal IgG1 humain dirigé contre

l'antigène tumoral trophoblastique 2 (Trop-2) à un médicament inhibiteur de la topoisomérase I, le SN-38 (7-éthyl-10-hydroxycamptothécine). Il a été approuvé par la FDA en Avril 2020. Le Ladiratuzumab Vedotin associe quant à lui un anticorps monoclonal IgG1 ciblant LIV-1 à l'inhibiteur des microtubules MMAE. Bien que des études cliniques approfondies soient encore nécessaires, ces conjugués anticorps-médicaments constituent des approches prometteuses pour contrôler les CSTNs. Des combinaisons avec des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire peuvent ouvrir de nouveaux horizons pour la recherche de cibles thérapeutiques contre les CSTNs.

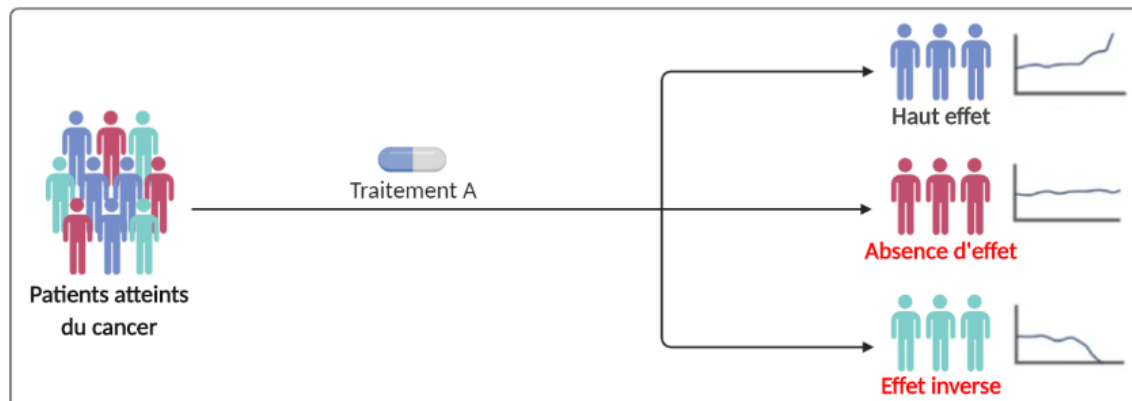
Enfin, différents inhibiteurs moléculaires spécifiques ont été utilisés comme médicaments potentiels contre le CSTNs. On peut citer les inhibiteurs de PI3K (GDC-0941), les inhibiteurs de MEK (MEK162), les inhibiteurs de l'EGFR (Dasatinib), les inhibiteurs du VEGF (Apatinib) et les inhibiteurs de l'AR (Bicalutamide et Enzalutamide). De nombreuses études cliniques associant des inhibiteurs spécifiques avec des molécules chimiothérapeutiques ont démontré des résultats efficaces sur la survie globale et sans rechute des patientes. C'est par exemple le cas pour l'essai de phase II LOTUS dont l'association de l'inhibiteur d'AKT Ipatasertib et du Paclitaxel a démontré des effets bénéfiques sur la survie sans rechute ¹⁵¹.

Si les différents sous-types de cancers mammaires disposent désormais de traitements ciblés efficaces, les CSTNs restent un groupe sans thérapie ciblée dont le pronostic reste mauvais. Les différentes approches thérapeutiques mentionnées annoncent toutefois qu'une nouvelle ère dans la gestion des patientes atteintes de CSTN arrive. Ces nouvelles stratégies et les agents thérapeutiques qui les accompagnent sont très prometteurs et l'existence de différents choix cliniques de traitements permettra d'affiner la prise en charge en fonction des caractéristiques spécifiques de chaque patiente CSTN. Malgré toutes ces avancées, les traitements disponibles actuellement pour le cancer du sein triple négatif ne sont pas suffisants pour traiter l'ensemble des cas, et en particulier les plus avancés avec un développement métastatique. Une étape pronostique prédisant précocement la rechute métastatique est donc cruciale pour adapter le traitement le plus tôt possible. Ces adaptations peuvent inclure des combinaisons plus complexes de médicaments pour les patientes les plus à risque de rechute, mais aussi éventuellement l'allègement des traitements pour certains sous-groupes de patientes présentant peu de risques de rechute, améliorant ainsi leur confort de vie.

L'identification de biomarqueurs pronostiques efficaces et le développement de signatures prédictives et pronostiques sont la condition nécessaire à ces thérapies ciblées et traitements

personnalisés. Ils permettront aussi d'élargir notre compréhension globale des altérations portées par ce cancer du sein péjoratif. Une combinaison des profils d'expression et de mutation avec les interactions et les mécanismes moléculaires permettra de comprendre plus en détails les divers aspects moléculaires des réseaux mis en jeu et éventuellement d'en identifier des spécifiques pour chaque groupe de tumeurs triple négatives. Dans les chapitres suivants, nous développerons plus particulièrement ces deux sujets, biomarqueurs diagnostiques et thérapeutiques et signatures moléculaires.

Thérapie conventionnelle



Thérapie de précision

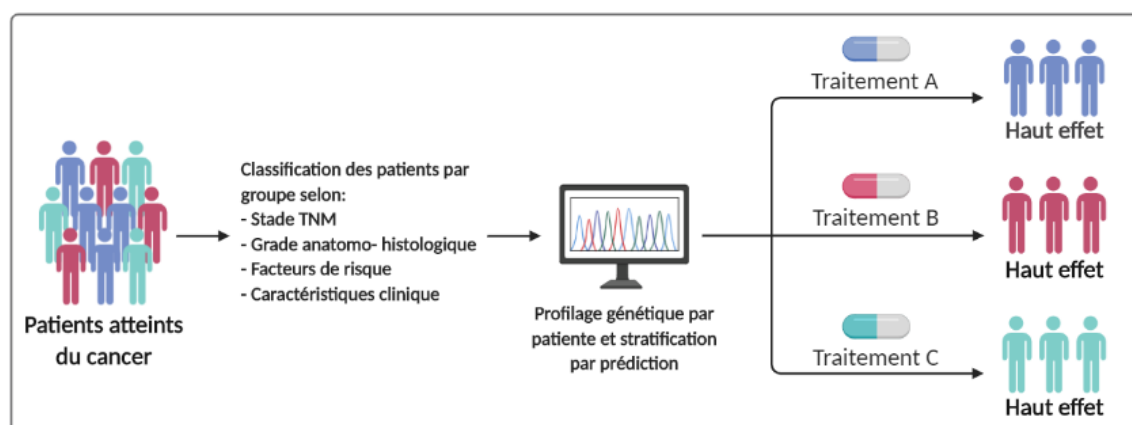


Figure 31 | Diagramme schématique démontrant la différence entre la thérapie conventionnelle et la thérapie de précision.

La médecine conventionnelle proposait un même traitement A à tous les patients qui ont le même diagnostic. Ce traitement peut être avec ou sans effet pour deux groupes différents mais il peut avoir des effets toxiques inverses pour un troisième groupe. De plus en plus, la médecine personnalisée permet de différencier le traitement par personne en fonction des caractéristiques cliniques et génétiques aboutissant à des stratégies thérapeutiques plus efficaces.

V. Les Biomarqueurs dans les CSTNs

A. Définition

Le terme « biomarqueur », issu de la combinaison des termes « marqueur » et « biologique », est largement utilisé dans la pratique médicale et la recherche clinique. De multiples définitions des biomarqueurs ont été citées durant plusieurs décennies. La définition la plus complète et pertinente actuellement admise par la communauté scientifique a été décrite par le groupe de travail sur les définitions des biomarqueurs (Biomarker Definitions Working Group) comme « *des caractéristiques mesurables objectivement et évaluées comme des indicateurs de processus biologiques normaux, pathogènes, ou bien des réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique* »¹⁵². Cette définition assez large inclut toutes les applications des biomarqueurs actuels en association claire avec l'état clinique des patientes. Par contre, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit les biomarqueurs comme « *Toute substance, structure ou processus pouvant être mesuré dans l'organisme ou ses produits et pouvant influencer ou prédire l'incidence ou la survenue (outcome) de la maladie* ».¹⁵³

Les biomarqueurs du cancer représentent toujours un sujet pertinent de la recherche sur le cancer. Ils jouent un rôle majeur dans l'identification et la sous-classification des différents sous-types de cancer. La découverte de biomarqueurs du cancer permet la mise en œuvre appropriée de stratégies de diagnostic et de pronostic et de protocoles thérapeutiques. La révolution -omique identifiant de nouveaux changements moléculaires et métaboliques ouvre la voie à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents à la cancérogenèse et aux événements cellulaires au cours de la progression du cancer et des métastases¹⁵⁴. Ces événements moléculaires ou biomarqueurs peuvent être ciblés sur le plan thérapeutique, engendrant de vastes changements dans les approches de traitement traditionnelles. Cette stratégie annule l'approche « *taille unique* » et permet la « *thérapie anticancéreuse individualisée axée sur les biomarqueurs* » ou la « *médecine personnalisée* ». La Haute Autorité de Santé recommande la nomenclature de la médecine stratifiée au lieu de la médecine personnalisée et l'a décrit comme « *une approche thérapeutique dont l'objectif est de sélectionner les patients auxquels administrer un traitement en fonction d'un marqueur prédictif, afin de ne traiter que la sous-population susceptible de recevoir un bénéfice du traitement* ». Grâce à la stratification ainsi obtenue, chaque patient sera traité spécifiquement en fonction de ses propres défauts génétiques spécifiques. La construction d'une cartographie génomique sera alors prise en compte par les médecins lors de leur décision thérapeutique¹⁵⁵,

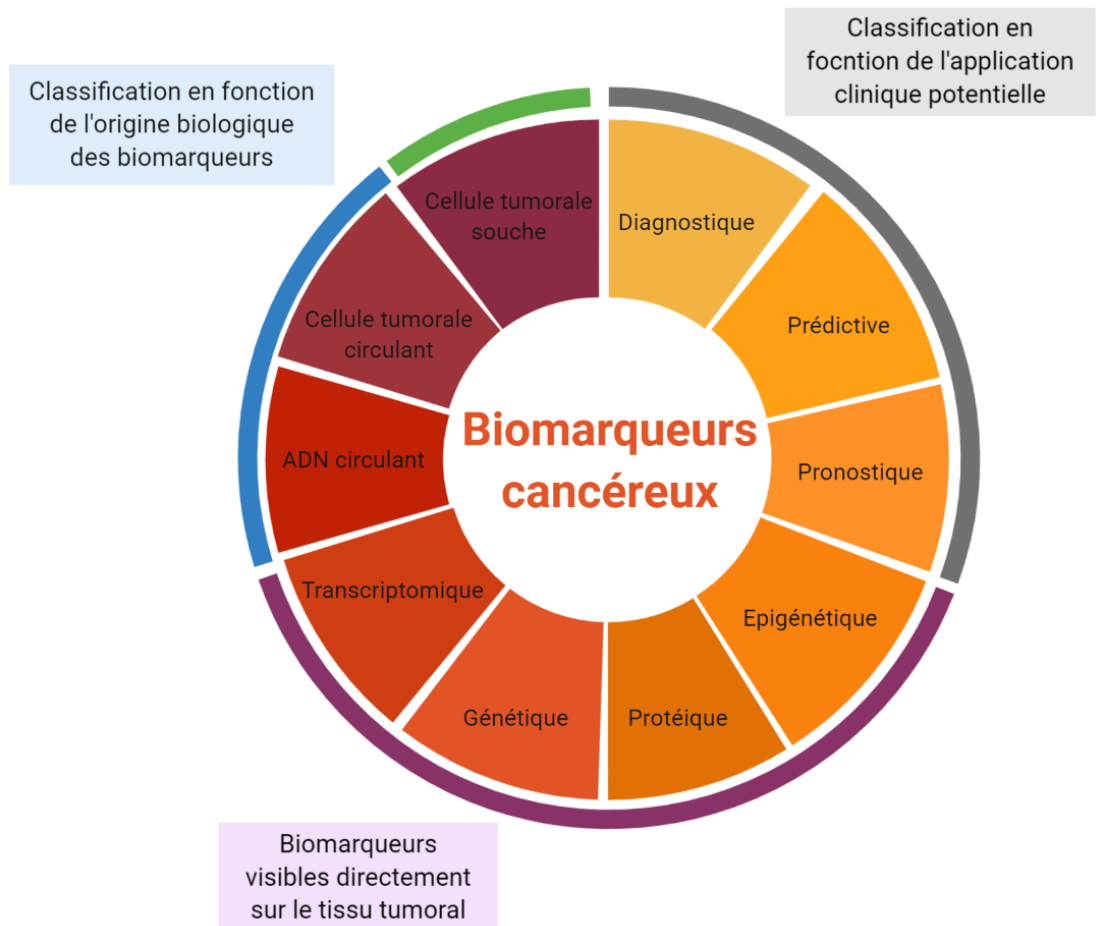


Figure 32 | Classification des différents types de biomarqueur.

Trois classifications peuvent être appliqués aux biomarqueurs en fonction de l'application clinique potentielle, l'origine biologique des biomarqueurs et des biomarqueurs visibles directement sur le tissu tumoral.

¹⁵⁶. En conséquence, la médecine personnalisée basée sur des biomarqueurs spécifiques promeut l'association d'une thérapie et d'un patient, en choisissant une thérapie plus efficace avec une toxicité générale plus faible, ainsi que la réduction du sur-traitement de ceux qui ont une réactivité plus élevée et un meilleur pronostic ¹⁵⁷ (Figure 31).

Les biomarqueurs du cancer sont fréquemment utilisés dans la pratique clinique pour le diagnostic et le pronostic, ainsi que pour l'identification de patientes sensibles et la prédiction de la réponse au traitement d'un patient atteint de cancer ¹⁵⁸. De ce fait, on attend plusieurs qualités d'un biomarqueur sensible, robuste et spécifique : il doit être impliqué dans les processus cancéreux et apporter ainsi une possibilité d'identification des mécanismes responsables de l'apparition du cancer et donc de nouvelles cibles thérapeutiques ; et ses modifications doivent corrélérer avec l'apparition et l'évolution du cancer, permettant son implication dans le diagnostic, le pronostic et la prévision de la réponse à un traitement. Les progrès technologiques permettent désormais la construction d'un pipeline complet de biomarqueurs à partir de six composants essentiels au processus : découverte de candidats, qualification, vérification, optimisation des tests de recherche, validation et commercialisation des biomarqueurs. À l'heure actuelle pourtant, il n'existe aucun moyen standardisé pour valider l'association entre un marqueur (ou un ensemble de marqueurs) et les résultats cliniques.

Durant la dernière décennie, de nombreuses recherches ont mis en évidence le potentiel clinique important des biomarqueurs dans diverses maladies humaines, y compris les cancers du sein triple négatifs. Des preuves scientifiques soutiennent désormais l'intérêt des biomarqueurs moléculaires pour le diagnostic et le pronostic du CSTN. Néanmoins, pour aller plus loin, il serait intéressant d'élucider les voies fonctionnelles, les mécanismes moléculaires et les réseaux génétiques associés à chaque biomarqueur dérégulé afin de comprendre leur rôle dans le développement et la progression du CSTN. Au cours des dernières années, des études *in vitro* et *in vivo* ont mesuré l'impact d'un grand nombre des gènes identifiés dans les tissus tumoraux sur l'agressivité, la prolifération, l'apoptose, la formation des mammosphères, la migration et l'invasion des cellules triple négatifs.

Ce chapitre présente une vision globale des biomarqueurs traditionnels, identifiés et bien décrits, ainsi qu'une description générale des nouveaux biomarqueurs. Je les ai classés selon leur rôle clinique puis selon leur localisation intra- ou extra-tumorale (Figure 32).

B. Classification en fonction de l'application clinique potentielle :

1. Les biomarqueurs diagnostiques :

Les biomarqueurs diagnostiques facilitent la détection d'un certain type de cancers en aidant à différencier un statut malade d'un état sain. Ces biomarqueurs sont caractérisés par une très forte sensibilité et spécificité afin de prévenir le risque de résultats faussement négatifs ou positifs. Ces biomarqueurs peuvent être utile dans plusieurs buts :

- Valider la présence d'un cancer donné chez un patient.
- Établir un diagnostic différentiel au cours de l'évaluation d'une masse tissulaire en différenciant une simple affection bénigne d'un cancer maligne.
- Identifier le tissu d'origine d'un cancer en différenciant une tumeur primaire d'une métastase résiduelle à distance.

Les biomarqueurs diagnostiques permettent une détection précoce des cancers évitant l'étape de la dissémination métastatique diminuant ainsi le taux de mortalité. Puisque le dépistage des cancers est particulièrement difficile avant l'apparition des symptômes cliniques, des biomarqueurs moléculaires peuvent donc présenter un outil de choix pour le dépistage précoce. Ces biomarqueurs sont détectés dans les fluides corporels en différenciant les échantillons cancéreux des témoins normaux. De multiples biomarqueurs diagnostiques impliqués dans les CSTNs ont déjà été proposés. Malgré ces informations, des études plus spécifiques sont nécessaires pour les utiliser en clinique comme c'est le cas pour l'antigène prostatique spécifique PSA approuvé par la « Food and Drug Administration » comme un biomarqueur diagnostique des cancers de prostate ¹⁵⁹. Au cours du temps, sa spécificité a cependant été remise en question et de meilleurs marqueurs émergent actuellement tels que le PSMA.

2. Les biomarqueurs pronostiques :

Les biomarqueurs pronostiques permettent de prédire l'évolution de la maladie dans le temps. Des informations essentielles sur le comportement d'une tumeur (agressivité) et sur le devenir des patientes (guérison, rémission ou apparition de récurrences locales ou à distance) seront tirées de ces marqueurs ^{160, 161}. Dans le cancer du sein, les mutations de gènes codant pour des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN sont le biomarqueur essentiel utilisé dans la phase clinique. Afin de toujours mieux personnaliser les prises en charges, les biomarqueurs pronostiques tendent à se multiplier grâce aux avancées techniques permettant de les mettre en évidence. Leur utilité est pourtant parfois discutable lorsqu'ils ne font que répliquer une constatation clinique ou lorsqu'aucune adaptation thérapeutique n'est possible.

Ces biomarqueurs sont utiles pour concevoir la stratégie thérapeutique à appliquer à chaque patient mais ne prédict pas la réponse à un traitement. La découverte de chacun d'eux devrait donc être suivie d'un essai clinique associant une prise en charge adaptée. Dans ce cadre, il apparaît donc capital d'identifier de nouveaux biomarqueurs pronostiques prédisant la rechute métastatique, et permettant d'adapter les stratégies pour chaque patiente de manière personnalisée. Un exemple serait d'ajouter un traitement adjuvant pour les patientes à fort risque d'échappement métastatique.

3. Les biomarqueurs prédictifs :

Les biomarqueurs prédictifs prédisent l'efficacité d'un traitement. Ils permettent de fournir des données sur la réponse attendue et possible à une thérapie donnée et d'évaluer un différentiel de réponses entre deux thérapies pour une maladie donnée ¹⁶¹. L'émergence de ces biomarqueurs dans la pratique clinique s'inscrit donc logiquement dans le développement de la médecine de précision et jouent un rôle crucial dans le choix de thérapie appliquée. Certains biomarqueur pronostiques peuvent avoir en plus un rôle prédictif de la réponse au traitement. Les biomarqueurs prédictifs permettront d'évaluer d'éventuels nouveaux traitements, puis de mettre en place des thérapies individuelles plus efficaces en prédisant la réponse précocement.

C. Biomarqueurs visibles directement sur le tissu tumoral :

1. Des biomarqueurs génétiques :

Des initiatives multi-omiques visent depuis plusieurs années à caractériser la physiopathologie complexe de l'oncogenèse dans le but d'identifier des facteurs de risque et des biomarqueurs diagnostiques du cancer du sein triple négatif. Les tests génétiques peuvent être constitutionnels pour rechercher une prédisposition héréditaire ou somatiques pour rechercher des variations propres à la tumeur. Des altérations génétiques héritées au niveau de l'ADN (oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs) rendent certaines personnes prédisposées au développement de tumeurs. Le risque au cancer du sein est ainsi augmenté si les patientes présentent des mutations dans des gènes suppresseurs de tumeurs comme CDH1 ¹⁶², PTEN ¹⁶³ et STK11 ¹⁶⁴. Des mutations dans différents gènes dont PALB2, FANCM, RAD51D, et ATM ont été associées à un risque augmenté de déclarer un CSTN ¹⁶⁵.

Au niveau somatique, les investigations génétiques incluent les variations mononucléotidiques (SNP), la perte d'hétérozygotie (LOH), les variations structurelles de

chromosomes telles que l'insertion, la suppression, l'inversion, la duplication, et la translocation et la variation du nombre de copies des gènes (CNV) ¹⁶⁶. Des exemples sont connus pour les gènes ESR1, PTHLH, LSP1, NRIP1 ¹⁶⁷, MAP3K1, TNRC9, et FGFR2 ¹⁶⁸, dans le cas de cancer du sein. Ces remaniements à grande échelle sont fréquents dans les CSTNs et semblent être augmentés dans les tumeurs qui présentent une dérive métastatique ¹⁶⁹. En outre, des études ont suggéré une nouvelle classe de biomarqueurs génétiques du cancer du sein représentée par des mutations somatiques de l'ADN mitochondrial telles que des altérations du gène ATPase6 ^{170, 171}. Les mutations somatiques, quel que soit le gène qu'elles affectent, donneront lieu à des protéines mal repliées capables d'être immunogènes et de fournir des cibles pour les lymphocytes T. Ainsi, une charge mutationnelle tumorale (TMB) est considérée comme un bon marqueur de l'antigénicité tumorale. Plusieurs formules de calcul existent pour cette TMB mais la plus simple consiste simplement à diviser le nombre total de mutations observées par la longueur de la région génomique analysée. La région analysée n'a pas à se focaliser sur un endroit spécifique du génome, mais plus elle est grande, plus le calcul de TMB sera précis. Le rôle prédictif de cette charge est toujours controversé pour les CSTNs. Cependant, cette charge a récemment été utilisée comme un indicateur de la sensibilité aux immunothérapies : les patientes avec un charge mutationnelle élevée présentent un taux de réponse plus élevé au Pembrolizumab ¹⁷².

Le gène TP53 occupe une place à part parmi les biomarqueurs géniques. Il code pour la protéine p53, un facteur de transcription qui régule de multiples fonctions cellulaires : inhibition de la croissance et de la migration cellulaires tout en favorisant l'apoptose et la sénescence ¹⁷³. Les études identifiant les mécanismes d'action de p53 ont révélé nombre de gènes cibles comme p21, les kinases dépendantes de la cycline (CDK), et les protéines de réparation de l'ADN (PARP, BRCA) ^{174, 175}. TP53 est mutée dans presque 80% des CSTNs. Ces altérations importantes de la fonction de la protéine p53 conduisent à une inhibition des gènes suppresseurs de tumeurs et une activation de la voie PI3K/AKT/mTOR aboutissant ainsi à une activation de la prolifération et de la progression tumorale ¹⁷⁶. En relation avec les cancers du sein triple négatifs, l'expression positive de p53 est corrélée à une meilleure survie globale des patientes sans métastase ganglionnaire ¹⁷⁷. De plus, une association entre la mutation et l'expression de TP53 a été décrite comme un marqueur pronostique potentiel de CSTN ¹⁷⁸. Enfin, un rôle de p53 a été décrit en liaison directe avec la TEM. p53 inhibe l'expression de ZEB2 via miR-30a inhibant ainsi l'invasion et la prolifération des cancers du sein triple négatifs ¹⁷⁹. La protéine p53 est non seulement un efficace biomarqueur mais représente aussi une

Tableau 6 | Autres Biomarqueurs transcriptomiques impliqués dans la progression des CSTNs.

Nom du ARNm	Rôle	Sens de régulation	Association	Biomarqueur	Références
CREB3L1	Anti-tumoral	sous-exprimé	Bon pronostic Meilleure survie globale	Biomarqueur de réponse thérapeutique	<i>Denard et al.; 2018</i>
NR1D1	Anti-tumoral	sous-exprimé	Meilleure survie sans maladie chez les patientes recevant de la chimiothérapie.	Potentiel biomarqueur pronostique Cible thérapeutique	<i>Na et al.; 2019</i>
TLR5	Anti-tumoral	sous-exprimé	Bon taux de survie	Biomarqueur pronostique et de suivi	<i>Shi et al.; 2019</i>
RNF208	Anti-tumoral	sous-exprimé	Longue survie sans rechute	Biomarqueur pronostique	<i>Pang et al.; 2019</i>
LKB1	Anti-tumoral	sous-exprimé	Bon pronostic Meilleure survie globale	Biomarqueur pronostique	<i>Rhodes et al.; 2015</i>
VGLL4	Anti-tumoral	sous-exprimé	Mauvais pronostic	Biomarqueur pronostique	<i>Song et al.; 2019</i>
CHD4-β1 integrin	Pro-tumoral	surexprimé	Mauvaises survie globale, sans maladie et sans rechute	Biomarqueur pronostique et thérapeutique	<i>Ou-Yang et al.; 2019</i>
Nectine 4	Pro-tumoral	surexprimé	Mauvais pronostic Courte survie sans métastase	Biomarqueur pronostique et thérapeutique	<i>M-Rabet et al.; 2017</i>

importante cible thérapeutique clinique afin d'inhiber la croissance tumorale. La réactivation de p53 muté grâce à PRIMA-1, APR-246 PK11007, et COTI-2 révèle une activité anti-tumorale dans des modèles précliniques de CSTN^{180, 181, 182}.

Cependant, même si la littérature contient beaucoup de biomarqueurs moléculaires associés aux CSTNs, peu sont validés par une utilité clinique éprouvée et robuste. Il est probable que ce déficit soit lié à la forte hétérogénéité des CSTNs. Il existe donc un intérêt persistant à identifier des mutations dans des gènes clés de la tumorigénèse triple négative, ces biomarqueurs contribuant aux tentatives de "personnalisation" des traitements.

2. Des biomarqueurs transcriptomiques :

Avec l'essor des technologies d'analyse transcriptomique à haut débit telles que les puces à ADN et le RNA-Seq, des analyses de l'expression génique se sont multipliées dans le but d'identifier une population plus large de biomarqueurs. Ces approches sans à priori génèrent des panels des gènes différentiellement exprimés entre deux conditions et produisent des profils moléculaires prédictifs et pronostiques utilisant des dizaines ou des milliers de gènes. Ces profils sont ensuite corrélés à la présence ou l'absence de maladie, l'examen clinique, la progression de la maladie, l'apparition des métastases et les réponses thérapeutiques. Ces analyses permettent d'identifier des biomarqueurs impliqués dans les différentes étapes de la carcinogénèse, isolés ou en combinaison. Ainsi, la chimiokine C-C motif ligand 5 (CCL5), l'interleukine 17B, le facteur de croissance transformant β (TGF- β), le facteur de croissance placentaire, CXCL10 et le récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes β (PDGFR β) ont été considérés comme des biomarqueurs de l'agressivité et de la progression du sous-type triple négatif¹⁸³. Quelques biomarqueurs font désormais office de référence pour les CSTNs et sont présentés ci-dessous. On peut leur ajouter d'autres biomarqueurs décrits au cours de la dernière décennie qui sont résumés dans le Tableau 6.

a. *Ki-67*

Aussi connu sous le nom de MKI67, Ki67 est un marqueur cellulaire de prolifération sous exprimé dans le tissu mammaire normal¹⁹². Ki67 est l'antigène de membrane cellulaire le plus couramment utilisé pour quantifier la prolifération cellulaire et est donc considéré comme un biomarqueur pronostique du cancer du sein¹⁹³. Selon Nakagawa et al., l'expression de Ki67 est significativement associée au phénotype CSTN¹⁹⁴. L'expression de Ki67 dans le sous-type CSTNs est hétérogène et permet de subdiviser les patientes CSTNs en deux groupes de

pronostics différents ¹⁹⁵. L'expression de Ki67 est corrélée à la taille et au grade de la tumeur chez les patientes CSTN mais également avec un risque accru de décès ¹⁹⁶. Même si l'accumulation de Ki67 dans le CSTN est associée à une faible survie globale et sans rechute, il a été montré qu'elle était liée à une réponse pathologique complète plus élevée à la chimiothérapie ¹⁹⁵.

b. Facteur de croissance endothélial vasculaire VEGF

VEGF est responsable de la régulation de l'angiogenèse, une étape cruciale pour la croissance et la propagation de la tumeur ¹⁹⁷. Une association a été affichée entre les niveaux sériques et tissulaires de tumeurs VEGF et le grade, la taille tumorale, l'invasion des ganglions lymphatiques et la survie des patientes atteintes des cancers du sein ^{198, 199}. L'expression élevée du VEGF chez les patientes CSTNs par rapport aux patientes non-CSTNs suggère son utilisation comme biomarqueur chez les patientes CSTNs ²⁰⁰. Un haut niveau de VEGF est corrélé à de mauvaises survie globale et survie sans rechute. VEGF semble augmenter l'agressivité des CSTNs d'après Taha et al. qui a présenté que le traitement classique des tumeurs à taux élevés de VEGF n'inhibe pas leur progression ²⁰¹. Chez les patientes atteintes de CSTN, le VEGF est ciblé par le Bevacizumab, un anticorps monoclonal humanisé anti-VEGF-A. L'ajout du Bevacizumab à la chimiothérapie néoadjuvante a significativement augmenté le taux de réponse pathologique complète ²⁰². Malgré une augmentation de la survie sans progression, aucune amélioration statistiquement significative n'a malheureusement été attribuée à la survie globale ²⁰³.

c. C-kit et Cytokératines basales

C-kit (CD117) est un récepteur de cytokine exprimé principalement à la surface des cellules souches hématopoïétiques. La signalisation par c-KIT est impliquée dans les mécanismes cellulaires de base tels que la prolifération, l'apoptose, l'adhésion et peut jouer un rôle important dans la différenciation cellulaire. Les tumeurs triple négatives présentent une expression de c-kit plus haute que les tumeurs non triple négatives ²⁰⁴. En tant que biomarqueur, Thike et al. ont identifiés une valeur pronostique pour c-kit sur la survie des patientes atteintes de CSTNs ^{205, 206}. La co-mutation de c-kit avec a été décrite comme un facteur pronostique de mauvaise survie des patientes CSTNs ²⁰⁷. Ces études suggèrent CD117 comme un marqueur biologique efficace représentant une potentielle cible thérapeutique. Un groupe de tumeurs basales représentant un sous type des cancers CSTNs se caractérise par l'expression des cytokératines basales CK 5/6, CK 14 et CK 17. Plusieurs résultats sur l'association de ces marqueurs et l'état des patientes ont été décrits. L'expression positive de CK 5/6 et de la

cytokératine 17 prédit un mauvais pronostic clinique ²⁰⁸. De plus, une surexpression de l'expression de CK5/6 est associée avec une augmentation du risque métastatique et de la taille tumorale des CSTNs ²⁰⁹.

d. Récepteur du facteur de croissance épidermique

Le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) est un membre d'une famille de 4 glycoprotéines transmembranaires à domaine tyrosine kinase intracellulaire. Cette famille joue un rôle important dans la prolifération cellulaire et l'inhibition de l'apoptose ¹²⁹. Même si le niveau d'expression du EGFR dans le CSTN est variable, de nombreuses études ont validé que le sous-type basal des CSTNs présente une expression plus élevée de l'EGFR par rapport à d'autres sous-types de cancer du sein ^{117, 210}. De plus, certains résultats suggèrent une forte association entre une amplification génique de EGFR et une survie faible, un grade tumoral plus élevé et des métastases ganglionnaires axillaires ²¹¹. Deux essais ont été menés pour évaluer l'efficacité de l'association de l'anticorps monoclonal anti-EGFR Cetuximab et d'un agent de réticulation au platine dans le CSTN métastatique ^{212, 213}. Les résultats ont légèrement amélioré le taux de réponse global. Ces résultats soulèvent deux hypothèses : soit le Cetuximab n'est pas un inhibiteur total de l'EGFR, soit l'EGFR n'est pas une cible efficace. Cependant, en différenciant le sous-type basal des autres sous types de CSTNs, l'EGFR remplit son rôle de biomarqueur.

e. Récepteur aux androgènes

Le récepteur aux androgènes (RA) fait partie d'un complexe de récepteurs aux hormones stéroïdiennes qui modulent différents facteurs de transcription et contrôlent ainsi l'expression de gènes impliqués dans de nombreux processus cellulaires. Le RA peut à la fois stimuler la prolifération et la différenciation et induire l'apoptose et la mort cellulaire, en fonction des voies de signalisation mobilisées ²¹⁴. Le rôle du RA dans le CSTN est controversé. Il a longtemps été associé à un effet pronostique négatif. Plus récemment, des études ont montré que les patientes atteintes de CSTN RA-positif ont un bilan clinique plus favorable ²¹⁴. De manière cohérente, d'autres études ont rapporté une incidence plus élevée de métastases à distance dans les tumeurs RA-négatives ainsi qu'un taux de survie moins bon en comparaison d'autres sous-types ²¹⁵. Le sous-type LAR est un phénotype moins réactif à la chimiothérapie. Le RA semble avoir un rôle prédictif négatif dans le cadre de la chimiothérapie néo-adjuvante, la positivité au RA étant corrélée à un taux de réponse à la chimiothérapie totale plus faible ^{145, 216}. Cependant l'identification d'un tel biomarqueur dans une sous-population des CSTNs permet d'envisager la mise en place d'une thérapie ciblée anti-RA.

Tableau 7 | Résumé des biomarqueurs protéiques impliqués comme biomarqueurs potentiels de la tumorigenèse du CSTN.

Nom du protéine	Rôle	Sens de dérégulation	Association	Mécanisme d'action	Références
Tinag1	Anti-tumorale	Niveau bas	Stade tumorale avancé Mauvaise survie sans maladie Mauvaise survie sans métastase	Double inhibition des voies de signalisation intégrine / FAK et EGFR.	<i>Shen et al.; 2019</i>
SPAG5	Pro-tumorale	Haut niveau	Mauvais survie globale Mauvaise survie sans maladie Grande infiltration de cellules T CD8 +	Régulation de l'axe SPAG5 / MYCBP / c-MYC	<i>Li et al.; 2019</i>
CYPOR	Pro-tumorale	Haut niveau	Court survie sans métastase Résistance aux traitements	—	<i>Pedersen et al.; 2019</i>
SOCS1	Pro-tumorale	Haut niveau	Mauvais pronostic Taille tumorale plus grande Grade histologique avancée Métastases ganglionnaires et à distance Stade clinique avancé.	—	<i>Qian et al.; 2018</i>
eEF1A2	Pro-tumorale	Haut niveau	Mauvais pronostic	—	<i>Giudici et al.; 2019</i>

4. Des biomarqueurs protéiques :

Les altérations géniques au niveau de l'ADN ou au niveau de l'expression résultent en un protéome tumoral altéré affectant des voies entières de signalisation cellulaire. Les progrès de la protéomique en font donc une approche importante dans le cancer ^{217, 218}. Aujourd'hui, ce sont près de 100 biomarqueurs protéiques sériques qui sont approuvés par la FDA. Cependant, le nombre de ces biomarqueurs protéiques actuellement utilisés en clinique est minime du fait de la complexité à développer des tests de routine. Plusieurs contraintes affectent l'efficacité de développement des biomarqueurs protéiques comme la mauvaise qualité des échantillons cliniques. Dans le cancer du sein, le dosage sérique clinique de deux épitopes différents du gène MUC1 impliqué dans l'adhésion cellulaire, CA 15-3 et CA 27-29 constitue le biomarqueur protéique principal. Ils permettent de prédire la récurrence du cancer du sein ainsi que la réponse aux traitements ^{219, 220, 221}. D'autres marqueurs encore fonctionnent sur le cancer du sein en général, comme PIP ²²² ou HSP90 ^{223, 224}, mais peu sont spécifiques du CSTN (Tableau 7). Les recherches de profilage protéomique des CSTNs doivent donc se poursuivre pour dégager de nouveaux biomarqueurs de ce sous-type.

5. Des biomarqueurs épigénétiques :

Les ARN non codants (ARNnc) sont largement présents dans toutes les cellules eucaryotes et constituent parfois la majeure partie du transcriptome. Ces dernières années, des preuves émergentes suggèrent que ces ARNnc, principalement les microARN (miARN), les longs ARN non codants (lncARN) et les ARN circulaires (circARN), jouent un rôle de premier plan dans la tumorigenèse et la progression du CSTN. Par contre, les fonctions de la plupart des ARN non codants n'ont pas été entièrement décrites et requièrent des analyses fonctionnelles afin d'élucider leur mode de fonctionnement et mécanismes d'action. Pour autant, ces ARNnc constituent une excellente perspective de biomarqueurs pronostiques, diagnostiques et/ou thérapeutiques car leur quantification est simple à mettre en œuvre en pratique clinique. Il est désormais établi que les autres changements épigénétiques comme la méthylation de l'ADN et les modifications des histones jouent aussi un rôle crucial dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans la cancérogenèse. De nombreuses études ont présenté un ensemble diversifié de signatures de méthylation de l'ADN prédisant la réponse au traitement chez les patientes atteintes de CSTN ⁹³. D'autres études ont rapporté l'utilisation de la méthylation d'ADN sur des promoteurs spécifiques tels que APC, RAR- β , GSTP1 et BMRS1 pour la détection précoce et le pronostic du cancer du sein ²³⁰. Je vais par la suite décrire les

Tableau 8 | Résumé des lncARNs impliqués comme biomarqueurs potentiels de la tumorigénèse du CSTN.

Nom du LncARN	Rôle	Sens de dérégulation	Association	Mécanisme d'action	Références
CCAT1	Pro-tumoral	surexprimé	Mauvais pronostic	Régulation de l'expression de OCT4-PG1 Régulation de l'axe miR-218/ZFX Activation de la voie Notch	<i>Xu et al.; 2020</i>
TINCR	Pro-tumoral	surexprimé	Caractéristiques clinico-pathologiques défavorables Mauvaise survie globale	Induction de la TEM	<i>Wang et al.; 2020</i>
HEIH	Pro-tumoral	surexprimé	Taille tumorale Stade clinique avancé	Régulation de la prolifération et de l'apoptose via l'axe miR-4458 / SOCSI	<i>Li et al.; 2019</i>
LINC01638	Pro-tumoral	surexprimé	Mauvais pronostic et survie globale	Activation de MTDH-Twist1	<i>Luo et al.; 2018</i>
HULC	Pro-tumoral	surexprimé	Mauvais pronostic Stade avancé	Activation des MMP-2 et MMP-9	<i>Shi et al.; 2016</i>
GAS5	Anti-tumoral	sous-exprimé	Stade clinique avancé Métastases ganglionnaires Mauvaise survie globale Phénotype agressif	Régulation de l'axe miR-378a-5p/SUFU	<i>Li et al.; 2018</i>
RMST	Anti-tumoral	sous-exprimé	Mauvais pronostic	-	<i>Yang et al.; 2016</i>
NEF	Anti-tumoral	sous-exprimé	Mauvaise survie globale	Régulation de miRNA-155	<i>Song et al.; 2019</i>
SONE	Anti-tumoral	sous-exprimé	Agressivité tumorale	Régulation positive de TP53 et négative de c-MYC	<i>Youness et al.; 2020</i>

différentes classes des ARNs non codants qui ont été identifiés comme de potentiels biomarqueurs pour les CSTNs. Toutes cependant ont besoin de validations.

a. Les longs ARNs non codants

Les longs ARNs non codants (LncARNs) sont un ensemble important de transcrits ne codant pas des protéines et dont la taille dépasse 200 nucléotides²³¹. Il existe entre 60 000 et 100 000 gènes de lncARNs chez l'être humain mais seuls environ 200 d'entre eux sont bien étudiés^{232, 233}. Des études ont montré qu'ils exercent une fonction spécifique à différents stades de la régulation cellulaire²³⁴ et qu'ils sont des régulateurs importants des différentes voies de signalisation liées au cancer²³⁵. Ainsi, les lncARNs peuvent fonctionner comme des suppresseurs de tumeur ou bien des lncARNs oncogènes. Leur action peut participer à l'induction de la TEM, la régulation des miARNs, la régulation de la voie de la PI3K-AKT kinase, la modulation du cycle cellulaire et des voies apoptotiques ainsi que la régulation des molécules d'adhésion cellulaire. Yang et al. ont identifié 1211 lncRNA différentiellement exprimés dans les CSTNs²³⁶. Ces études fournissent une riche ressource en nouveaux lncARNs biomarqueurs potentiels^{237, 238}. Les biomarqueurs les mieux caractérisés sont résumés dans le Tableau 8.

b. Les microARNs

Chaque microARN (miARN) régule le plus souvent l'expression de nombreux ARNm. À ce titre, ce sont d'excellents biomarqueurs potentiels du cancer du sein²⁴⁷. En plus de leur rôle dans l'activation de l'EMT⁹³, certains miARNs permettent un diagnostic précoce ainsi qu'une prédiction de la réponse aux médicaments^{248, 249, 250}. La revue publiée par Tang et al. a présenté une description des miRNAs distinguant les CSTNs des autres sous-types de cancer du sein et a dressé un bilan des miARNs qui peuvent être utilisés en tant que marqueurs pronostiques potentiels ou avec une application thérapeutique²⁵¹. Ding et al. ont résumé la valeur clinique potentielle des miARNs dans les CSTNs ainsi que leur rôle dans la carcinogenèse, le pronostic, la résistance thérapeutique et leurs applications dans le cancer du sein humain triple négatif. Ils les présentent donc comme des cibles thérapeutiques pertinentes²⁵². Ils décrivent de plus leur rôle dans la pathogenèse des CSTN, tels que la régulation des mécanismes épigénétiques, la transition épithéliale-mésenchymateuse (TEM), la promotion ou pas de la prolifération, les métastases, et l'apoptose²⁵². Une seconde étude a identifié une association de l'expression altérée de quatre miARNs et 3 Hub gènes avec le pronostic des patientes CSTNs²⁵³. Toutes ces études démontrent que l'expression dérégulée des miARNs est un moteur fort des CSTNs

Tableau 9 | Résumé des miARNs impliqués comme biomarqueurs potentiels de la tumorigénèse du CSTN.

Nom du miARN	Rôle	Sens de régulation	Association	Mécanisme d'action	Références
miR-4417	Anti-tumoral	sous-exprimé	Bon pronostic	Biomarqueur pronostique	<i>Wong et al.; 2019</i>
miR-137	Anti-tumoral	sous-exprimé	Bonne survie	Biomarqueur thérapeutique	<i>Lee et al.; 2019</i>
miR-199a-5p	Anti-tumoral	sous-exprimé	Meilleur stade tumoral	Biomarqueur diagnostique et thérapeutique	<i>Shin et al.; 2015</i>
miR-148a	Anti-tumoral	sous-exprimé	Métastases	Biomarqueur pronostique	<i>Xu et al.; 2016</i>
miR-21	Anti-tumoral	sous-exprimé	Survie sans métastase	Biomarqueur pronostique	<i>MacKenzie et al.; 2014</i>
miR-105 et miR93-3p	Pro-tumoral	surexprimé	Chimiorésistance	Biomarqueur diagnostique	<i>Li et al.; 2017</i>
miR34b, miR-301a et miR-361-5p	Pro-tumoral	surexprimé	Mauvaise survie globale	Biomarqueur pronostique	<i>Svoboda et al.; 2012, Yu et al.; 2014, Cao et al.; 2016</i>
miR-9 et miR-155	Pro-tumoral	surexprimé	Mauvaise survie sans rechute	Biomarqueur pronostique	<i>Jand et al.; 2017</i>

et que l'étude de leur expression permet de stratifier les patientes en deux groupes de bon et mauvais pronostic. Le rôle de quelques miARNs uniques en tant que biomarqueurs dans le CSTN sont décrits dans le Tableau 9.

c. Les ARNs circulaires

Les ARN circulaires (circRNAs) sont un type d'ARN qui a été récemment redécouvert. Due à l'absence d'extrémités libres 3' ou 5', les circARNs ont de longues demi-vies les rendant résistants aux mécanismes habituels de dégradation linéaire de l'ARN ²⁶⁴. Les circARNs semblent fonctionner à travers plusieurs mécanismes au niveau moléculaire. Les circARNs n'ont pas été largement décrits dans le cancer à cause de leur faible abondance. Les études ont démontré que leur expression est inversement proportionnelle au taux de duplication cellulaire expliquant leur faible présence dans les cellules tumorales. Ces dernières années, les circARNs sont progressivement devenus un nouveau point chaud dans le domaine de la recherche sur les ARN non codants et le cancer. Dans les cancers du sein triple négatifs, les fonctions biologiques et le mécanisme moléculaire sous-jacent des circARNs restent vagues jusqu'à présent, mais leur demi-vie longue et leur résistance pourraient faire d'eux de puissants biomarqueurs diagnostiques et/ou pronostiques. Un nombre limité d'études sur leur rôle dans les CSTNs sont disponibles actuellement et sont résumées dans le Tableau 10.

Les marqueurs épigénétiques spécifiquement impliqués dans la TEM des CSTNs sont le sujet d'une revue que j'ai publiée dans *Cancers*. Elle est insérée à la fin de ce chapitre.

6. Les cellules souches biomarqueurs des CSTNs

Dans un autre contexte, les cellules souches cancéreuses (CSCs) ont acquis une place prépondérante dans les recherches qui cherchent à expliquer la croissance inexorable des cancers. Elles jouent un rôle majeur dans la croissance tumorale, la résistance au traitement, et la métastase des cancers ²⁷⁸. Dans les cancers du sein, différents marqueurs des cellules souches ont été étudiés afin d'utiliser ces CSCs comme biomarqueurs pronostiques. Ces marqueurs incluent CD44, CD24 et ALDH1 mais les résultats restent contradictoires sur leur corrélation à des valeurs pronostiques. Par exemple, plusieurs études ont démontré une corrélation entre une survie sans maladie courte (ou une mauvaise survie globale) et une forte prévalence des cellules tumorales CD44 + / CD24 - ^{279, 280, 281, 282, 283}. À l'inverse, l'étude de Abraham et coll. a constaté que les cellules tumorales CD44 + / CD24 - sont associées seulement à l'apparition

Tableau 10 | Résumé des ARNs circulaires impliqués comme biomarqueurs potentiels de la tumorigénèse du CSTN.

Nom du circARN	Rôle	Sens de dérégulation	Association	Mécanisme d'action	Références
circSEPT9	Pro-tumoral	surexprimé	Stade clinique avancé Mauvais pronostic	Régulation de l'expression du facteur inhibiteur de leucémie (LIF) via l'épongeage de miR-637 Active la signalisation LIF / Stat3	<i>Zheng et al.; 2020</i>
circGNB1	Pro-tumoral	surexprimé	Taille tumorale Stade clinique avancé Facteur de risque des CSTNs	Eponge miR-141-5p en surexprimant l'IGF1R	<i>Liu et al.; 2020</i>
circRAD18	Pro-tumoral	surexprimé	Taille tumorale Stade clinique Grade pathologique	Eponge de miR-208a et miR-3164 en surexprimant l'IGF1 et le FGF2	<i>Zou et al.; 2019</i>
circIFI30	Pro-tumoral	surexprimé	Stade TNM clinique avancé Grade pathologique élevé Mauvais pronostic	Régulation de l'axe circIFI30 / miR-520b-3p / CD44	<i>Xing et al.; 2020</i>
circEPST11	Pro-tumoral	surexprimé	Mauvaise survie	Eponge des miR-4753 et miR-6809 en surexprimant BCL11A Affecter la prolifération et l'apoptose	<i>Chen et al.; 2018</i>
circGFRA1	Pro-tumoral	surexprimé	Taille tumorale Stade TNM avancé Métastases ganglionnaires Grade histologique élevé	Eponge de miR-34a	<i>He et al.; 2017</i>
circ-UBAP2	Pro-tumoral	surexprimé	Taille et stade tumoraux avancés Métastases ganglionnaires Mauvaise survie globale	Régulation de l'axe miR-661 / MTA1	<i>Wang et al.; 2020</i>
ciRS-7	Pro-tumoral	surexprimé	Haute infiltration tumorale Plus des métastases ganglionnaires	Eponge miR-1299 overexprimant MMPs	<i>Meng et al.; 2020</i>
CircANKS1B	Pro-tumoral	surexprimé	Métastases ganglionnaires	Activation de la TEM via la voie TGF-β1/Smad et l'inhibition de miR - 148a - 3p et miR - 152-3p.	<i>Zheng et al.; 2018</i>
Circ-ITCH	Anti-tumoral	sous-exprimé	Bonne survie globale et bon pronostic	Régulation de l'axe miR-214/miR-17/ITCH Activation de la voie Wnt/β-caténine	<i>Wang et al.; 2019</i>
circFBXW7	Anti-tumoral	sous-exprimé	Stade clinique Taille tumorale Métastases ganglionnaires	Eponges miR-197-3p Surexprime FBXW7 en codant la protéine suppresseur de tumeur FBXW7-185aa	<i>Ye et al.; 2019</i>
CircAHNAK1	Anti-tumoral	sous-exprimé	Bonne survie globale Bonne survie sans rechute	Eponge de miR-421 réactivant RASA1	<i>Xiao et al.; 2019</i>
CircTADA2A-E6	Anti-tumoral	sous-exprimé	Mauvaise survie	Régulation de l'axe miR-203a-3p / SOCS3	<i>Xu et al.; 2019</i>

des métastases à distance et sans aucune corrélation avec la progression tumorale, la survie sans maladie ni la survie globale ²⁸⁴.

Collina et al. ont étudié la valeur pronostique des 5 marqueurs des cellules souches CD44, CD24, CD133, ALDH1, and ABCG2 par immunohistochimie. Les résultats ont démontré un rôle pronostique réel uniquement pour le CD44, associé à l'apparition des métastases distantes et un faible taux de survie sans aucune association avec les autres marqueurs des cellules souches étudiés ²⁸⁵. Bien qu'aucune relation n'ait été attribuée à ALDH1 par la dernière étude, Ma et al. ont observé que l'expression protéique de ALDH1 est significativement corrélée avec la taille et le stade de la tumeur, et était un indicateur pronostique négatif de la survie sans rechute et globale ²⁸⁶. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Ohi et al. ²⁸⁷ mais pas avec l'étude de De Brot et al. ²⁸⁸. Récemment, Panigoro et al. a suggéré que ALDH1 puisse être utilisé comme facteur de mauvais pronostic de survie ²⁸⁹.

De plus, il a été montré que le ciblage de PROCR, une nouvelle protéine de surface, avec un nanocorps inhibe la carcinogénèse des CSTNs ^{290, 291, 292}. De son côté, l'oncoprotéine MUC1 pilote la reprogrammation épigénétique en association avec l'induction du programme de TEM et de l'état des cellules souches tumorales ²⁹³. MUC1 est hautement dérégulée dans les CSTNs et induit un état de dédifférenciation en activant le complexe NuRD ²⁹⁴.

Les marqueurs des CSCs apparaissent donc comme des marqueurs pronostiques potentiels pour les CSTNs mais une longue étape de validation reste à venir. Néanmoins, la signification pronostique de l'enrichissement en cellules souches tumorales dans les CSTNs suggère un rôle critique pour ces cellules, et les positionne en cible intrigante pour de nouvelles thérapies.

D. Biomarqueurs extra-tumoraux :

Les altérations génomiques, transcriptomiques et épigénétiques définies à partir d'échantillons de tumeurs prélevés après geste chirurgical présentent trois inconvénients principaux : le prélèvement est invasif, nécessite un matériel coûteux, du temps et peut être douloureux pour la patiente. En outre, la fixation des tumeurs peut affecter les acides nucléiques et diminuer la qualité des résultats. Enfin, l'échantillon prélevé peut ne pas refléter l'ensemble de l'hétérogénéité tumorale. Les biopsies liquides apparaissent donc comme un substitut non invasif intéressant dans la pratique clinique. Des biomarqueurs "liquides" sont détectés dans plusieurs types de fluides corporels comme le salive, l'urine ²⁹⁵, et le sérum qui représente la catégorie la plus riche. Les biomarqueurs sériques portent de grands potentiels

cliniques car ils permettent une détection précoce et une surveillance chronique de la progression des tumeurs. Quelques biomarqueurs sériques ont été identifiés dans le cancer du sein triple négatif mais, malgré leur efficacité et leur facilité d'accès, les connaissances sont encore limitées. Dans cette catégorie, nous retrouverons les versions circulantes des protéines ou des ARNs tumoraux déjà décrits. De par leur petite taille, les miARNs sont réputés stables dans la circulation sanguine et leur quantité libre serait modifiée selon les différents stades tumoraux^{296,297}. Je vais présenter ici les deux autres classes de biomarqueurs sériques chez les patientes CSTNs.

a Les cellules tumorales circulantes (CTCs) ont été un sujet d'intérêt durant les dernières années de par leur rôle essentiel dans la formation des métastases à distance. La présence de cellules tumorales circulantes est associée à une diminution de la survie sans métastase, de la survie globale et de la réponse au traitement chez les patientes atteintes du cancer du sein²⁹⁸. Les CTCs représentent un moyen de diagnostic important pour les CSTNs. Elles sont révélées par marquage à la cytokératine et au CD45²⁹⁹. Une étude par Lu et al. a démontré que la présence des CTC dans le sang périphérique est un pronostic négativement associé à la survie globale des patientes atteintes de CSTNs³⁰⁰. Une combinaison du dénombrement des CTCs et des cellules immunitaires NK est cliniquement pertinent et pourrait être un outil pronostique utile de la survie sans progression³⁰¹. Récemment, de nombreuses recherches ont lié les cellules tumorales circulantes et les métastases à distance dans des modèles de xénogreffe orthotopique. Une signature de métastase hépatique CSTN a été associée aux CTCs³⁰². Comme la majorité de la mortalité liée au CSTN est causée par des métastases à distance impliquant la dissémination des cellules tumorales du site primaire vers des organes distants, les cellules tumorales circulant dans le sang sont un prédicteur indépendant d'une survie et de métastase. Même si les progrès technologiques ont permis la détection efficace des CTC, beaucoup d'inconnues subsistent sur les voies régulant leur formation et leur mode de fonctionnement.

b L'ADN tumoral circulant est constitué de fragments d'ADN libérés par le tissu tumoral et portant donc les mêmes altérations génétiques et épigénétiques que la tumeur du patient. Il a été proposé que l'ADN tumoral soit issu de la nécrose tumorale, l'apoptose des cellules tumorales et/ou d'une sécrétion directe³⁰³. L'utilisation de l'ADNc comme "biopsie liquide" pour la caractérisation moléculaire et la surveillance dynamique des tumeurs suscite un intérêt croissant. Dans le cas des CSTNs, les mutations les plus recherchées touchent les gènes TP53 et PIK3CA^{299,304}. Saliou et al. ont décrits que la détection d'ADN tumoral circulant facilite la prise en charge des TNBC aux différentes stades de la maladie en favorisant le diagnostic, le

pronostic, les choix ainsi que les réponses thérapeutiques, et finalement la prédiction de la rechute métastatique³⁰⁵.

Comme les cellules constituant une tumeur sont extrêmement diverses et qu'un seul biomarqueur ne permet généralement pas de prédire avec précision la progression du cancer, des signatures multiparamètres sont des alternatives efficaces au biomarqueur isolé, pour le diagnostic et le pronostic du cancer. Avec l'avancement rapide des technologies -omiques, de nombreuses signatures d'expression génique ont été décrites avec la capacité de prédire le risque de métastases, de récurrence et de résistance aux médicaments dans plusieurs sous-types de cancer du sein. Ces signatures ont pour but principal de mieux définir le pronostic individuel des patientes atteintes de cancer du sein localisé, afin de mieux différencier les stratégies thérapeutiques. Certaines d'entre elles ont été développées et commercialisées pour un usage clinique. Cependant, aucune signature prédisant la rechute métastatique n'a été décrite pour le cancer du sein triple négatif.

Review

New Insights into the Implication of Epigenetic Alterations in the EMT of Triple Negative Breast Cancer

Noura Khaled *  and Yannick Bidet 

Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Centre Jean PERRIN et IMoST, UMR 1240, Inserm/Université Clermont Auvergne 58 rue Montalembert, 63000 Clermont-Ferrand, France; yannick.bidet@uca.fr

* Correspondence: Noura.KHALED@uca.fr

Received: 5 February 2019; Accepted: 11 April 2019; Published: 18 April 2019



Abstract: Breast cancer is the most common cancer and leading cause of cancer death among women worldwide, encompassing a wide heterogeneity of subtypes with different clinical features. During the last two decades, the use of targeted therapies has emerged in clinical research in order to increase treatment efficiency, improve prognosis and reduce recurrence. However, the triple negative breast cancer (TNBC) subtype remains a clinical challenge, with poor prognosis since no therapeutic targets have been identified. This aggressive breast cancer entity lacks expression of oestrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR), and it does not overexpress human epidermal growth factor receptor 2 (HER2). The major reason for TNBC poor prognosis is early therapeutic escape from conventional treatments, leading to aggressive metastatic relapse. Metastases occur after an epithelial-mesenchymal transition EMT of epithelial cells, allowing them to break free from the primary tumour site and to colonize distant organs. Cancer-associated EMT consists not only of acquired migration and invasion ability, but involves complex and comprehensive reprogramming, including changes in metabolism, expression levels and epigenetic. Recently, many studies have considered epigenetic alterations as the primary initiator of cancer development and metastasis. This review builds a picture of the epigenetic modifications implicated in the EMT of breast cancer. It focuses on TNBC and allows comparisons with other subtypes. It emphasizes the role of the main epigenetic modifications lncRNAs, miRNAs, histone and DNA- modifications in tumour invasion and appearance of metastases. These epigenetic alterations can be considered biomarkers representing potential diagnostic and prognostic factors in order to define a global metastatic signature for TNBC.

Keywords: triple negative breast cancer TNBC; epithelial-mesenchymal transition EMT; epigenetic modifications; long non-coding RNAs lncRNAs; miRNAs; histone modifications; DNA methylation; metastasis

1. Introduction

Although mortality associated with breast cancer has been constantly declining over the last 20 years, there were still more than 626,000 deaths worldwide in 2018 (International Agency for Research on Cancer IARC 2018 Breast Cancer Statistics). A major reason for these therapeutic failures is the wide heterogeneity of breast cancer and distant metastases. Fifteen years ago, molecular classification of these cancers paved the way for targeted therapeutic approaches taking into account the specificities of different subtypes of breast cancer [1,2].

Triple Negative Breast Cancer (TNBC) is a highly aggressive subtype, accounting for 10–20% of all diagnosed breast cancers, with no targeted therapy available due to the lack of oestrogen and progesterone receptor expression and the absence of HER2 amplification [3]. Representing a serious clinical therapeutic challenge, TNBC is characterized by poor overall survival, early relapse and most importantly, frequent distant metastasis [3]. A lethal hallmark of cancer, metastasis of TNBC is correlated with aberrant activation of epithelial-mesenchymal transition (EMT) [4,5]. EMT is a fundamental biological mechanism by which epithelial cells acquire a mesenchymal phenotype by gaining migratory and invasive properties and modifying cell adhesion molecules [4,5]. This differentiation process is important during development, but inhibiting EMT by antagonizing the EMT-related mesenchymal cell markers such as $\alpha v\beta 3$ integrin reveals its massive involvement in TNBC aggressiveness and metastasis [6]. It allows triple negative epithelial breast cancer cells to break free from their primary tumour site and eventually to colonize distant organs developing metastasis [4,5]. During the last decade, a large amount of data and knowledge were acquired on TNBC biomarkers. Chemokine C-C motif ligand 5 (CCL5), interleukin 17B, transforming growth factor β (TGF- β), placental growth factor, CXCL10 and platelet-derived growth factor receptor β (PDGFR β) were considered as biomarkers for TNBC aggressiveness and progression. These biomolecules were involved in the recruitment of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs), which play a crucial role in multiple EMT program mechanisms (cell migration and invasion, neo-angiogenesis, promoting extracellular matrix remodelling ...), towards TNBC sites [7]. Cancer-associated EMT requires complex and comprehensive reprogramming, including changes in metabolism, expression levels and epigenetic [4,5].

From a molecular point of view, EMT is characterized by the loss of E-cadherin, claudin and cytokeratin expression, and the overexpression of N-cadherin and vimentin, which are respectively epithelial and mesenchymal cell markers [5]. Partial EMT leads to cells with a mixed phenotype, called “metastable”. Several major pathways are involved in the EMT, including TGF- β , NF- κ B, WNT, NOTCH, HIF1/2 and RAS-ERK1/2. Most of these interact with transcription factors implicated in the modulation of E-cadherin expression such as Snail, Slug, ZEB1, ZEB2, E47, Twist, and KLF8 [5].

As researchers continue to illustrate the effect of epithelial-mesenchymal plasticity on tumour progression and to investigate its invasion-related molecular mechanism, a clearer perception of the general epigenetic modifications in malignant cells undergoing EMT is now appearing. Nevertheless, the current state of art of the precise role of epigenetic regulators in controlling both EMT and MET processes in tumorigenesis including TNBC are not fully understood yet. In sharp contradiction with EMT inducing factors and transcription factors, we are just now beginning to understand how those alterations induce EMT and MET or function to maintain epithelial and mesenchymal phenotypes. For this reason, the exact epigenetic regulation remains a frontier to discover.

We hypothesize that close interactions between different EMT inducing factors and TFs and epigenetic regulators exist. EMT-related factors and markers are targets of epigenetic regulations. Epigenetic modifiers must also be regulated by TFs to transcriptionally regulate epithelial and mesenchymal genes during EMT. For example, TFs may be responsible for the expression of epigenetic factors activating or repressing in return the expression of EMT-markers. The understanding of these probable functional interactions controlling the inter-conversion between epithelial and mesenchymal phenotypes may provide new opportunities and novel therapeutic approaches aiming towards the prevention of cancer invasion and metastasis, based on the development of individualized epigenetic cancer therapy.

A lot of work has been published on TNBC, and mutations and modifications of expression levels are now well described. In our review, we would discuss the current state-of-the-art and latest findings regarding the implication of epigenetic modifications in EMT. We would emphasize on the role of four major epigenetic modifications in the regulations of the EMT of TNBC responsible for distant metastases, describing the various molecular pathways implicated as well as a large number of transcription factors influenced by the deregulation of these factors. They include non-coding RNA,

both long-non-coding RNAs (lncRNAs) and micro RNA (miRNAs), and modifications at the level of histones or DNA, such as acetylation or methylation.

For each class of epigenetic factors (lncRNA, miRNA, histone or DNA modification), we first present large screening studies that provide lists of candidates specifically dysregulated in TNBC. These general studies pave the way for targeting TNBC through the identification of high impact candidate genes and factors. However, from one study to another, the sets of genes often overlap poorly, and functional validation is required. Thus, in the second part of each chapter, we focus on studies describing the role of epigenetic factors involved in the EMT of TNBC. The functional evidences are not paraphrased for each factor, but they are gathered in Tables 1–5 and a comprehensive network assembles all interactions in Figure S1 (Supplementary Material). Further genes are pending for validation in order to identify novel prognostic factors and therapeutic targets. A number of essential anti-TNBC drugs used (Table 4) and a description of primary applied clinical trials are discussed in this paper.

2. Long Non-Coding RNAs

Long non-coding RNAs (lncRNAs) are transcribed RNA molecules not encoding any protein, with a length over 200 nucleotides [8]. Due to the lack of experimental tools and overall knowledge, the function of lncRNAs was largely unknown until the early 1990's when H19 and Xist were found to be involved in epigenetic modulations [9]. Since the publication of the human genome in 2001 and the finding that only 2% of the genome encodes for proteins despite the fact that >90% is actively transcribed [10], extensive attention has been given to long non-coding RNAs in order to investigate their biological and regulatory activity. While considering that dysregulation of lncRNAs is well described in many human disorders, such as cardiovascular disease [10], prior investigations have shown that dysregulation of lncRNAs plays a critical role in cancer progression, as oncogenic or tumour-suppressor genes by modulating tumour cell death, proliferation, migration, invasion and drug resistance [11]. In recent years, researchers were highly interested in the role of lncRNAs in several subtypes of breast cancer including TNBC [12–16]. lncRNAs have been reported as promising diagnostic biomarkers, prognostic factors and potentially efficient therapeutic targets by a set of systematic research described further down. Moreover, these studies have evaluated the role of single lncRNAs for different endpoints, such as overall survival OS, progression-free survival PFS, poor prognosis, and TNBC proliferation and metastasis.

Lately, abnormal expression of lncRNAs, related altered mechanisms and primary deregulation were the subject of pivotal studies presented later.

In a microarray analysis study, a set of 1403 unique lncRNAs, with 853 up-regulated and 550 down-regulated, was discovered to be differentially expressed between TNBC and non-tumorous tissues, suggesting a pivotal role of lncRNAs in TNBC progression [17]. In the aim of offering specific therapeutic targets and promising diagnosis biomarkers, a core group of onco-lncRNAs was identified. Another set of 1211 differentially expressed TNBC-specific lncRNAs among the wide dysregulated lncRNAs was defined by co-expression networks [18].

Furthermore, a lncRNA expression signature of four lncRNAs (*IGKV*, *RP11-434D9.1*, *BC016831*, and *LINC00052*) differentially expressed between TNBC and non-TNBC tissues was validated [19]. Recently, a re-mapping strategy generated novel data allowing the discovery of additional differentially expressed lncRNAs in TNBC. Sixty one recent lncRNAs were identified, where thirty-three lncRNAs were downregulated (Top five: *lnc-PAPLN-2:1*, *lnc-FLT3LG-1:7*, *lnc-NEK8-2:1*, *lnc-FLOT2-1:1* and *lnc-ZNF75D-2:2*) and twenty eight lncRNAs were upregulated (Top five: *lnc-DNAJC16-1:1*, *lnc-SC5DL-3:1*, *lnc-PURA-2:1*, *lnc-EIF2C2-1:1* and *lnc-ELP4-3:1*) [20].

From our intention to review the recent advances in this field evaluating the crucial role of each lncRNA in a single study separately in the outcome of the ‘invasion-metastasis cascade’ in TNBC patients, a set of EMT specific lncRNAs are presented. lncRNAs involved in EMT of TNBC could be assigned to two classes based on the level of expression and molecular regulation. First, lncRNAs *LET* [21], *Xist* [22], *lncRNA-CTD-210809.1* [23], and *GAS5* [24] were shown to be downregulated in TNBC cell lines. Upregulation of these lncRNAs attenuates TNBC cell proliferation and viability and enhances apoptosis. In addition, the overexpression of these lncRNAs inhibits TNBC growth, invasion and migration, and represses EMT by increasing E-cadherin expression as well as decreasing N-cadherin and Vimentin expression. The mechanisms by which this category of lncRNA acts differ from one lncRNA to another. *XIST* exerts its suppressive activity via miR-155/CDX1 [22], *GAS5* by functioning as a competing endogenous RNA (ceRNA) that antagonizes miR-196a-5p targeting thereby FOXO1/PI3K/AKT signalling [24], *lncRNA-CTD-210809.1* targets leukemia inhibitory factor receptor LIFR [23], while no specific molecular mechanism for *LET* is yet defined [21]. (see Figure S1 and Table 1).

Twenty-three different lncRNAs investigated in separated studies were reported to be pro-tumoural agents, usually correlated with a high capacity of TNBC progression and metastasis, poor overall survival and early outcome. Knockdown of these upregulated TNBC lncRNAs leads eventually to the suppression of cell motility along with TNBC metastasis and invasion and to the inhibition of EMT molecular marker expression. The mechanisms of actions of these lncRNAs, *MALAT1* [25–27], *HOTAIR* [28], *SNHG12* [29], *LINC01638* [30], *H19* [31], *Linc-ZNF469-3* [32], *LINC00673* [33], *lnc-ATB* [34], *HOXA11-AS* [35], *OR3A4* [36], *MIAT* [37], *GHET1* [38], *AC026904.1/UCA* [39], *NNT-AS1* [40], *PVT1* [41], *ARNILA* [42], *lncRNA-RoR* [43], *LINC00518* [44], *ADAM/lnc015192* [45], *LOC554202* [46], and *snaR* [47] are summarized in Table 1 (see Figure S1).

Among these two profiles, some lncRNAs, *GAS5* [24], *MIAT* [37], *ARNILA* [42], *NNT-AS1* [40], *lnc015192* [45], and *UCA* [39] are able to directly regulate EMT pathways and TNBC invasion by functioning as ceRNAs for EMT-regulating-RNA via sharing common sequences with them (see Figure S1 and Table 1).

Table 1. Significant lncRNAs implicated in EMT of TNBC.

lncRNAs	Targets	Genes and Pathways Implicated	Sense of Dyregulation in TNBC	Role of lncRNA in TNBC	References
LET			Downregulated	Anti-tumoural	[21]
XIST	miR-155	CDX1	Downregulated	Anti-tumoural	[22]
lncRNA-CTD-210809.1	LIFReceptor	JAK/STAT and MAPK pathway	Downregulated	Anti-tumoural	[23]
GAS5	miR-196a-5p	FOXO1/P13K/AKT pathway	Downregulated	Anti-tumoural	[24]
MALAT1	miR-1	Slug	Up-regulated	Pro-tumoural	[25]
	miR-129-5p	-	Up-regulated	Pro-tumoural	[26]
MALAT1/HuR (ELALV1) complex	-	CDI33	Absence of complex	Anti-tumoural	[27]
HOTAIR			Up-regulated	Pro-tumoural	[28]
SNHG12		MMPI3	Up-regulated	Pro-tumoural	[29]
LINC01638		c-Myc MTDH-Twist1 pathway	up-regulated	Pro-tumoural	[30]
H19	miR-675	ubiquitin ligase E3 family (c-Cbl and Cbl-b)	Up-regulated	Pro-tumoural	[31]
linc-ZNF469-3	miR-574-5p	ZEB1	Up-regulated	Pro-tumoural	[32]
LINC00673		NCR3LG1 (B7-H6)	Up-regulated	Pro-tumoural	[33]
lnc-ATB	miR-141-3p	ZEB1 and ZEB2	Up-regulated	Pro-tumoural	[34]
HOXA11-AS			Up-regulated	Pro-tumoural	[35]
OR3A4			Up-regulated	Pro-tumoural	[36]
MIAT (ceRNA)	miR-155-5p	DUSP7	Up-regulated	Pro-tumoural	[37]
GHET1			Up-regulated	Pro-tumoural	[38]
AC026904.1 and UCA (ceRNA)		Slug	Up-regulated	Pro-tumoural	[39]
NNT-AS1 (ceRNA)	miR-142-3p	ZEB1	Up-regulated	Pro-tumoural	[40]
PVT1		P21	Up-regulated	Pro-tumoural	[41]
ARNILA (ceRNA)	miR-204	Sox4	Up-regulated	Pro-tumoural	[42]
lncRNA-RoR	miR-145	ARF6	Up-regulated	Pro-tumoural	[43]
LINC00518		CDX2 and Wnt signaling pathway	Up-regulated	Pro-tumoural	[44]
ADAM and linc015192 (ceRNA)	miR-34a		Up-regulated	Pro-tumoural	[45]
LOC554202			Up-regulated	Pro-tumoural	[46]
snar			Up-regulated	Pro-tumoural	[47]

3. MiRNAs

MicroRNAs (miRNAs) are small noncoding RNAs approximately 22 nucleotides long, involved in the regulation of posttranscriptional gene expression [48]. Aberrant miRNA expression has been associated with cancer cell progression, invasion and metastasis, acting both as oncogenes and tumour suppressors [49–55]. miRNAs are also powerful drivers of metastasis in many malignancies by regulating non-EMT-related and/or EMT-related mechanisms [56].

As miRNAs are smaller and more stable than mRNAs in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues and accessible body fluids, their expression was the subject of multiple investigations mentioned later, as potential TNBC biomarkers in order to give insight into their role in TNBC progression and invasion along with the appearance of distant metastasis. A number of general studies evaluating a panel of miRNAs by different technics are described lately.

Recently, using the robust rank aggregation (RRA) method, metasignatures of six significantly dysregulated miRNAs: two downregulated: *hsa-miR-449a* and *hsa-miR-190b* and four upregulated: *hsa-miR-9-5p*, *hsa-miR-18a-5p*, *hsa-miR-135b-5p* and *hsa-miR-522-3p*, were identified from different studies, with high prediction accuracy. The gene ontology analysis revealed the top 10 preferred target genes and 10 pathways of metasignature miRNAs in TNBC suggesting promising candidate for diagnostic biomarkers in TNBC [57].

Four miRNA signatures in TNBC given by *miR-155*, *miR-493*, *miR-30e* and *miR-27a* expression levels were identified allowing a new stratification of TNBC based on the level of patient outcome. Defined as “risk”-associated, down-regulation of *miR-27a* and *miR-30e* is correlated with worse patient outcome, while upregulation of *miR-493* and *miR-155* associated with better outcome is described as “protective” [58].

Furthermore, miRNAs expression profile generated by *limma* algorithm identified 67 significantly differentially expressed miRNAs (DEmiRNAs) between TNBC and normal tissues. Among them 21 were down-regulated (Top five: *hsa-mir-486-1*, *hsa-mir-486-2*, *hsa-mir-4732*, *hsa-mir-139* and *hsa-mir-451a*) and 46 up-regulated (Top five: *hsa-mir-105-1*, *hsa-mir-519a-1*, *hsa-mir-105-2*, *hsa-mir-767* and *hsa-mir-516a-1*) [59].

Further profiling of miRNAs expression in TNBC cells identified four candidate miRNAs (miR-26a, miR-153, miR-10b and miR-146a) as potential TNBC biomarkers. Exogenous expression assays reported that miR-26a and miR-10b suppress *BRCA1* expression in MDA-MB-231 and MCF-7 cells, while *BRCA1* expression was downregulated by miR-153 only in MCF7 cells. High expression of miR-146a in TNBC cells compared to non-TNBC was validated by in silico analysis of The Cancer Genome Atlas (TCGA) data [60].

Seven other miRNAs (*miR-300*, *miR-382*, *miR-494*, *miR-495*, *miR-539*, *miR-543*, and *miR-544*) in the imprinted DLK1-DIO3 region are known to cooperatively repress EMT. DLK1-DIO3 miRNAs target EMT-inducing molecules repressing a signaling network comprising ZEB1/2, TWIST1, BMI1, and miR-200 family miRNAs. Thus, silencing the cluster by hypermethylation of upstream CpG islands in MDA-MB-231 cells represents a key early step that promotes loss of CDH1 expression, initiates EMT, and activates tumour cell invasion and metastasis [61]. Three main members (*miR-200 a*, *b* and *c*) of the miR200 family are considered as tumour suppressor miRNAs restraining EMT. These miRNAs targeting E-cadherin suppressors ZEB1, ZEB2 and SUZ12 are downregulated in TNBC cells, representing a promising therapeutic target [62–64] (see Figure S1 and Table 2).

Given that many lncRNAs act as competing endogenous lncRNA (ceRNA) to sequester miRNAs, and since miRNAs rank among the main drivers of EMT in many malignancies, this report aims to generate a general summary of all miRNAs differentially expressed in TNBC, as promising new therapeutic targets and novel molecular biomarkers for TNBC. Several data suggest that chromatin modifications are correlated with differential expression of lncRNAs and miRNAs in TNBC. Promoter hypermethylation was shown to be one of the major mechanisms to silence miR-200c/miR-141 and LOC554202/miR-31 locus [46,64]. It is very likely that the same regulation occurs with other lncRNAs and miRNAs involved in the EMT of TNBC.

Table 2. Major miRNAs involved in EMT of TNBC.

miRNAs	Targets and Pathways	Sense of Dysregulation in TNBC	Role of miRNA in TNBC	References
miR-31		Downregulated	Anti-tumoural	[46]
DLK1-DIO3 region (miRs 300, 382, 494, 495, 539, 543, and 544)	TWIST1, BMI1, ZEB1/2, and miR-200 family	Downregulated	Anti-tumoural	[61]
miR200a	ZEB1, ZEB2 and SUZ12 E-cadherin pathway EPH receptor A2 (EPHA2) EPHA2 pathway	Downregulated	Anti-tumoural	[62]
miR200b	PKC α /Rac1	Downregulated	Anti-tumoural	[63]
miR-200c	ZEB1	Downregulated	Anti-tumoural	[64]
miR-30a	Inhibition of ROR1	Downregulated	Anti-tumoural	[65]
miR-146a	Inhibition of RhoA	Downregulated	Anti-tumoural	[66]
miR-143-3p	LIMK1 expression LIMK1/CFL1 pathway	Downregulated	Anti-tumoural	[67]
miR-200b-3p/miR-429-5p	LIMK1 expression LIMK1/CFL1 pathway	Downregulated	Anti-tumoural	[68]
miR-139-5p	TGF- β , Wnt, MAPK, and PI3K	Downregulated	Anti-tumoural	[69]
miR-212-5p	Prrx2	Downregulated	Anti-tumoural	[70]
miR-199a-5p	Wnt/ β -catenin pathway	Downregulated	Anti-tumoural	[71]
miR-155		Downregulated	Anti-tumoural	[72]
miR-34c-3p	MAP3K2 MAP3K2 pathway	Downregulated	Anti-tumoural	[73]
miR-3178	Notch1	Downregulated	Anti-tumoural	[74]
miR-200b-3p		Downregulated	Anti-tumoural	[75]
miR-125b	MAP2K7 MAPK pathway	Downregulated	Anti-tumoural	[76]
miR-655	Prrx1	Downregulated	Anti-tumoural	[77]
miR27-a	PTEN, PKB PI3K/AKT pathway	Up-regulated	Pro-tumoural	[78]
miR-182	Inhibition of FOXF2	Up-regulated	Pro-tumoural	[79]
miR-454	PFN1	Up-regulated	Pro-tumoural	[80]
miR-373	PTEN PI3K/AKT pathway	Up-regulated	Pro-tumoural	[81]
miR-221/222	HIF1 α and TWIST HIF1 α -TWIST pathway	Up-regulated	Pro-tumoural	[82]
miR-10b	ADIPOR1 and TRPS1 NF- κ B, IL6, and JAK2/STAT3 pathway TGF- β 1-induced EMT pathway	Up-regulated	Pro-tumoural	[83]
		Up-regulated	Pro-tumoural	[84]

Among the numerous miRNAs identified by these large screening assays, single studies aiming to investigate the precise performance of some specific miRNAs in the EMT of TNBC were proceeded. The goal was to determine the level of miRNAs expression in TNBC highly metastatic cells in vitro and to alter this expression. The analysis of epithelial and mesenchymal markers was used to determine the anti- or pro-metastatic role of the candidate miRNAs. For a number of these miRNAs, target genes were predicted and tested in order to identify the specific mechanism of action of the miRNAs.

A set of twenty two miRNAs correlated with EMT and TNBC cell migration and invasion suggesting a leading role in influencing the expression levels of their target genes and pathways can be established: *miR-30a* [65], *miR-146a* [66], *miR-143-3p* [67], *miR-200b-3p/miR-429-5p* [68], *miR-139-5p* [69], *miR-212-5p* [70], *miR-199a-5p* [71], *miR-155* [72], *miR-34c-3p* [73], *miR-3178* [74], *miRNA-200b-3p* [75], *miR-125b* [76], and *miR-655* [77], were outlined as down regulated while *miR27-a* [78], *miR-182* [79,80], *miR-454* [81], *miR-373* [82], *miR-221/222* [83], and *miR-10b* [84] were reported as up regulated (see Figure S1 and Table 2).

4. Histone Modifications

N-terminal modifications of histones, including acetylation and methylation, as well as the reverse of these processes frequently observed in cancer, are responsible for modifying the secondary DNA structure and the accessibility of transcription factors to gene promoter regions regulating gene transcription [85–87]. In breast cancer, histones modifications play a major role in cell proliferation, induced apoptosis and metastatic ability [88].

Discussing histone modifications mechanisms in TNBC especially, surveys proposed an interesting performance for histones modifications in the appearance and progression of TNBC [89–91]. Despite the not fully understood effect of histones alterations, histone modification inhibitors, such as histone deacetylase inhibitors (HDACis) have emerged as a promising new class of multifunctional anticancer agents preventing TNBC growth and metastasis [92]. These inhibitors could also help to better understand the effect of histone modifications on the outcome and the metastasis of TNBC through gene expression regulation in order to define new biomarkers and targeted therapies [92,93]. Nonetheless, two HDACis used together with ionizing radiation, autophagy and kinase inhibitors were the subject of multiple investigations [94–96].

Identifying major histone alteration's delineation in TNBC as well as principle genes influenced by these modifications is the subject of upcoming surveys. A specific histone modification profile identified eight key histone modifications (*H3K9me3*, *H3K9ac*, *H3K27ac*, *H3K4me3*, *H3K27me3*, *H3K4me1*, *H3K36me3* and *H3K79me2*) in four different TNBC cell lines (*MDA-MB-231*, *MDA-MB-468*, *MDA-MB-436*, and *HCC1937*) among thirteen cell lines [97]. Intriguingly, a TNBC specific gene was also identified: Actin Filament Associated Protein Antisense RNA 1 (*AFAP1-AS1*), an anti-sense lncRNA marked by numerous active histone modifications, such as *H3K79me2* and *H3K4me3*, suggesting a role in tumour EMT and progression. The same study showed that a new histone acetyltransferase *NAA60*, which mediates acetylation events in H4 such as *H4K20ac*, *H4K79ac* and *H4K91ac*, was silenced in TNBC [97]. Furthermore, a global map of histone H3 methylation (*H3K4me3*) and acetylation (*H3K4ac*) profiles in *MDA-MB-231* cells showed an association of *H3K4me3* with late-stage cancer cells, while gain of *H3K4ac* was correlated with cancer-related phenotypic traits, especially EMT pathways [98].

Histone methyltransferases (HMTs) catalyse the methylation of lysine and arginine residues. Genetic modifications of HMTs affect tumour progression and metastasis. Four HMTs (*ASH1L*, *SETDB1*, and *SMYD3*) presented higher amplification frequencies in basal-like breast cancer (a subtype of TNBC) while eight HMT expression levels (*EZH1*, *SMYD3*, *EHMT1*, *SETD7*, *PRDM4*, *SETD3*, *SETD1B*, and *PRDM6*) were significantly downregulated and twelve HMT expression levels (*EZH2*, *PRDM15*, *PRDM13*, *SMYD2*, *SMYD5*, *SUV39H1*, *SUV39H2*, *EHMT2*, *WHSC1*, *SETD8*, *SETDB* and *SETD6*) were significantly up-regulated comparing basal-like to other breast cancer subtypes [99].

A multi-parametric RNAi screening approach identified 70 gene candidates involved in EMT. Among them, three histone alteration modulators, histone methyltransferase *G9a*, *H3K79* methylator

DOT1L and a new histone acetyltransferase *KAT5*, were shown to be up-regulated, repressing *CDH1* and enhancing EMT [100].

DNMTi SGI and HDACi MS275 have been proposed as combined treatment for TNBC able to epigenetically reverse EMT and inhibit cell motility, proliferation and colony formation. This anti-EMT/antitumour activity is exerted by impeding EpCAM cleavage and the WNT pathway, repressing abnormal p53, EZH2, and ZEB1, and by promoting E-cadherin and apoptosis, together with histone H3 tri-methylation [101].

DNA damage-specific histone chaperone aprataxin PNK-like factor (APLF), significantly enhanced in TNBC, was reported as an essential TNBC biomarker and a treatment target. Downregulation of APLF upregulates E-cadherin (*CDH1*) expression and suppresses EMT related genes inhibiting MDA-MB-231 cell invasion and metastasis [102].

Based on histone modifications profiling, several studies aimed to reconstitute the normal expression level of epigenetically deregulated genes. For this reason, metastatic TNBC cells have been treated with specific histone modifiers inhibitors to investigate their ability to induce or reduce TNBC metastasis and to evaluate their global effect on the TNBC EMT. Furthermore, the effect of depletion of upregulated histones modifiers on migration and invasive characteristics has been investigated in TNBC metastatic cells. Variations of epithelial and cell adhesion markers were also analysed in order to understand the roles of histone modifications on EMT and, eventually, identify potential diagnostic and prognostic biomarkers.

The role of multiple histone alteration effectors in inducing or reversing EMT in TNBC are listed in Table 3 (see Figure S1). EMT-repressive factors *TIP 60* [103] and *KDM6A* [104] and EMT-inductive factors *EZH2* [105], *LSD1* [106], *hSETD1A* [107], *JMJD5* [108], *KDM5B* [109], *KDM3A* [110] and *HDAC8* [111] have been investigated in multiple studies (Table 3 and see Figure S1). Histone modification inhibitors used in studies evaluating the role of specific histone modification treatments in promoting or inhibiting the EMT of TNBC are listed in a supplementary table (Table 4 and see Figure S1). The mechanisms of treatment of the histone deacetylase inhibitors vorinostat (*SAHA*) [94,112], panobinostat (*LBH589*) [93], entinostat (*ENT*) [113,114], trichostatin A (*TSA*) [115] and *HTPB* [116], as well as the lysine demethylase inhibitor parnate (*PCPA*) [117], and the histone methyltransferase inhibitor *UNC0638* [118], along with their main role in reversing EMT are listed in Table 4 (see Figure S1).

5. DNA Methylation

DNA methylation is the first and the best-described epigenetic modification in tumours characterized by abnormal activity of DNA methyltransferase enzymes (DNMTs), principally DNMT1 [118]. Two main characteristics delineate the cancer epigenome; gene-specific hyper-methylation and global DNA hypo-methylation [119]. Gene-specific hyper methylation of caretaker and tumour suppressor genes is caused by cytosine methylation in CpG islands, which is a recognized epigenetic silencing marker and a key factor in breast carcinogenesis [119–121]. The identification of differentially methylated regions (DMRs) enriched with promoters associated with DNA hypersensitive sites and transcription factor binding sites can be used to sort TNBCs into three different methylation clusters with different prognosis. Three DMRs were associated with good survival, while fourteen DMRs were associated with poor survival [122].

A diverse set of DNA methylation signatures predicting TNBC treatment response, identifying different breast cancer subtypes with significant diagnostic and prognostic potential have been presented by many studies.

First, an association is strongly suggested between the loss of expression of epithelial biomarkers and gene promoter hypermethylation events in human TNBC. Comparison of the hypermethylation of 110 CpGI in 69 cancer-related genes between TNBC and non-TNBC revealed a similar number of methylated CpGI but a different list of methylated genes [123].

Table 3. Histone modification factors associated with EMT of TNBC.

Histones Modifications Factors	Targets and Pathways	Sense of Dyregulation in TNBC	Role of histone modifications in TNBC	References
TIP60 <i>Lysine acetyltransferase</i>	Destabilize DNMT1 and inhibit SNAIL2 function leading to the inhibition of DNA methylation of EpCAM promoter region activating the expression of epithelial markers.	Downregulated	Anti-tumoural	[103]
KDM6A <i>H3K27me3-demethylase</i>	Maintenance of CDH1/E-cadherin levels. Role in the ME1-associated resolution. Reactivation of bivalent genes by removing H3K27me3 marks deposited during EMT.	Downregulated	Anti-tumoural	[104]
EZH2 <i>Histone-lysine N-methyltransferase (H3K27me3)</i>	Induce the repression of TIMP2 transcription increasing MMP-2 and MMP-9 activity.	Up-regulated	Pro-tumoural	[105]
LSD1 <i>Lysine demethylase 1</i>	Represses E-cadherin expression by demethylating H3K4me at gene's promoter, during which phosphorylation of LSD1 Ser112 is crucial.	Up-regulated	Pro-tumoural	[106]
hSETD1A <i>H3K4 Methyltransferase</i>	Activates MMP's expression (MMP2, MMP9, MMP12, MMP13, and MMP17).	Up-regulated	Pro-tumoural	[107]
JMJD5 <i>H3K36me2 demethylase</i>	Promote cell invasion and induce EMT. Catalyze Snail promoter H3K36me2 demethylation activating its expression.	Up-regulated	Pro-tumoural	[108]
KDM5B <i>Lysine-specific demethylase 5B</i>	Overexpress MALAT1. Overexpress EMT markers, c-Met, Slug and N-Cadherin, and inhibits E-Cadherin.	Up-regulated	Pro-tumoural	[109]
KDM3A <i>H3 lysine 9 demethylase 3A</i>	Promotes the expression of invasive genes by erasing H3K9me2 marks. Regulates the expression of MMP-9 and JUN expressions.	not evaluated	Pro-tumoural	[110]
HDAC8 <i>Zinc-dependent class I HDAC</i>	Enhance TNBC cell migration. Regulates YAP protein levels by decreasing YAP phosphorylation at Ser127.	not evaluated	Pro-tumoural	[111]

Table 4. Role of histone modification inhibitors.

Treatment	Mechanisms	References
Panobinostat (LBH589) <i>Histone deacetylase inhibitor</i>	Increases CDH1 protein expression and morphology changes in MDA-MB-231 cells. Reverse EMT	[93]
Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) or Vorinostat <i>pan-HDAC inhibitor</i>	Suppress metastasis by Inhibiting MMP-9 activity Promote EMT of TNBC cells via HDAC8/FOXO1 signals Downregulate E-cadherin Upregulate N-cadherin, vimentin and fibronectin	[94] [112]
Entinostat (ENT) <i>Class I HDAC (nuclear) inhibitor</i>	Increases E-cadherin transcription Reduces in N-cadherin mRNA expression Downregulates snail and twist Increases vimentin phosphorylation Reduces formation of tubulin-based microtubules Upregulates cytokeratin 8/18 Reverse EMT	[113]
Trichostatin A (TSA) <i>HDAC inhibitor</i>	Reduce the percentage of TIC cells from TNBC cells. Reduce the CD44high/ CD24 low cell population, ALDH-1 activity, and protein and mRNA expression of known TIC markers such as Bmi-1, Nanog, and Oct-4.	[114]
HTPB <i>pan-HDAC inhibitor</i>	Reverse EMT Upregulate E-cadherin and suppresses Slug and Vimentin Inhibits integrin- β 1/FAK/MMP/RhoA/F-actin pathways. Suppress tumour metastasis	[115] [116]
Parnate (PCPA) <i>Lysine demethylase 1 LSD1 inhibitor</i>	Blockage of Slug/LSD1 interaction Induces the expression of E-cadherin and other epithelial markers	[117]
UNC0638 <i>Histone methyltransferase inhibitor</i>	Restores E-cadherin and vimentin via modulating the Snail-G9a axis in order to block CSCs properties and reverse EMT.	[118]

A specific methylation profile of sixteen cancer-related genes specific to TNBC was defined by the non-methylation of eleven genes (*MSH2*, *MLH1*, *MSH3*, *MSH6*, *CACNA1A*, *CACNA1G*, *GSTP1*, *ID4*, *PMS2*, *DLC1*, and *TWIST1*) and the methylation of five genes (*RB*, *CD44*, *CDKN2B*, *MGMT*, and *p73*) [123].

Among 38 genes identified as deregulated in TNBC, whole genome DNA methylation analysis revealed an essential role of DNA methylation in modifying the expression of 16 TNBC-specific genes expression. Only *IL6ST* showed significantly altered methylation in three probes allowing it to be classed as a DMR [124].

The analysis of EMT-related marker expression in TNBC described a new signature for TNBC subclasses, based on the association of CD146 or MCAM expression (an EMT inducer) with the expression of EMT and breast cancer stem cell (BCSC) (CD44+/CD24−) markers, and suggested that ZEB1 expression as a promising biomarker for poor clinical outcome [125].

Aside from DNA methylation inhibition of anti-tumour genes, hypermethylation or hypomethylation of miRNA were responsible for main miRNAs deregulation mentioned above. Addition to the pro-tumour miRNAs up-regulated in TNBC by the absence of methylation, a set of miRNAs displaying anti-tumour characteristics were epigenetically inactivated by DNA methylation (*DLK1-DIO3 cluster*, *miR126*, *miR195*, *miR497*, *miR148a*, *miR152* and *miR-200 family*) [126].

A TNBC gene expression signature has been linked to aberrant promoter CpG hypermethylation of nine epigenetic biomarker genes (*CDH1*, *CEACAM6*, *CST6*, *ESR1*, *GNA11*, *MUC1*, *MYB*, *SCNN1A*, and *TFF3*). The loss or reduced level of methylation-sensitive gene products was defined as a fundamental characteristic of TNBC, and associated with poor long-term survival [127].

Several genes chosen from the DNA-methylation-based profiles were evaluated in separated studies. The impact of epigenetic inactivation was evaluated after methylation of their promoter and correlated to the outcome of metastasis in TNBC invasive cells. Demethylation treatments restoring the expression of target genes changed the progressive character of TNBC cell, allowing the definition of the promoter methylation impact on EMT. The identification of the signalling pathways impacted by this methylation enlightened on target gene functions and may lead to establish novel TNBC gene therapeutic strategies.

Finally, many studies have evaluated the role of DNA methylation in TNBC by inhibiting the regulatory sequences methylation of a number of specific genes. *CREB3L1* [128], *BRMS1* [129], *DACT2* [130], *WWC1* [131] and *ADAMTS18* [132] with anti-EMT activity were shown to be down-regulated in TNBC, while *FOXF2* [133] and *DKK2* [134] exerting pro-EMT activity were upregulated in TNBC; suggesting that DNA methylation is a leading source of the expression deregulation and TNBC high metastasis capacity (see Figure S1 and Table 5).

6. Clinical Trials

Interpretation of clinical trials related to TNBC remains very complex due to the heterogeneous response to systemic therapy. In the last decade, multiple clinical trials have been conducted to control TNBC growth and metastasis, in order to define new targeted therapies and novel biomarkers. Furthermore, targeting PI3K, AKT, HDAC, PD-1, AR and Hsp 90 in metastatic TNBC with specific inhibitors and antagonists was the topic of a substantial number of clinical trials, including NCT01629615, NCT01790932, NCT02162719, NCT02353988, NCT02457910, NCT02657889, NCT02513472, NCT02768701, NCT02734290, NCT01349959, NCT02898207 and NCT02474173. Moreover, the effect of different drugs such as dasatinib, iniparib, epalrestat, tinostamustine and others was evaluated in various clinical studies NCT00371254, NCT01173497, NCT03244358, and NCT03345485, in the search of therapeutic biomarkers for metastatic TNBC.

Table 5. DNA modifications implicated in the induction of EMT.

Genes	Targets and Pathways	Sense of dysregulation in TNBC	Role of DNA methylation in TNBC	References
CREB3L1 <i>Methylation of several key CpG sites</i>	Metastasis suppressor Activates p21 expression Suppresses cancer cell survival and angiogenesis genes.	Downregulated	Anti-tumoural	[128]
BRMS1 <i>Promoter hypermethylation</i>	Metastasis suppressor. Downregulates several metastasis-related genes through modulating the activity of NF- κ B, including osteopontin (OPN), urokinase-type plasminogen activator (uPA), micro-RNA-146, interleukin-6 (IL-6) and chemokine receptor 4 (CXCR4).	Downregulated	Anti-tumoural	[129]
DAPPER2 (DACT2) <i>Promoter CpG methylation</i>	Metastasis suppressor by antagonizing Wnt/ β -catenin and Akt/GSK-3 signaling.	Downregulated	Anti-tumoural	[130]
WWC1 <i>HBK27me3 inhibition catalysed by EZH2 and CpG island methylation mediated by DNMT1 within the wwo1 promoter</i>	Code for Kibra protein. EMT suppressor by regulating the Hippo/ YAP tumour suppressor pathway.	Downregulated	Anti-tumoural	[131]
ADAMTS18 <i>Promoter methylation</i>	Deregulates AKT and NF- κ B signaling, by inhibiting phosphorylation levels of AKT and p65. Functions as a promoter for EMT and metastasis.	Downregulated	Anti-tumoural	[132]
FOXF2 <i>Absence of promoter methylation</i>	Regulates genes involved in controlling cell cycle progression and EMT, and is co-expressed with EMT genes SNAI2/Slug and Vimentin and a metastasis-promoting gene GLI2.	Up regulated	Pro-tumoural	[133]
DKK2 <i>promoter CpG methylation</i>	EMT suppressor by suppressing canonical Wnt/ β -catenin signaling via inhibiting β -catenin activity.	Downregulated	Anti-tumoural	[134]

Some authors have tried to revert the triple negative character of TNBC patients in order to give them a chance to benefit from treatments such as trastuzumab (Herceptin®) or tamoxifen (NCT01194908). It has been demonstrated that ER is not absent in some TNBCs but is epigenetically silenced by several histone and methyl groups leading to its inactivation. Thus, some clinical trials have intended to evaluate the effect of epigenetic reprogramming. Histone deacetylase inhibitors such as LBH589 and demethylating inhibitors can rid of histone- or methyl-group excess; the reactivation of ER opens the door to use hormonal agents in order to control the growth and the metastasis of TNBCs. Despite the number of metastatic TNBC clinical trials every year, drug resistance, wide heterogeneity and high metastasis rate keep TNBC treatment very challenging and epigenetic approaches must be considered and developed.

7. Conclusions

Triple negative breast cancer is a heterogeneous entity with a high rate of treatment failure due to the appearance of distant and/or nearby metastases. As a main factor responsible for this invasive capacity, EMT is an interesting prognostic biomarker and therapeutic target for TNBC patients. However, its clinical significance has only recently been investigated. Comprehensive new studies should shed light on EMT-related markers and particularly those implicated in epigenetic mechanisms. Thus, the study of epigenetic alterations in TNBC, encompassing lncRNAs, miRNAs, histone and DNA modifications, is a promising area to develop new treatments and EMT-related biomarkers. It is unlikely however that one epigenetic modification alone would be sufficient to identify robust and potential biomarkers of TNBC. A global study incorporating different epigenetic markers is necessary for understanding their role in TNBC. In conclusion, EMT is a promising anticancer target; its epigenetic alterations can be considered early biomarkers representing potential diagnostic and prognostic factors in order to define a global metastatic signature for TNBC.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/11/4/559/s1>, Figure S1: Interactive network of epigenetic factors driving EMT in Triple Negative Breast Cancers.

Author Contributions: Both authors contributed equally to the writing of this article.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: This work is performed within the framework of CPER Epicure 2016 project by the Region Auvergne-Rhone-Alpes and was supported by the “Ligue contre le cancer du Puy de Dôme”. We gratefully acknowledge Nancy Uhrhammer for her kind grammatical/spelling review of this paper. We also thank Flora Ponelle-Chachuat for assistance in the generation of the network diagram.

Conflicts of Interest: The authors declare no competing interests.

References

1. Perou, C.M.; Sørlie, T.; Eisen, M.B.; van de Rijn, M.; Jeffrey, S.S.; Rees, C.A.; Pollack, J.R.; Ross, D.T.; Johnsen, H.; Akslen, L.A.; et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **2000**, *406*, 747–752. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Sørlie, T.; Perou, C.M.; Tibshirani, R.; Aas, T.; Geisler, S.; Johnsen, H.; Hastie, T.; Eisen, M.B.; van de Rijn, M.; Jeffrey, S.S.; et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 10869–10874. [[CrossRef](#)]
3. He, M.Y.; Rancoule, C.; Rehaillia-Blanchard, A.; Espenel, S.; Trone, J.-C.; Bernichon, E.; Guillaume, E.; Vallard, A.; Magné, N. Radiotherapy in triple-negative breast cancer: Current situation and upcoming strategies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2018**, *131*, 96–101. [[CrossRef](#)]
4. Neelakantan, D.; Zhou, H.; Oliphant, M.U.J.; Zhang, X.; Simon, L.M.; Henke, D.M.; Shaw, C.A.; Wu, M.-F.; Hilsenbeck, S.G.; White, L.D.; et al. EMT cells increase breast cancer metastasis via paracrine GLI activation in neighbouring tumour cells. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15773. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Nieto, M.A.; Huang, R.Y.-J.; Jackson, R.A.; Thiery, J.P. EMT: 2016. *Cell* **2016**, *166*, 21–45. [[CrossRef](#)]

6. Hill, B.S.; Sarnella, A.; Capasso, D.; Comegna, D.; Del Gatto, A.; Gramanzini, M.; Albanese, S.; Saviano, M.; Zaccaro, L.; Zannetti, A. Therapeutic Potential of a Novel $\alpha v\beta 3$ Antagonist to Hamper the Aggressiveness of Mesenchymal Triple Negative Breast Cancer Sub-Type. *Cancers* **2019**, *11*, 139. [[CrossRef](#)]
7. Camorani, S.; Hill, B.S.; Fontanella, R.; Greco, A.; Gramanzini, M.; Auletta, L.; Gargiulo, S.; Albanese, S.; Lucarelli, E.; Cerchia, L.; et al. Inhibition of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Homing Towards Triple-Negative Breast Cancer Microenvironment Using an Anti-PDGFR β Aptamer. *Theranostics* **2017**, *7*, 3595–3607. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Palazzo, A.F.; Lee, E.S. Non-coding RNA: What is functional and what is junk? *Front. Genet.* **2015**, *6*, 2. [[CrossRef](#)]
9. Kung, J.T.Y.; Colognori, D.; Lee, J.T. Long Noncoding RNAs: Past, Present, and Future. *Genetics* **2013**, *193*, 651–669. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Sallam, T.; Sandhu, J.; Tontonoz, P. Long Noncoding RNA Discovery in Cardiovascular Disease: Decoding Form to Function. *Circ. Res.* **2018**, *122*, 155–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Hauptman, N.; Glavač, D. Long Non-Coding RNA in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 4655–4669. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Zhang, M.; Wu, W.-B.; Wang, Z.-W.; Wang, X.-H. lncRNA NEAT1 is closely related with progression of breast cancer via promoting proliferation and EMT. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2017**, *21*, 1020–1026.
13. Tao, S.; He, H.; Chen, Q. Estradiol induces HOTAIR levels via GPER-mediated miR-148a inhibition in breast cancer. *J. Transl. Med.* **2015**, *13*, 131. [[CrossRef](#)]
14. Cooper, C.; Guo, J.; Yan, Y.; Chooniedass-Kothari, S.; Hube, F.; Hamedani, M.K.; Murphy, L.C.; Myal, Y.; Leygue, E. Increasing the relative expression of endogenous non-coding Steroid Receptor RNA Activator (SRA) in human breast cancer cells using modified oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 4518–4531. [[CrossRef](#)]
15. Godinho, M.; Meijer, D.; Setyono-Han, B.; Dorssers, L.C.J.; van Agthoven, T. Characterization of BCAR4, a novel oncogene causing endocrine resistance in human breast cancer cells. *J. Cell. Physiol.* **2011**, *226*, 1741–1749. [[CrossRef](#)]
16. Lin, A.; Li, C.; Xing, Z.; Hu, Q.; Liang, K.; Han, L.; Wang, C.; Hawke, D.H.; Wang, S.; Zhang, Y.; et al. The LINK-A lncRNA Activates Normoxic HIF1 α Signaling in Triple-negative Breast Cancer. *Nat. Cell Biol.* **2016**, *18*, 213–224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Shen, X.; Xie, B.; Ma, Z.; Yu, W.; Wang, W.; Xu, D.; Yan, X.; Chen, B.; Yu, L.; Li, J.; et al. Identification of novel long non-coding RNAs in triple-negative breast cancer. *Oncotarget* **2015**, *6*, 21730–21739. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Yang, F.; Liu, Y.-H.; Dong, S.-Y.; Yao, Z.-H.; Lv, L.; Ma, R.-M.; Dai, X.-X.; Wang, J.; Zhang, X.-H.; Wang, O.-C. Co-expression networks revealed potential core lncRNAs in the triple-negative breast cancer. *Gene* **2016**, *591*, 471–477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Lv, M.; Xu, P.; Wu, Y.; Huang, L.; Li, W.; Lv, S.; Wu, X.; Zeng, X.; Shen, R.; Jia, X.; et al. lncRNAs as new biomarkers to differentiate triple negative breast cancer from non-triple negative breast cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 13047–13059. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Koduru, S.V.; Tiwari, A.K.; Leberfinger, A.; Hazard, S.W.; Kawasawa, Y.I.; Mahajan, M.; Ravnic, D.J. A Comprehensive NGS Data Analysis of Differentially Regulated miRNAs, piRNAs, lncRNAs and sn/snoRNAs in Triple Negative Breast Cancer. *J. Cancer* **2017**, *8*, 578–596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Zhou, C.-X.; Wang, X.; Yang, N.; Xue, S.-K.; Li, W.-C.; Xie, P.-P. lncRNA LET function as a tumor suppressor in breast cancer development. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2018**, *22*, 6002–6007. [[PubMed](#)]
22. Zheng, R.; Lin, S.; Guan, L.; Yuan, H.; Liu, K.; Liu, C.; Ye, W.; Liao, Y.; Jia, J.; Zhang, R. Long non-coding RNA XIST inhibited breast cancer cell growth, migration, and invasion via miR-155/CDX1 axis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *498*, 1002–1008. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Wang, M.; Wang, M.; Wang, Z.; Yu, X.; Song, Y.; Wang, C.; Xu, Y.; Wei, F.; Zhao, Y.; Xu, Y. Long non-coding RNA-CTD-2108O9.1 represses breast cancer metastasis by influencing leukemia inhibitory factor receptor. *Cancer Sci.* **2018**, *109*, 1764–1774. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Li, S.; Zhou, J.; Wang, Z.; Wang, P.; Gao, X.; Wang, Y. Long noncoding RNA GAS5 suppresses triple negative breast cancer progression through inhibition of proliferation and invasion by competitively binding miR-196a-5p. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *104*, 451–457. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

25. Jin, C.; Yan, B.; Lu, Q.; Lin, Y.; Ma, L. Reciprocal regulation of Hsa-miR-1 and long noncoding RNA MALAT1 promotes triple-negative breast cancer development. *Tumor Biol.* **2016**, *37*, 7383–7394. [[CrossRef](#)]
26. Zuo, Y.; Li, Y.; Zhou, Z.; Ma, M.; Fu, K. Long non-coding RNA MALAT1 promotes proliferation and invasion via targeting miR-129-5p in triple-negative breast cancer. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *95*, 922–928. [[CrossRef](#)]
27. Latorre, E.; Carelli, S.; Raimondi, I.; D'Agostino, V.; Castiglioni, I.; Zucal, C.; Moro, G.; Luciani, A.; Ghilardi, G.; Monti, E.; et al. The Ribonucleic Complex HuR-MALAT1 Represses CD133 Expression and Suppresses Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 2626–2636. [[CrossRef](#)]
28. Wang, Y.-L.; Overstreet, A.-M.; Chen, M.-S.; Wang, J.; Zhao, H.-J.; Ho, P.-C.; Smith, M.; Wang, S.-C. Combined inhibition of EGFR and c-ABL suppresses the growth of triple-negative breast cancer growth through inhibition of HOTAIR. *Oncotarget* **2015**, *6*, 11150–11161. [[CrossRef](#)]
29. Wang, O.; Yang, F.; Liu, Y.; Lv, L.; Ma, R.; Chen, C.; Wang, J.; Tan, Q.; Cheng, Y.; Xia, E.; et al. C-MYC-induced upregulation of lncRNA SNHG12 regulates cell proliferation, apoptosis and migration in triple-negative breast cancer. *Am. J. Transl. Res.* **2017**, *9*, 533–545.
30. Luo, L.; Tang, H.; Ling, L.; Li, N.; Jia, X.; Zhang, Z.; Wang, X.; Shi, L.; Yin, J.; Qiu, N.; et al. LINC01638 lncRNA activates MTDH-Twist1 signaling by preventing SPOP-mediated c-Myc degradation in triple-negative breast cancer. *Oncogene* **2018**, *37*, 6166–6179. [[CrossRef](#)]
31. Vennin, C.; Spruyt, N.; Dahmani, F.; Julien, S.; Bertucci, F.; Finetti, P.; Chassat, T.; Bourette, R.P.; Le Bourhis, X.; Adriaenssens, E. H19 non coding RNA-derived miR-675 enhances tumorigenesis and metastasis of breast cancer cells by downregulating c-Cbl and Cbl-b. *Oncotarget* **2015**, *6*, 29209–29223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Wang, P.-S.; Chou, C.-H.; Lin, C.-H.; Yao, Y.-C.; Cheng, H.-C.; Li, H.-Y.; Chuang, Y.-C.; Yang, C.-N.; Ger, L.-P.; Chen, Y.-C.; et al. A novel long non-coding RNA linc-ZNF469-3 promotes lung metastasis through miR-574-5p—ZEB1 axis in triple negative breast cancer. *Oncogene* **2018**, 4662–4678. [[CrossRef](#)]
33. Xia, E.; Shen, Y.; Bhandari, A.; Zhou, X.; Wang, Y.; Yang, F.; Wang, O. Long non-coding RNA LINC00673 promotes breast cancer proliferation and metastasis through regulating B7-H6 and epithelial-mesenchymal transition. *Am. J. Cancer Res.* **2018**, *8*, 1273–1287.
34. Zhang, Y.; Li, J.; Jia, S.; Wang, Y.; Kang, Y.; Zhang, W. Down-regulation of lncRNA-ATB inhibits epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells by increasing miR-141-3p expression. *Biochem. Cell Biol.* **2019**, *97*, 193–200. [[CrossRef](#)]
35. Li, W.; Jia, G.; Qu, Y.; Du, Q.; Liu, B.; Liu, B. Long Non-Coding RNA (lncRNA) HOXA11-AS Promotes Breast Cancer Invasion and Metastasis by Regulating Epithelial-Mesenchymal Transition. *Med. Sci. Monit.* **2017**, *23*, 3393–3403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Liu, G.; Hu, X.; Zhou, G. Long non-coding RNA OR3A4 promotes proliferation and migration in breast cancer. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *96*, 426–433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Luan, T.; Zhang, X.; Wang, S.; Song, Y.; Zhou, S.; Lin, J.; An, W.; Yuan, W.; Yang, Y.; Cai, H.; et al. Long non-coding RNA MIAT promotes breast cancer progression and functions as ceRNA to regulate DUSP7 expression by sponging miR-155-5p. *Oncotarget* **2017**, *8*, 76153–76164. [[CrossRef](#)]
38. Song, R.; Zhang, J.; Huang, J.; Hai, T. Long non-coding RNA GHET1 promotes human breast cancer cell proliferation, invasion and migration via affecting epithelial mesenchymal transition. *Cancer Biomark.* **2018**, *22*, 565–573. [[CrossRef](#)]
39. Li, G.-Y.; Wang, W.; Sun, J.-Y.; Xin, B.; Zhang, X.; Wang, T.; Zhang, Q.-F.; Yao, L.-B.; Han, H.; Fan, D.-M.; et al. Long non-coding RNAs AC026904.1 and UCA1: A “one-two punch” for TGF- β -induced SNAI2 activation and epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *Theranostics* **2018**, *8*, 2846–2861. [[CrossRef](#)]
40. Li, Y.; Lv, M.; Song, Z.; Lou, Z.; Wang, R.; Zhuang, M. Long non-coding RNA NNT-AS1 affects progression of breast cancer through miR-142-3p/ZEB1 axis. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *103*, 939–946. [[CrossRef](#)]
41. Wang, L.; Wang, R.; Ye, Z.; Wang, Y.; Li, X.; Chen, W.; Zhang, M.; Cai, C. PVT1 affects EMT and cell proliferation and migration via regulating p21 in triple-negative breast cancer cells cultured with mature adipogenic medium. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2018**, *50*, 1211–1218. [[CrossRef](#)]
42. Yang, F.; Shen, Y.; Zhang, W.; Jin, J.; Huang, D.; Fang, H.; Ji, W.; Shi, Y.; Tang, L.; Chen, W.; et al. An androgen receptor negatively induced long non-coding RNA ARNILA binding to miR-204 promotes the invasion and metastasis of triple-negative breast cancer. *Cell Death Differ.* **2018**, *25*, 2209–2220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Eades, G.; Wolfson, B.; Zhang, Y.; Li, Q.; Yao, Y.; Zhou, Q. lincRNA-RoR and miR-145 regulate invasion in triple-negative breast cancer via targeting ARF6. *Mol. Cancer Res.* **2015**, *13*, 330–338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

44. Wang, H.-B.; Wei, H.; Wang, J.-S.; Li, L.; Chen, A.-Y.; Li, Z.-G. Down-regulated expression of LINC00518 prevents epithelial cell growth and metastasis in breast cancer through the inhibition of CDX2 methylation and activation of the Wnt signaling pathway. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Mol. Basis Dis.* **2019**, *1865*, 708–723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Huang, X.; Xie, X.; Liu, P.; Yang, L.; Chen, B.; Song, C.; Tang, H.; Xie, X. Adam12 and lnc015192 act as ceRNAs in breast cancer by regulating miR-34a. *Oncogene* **2018**, *37*, 6316–6326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Augoff, K.; McCue, B.; Plow, E.F.; Sossey-Alaoui, K. miR-31 and its host gene lncRNA LOC554202 are regulated by promoter hypermethylation in triple-negative breast cancer. *Mol. Cancer* **2012**, *11*, 5. [[CrossRef](#)]
47. Lee, J.; Jung, J.H.; Chae, Y.S.; Park, H.Y.; Kim, W.W.; Lee, S.J.; Jeong, J.-H.; Kang, S.H. Long Noncoding RNA snaR Regulates Proliferation, Migration and Invasion of Triple-negative Breast Cancer Cells. *Anticancer Res.* **2016**, *36*, 6289–6295. [[CrossRef](#)]
48. He, L.; Hannon, G.J. MicroRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* **2004**, *5*, 522–531. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Calin, G.A.; Dumitru, C.D.; Shimizu, M.; Bichi, R.; Zupo, S.; Noch, E.; Aldler, H.; Rattan, S.; Keating, M.; Rai, K.; et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 15524–15529. [[CrossRef](#)]
50. Kluiver, J.; Poppema, S.; de Jong, D.; Blokzijl, T.; Harms, G.; Jacobs, S.; Kroesen, B.-J.; van den Berg, A. BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J. Pathol.* **2005**, *207*, 243–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Di Leva, G.; Gasparini, P.; Piovan, C.; Ngankou, A.; Garofalo, M.; Taccioli, C.; Iorio, M.V.; Li, M.; Volinia, S.; Alder, H.; et al. MicroRNA Cluster 221-222 and Estrogen Receptor α Interactions in Breast Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2010**, *102*, 706–721. [[CrossRef](#)]
52. Hayashita, Y.; Osada, H.; Tatematsu, Y.; Yamada, H.; Yanagisawa, K.; Tomida, S.; Yatabe, Y.; Kawahara, K.; Sekido, Y.; Takahashi, T. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 9628–9632. [[CrossRef](#)]
53. Felicetti, F.; Errico, M.C.; Bottero, L.; Segnalini, P.; Stoppacciaro, A.; Biffoni, M.; Felli, N.; Mattia, G.; Petrini, M.; Colombo, M.P.; et al. The promyelocytic leukemia zinc finger-microRNA-221/-222 pathway controls melanoma progression through multiple oncogenic mechanisms. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 2745–2754. [[CrossRef](#)]
54. Calin, G.A.; Sevignani, C.; Dumitru, C.D.; Hyslop, T.; Noch, E.; Yendamuri, S.; Shimizu, M.; Rattan, S.; Bullrich, F.; Negrini, M.; et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 2999–3004. [[CrossRef](#)]
55. Corney, D.C.; Flesken-Nikitin, A.; Godwin, A.K.; Wang, W.; Nikitin, A.Y. MicroRNA-34b and MicroRNA-34c are targets of p53 and cooperate in control of cell proliferation and adhesion-independent growth. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 8433–8438. [[CrossRef](#)]
56. Ding, X.-M. MicroRNAs: Regulators of cancer metastasis and epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Chin. J. Cancer* **2014**, *33*, 140–147. [[CrossRef](#)]
57. Naorem, L.D.; Muthaiyan, M.; Venkatesan, A. Identification of dysregulated miRNAs in triple negative breast cancer: A meta-analysis approach. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *234*, 11768–11779. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Gasparini, P.; Cascione, L.; Fassan, M.; Lovat, F.; Guler, G.; Balci, S.; Irkkan, C.; Morrison, C.; Croce, C.M.; Shapiro, C.L.; et al. microRNA expression profiling identifies a four microRNA signature as a novel diagnostic and prognostic biomarker in triple negative breast cancers. *Oncotarget* **2014**, *5*, 1174–1184. [[CrossRef](#)]
59. Yuan, N.; Zhang, G.; Bie, F.; Ma, M.; Ma, Y.; Jiang, X.; Wang, Y.; Hao, X. Integrative analysis of lncRNAs and miRNAs with coding RNAs associated with ceRNA crosstalk network in triple negative breast cancer. *OncoTargets Ther.* **2017**, *10*, 5883–5897. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Fkih M'hamed, I.; Privat, M.; Ponelle, F.; Penault-Llorca, F.; Kenani, A.; Bignon, Y.-J. Identification of miR-10b, miR-26a, miR-146a and miR-153 as potential triple-negative breast cancer biomarkers. *Cell. Oncol.* **2015**, *38*, 433–442. [[CrossRef](#)]
61. Haga, C.L.; Phinney, D.G. MicroRNAs in the Imprinted DLK1-DIO3 Region Repress the Epithelial-to-Mesenchymal Transition by Targeting the TWIST1 Protein Signaling Network. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 42695–42707. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

62. Tsouko, E.; Wang, J.; Frigo, D.E.; Aydoğdu, E.; Williams, C. miR-200a inhibits migration of triple-negative breast cancer cells through direct repression of the EPHA2 oncogene. *Carcinogenesis* **2015**, *36*, 1051–1060. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Humphries, B.; Wang, Z.; Oom, A.L.; Fisher, T.; Tan, D.; Cui, Y.; Jiang, Y.; Yang, C. MicroRNA-200b targets protein kinase C α and suppresses triple-negative breast cancer metastasis. *Carcinogenesis* **2014**, *35*, 2254–2263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Damiano, V.; Brisotto, G.; Borgna, S.; di Gennaro, A.; Armellin, M.; Perin, T.; Guardascione, M.; Maestro, R.; Santarosa, M. Epigenetic silencing of miR-200c in breast cancer is associated with aggressiveness and is modulated by ZEB1. *Genes Chromosomes Cancer* **2017**, *56*, 147–158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Wang, X.; Qiu, H.; Tang, R.; Song, H.; Pan, H.; Feng, Z.; Chen, L. miR-30a inhibits epithelial-mesenchymal transition and metastasis in triple-negative breast cancer by targeting ROR1. *Oncol. Rep.* **2018**, *39*, 2635–2643. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Liu, Q.; Wang, W.; Yang, X.; Zhao, D.; Li, F.; Wang, H. MicroRNA-146a inhibits cell migration and invasion by targeting RhoA in breast cancer. *Oncol. Rep.* **2016**, *36*, 189–196. [[CrossRef](#)]
67. Li, D.; Hu, J.; Song, H.; Xu, H.; Wu, C.; Zhao, B.; Xie, D.; Wu, T.; Zhao, J.; Fang, L. miR-143-3p targeting LIM domain kinase 1 suppresses the progression of triple-negative breast cancer cells. *Am. J. Transl. Res.* **2017**, *9*, 2276–2285.
68. Li, D.; Wang, H.; Song, H.; Xu, H.; Zhao, B.; Wu, C.; Hu, J.; Wu, T.; Xie, D.; Zhao, J.; et al. The microRNAs miR-200b-3p and miR-429-5p target the LIMK1/CFL1 pathway to inhibit growth and motility of breast cancer cells. *Oncotarget* **2017**, *8*, 85276–85289. [[CrossRef](#)]
69. Krishnan, K.; Steptoe, A.L.; Martin, H.C.; Pattabiraman, D.R.; Nones, K.; Waddell, N.; Mariasegaram, M.; Simpson, P.T.; Lakhani, S.R.; Vlassov, A.; et al. miR-139-5p is a regulator of metastatic pathways in breast cancer. *RNA* **2013**, *19*, 1767–1780. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Lv, Z.-D.; Yang, D.-X.; Liu, X.-P.; Jin, L.-Y.; Wang, X.-G.; Yang, Z.-C.; Liu, D.; Zhao, J.-J.; Kong, B.; Li, F.-N.; et al. MiR-212-5p Suppresses the Epithelial-Mesenchymal Transition in Triple-Negative Breast Cancer by Targeting Prrx2. *Cell. Physiol. Biochem.* **2017**, *44*, 1785–1795. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Chen, J.; Shin, V.Y.; Siu, M.T.; Ho, J.C.W.; Cheuk, I.; Kwong, A. miR-199a-5p confers tumor-suppressive role in triple-negative breast cancer. *BMC Cancer* **2016**, *16*, 887. [[CrossRef](#)]
72. Jang, M.H.; Kim, H.J.; Gwak, J.M.; Chung, Y.R.; Park, S.Y. Prognostic value of microRNA-9 and microRNA-155 expression in triple-negative breast cancer. *Hum. Pathol.* **2017**, *68*, 69–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Wu, J.; Li, W.-Z.; Huang, M.-L.; Wei, H.-L.; Wang, T.; Fan, J.; Li, N.-L.; Ling, R. Regulation of cancerous progression and epithelial-mesenchymal transition by miR-34c-3p via modulation of MAP3K2 signaling in triple-negative breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *483*, 10–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Kong, P.; Chen, L.; Yu, M.; Tao, J.; Liu, J.; Wang, Y.; Pan, H.; Zhou, W.; Wang, S. miR-3178 inhibits cell proliferation and metastasis by targeting Notch1 in triple-negative breast cancer. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 1059. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Rhodes, L.V.; Martin, E.C.; Segar, H.C.; Miller, D.F.B.; Buechlein, A.; Rusch, D.B.; Nephew, K.P.; Burow, M.E.; Collins-Burow, B.M. Dual regulation by microRNA-200b-3p and microRNA-200b-5p in the inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition in triple-negative breast cancer. *Oncotarget* **2015**, *6*, 16638–16652. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Hong, L.; Pan, F.; Jiang, H.; Zhang, L.; Liu, Y.; Cai, C.; Hua, C.; Luo, X.; Sun, J.; Chen, Z. miR-125b inhibited epithelial-mesenchymal transition of triple-negative breast cancer by targeting MAP2K7. *OncoTargets Ther.* **2016**, *9*, 2639–2648.
77. Lv, Z.-D.; Kong, B.; Liu, X.-P.; Jin, L.-Y.; Dong, Q.; Li, F.-N.; Wang, H.-B. miR-655 suppresses epithelial-to-mesenchymal transition by targeting Prrx1 in triple-negative breast cancer. *J. Cell. Mol. Med.* **2016**, *20*, 864–873. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Wu, J.; Sun, Z.; Sun, H.; Li, Y. MicroRNA-27a promotes tumorigenesis via targeting AKT in triple negative breast cancer. *Mol. Med. Rep.* **2018**, *17*, 562–570. [[CrossRef](#)]
79. Zhang, X.; Ma, G.; Liu, J.; Zhang, Y. MicroRNA-182 promotes proliferation and metastasis by targeting FOXF2 in triple-negative breast cancer. *Oncol. Lett.* **2017**, *14*, 4805–4811. [[CrossRef](#)]
80. Liu, H.; Wang, Y.; Li, X.; Zhang, Y.; Li, J.; Zheng, Y.; Liu, M.; Song, X.; Li, X. Expression and regulatory function of miRNA-182 in triple-negative breast cancer cells through its targeting of profilin 1. *Tumor Biol.* **2013**, *34*, 1713–1722. [[CrossRef](#)]

81. Li, Q.; Liu, J.; Meng, X.; Pang, R.; Li, J. MicroRNA-454 may function as an oncogene via targeting AKT in triple negative breast cancer. *J. Biol. Res.* **2017**, *24*, 10. [[CrossRef](#)]
82. Chen, D.; Dang, B.-L.; Huang, J.; Chen, M.; Wu, D.; Xu, M.-L.; Li, R.; Yan, G.-R. MiR-373 drives the epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis via the miR-373-TXNIP-HIF1 α -TWIST signaling axis in breast cancer. *Oncotarget* **2015**, *6*, 32701–32712.
83. Hwang, M.S.; Yu, N.; Stinson, S.Y.; Yue, P.; Newman, R.J.; Allan, B.B.; Dornan, D. miR-221/222 Targets Adiponectin Receptor 1 to Promote the Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Breast Cancer. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e66502. [[CrossRef](#)]
84. Han, X.; Yan, S.; Weijie, Z.; Feng, W.; Liuxing, W.; Mengquan, L.; Qingxia, F. Critical role of miR-10b in transforming growth factor- β 1-induced epithelial–mesenchymal transition in breast cancer. *Cancer Gene Ther.* **2014**, *21*, 60–67. [[CrossRef](#)]
85. Chen, M.; Wei, L.; Law, C.-T.; Tsang, F.H.-C.; Shen, J.; Cheng, C.L.-H.; Tsang, L.-H.; Ho, D.W.-H.; Chiu, D.K.-C.; Lee, J.M.-F.; et al. RNA N6-methyladenosine methyltransferase-like 3 promotes liver cancer progression through YTHDF2-dependent posttranscriptional silencing of SOCS2. *Hepatology* **2018**, *67*, 2254–2270. [[CrossRef](#)]
86. Lv, D.; Jia, F.; Hou, Y.; Sang, Y.; Alvarez, A.A.; Zhang, W.; Gao, W.-Q.; Hu, B.; Cheng, S.-Y.; Ge, J.; et al. Histone acetyltransferase KAT6A upregulates PI3K/AKT signaling through TRIM24 binding. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 6190–6201. [[CrossRef](#)]
87. Audia, J.E.; Campbell, R.M. Histone Modifications and Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2016**, *8*. [[CrossRef](#)]
88. Michalak, E.M.; Visvader, J.E. Dysregulation of histone methyltransferases in breast cancer—Opportunities for new targeted therapies? *Mol. Oncol.* **2016**, *10*, 1497–1515. [[CrossRef](#)]
89. Wang, Z.-T.; Chen, Z.-J.; Jiang, G.-M.; Wu, Y.-M.; Liu, T.; Yi, Y.-M.; Zeng, J.; Du, J.; Wang, H.-S. Histone deacetylase inhibitors suppress mutant p53 transcription via HDAC8/YY1 signals in triple negative breast cancer cells. *Cell. Signal.* **2016**, *28*, 506–515. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Lewis, K.A.; Jordan, H.R.; Tollefsbol, T.O. Effects of SAHA and EGCG on Growth Potentiation of Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Cancers* **2019**, *11*, 23. [[CrossRef](#)]
91. Manna, P.R.; Ahmed, A.U.; Vartak, D.; Molehin, D.; Pruitt, K. Overexpression of the steroidogenic acute regulatory protein in breast cancer: Regulation by histone deacetylase inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, *509*, 476–482. [[CrossRef](#)]
92. Fedele, P.; Orlando, L.; Cinieri, S. Targeting triple negative breast cancer with histone deacetylase inhibitors. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2017**, *26*, 1199–1206. [[CrossRef](#)]
93. Tate, C.R.; Rhodes, L.V.; Segar, H.C.; Driver, J.L.; Pounder, F.N.; Burow, M.E.; Collins-Burow, B.M. Targeting triple-negative breast cancer cells with the histone deacetylase inhibitor panobinostat. *Breast Cancer Res.* **2012**, *14*, R79. [[CrossRef](#)]
94. Chiu, H.-W.; Yeh, Y.-L.; Wang, Y.-C.; Huang, W.-J.; Ho, S.-Y.; Lin, P.; Wang, Y.-J. Combination of the novel histone deacetylase inhibitor YCW1 and radiation induces autophagic cell death through the downregulation of BNIP3 in triple-negative breast cancer cells in vitro and in an orthotopic mouse model. *Mol. Cancer* **2016**, *15*, 46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Carlisi, D.; Lauricella, M.; D’Anneo, A.; Buttitta, G.; Emanuele, S.; di Fiore, R.; Martinez, R.; Rolfo, C.; Vento, R.; Tesoriere, G. The synergistic effect of SAHA and parthenolide in MDA-MB231 breast cancer cells. *J. Cell. Physiol.* **2015**, *230*, 1276–1289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Zhang, G.; Park, M.A.; Mitchell, C.; Hamed, H.; Rahmani, M.; Martin, A.P.; Curiel, D.T.; Yacoub, A.; Graf, M.; Lee, R.; et al. Vorinostat and sorafenib synergistically kill tumor cells via FLIP suppression and CD95 activation. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 5385–5399. [[CrossRef](#)]
97. Xi, Y.; Shi, J.; Li, W.; Tanaka, K.; Allton, K.L.; Richardson, D.; Li, J.; Franco, H.L.; Nagari, A.; Malladi, V.S.; et al. Histone modification profiling in breast cancer cell lines highlights commonalities and differences among subtypes. *BMC Genom.* **2018**, *19*, 150. [[CrossRef](#)]
98. Messier, T.L.; Gordon, J.A.R.; Boyd, J.R.; Tye, C.E.; Browne, G.; Stein, J.L.; Lian, J.B.; Stein, G.S. Histone H3 lysine 4 acetylation and methylation dynamics define breast cancer subtypes. *Oncotarget* **2016**, *7*, 5094–5109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Liu, L.; Kimball, S.; Liu, H.; Holowatyj, A.; Yang, Z.-Q. Genetic alterations of histone lysine methyltransferases and their significance in breast cancer. *Oncotarget* **2014**, *6*, 2466–2482. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

100. Gregoire, J.-M.; Fleury, L.; Salazar-Cardozo, C.; Alby, F.; Masson, V.; Arimondo, P.B.; Ausseil, F. Identification of epigenetic factors regulating the mesenchyme to epithelium transition by RNA interference screening in breast cancer cells. *BMC Cancer* **2016**, *16*, 700. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Su, Y.; Hopfinger, N.R.; Nguyen, T.D.; Pogash, T.J.; Santucci-Pereira, J.; Russo, J. Epigenetic reprogramming of epithelial mesenchymal transition in triple negative breast cancer cells with DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2018**, *37*, 1848–1857. [[CrossRef](#)]
102. Majumder, A.; Syed, K.M.; Mukherjee, A.; Lankadasari, M.B.; Azeez, J.M.; Sreeja, S.; Harikumar, K.B.; Pillai, M.R.; Dutta, D. Enhanced expression of histone chaperone APLF associate with breast cancer. *Mol. Cancer* **2018**, *17*, 76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Zhang, Y.; Subbiah, V.K.; Rajagopalan, D.; Tham, C.Y.; Abdullah, L.N.; Toh, T.B.; Gong, M.; Tan, T.Z.; Jadhav, S.P.; Pandey, A.K.; et al. TIP60 inhibits metastasis by ablating DNMT1–SNAIL2-driven epithelial-mesenchymal transition program. *J. Mol. Cell Biol.* **2016**, *8*, 384–399. [[CrossRef](#)]
104. Taube, J.H.; Sphyris, N.; Johnson, K.S.; Reisenauer, K.N.; Nesbit, T.A.; Joseph, R.; Vijay, G.V.; Sarkar, T.R.; Bhangre, N.A.; Song, J.J.; et al. The H3K27me3-demethylase KDM6A is suppressed in breast cancer stem-like cells, and enables the resolution of bivalency during the mesenchymal-epithelial transition. *Oncotarget* **2017**, *8*, 65548–65565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Chien, Y.-C.; Liu, L.-C.; Ye, H.-Y.; Wu, J.-Y.; Yu, Y.-L. EZH2 promotes migration and invasion of triple-negative breast cancer cells via regulating TIMP2-MMP-2/-9 pathway. *Am. J. Cancer Res.* **2018**, *8*, 422–434. [[PubMed](#)]
106. Feng, J.; Xu, G.; Liu, J.; Zhang, N.; Li, L.; Ji, J.; Zhang, J.; Zhang, L.; Wang, G.; Wang, X.; et al. Phosphorylation of LSD1 at Ser112 is crucial for its function in induction of EMT and metastasis in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **2016**, *159*, 443–456. [[CrossRef](#)]
107. Salz, T.; Deng, C.; Pampo, C.; Siemann, D.; Qiu, Y.; Brown, K.; Huang, S. Histone Methyltransferase hSETD1A Is a Novel Regulator of Metastasis in Breast Cancer. *Mol. Cancer Res.* **2015**, *13*, 461–469. [[CrossRef](#)]
108. Zhao, Z.; Sun, C.; Li, F.; Han, J.; Li, X.; Song, Z. Overexpression of histone demethylase JMJD5 promotes metastasis and indicates a poor prognosis in breast cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2015**, *8*, 10325–10334.
109. Bamodu, O.A.; Huang, W.-C.; Lee, W.-H.; Wu, A.; Wang, L.S.; Hsiao, M.; Yeh, C.-T.; Chao, T.-Y. Aberrant KDM5B expression promotes aggressive breast cancer through MALAT1 overexpression and downregulation of hsa-miR-448. *BMC Cancer* **2016**, *16*, 160. [[CrossRef](#)]
110. Ramadoss, S.; Guo, G.; Wang, C.-Y. Lysine demethylase KDM3A regulates breast cancer cell invasion and apoptosis by targeting histone and the non-histone protein p53. *Oncogene* **2017**, *36*, 47–59. [[CrossRef](#)]
111. An, P.; Li, J.; Lu, L.; Wu, Y.; Ling, Y.; Du, J.; Chen, Z.; Wang, H. Histone deacetylase 8 triggers the migration of triple negative breast cancer cells via regulation of YAP signals. *Eur. J. Pharmacol.* **2018**, *845*, 16–23. [[CrossRef](#)]
112. Wu, S.; Luo, Z.; Yu, P.-J.; Xie, H.; He, Y.-W. Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) promotes the epithelial mesenchymal transition of triple negative breast cancer cells via HDAC8/FOXA1 signals. *Biol. Chem.* **2016**, *397*, 75–83. [[CrossRef](#)]
113. Shah, P.; Gau, Y.; Sabnis, G. Histone deacetylase inhibitor entinostat reverses epithelial to mesenchymal transition of breast cancer cells by reversing the repression of E-cadherin. *Breast Cancer Res. Treat.* **2014**, *143*, 99–111. [[CrossRef](#)]
114. Schech, A.; Kazi, A.; Yu, S.; Shah, P.; Sabnis, G. Histone Deacetylase Inhibitor Entinostat Inhibits Tumor-Initiating Cells in Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Mol. Cancer Ther.* **2015**, *14*, 1848–1857. [[CrossRef](#)]
115. Rahimian, A.; Barati, G.; Mehrandish, R.; Mellati, A.A. Inhibition of Histone Deacetylases Reverses Epithelial-Mesenchymal Transition in Triple-Negative Breast Cancer Cells through a Slug Mediated Mechanism. *Mol. Biol.* **2018**, *52*, 474–481. [[CrossRef](#)]
116. Shieh, J.-M.; Wei, T.-T.; Tang, Y.-A.; Huang, S.-M.; Wen, W.-L.; Chen, M.-Y.; Cheng, H.-C.; Salunke, S.B.; Chen, C.-S.; Lin, P.; et al. Mitochondrial Apoptosis and FAK Signaling Disruption by a Novel Histone Deacetylase Inhibitor, HTPB, in Antitumor and Antimetastatic Mouse Models. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e30240. [[CrossRef](#)]
117. Ferrari-Amorotti, G.; Chiodoni, C.; Shen, F.; Cattelani, S.; Soliera, A.R.; Manzotti, G.; Grisendi, G.; Dominici, M.; Rivasi, F.; Colombo, M.P.; et al. Suppression of Invasion and Metastasis of Triple-Negative Breast Cancer Lines by Pharmacological or Genetic Inhibition of Slug Activity. *Neoplasia* **2014**, *16*, 1047–1058. [[CrossRef](#)]

118. Liu, X.-R.; Zhou, L.-H.; Hu, J.-X.; Liu, L.-M.; Wan, H.-P.; Zhang, X.-Q. UNC0638, a G9a inhibitor, suppresses epithelial-mesenchymal transition-mediated cellular migration and invasion in triple negative breast cancer. *Mol. Med. Rep.* **2018**, *17*, 2239. [[CrossRef](#)]
119. Hirst, M.; Marra, M.A. Epigenetics and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2009**, *41*, 136–146. [[CrossRef](#)]
120. Esteller, M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: A booming present, a brighter future. *Oncogene* **2002**, *21*, 5427–5440. [[CrossRef](#)]
121. Jing, F.; Yuping, W.; Yong, C.; Jie, L.; Jun, L.; Xuanbing, T.; Lihua, H. CpG island methylator phenotype of multigene in serum of sporadic breast carcinoma. *Tumor Biol.* **2010**, *31*, 321–331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Stirzaker, C.; Zotenko, E.; Song, J.Z.; Qu, W.; Nair, S.S.; Locke, W.J.; Stone, A.; Armstrong, N.J.; Robinson, M.D.; Dobrovic, A.; et al. Methylation sequencing in triple-negative breast cancer reveals distinct methylation clusters with prognostic value. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 5899. [[CrossRef](#)]
123. Branham, M.T.; Marzese, D.M.; Laurito, S.R.; Gago, F.E.; Orozco, J.I.; Tello, O.M.; Vargas-Roig, L.M.; Roqué, M. Methylation profile of triple-negative breast carcinomas. *Oncogenesis* **2012**, *1*, e17. [[CrossRef](#)]
124. Mathe, A.; Wong-Brown, M.; Locke, W.J.; Stirzaker, C.; Braye, S.G.; Forbes, J.F.; Clark, S.J.; Avery-Kiejda, K.A.; Scott, R.J. DNA methylation profile of triple negative breast cancer-specific genes comparing lymph node positive patients to lymph node negative patients. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 33435. [[CrossRef](#)]
125. Jang, M.H.; Kim, H.J.; Kim, E.J.; Chung, Y.R.; Park, S.Y. Expression of epithelial-mesenchymal transition-related markers in triple-negative breast cancer: ZEB1 as a potential biomarker for poor clinical outcome. *Hum. Pathol.* **2015**, *46*, 1267–1274. [[CrossRef](#)]
126. Ramassone, A.; Pagotto, S.; Veronese, A.; Visone, R. Epigenetics and MicroRNAs in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 459. [[CrossRef](#)]
127. Roll, J.D.; Rivenbark, A.G.; Sandhu, R.; Parker, J.S.; Jones, W.D.; Carey, L.A.; Livasy, C.A.; Coleman, W.B. Dysregulation of the epigenome in triple-negative breast cancers: Basal-like and claudin-low breast cancers express aberrant DNA hypermethylation. *Exp. Mol. Pathol.* **2013**, *95*, 276–287. [[CrossRef](#)]
128. Ward, A.K.; Mellor, P.; Smith, S.E.; Kendall, S.; Just, N.A.; Vizeacoumar, F.S.; Sarker, S.; Phillips, Z.; Alvi, R.; Saxena, A.; et al. Epigenetic silencing of CREB3L1 by DNA methylation is associated with high-grade metastatic breast cancers with poor prognosis and is prevalent in triple negative breast cancers. *Breast Cancer Res.* **2016**, *18*, 12. [[CrossRef](#)]
129. Kong, B.; Lv, Z.-D.; Wang, Y.; Jin, L.-Y.; Ding, L.; Yang, Z.-C. Down-regulation of BRMS1 by DNA hypermethylation and its association with metastatic progression in triple-negative breast cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2015**, *8*, 11076–11083.
130. Xiang, T.; Fan, Y.; Li, C.; Li, L.; Ying, Y.; Mu, J.; Peng, W.; Feng, Y.; Oberst, M.; Kelly, K.; et al. DACT2 silencing by promoter CpG methylation disrupts its regulation of epithelial-to-mesenchymal transition and cytoskeleton reorganization in breast cancer cells. *Oncotarget* **2016**, *7*, 70924–70935. [[CrossRef](#)]
131. Liu, X.; Li, C.; Zhang, R.; Xiao, W.; Niu, X.; Ye, X.; Li, Z.; Guo, Y.; Tan, J.; Li, Y. The EZH2-H3K27me3-DNMT1 complex orchestrates epigenetic silencing of the *wwc1* gene, a Hippo/YAP pathway upstream effector, in breast cancer epithelial cells. *Cell. Signal.* **2018**, *51*, 243–256. [[CrossRef](#)]
132. Xu, H.; Xiao, Q.; Fan, Y.; Xiang, T.; Li, C.; Li, C.; Li, S.; Hui, T.; Zhang, L.; Li, H.; et al. Epigenetic silencing of ADAMTS18 promotes cell migration and invasion of breast cancer through AKT and NF- κ B signaling. *Cancer Med.* **2017**, *6*, 1399–1408. [[CrossRef](#)]
133. Lo, P.-K.; Lee, J.S.; Liang, X.; Sukumar, S. The dual role of FOXF2 in regulation of DNA replication and the epithelial-mesenchymal transition in breast cancer progression. *Cell. Signal.* **2016**, *28*, 1502–1519. [[CrossRef](#)]
134. Mu, J.; Hui, T.; Shao, B.; Li, L.; Du, Z.; Lu, L.; Ye, L.; Li, S.; Li, Q.; Xiao, Q.; et al. Dickkopf-related protein 2 induces G0/G1 arrest and apoptosis through suppressing Wnt/ β -catenin signaling and is frequently methylated in breast cancer. *Oncotarget* **2017**, *8*, 39443–39459. [[CrossRef](#)]



Tableau 11 | Les principales signatures moléculaires pronostiques développées dans le cancer du sein.

Test ou Signature	Test Local ou Centralisé	Techniques utilisées	Gènes analysés	Conservation des tissus	Sélection des patientes	Objectifs
Oncotype Dx™ (Genomic Health)	Centralisé	RT-qPCR	21 gènes : ACTB, GAPDH, GUS, RPLPO, TFRC, GRB7, ER, HER2, PGR, BCL2, SCUBE2, BIRC5 Survivin, KI67, MYBL2, CCNB1, STK15, CTSL2, MMP11, CD68, GSTM1 et BAG1.	FFPE	ER+ Ganglions lymphatiques -	Pronostic de récidive à distance (5 à 10 ans). Prédiction de la réponse à la chimiothérapie et la radiothérapie.
MammaPrint (Agendia)	Centralisé	Microarray	70 gènes : BBC3, TGFB3, ESM1, IGFBP5, FGF18, SCUBE2, WISP1, FLT1, HRASLS, STK32B, RASSF7, DCK, MELK, EXT1, GNAZ, EBF4, MTDH, PITRM1, QSCN6L1, CCNE2, ECT2, CENPA, LIN9, KNTC2, MCM6, NUSAP1, ORC6L, TSPYL5, RUNCDC1, PRC1, RFC 4, RECQL5, CDCA7, DTL, COL4A2, GPR180, MMP9, GPR126, RTN4RL1, DIAPH3, CDC42BPA, PALM2, ALDH4A1, AYTL2, OXCT1, PEI1, GMPS, GSTM3, SLC2A3, FGF18, COL4A2, GPR180, EGLN1, MMP9, LOC100288906, C9orf30, ZNF533, C16orf61, SERF1A, C20orf46, LOC730018, LOC100131053, AA555029_RC, LGP2, NMU, UCHL5, JHDMID, AP2B1, MS4A7, et RAB6B.	Frais ou FFPE	Stade I ou II Age <61 ans, Tumeur ganglionnaire inférieure à 5 mm3	Pronostic de récidive à court terme et à distance (0–5 ans). Prédiction de la réponse à la chimiothérapie dans le groupe des patientes à haut risque ER. Prédiction puissante de survie sans métastase à 10 ans.
EndoPredict®	Local	RT-qPCR	11 gènes : BIRC5, UBE2C, DHCR7, RBBP8, IL6ST, STC2, AZGP1, MGP, CALM2, OAZ1, et RPL37A.	FFPE	RH + HER2 -	Pronostic de rechute métastatique précoce (0–5 ans) et tardive (5–15 ans). Prédiction des avantages de la chimiothérapie adjuvante. Amélioration des stratégies thérapeutiques cliniques des patientes.
PAM50/ Prosigna™	Local	Nanostring, nCounter et RT-qPCR	50 gènes : MIA, SFRP1, KRT14, KRT17, KRT5, FGFR4, GRB7, ERBB2, BAG1, MDM2, ACTR3B, BLVRA, CXXC5, TMEM45B, MMP11, FOXC1, EGFR, CDH3, PHGDH, MYC, CCNE1, CDCA1, CDC20, KIF2C, TYMS, KNTC2, UBE2T, MELK, PTTG1, CCNB1, CDC6, MYBL2, BIRC5, CENPF, EXO1, ORC6L, ANLN, UBE2C, RRM2, MKI67, CEP55, PGR, NAT1, SLC39A6, BCL2, ESRI, MAPT, GPR160, MLPH, FOXA1.	FFPE	ER positif Ganglion lymphatique - Stade I ou II	Identification des sous-types moléculaires du cancer du sein. Pronostic de récidive à 10 ans Pronostic et prédiction de la réponse au traitement néoadjuvant.

V. Signatures moléculaires

Des patientes atteintes de cancer du sein d'un sous-type moléculaire ou d'un stade clinique donnés peuvent développer des réponses différentes aux stratégies thérapeutiques. Ces différences de pronostics cliniques démontrent la grande hétérogénéité de la maladie. Des profils d'expression géniques ont été étudiés dans le but d'affiner le processus décisionnel des médecins et de personnaliser le traitement et la prise en charge des patientes. Ainsi, des signatures multi-gènes ont été largement développées ces dernières décennies dans le but de fournir des indicateurs supplémentaires, plus robustes que les paramètres clinico-pathologiques conventionnels. Au cours de la dernière décennie, le profilage de l'expression génique a identifié plus de 30 signatures multigéniques prometteuses dans le cancer du sein améliorant la prédiction, la classification et le pronostic du cancer du sein. Ces signatures ont été proposées dans le but d'améliorer la sélection des patientes candidates à la chimiothérapie adjuvante ou néoadjuvante, ou aux thérapies ciblées. Plus spécifiquement, ces tests sont conçus pour épargner aux patientes des traitements supplémentaires voire inutiles et leur éviter les effets secondaires associés. Parmi ces signatures, plusieurs sont aujourd'hui disponibles dans le commerce, affectant la stratégie de traitement de 25 à 30% des patientes atteintes de cancer du sein. Dans ce chapitre, nous discuterons les principales signatures moléculaires pronostiques développées dans le cancer du sein : Oncotype DXTM, MammaPrint, EndoPredict et PAM50 / Prosigna (Tableau 11).

A. Oncotype DxTM :

Oncotype DxTM est un test d'expression génique basé sur une RT-qPCR à partir des ARN extrait de tissus FFPE³⁰⁶. Ce test, est effectué uniquement aux États-Unis par Genomic Health, dans un laboratoire centralisé, accrédité par le College of American Pathologists³⁰⁷. Il analyse l'expression de 21 gènes dont 16 gènes sont liés au cancer et 5 gènes sont des gènes de référence utilisés pour la normalisation³⁰⁷. Les gènes sélectionnés reflètent des activités biologiques qui peuvent être regroupées dans la signalisation d'œstrogène (ER, HER2, BCL2, et SCUBE2), dans la prolifération (MYBL2, CCNB1, KI67, STK15, et BIRC5 Survivin), l'amplification HER2 (HER2 et GRB7), l'invasion (CTSL2 et MMP11), la présence de macrophages associés aux tumeurs (CD68), la détoxification (GTSM1) et la liaison aux protéines chaperonnes (BAG-1, co-chaperone pour HSP70).

Le test Oncotype Dx TM est actuellement recommandé pour les patientes atteintes d'un cancer du sein ER-positif, sans invasion des ganglions lymphatiques ⁹⁸. Ce test peut agir dans deux contextes séparés : il a une importance pronostique en prédisant la probabilité de récurrence à distance chez les patientes traitées par le tamoxifène dans le cas d'un cancer du sein à nodules négatifs et à récepteurs d'œstrogènes positifs ; il possède également une signification prédictive en prédisant la probabilité de survie à 10 ans chez le même sous-type de patientes. Ce test calcule des scores de récurrence (SR) de 0 à 100 permettant de classer ces patientes en trois groupes de risque de récurrence : faible (score <18), intermédiaire (score 18 à 30) et haut risque (score \geq 31) ^{98, 308}. De plus, il permet d'évaluer le degré de bénéfice et d'efficacité de la chimiothérapie en fonction des scores de risque prouvant une nouvelle fois le principe que toutes les femmes atteintes d'un cancer du sein ne bénéficient pas de la même manière de la chimiothérapie. Par exemple, un plus grand bénéfice a été attribué aux patientes de haut SR par rapport aux patientes présentant un SR faible ³⁰⁹. Oncotype Dx TM permet donc d'appliquer des traitements plus personnalisés chez des patientes porteuses de ce sous-type, en identifiant plus spécifiquement les patientes qui tireront le meilleur bénéfice d'une chimiothérapie. Ce traitement individualisé permet de réduire les effets secondaires indésirables et les coûts associés au sur-traitement par chimiothérapie ³¹⁰.

B. MammaPrint (Agendia) :

MammaPrint est un panel d'expression génique basée sur des microarrays constituées de 70 gènes en relation avec des caractéristiques pivots du cancer (croissance et cycle cellulaire, prolifération) et plus spécialement avec les risques précoces de métastase incluant des gènes impliqués dans les mécanismes d'invasion tumorale, d'angiogenèse, et de métastase ^{311, 96}. MammaPrint est réalisé par Agendia dans un laboratoire central à Amsterdam, aux Pays-Bas ³⁰⁶. Ce test d'expression génique a été conçu à partir de 78 tissus tumoraux frais et a récemment été adapté aux tissus fixés, inclus en paraffine. En 2002, Van't Veer et ses collègues ont validé la capacité du test MammaPrint à prédire un pronostic favorable ou défavorable de développement de métastases à distance dans les 10 ans ⁹⁶. Ce test est recommandé pour les patientes atteintes d'un cancer du sein invasif de stade 1 ou 2, < 61 ans, avec une tumeur ganglionnaire inférieure ou égale à 50 mm (pT1-2cN0) ³¹². En déterminant le niveau de risque métastatique, MammaPrint classe les patientes en deux groupes : faible risque métastatique à distance (bon pronostic) avec un taux de survie > 90% et haut risque (mauvais pronostic) pour une survie < 90% ³¹³. En se basant sur la littérature, MammaPrint est une méthode plus sensible et plus puissante pour prédire la rechute métastatique des cancers du sein, en comparaison avec

les méthodes conventionnelles (grade histologique, taille de la tumeur primaire, et autres...) ⁹⁶. Pour cette raison, MammaPrint a hautement amélioré la prise en charge des patientes en évitant la chimiothérapie pour les patientes de bon pronostic et en recommandant la chimiothérapie adjuvante cytotoxique pour les patientes de mauvais pronostic ^{314, 315}. Malheureusement, cette signature ne permet pas de modifier l'approche thérapeutique des cancers du sein triple négatifs qui ne disposent pas de traitement ciblé et donc d'alternative à la chimiothérapie.

C. EndoPredict® :

Le test EndoPredict (EP) (Sividon, Cologne, distribué par Myriad Genetics) est un test multigénique basé sur l'expression de l'ARNm de 11 gènes évalués par RT-qPCR. Il est utilisable sur des échantillons fixés au formol en paraffine (FFPE) ³¹⁶ et peut être mis en œuvre de manière décentralisée, dans les laboratoires de pathologie moléculaire locaux ^{317, 318}. Huit gènes sont liés au cancer et sont normalisés par trois gènes de contrôle. Ils se distribuent en cinq gènes associés à la signalisation et la différenciation des récepteurs aux œstrogènes et trois gènes prolifératifs ³¹⁹. Filipits et ses collègues ont validé la capacité du test EndoPredict à prédire le risque de métastases à distance chez les patientes atteintes d'un cancer du sein à un stade précoce, avec récepteurs hormonaux positifs et HER2 négatif. Il est efficace en cas de traitement endocrinien adjuvant uniquement ³¹⁹. En affectant un coefficient à l'expression de chaque gène, EndoPredict délivre deux types de scores (entre 0 et 15) : a. un score prédisant le risque de rechute précoce généré à partir des gènes de prolifération et b. un score prédisant la rechute métastatique à 5-10 ans calculé à partir des gènes associés aux récepteurs aux œstrogènes ³¹⁹. Ce score améliore la prise en charge des patientes en suggérant de traiter les patientes à faible risque avec de l'hormonothérapie adjuvante seulement alors que la chimiothérapie adjuvante est ajoutée pour les patientes à haut risque ³²⁰. Cette signature a été encore améliorée en combinant différents paramètres cliniques à EndoPredict ³²⁰. L'incorporation du statut nodal et de la taille de la tumeur améliore efficacement le pronostic à long terme délivré par EndoPredictClin ^{321, 319}.

D. PAM50 (Prosigna™) :

Le PAM50 Breast Cancer Intrinsic Classifier™ (Prosigna™), commercialisée par NanoString®, est un test de classification réalisé dans le cadre de la recherche par microarray et RT-qPCR ^{322, 323}. C'est un test décentralisé, réalisé localement, qui analyse l'expression de 50 gènes classificateurs et 5 gènes de contrôle ^{324, 325}, en utilisant l'ARN extrait de tissus

fixés inclus en paraffine ³¹³. Ce test clinique fournit des valeurs quantitatives pour la prolifération, l'expression des gènes luminaux, ESR1, PGR et ERBB2. PAM50 est un classificateur du cancer du sein permettant la reconnaissance des quatre sous-types biologiques “moléculaires” majeurs (luminal A, luminal B, HER2 enrichi, basal) ^{325, 326}. Ce test est prescrit aux patientes atteintes de cancer du sein positif aux récepteurs aux œstrogènes, à un stage précoce. En combinaison avec les paramètres clinicopathologiques, PAM50 permet de calculer un score de risque de récurrence ROR stratifiant les patientes en trois classes : faible risque (ROR < 29), risque modéré (ROR = 29-53) et haut risque (ROR ≥ 53) ³²². Le score PAM50 est également hautement prédictif de la réponse néoadjuvante de toutes les patientes atteintes d'un cancer du sein, y compris les patientes ER négatifs ³²². Il permet également de prédire la rechute métastatique à 5 ans. Par contre, cette signature ne prend pas en compte les tumeurs claudin-low, de particulièrement mauvais pronostic et souvent retrouvées parmi les CSTN.

VI. Signatures moléculaires des CSTNs

Alors que différents sous-types de cancer du sein disposent de tests pronostiques multigéniques qui permettent la stratification du risque des patientes afin de guider le choix thérapeutique, ces signatures multigéniques n'ont aucune valeur clinique pour les tumeurs triple négatives. Un besoin urgent d'une méthode efficace d'évaluation des risques pour proposer un traitement précis pour les CSTNs est donc prioritaire. En effet, la prise en charge des cancers du sein triple négatifs est un défi majeur pour le clinicien : comportement agressif, réponses partielles et résistances thérapeutiques, et absence de thérapie ciblée conduisent à un taux élevé de récurrence et une survie courte.

Le développement des outils d'études globales (microarrays, WGS, RNA-Seq) a permis de produire et d'analyser les profils génomiques et transcriptomiques des CSTNs afin de définir des signatures caractéristiques. Des listes de transcrits différentiellement exprimés entre les cancers du sein triple négatifs et les autres sous-types de cancer du sein ont été établies et répertorient des transcrits anormalement exprimés dans les cancers du sein triple négatifs. Pour l'essentiel, ces analyses ont contribué à mieux définir ce qu'est une tumeur mammaire triple négative, tout en pointant le caractère hétérogène de ce sous-groupe^{129, 327}. Elles n'ont pourtant pas permis de réellement faire évoluer les prises en charges thérapeutiques. Cependant, certaines signatures ont été corrélées au pronostic ou à la réponse aux traitements³²⁸.

C'est par exemple le cas de la signature identifiée par Zhong et al. Les auteurs ont comparé le profil d'expression génique de tumeurs triple négatives par rapport à des tumeurs non triple négatives. A partir de l'ensemble des gènes différentiellement exprimés, 4 gènes (FABP7, ART3, CT83 et TTYH1) ont été retenus comme biomarqueurs potentiels et effecteurs majeurs de la pathogenèse des CSTNs. Les deux gènes FABP7 et CT83 ont été utilisés pour construire une signature de prédiction de la survie globale des patientes CSTNs classant les patientes en deux groupes à faible et haut risque³²⁹. Cette signature présente une performance relativement haute avec de bonnes sensibilité et spécificité représentées par une aire sous la courbe ROC (en anglais « receiver operating characteristic ») égale à 0,777. Une autre étude a proposé qu'un panel de 6 ARNm (TMEM252, PRB2, SMCO1, IVL, SMR3B and COL9A3) soit capable de fortement prédire la survie globale chez les cancers triple négatifs. Son efficacité est très bonne avec une aire sous la courbe ROC de 0.929³³⁰. Dans une autre étude, une signature à deux gènes (ACSM4 et SPDYC) a été identifiée en se basant sur l'analyse des données transcriptomiques par réseau neuronal artificiel. Une valeur pronostique a été attribuée

à cette signature classifiant les patientes en deux groupes à faible et haut risque avec une sensibilité de 58% et une spécificité de 69%, associé au développement de métastases à distance ³³¹. Grâce au séquençage du génome entier, Xie et al. ont caractérisé les altérations génétiques entre des tumeurs primaires et leurs métastases pulmonaires associées. Cette caractérisation a permis d'établir une signature à quatre gènes (ENY2, KCNK9, TNFRSF11B et KCNMB2) avec une valeur pronostique pour la récurrence tumorale au niveau pulmonaire des CSTNs ³³². La courbe ROC a montré une sensibilité de 82.8% et une spécificité de 61.6%.

L'infiltration lymphocytaire étant un bon biomarqueur pronostique dans les CSTN, certaines signatures se sont focalisées sur l'immunité. Une première signature a été développée à partir d'un panel de cinq gènes immunitaires. Chez les patientes atteints de CSTN à un stade précoce, cette signature robuste permet de prédire les patientes à haut risque de métastases dans les ganglions lymphatiques axillaires, en préopératoire ³³³. Une autre signature a été développée autour de quatre gènes (GBP1, HLF, CXCL13, et SULT1). Celle-ci permet de prédire un niveau élevé de lymphocytes intratumoraux, associé à une meilleure espérance de vie après chimiothérapie néoadjuvante contenant de l'anthracycline. Par contre, son effet n'a pas été validé sur une seconde population et sa validation ainsi que l'intégration de paramètres cliniques sont attendus ³³⁴.

Très récemment, en Juillet 2020, Hong et al. ont identifié une signature de 8 micro ARNs (miR-139-5p, miR-10b-5p, miR-486-5p, miR-455-3p, miR-107, miR-146b-5p, miR-324-5p et miR-20a-5p) comme un modèle prédictif robuste de la rechute chez les patientes CSTNs. L'identification des patientes à risque élevé de rechute favorise le pronostic clinique et permet d'envisager des traitements personnalisés afin d'améliorer la prise en charge et la survie des patientes CSTNs ³³⁵. Antérieurement, une signature de trois miARNs (miR-21-3p, miR-659-5p et miR-200b-5p) a été décrite pour corrélérer avec le taux de survie des patientes CSTNs ³³⁶. Une autre signature à quatre miRNAs sériques (miR-18b, miR-103, miR-107, et miR-652) a été développée, identifiant les patientes à haut risque de rechute métastatique et survie courte ³³⁷.

De plus, une étude protéomique sur 76 biomarqueurs a investigué une association entre les protéines et une prédiction de la survie sans rechute chez les patientes CSTN. Une combinaison de six protéines permet de calculer un risque score stratifiant les patientes en deux groupes de risque a été développé ³³⁸. Une seconde étude a identifié un nouveau réseau de 10 à 14 protéines

qui classifient fortement les CSTNs présentant un set des biomarqueurs de la récurrence à évaluer
339 .

Les signatures d'expression peuvent également permettre de prédire la réponse aux chimiothérapies. De façon intéressante, une étude a évalué le profil de méthylation de patientes CSTNs traitées par chimiothérapie systémique néoadjuvante en fonction de leur réponse au traitement. Une signature épigénétique à deux gènes, FERD3L et TRIP10, a été associée à la réponse à la chimiothérapie et est capable de classer les patientes CSTNs en répondeuses et non-répondeuses. Son utilisation en clinique pourrait permettre d'affiner le choix des traitements par patiente ³⁴⁰. Une signature pronostique combinant trois ARN messagers (FCGR1A, RSAD2, CHRDL1) et deux longs ARN non codants (HIF1A-AS2 et AK124454) a été construite par Jiang et al. Elle est présentée comme un outil pronostique et prédictif à la fois, aidant à distinguer deux groupes des patientes selon leur risque de rechute et de prédire la réponse à la chimiothérapie à base de taxane ³⁴¹.

Ces signatures moléculaires pronostiques, composites et multifactorielles ont toutes pour but de mieux guider la prise de décision clinique. Ces signatures permettant la stratification des patientes favorisent la médecine personnalisée et permettent d'orienter vers un traitement optimal et d'améliorer les résultats. Bien qu'aucune ne soit utilisée en pratique clinique aujourd'hui, ces signatures ouvrent des pistes pour le développement de nouveaux médicaments pour les patientes atteintes de CSTN qui ont un besoin urgent d'options thérapeutiques efficaces. Toutes ces signatures ont cependant été générées sur de petites populations et validées sur des populations restreintes. D'autres études de validation dans des cohortes de patientes indépendantes et de plus grande taille sont nécessaires pour évaluer la véritable valeur clinique de ces résultats. La confirmation de l'efficacité de ces signatures passe donc par des essais cliniques prospectifs multicentriques. L'intégration de paramètres cliniques des patientes à ces signatures semble également une approche pertinente qui a obtenu de bons résultats jusqu'à aujourd'hui. Des études fonctionnelles, à minima in vitro, permettraient également de mieux comprendre le rôle des différents gènes décrits dans chaque signature. Cette compréhension mécanistique permettrait de dépasser le statut de simple biomarqueur et d'enclencher une recherche réelle de nouvelles approches thérapeutiques. L'absence complète de recouvrement des différentes signatures décrites jusqu'ici est également un sujet de questionnement : il était attendu que les différentes approches techniques et méthodologiques ne conduisent pas à des listes identiques de gènes. Par contre, les gènes les plus efficaces pour prédire la réponse et/ou la survie des patientes atteintes de CSTN auraient dû être retrouvés

dans plusieurs études. Ainsi, même si chaque étude individuellement apparaît convaincante, leur méta-analyse instille un doute sur leur pertinence. Pourtant, un test prédictif fiable de rechute métastatique est indispensable afin d'améliorer la prise en charge globale des patientes atteinte de CSTN.

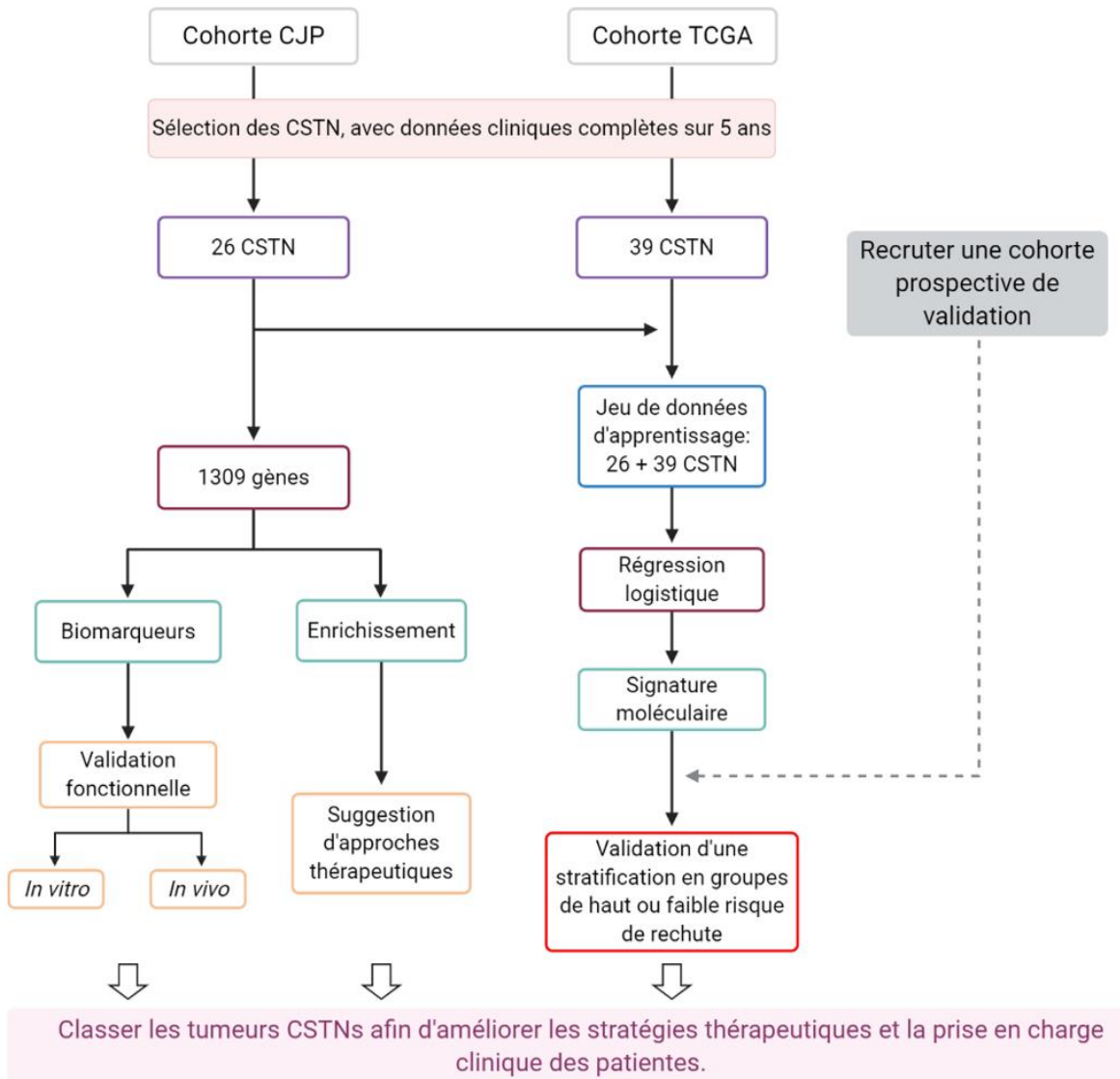


Figure 33 | Objectif de la thèse

Objectifs de la thèse

La thématique générale de ce travail de recherche concerne la caractérisation moléculaire de l'échappement métastatique des cancers du sein triple négatifs, dans le but de promouvoir des stratégies thérapeutiques adaptées aux spécificités des patientes. La question est donc d'identifier de nouveaux biomarqueurs de rechute métastatique et de s'en servir pour prédire la rechute des patientes dès un stade précoce. Le premier point peut conduire à suggérer de nouvelles cibles thérapeutiques alors que le second peut aider à guider le choix de traitement.

Dans ce contexte, l'objectif de mes travaux de thèse est double (Figure 33):

- Le **premier objectif** de ma thèse a été d'identifier et de caractériser un nouveau biomarqueur impliqué dans le processus d'échappement métastatique des carcinomes triple négatifs. Cette partie a été réalisée par analyse transcriptomique de deux groupes de CSTNs : l'un a conduit à un échappement métastatique en moins de 5 ans, aucune rechute n'a été décelée dans l'autre malgré un suivi de plus de 5 ans. L'analyse des gènes différentiellement exprimés entre ces deux groupes a permis d'identifier un nouveau biomarqueur puis de confirmer son rôle *in vitro* et *in vivo*. Il pourrait constituer une future cible thérapeutique.

- Le **deuxième objectif** a consisté à définir une signature moléculaire pronostique de la rechute métastatique rapide des patientes atteintes de cancer du sein triple négatif. Les profils d'expression caractéristiques des CSTNs qui évoluent ou non en métastases, générés pour le premier objectif, ont été assemblés à des données similaires issues de la collection publique TCGA afin de construire un modèle de stratification. L'utilisation d'une telle signature dans le CSTN permettrait, comme dans d'autres sous-types, d'adapter le traitement des patientes en fonction de leur probable évaluation métastatique en évitant un sur-traitement pour les patientes de bon pronostic et en utilisant des thérapies plus agressives pour les patientes au pronostic le plus défavorable.

La stratégie appliquée durant cette thèse s'appuie sur une étape commune représentée par la génération par RNA-Seq des profils d'expression géniques à partir d'échantillons tumoraux humains sélectionnés de manière rétrospective. Ensuite, des approches statistiques, *in vitro* et *in vivo* ont permis de générer les résultats présentés dans le chapitre suivant sous forme d'articles scientifiques.

RESULTATS

Article N°1 :

RNA sequencing reveals the differentially expression profiles
in metastatic triple negative breast cancer and identified
SHISA₃ as an efficient tumor suppressor gene

RNA sequencing reveals the differentially expression profiles in metastatic triple negative breast cancer and identified SHISA3 as an efficient tumor suppressor gene

Noura Khaled¹, Nicolas Sonnier², Ioana Molnar², Arnaud Briat¹, Flora Ponelle-Chachuat²,
Nina Radosevic-Robin^{1,2}, Maud Privat^{1,2} and Yannick Bidet^{1,2,*}

¹ Université Clermont Auvergne, Inserm, IMoST UMR 1240, F-63000 CLERMONT-FERRAND, FRANCE

² Centre Jean Perrin, Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, IMoST UMR 1240, F-63000 CLERMONT-FERRAND, FRANCE

* Correspondence: Yannick.Bidet@uca.fr

Soumission prévue en Janvier 2021 dans *Cancers*

Contexte et objectifs

Inéligible aux thérapies ciblées actuelles, le CSTN est associé à un fort pourcentage de mortalité en raison de sa grande capacité à développer une chimiorésistance puis un échappement métastatique. L'hétérogénéité de ce sous-groupe rend difficile la compréhension de sa biologie. Pourtant, c'est en identifiant des acteurs-clés de la progression métastatique que de nouvelles cibles thérapeutiques pourront voir le jour. Différents biomarqueurs existent pour le CSTN mais ils sont principalement utilisés pour sous-classer le groupe triple négatif. Nous proposons donc de rechercher un gène dont l'expression soit spécifique des CSTNs qui développent des métastases, et d'étudier son rôle fonctionnel afin de le proposer comme cible thérapeutique.

Méthodes

Parmi tous les échantillons disponibles au Centre Jean Perrin, une sélection rigoureuse nous a permis de retenir 26 patientes atteintes de CSTN et pour lesquelles nous disposons d'un suivi clinique complet sur 5 ans minimum. 10 d'entre elles ont développé des métastases et 16 non.

Le profil transcriptomique complet et sans *a priori* a été établi par RNA-Seq et les gènes différentiellement exprimés entre les 2 groupes ont été identifiés. Un gène candidat a été retenu sur la base d'analyses d'enrichissement et de fouille de la littérature. Son rôle sur la prolifération, l'apoptose, la capacité de formation de colonies, la migration et l'invasion a été étudié *in vitro* sur deux lignées cellulaires triple négatives : MDA MB 231 et HCC 1937. De plus, des cellules surexprimant ce candidat ont été injectées dans la glande mammaire de souris nude NMRI-Foxn1 femelles de onze semaines. La tumorigénicité et la croissance tumorale ont été évaluées en mesurant le poids des souris et les dimensions de la tumeur à l'aide d'un pied à coulisse jusqu'à leur euthanasie et leur dissection 33 jours après l'injection.

Résultats

L'analyse transcriptomique révèle 1309 gènes différentiellement exprimés entre les cancers triple négatifs métastasés ou non. L'analyse de l'enrichissement montre une implication de la voie WNT dans l'échappement métastatique des CSTNs. Nous avons choisi de nous concentrer sur un des éléments de cette voie, le gène SHISA3 dont l'expression est diminuée dans les tumeurs qui développent des métastases. Nos études *in vitro* montrent que la surexpression de SHISA3 inhibe la prolifération, la migration, l'invasion et la capacité à former des colonies de deux lignées cellulaires triple négatives, sans aucun effet sur l'apoptose. Les études *in vivo* confirment que la surexpression de SHISA3 ralentit la croissance tumorale pour la lignée MDA MB 231. Des résultats préliminaires suggèrent que SHISA3 inhibe la TEM *via* la régulation de la voie de signalisation Wnt / β caténine.

Conclusion

En conclusion, le séquençage à haut débit nous a permis de révéler les profils d'expression différentiels du cancer du sein métastatique triple négatif et de dégager un gène candidat. SHISA3 inhibe l'agressivité des cellules tumorales triple négatives et fonctionne comme un gène suppresseur de tumeur dans les CSTNs, probablement *via* la voie de signalisation Wnt / β -caténine. SHISA3 apparaît donc comme une cible thérapeutique potentielle pour les CSTNs de mauvais pronostic.

1 Article

2 RNA sequencing reveals the differentially expression 3 profiles of RNA in metastatic triple negative breast 4 cancer and identified SHISA3 as an efficient tumor 5 suppressor gene

6 Noura Khaled ^{1,2}, Nicolas Sonnier ², Ioana Molnar ^{1,2}, Arnaud Briat ¹, Flora Ponelle-Chachuat ²,
7 Nina Radosevic-Robin ^{1,2}, Maud Privat ^{1,2} and Yannick Bidet ^{*1,2}

8 ¹ Université Clermont Auvergne, Inserm, IMoST UMR 1240, F-63000 CLERMONT-FERRAND, FRANCE

9 ² Centre Jean Perrin, Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, IMoST UMR 1240, F-63000 CLERMONT-
10 FERRAND, France

11 * Correspondence: Yannick.Bidet@uca.fr

12 Received: date; Accepted: date; Published: date

13 Understanding the metastasis relapse of triple-negative breast cancer (TNBC) is an important
14 priority to improve patient care and follow-up. The aim of this study was to identify robust
15 biomarkers of TNBC distant relapse. In the current study, we describe the expression profile of early
16 metastatic versus non-metastatic triple-negative breast cancers (mTNBCs vs non-mTNBCs).
17 Enrichment analyses of differentially expressed RNAs highlighted major implications of cell-cell
18 adhesion, immune-modulation, and Wnt/ β -catenin pathways. In this last pathway, we identified
19 SHISA3 as a tumor suppressor gene repressed in mTNBCs. Two different cell lines were used to
20 demonstrate that overexpression of SHISA3 inhibits TNBC cell proliferation, tumor colony
21 formation, and metastasis potential. In vivo results showed inhibition of tumor growth on a mice
22 model. Overall, our results present a transcriptomic characterization of highly metastatic TNBCs
23 and provide SHISA3 as a potential tumor suppressor gene and future efficient therapeutic target.

24 Abstract:

25 Breast cancer metastasis is the second leading cause of female mortality worldwide. Because of
26 the heterogeneity within the group, metastatic biomarkers for triple-negative breast cancer (TNBC)
27 providing predictive and prognosis values are urgently needed. Using RNA-Seq, we analyzed the
28 transcriptome profiles of two groups of TNBCs tumors with or without distant metastasis. Whole
29 transcriptome sequencing identified a set of genes implicated in TNBC metastasis with major roles
30 in cell-cell adhesion, immune-modulation, and Wnt/ β -catenin pathways. We further selected the
31 SHISA3 gene and studied its biological significance through a series of *in vitro* and *in vivo*
32 experiments. SHISA3 is a tumor suppressor gene, involved in several types of cancer. However,
33 little is known concerning the role of SHISA3 in TNBC. Our *in vitro* and *in vivo* studies demonstrate
34 that overexpression of SHISA3 inhibits TNBCs cell proliferation, metastasis and colony
35 formation, and TNBC growth in xenografts. Mechanistically, SHISA3 inhibits TNBCs development
36 and growth via downregulation of the epithelial-mesenchymal transition. Taken together, these
37 results identified SHISA3 as a novel tumor suppressor gene in TNBC and suggest that SHISA3
38 could serve as a therapeutic target for TNBC patients.

39 **Keywords:** Triple-negative breast cancer TNBC; Metastasis; SHISA3; Prognosis; Biomarker

40 1. Introduction

41 Breast cancer is one of the most common malignancies, ranking as high as the first leading cause
42 of cancer mortality worldwide in women [1]. Over the years, advanced molecular and histological
43 classifications, early detection, and personalized treatments contributed to a decrease in the mortality

44 rate associated with breast cancer. These progresses revealed that a subtype of mammary tumors
45 called "triple negative" remains of poor diagnosis [2]. Counting for about 15% of breast cancers, Triple
46 Negative Breast Cancers (TNBC) are characterized by the lack of expression of estrogen receptor α
47 (ER α) and progesterone receptor (PR) and no overexpression of human epidermal growth factor
48 receptor 2 (HER2). These characteristics prevent them to benefit from effective targeted therapies [3].
49 Although chemotherapy is effective against these highly proliferative tumors, more than 40% evade
50 to metastasis, and TNBCs are associated with the highest rate of relapse, and the worst survival
51 outcomes [4]. Hence, elucidating molecular mechanisms involved in the process of invasion and
52 metastasis of TNBC is urgently needed. New insights could come from the definition of TNBC
53 deregulated metastasis-related genes. In return, the identification of novel molecular metastasis
54 biomarkers and effective druggable targets would be important clinical breakthroughs to improve
55 the prognosis of TNBC.

56 TNBC is recognized as a highly proliferative and invasive subtype. In order to evolve into
57 metastases, primary tumors have to go through epithelial-mesenchymal transition (EMT) [5]. EMT
58 allows polarized immobile epithelial cells with tight cell-cell adherence to transform into individual
59 motile mesenchymal cells acquiring exceptional migratory and invasive capacities [6]. This process
60 is subtly regulated by several signalling pathways including TGF β , Notch, Wnt, and most growth
61 factor receptors. It has also been shown that epigenetic modifications are major regulators of the EMT
62 [7]. Whatever the pathways involved, they converge on key transcription factors considered as the
63 starting points of EMT. Such nuclear regulators include ZEB1 and ZEB2, TWIST, SLUG, and SNAIL.
64 Their combined action switches the expression of structural proteins such as E- and N-Cadherin or
65 Vimentin [6]. The activation of EMT is highly associated with the poor prognosis and overall survival
66 of TNBC due to its role in tumor progression, therapy resistance and escape, tumor recurrence, and
67 metastatic dissemination to distant organs [8], [9], [10], [11]. Hence, reversing EMT is of great interest
68 nowadays as a therapeutic target improving the treatment and care of TNBC patients.

69 As a member of Wnt pathway, SHISA3 has been investigated in several types of cancers, and it
70 is now described as a tumor suppressor gene. SHISA3 has been revealed to behave as an antagonist
71 of the Wnt/ β -catenin pathway via promoting β -catenin degradation in lung cancer [12]. Moreover,
72 SHISA3 was reported to be epigenetically silenced in colorectal and laryngeal cancers associated with
73 poor prognosis [13], [14]. Recently, *Shahzad et al.* demonstrated that SHISA3 is inactivated by
74 hypermethylation in breast cancer and that regaining SHISA3 function classifies it as a tumor
75 suppressor gene in breast cancer [15]. However, little is known concerning the role of SHISA3 in
76 TNBC.

77 In this study, we explored the RNA expression profiles of metastatic TNBC (mTNBC) and non-
78 metastatic TNBC (non-mTNBC) using high-throughput RNA sequencing (RNA-seq). Gene
79 enrichment analyses performed on 1309 significantly dysregulated RNAs in mTNBCs compared with
80 non-mTNBCs tissues reveal potential pathways and networks implicated in TNBC progression and
81 metastasis. This study points out the role of SHISA3 in TNBC as a tumor suppressor gene. SHISA3 is
82 downregulated in TNBC cell lines and metastasis-prone tumors. Our *in vitro* experiments
83 demonstrated that overexpressing SHISA3 inhibits TNBC cells proliferation, colony-forming,
84 migration, and invasion, therefore, inhibiting TNBC metastasis. *In vivo* experiments on a mice model
85 confirmed these results showing a significant reduction of tumor size.

86

87 2. Results

88

2.1. Transcriptome analyses of mTNBCs and Non-mTNBCs

89 To highlight the differences between the tumors that develop into metastases (mTNBC) and those
90 that do not (non-mTNBC), we carried a retrospective study enrolling patients according to their
91 metastatic status. Proof of non-relapse is gained by a certified 5-years+ follow up. 26 patients met our
92 inclusion criteria, divided into 16 non-mTNBC and 10 mTNBC. This distribution (38,5% of relapse)
93 is consistent with global clinical observations and rules out a major recruitment bias. The
94 clinicopathologic features of the 26 patients with TNBC are summarized in Table 1. Whole

95 transcriptome RNA sequencing was performed on the corresponding FFPE samples. A total of 46 426
96 distinct RNAs were detected and quantified. Data were normalized and differentially expressed
97 RNAs were revealed by fold-change filtering ($|\log_2(\text{fold change})| > 1$) and Student's t-testing (p-
98 value < 0.05). 1309 differentially expressed genes (DEGs) were identified in mTNBCs relative to non-
99 mTNBCs patients. Among them, 741 were downregulated and 568 were upregulated in mTNBCs.
100 The top 10 upregulated and 10 downregulated genes in mTNBCs are presented in Table 2.

101 To further examine the role of the DEGs in the metastatic mechanism of TNBC, functional
102 enrichment analyses of 1309 differentially expressed genes were performed. The most significant
103 results were revealed concerning three categories: molecular and cellular functions, canonical
104 pathways, and biological networks. Ingenuity pathway analysis (IPA) identified the top 5 molecular
105 and cellular functions associated with the DEGs in mTNBCs according to the most significant p-value
106 and the highest number of implicated molecules including cellular development, growth,
107 proliferation, morphology, death, and survival along with cell-to-cell signaling and interaction
108 (Figure 2.a). In addition, the same DEGs in mTNBCs were analyzed with Gene Ontology GO
109 enrichment analysis covering three major domains: cellular component, molecular function, and
110 biological process. The top 10 enriched GO of each domain are presented in Figure 2b. Cell surface
111 receptor signaling pathway, Notch binding, and transcription regulator complex are the most
112 significant enriched GO terms in the biological process, molecular function, and cellular component,
113 respectively. Our analysis further revealed a highly significant overlap of 10 canonical pathways (p
114 < 0.005) with KEGG connected with metabolic pathways, T cell receptor signaling pathway, and cell
115 adhesion molecules (CAMs) presented in Figure 2c.

116 All these genes were then grouped by unsupervised clusterization, using complete linkage with
117 centered absolute correlation. Although the sorting of mTNBC *vs* non-mTNBC was perfect, the
118 resulting heatmap revealed two populations of samples in each group (Figure 2d). First two
119 populations, represented by external tumors, are distant samples sitting on different branches,
120 whereas remaining tumors in the middle of the graph are more difficult to classify. Gene Ontology
121 was investigated for each cluster of genes. Besides already mentioned pathways such as metabolic
122 pathways or T cell receptor signaling pathway, the per gene-cluster analysis unveiled two groups of
123 genes involved in the biosynthesis of steroids, including estrogens and progesterone.

124 According to multiple enrichment analyses, cell-to-cell signaling and cell-matrix interaction
125 appeared always between the top significantly implicated enriched processes in comparing
126 metastatic and non-metastatic TNBC. Moreover, since DEGs in mTNBCs were at the same percentage
127 between upregulated and suppressed genes, we sought to investigate novel potential candidate
128 suppressor gene associated with these processes affecting thereby the outcome of metastasis. While
129 investigating enriched GO terms, our attention was caught by the Wnt pathway that appears to be
130 highly deregulated in mTNBCs. Three enriched biological processes: Wnt signaling pathway, cell-to-
131 cell signaling by Wnt, and canonical Wnt signaling pathway involving Wnt pathway were identified,
132 along with beta-catenin and Frizzled binding as molecular functions and beta-catenin destruction
133 complex as a cellular component. Known as an essential EMT- regulator pathway, we searched for
134 Wnt pathway genes among the most significant differentially expressed RNAs. Based on the
135 literature and the p-value, we selected SHISA3 gene to investigate its role in vitro and in vivo studies
136 on the metastasis of TNBC. Our transcriptomic result revealed that SHISA3 is downregulated in
137 mTNBCs with log fold change = -3.5 and p-value adj = 0.01 $< 0,05$. Comparing the expression of
138 SHISA3 in different normal human tissues to their corresponding tumors showed that the mRNA
139 level of SHISA3 is significantly downregulated in human tumors (Supplementary Figure 1). SHISA3
140 expression was also suppressed in breast tumors relative to normal tissues (Figure 2.a).

141 Furthermore, we evaluated the correlation between SHISA3 expression level and the clinical or
142 pathological characteristics in the two groups of patients with or without metastasis (cutoff value of
143 median). No statistically significant relationships were reported between SHISA3 negative
144 expression and different clinical characteristics including age, histologic grade, proliferation factor
145 KI67, N stage, TNM stage, and 5-years metastatic relapse (data not shown).

146

147 2.2. SHISA3 overexpression influence on TNBC cell lines aggressivity *in vitro*:

148 Given that low SHISA3 expression was significantly revealed in metastatic TNBCs, we then
149 investigated whether SHISA3 can regulate cancerous phenotypes and have a biological function in
150 TNBC cells. First, we identified SHISA3 expression in various triple-negative breast cancer cell lines.
151 Data from GTEX showed that, although SHISA3 expression level remains low in all of them,
152 variability exists among invasive triple-negative breast cancer cell lines (Figure 2.b). For further
153 overexpression experiments, we selected two cell lines with different SHISA3 basal expression: MDA
154 MB 231 and HCC 1937. SHISA3 expression shown to be more expressed in MDA MB 231 relative to
155 HCC1937 while the expression in both cell lines is considered low. Transfection of a plasmid
156 expressing the full-length cDNA of SHISA3 into both cell lines revealed a robust over-expression of
157 SHISA3 detected by qPCR (Figure 2.c). Due to the non-specificity of SHISA3 antibodies on market
158 today, SHISA3 overexpression could not be validated at the protein level. We further evaluate the
159 influence of SHISA3 overexpression on cell proliferation, colony formation ability, apoptosis,
160 invasiveness, and migration. Enhanced cell proliferation is one of the key hallmarks of malignant
161 transformation. In this context, we evaluated the effect of SHISA3 overexpression on the proliferative
162 ability of TNBC cell lines using the cell viability Resazurin assay. The proliferative rates of HCC 1937
163 and MDA MB 231 overexpressing SHISA3 were reduced relative to the corresponding control cell
164 lines ($p < 0.001$ for both cell lines) (Figure 3.a). This result indicates that SHISA3 inhibits TNBC
165 proliferation. To further explore the role of SHISA3 in tumorigenesis, we performed a flow cytometry
166 analysis of annexin V to measure the apoptosis rate in TNBC cell lines overexpressing SHISA3. The
167 percentage of four categories of cells consisting of late apoptosis, early apoptosis, necrosis, and living
168 cells was measured in both conditions. Our results indicate that SHISA3 does not affect TNBC cell
169 apoptosis compared to the control (Figure 3.b). Furthermore, we have explored the Anchorage-
170 independent growth ability of SHISA3 overexpressed cell line by soft colony agar formation test in
171 order to dissect the functional role of SHISA3 in TNBC aggressivity. The clonogenic assay revealed
172 that SHISA3 significantly inhibits the colony-forming ability of HCC1937 cell line ($p < 0.05$) in
173 comparison with the vector control cells while no statistically significant result was shown to MDA
174 MB 231 cell line ($p = 0.14$) (Figure 3.c).

175 Given that SHISA3 was suppressed in patients with metastatic TNBCs and since the function of
176 SHISA3 is totally unknown in TNBC, we next investigated whether SHISA3 overexpression affects
177 TNBC cell metastasis *in vitro*. A wound-healing assay was performed to evaluate the effects of
178 SHISA3 overexpression on migration in HCC 1937 and MDA MB 231 cells. The wound-healing assay
179 showed a difference in the wound closure ratio between cells with or without SHISA3
180 overexpression. The percentage of wound closure was significantly smaller in cells with SHISA3
181 overexpression HCC1937 ($p < 0.05$) and MDA MB 231 ($p < 0.01$) cell lines than the cells with an empty
182 vector (Figure 3.d). These results indicate that SHISA3 inhibits TNBC cell migration *in vitro*. In
183 consistent with these results, the invasive potential of TNBC cells with SHISA3 overexpression was
184 addressed with a Transwell matrigel assay. A significant decrease in the number of invaded TNBC
185 cancer cells was demonstrated after SHISA3 overexpression relative to cells without SHISA3
186 overexpression with $p < 0.001$ for HCC1937 cell line and $p < 0.05$ for MDA MB 231. Data are presented
187 in Figure 3.e. These results indicate that SHISA3 inhibits the invasion of TNBC cancer cells *in vitro*.
188 Taken together, Shisa3 inhibits the anchorage-independent growth, migration, and invasion of TNBC
189 cells *in vitro* with no effect on the apoptosis capacity.

190 SHISA3 expression blocks EMT:

191 Accumulating evidence suggests that EMT, a process by which epithelial cells undergo
192 transdifferentiation into motile mesenchymal cells, plays a critical role in TNBC [16]. In order to
193 investigate whether SHISA3 regulates EMT, we transiently expressed SHISA3 in the two highly
194 invasive cell lines HCC 1937 and MDA MB 231. As shown in Figure 4, Epithelial markers like E-
195 cadherin were up-regulated in HCC1937, whereas mesenchymal markers Vimentin were down-
196 regulated in MDA MB 231. Both markers along with N cadherin were not expressed in respective cell
197 lines. Transcription factors such as ZEB1, ZEB2, Slug, and Snail1, whose high expression was

198 considered a hallmark of EMT, were also studied [16]. In HCC 1937 overexpressing SHISA3, Slug,
199 Snail, and ZEB1 were downregulated while ZEB2 was not expressed. Slug and Snail showed
200 downregulation in MDA MB 231 cells with SHISA3 overexpression with no effect on ZEB1 and ZEB2
201 (Figure 4). Consistently, overexpression of SHISA3 decreased EMT progression in both TNBC cell
202 lines HCC1937 and MDA MB 231 as EMT markers and transcription factors indicated.

203 Enrichment analysis demonstrates a high implication of cell adhesion and cell-to-cell interaction
204 and signaling in cellular processes in mTNBCs. We also particularly noticed the Wnt signaling
205 pathway along with β catenin complex and Frizzled binding among the high significant GO terms
206 analysis. In point of fact, Slug and Snail transcription factors, potent repressors of E cadherin
207 expression, and relevant Wnt signaling pathway target genes, presume that SHISA3 may act via
208 affecting the Wnt signaling pathway. To give insight into the mechanism by which SHISA3
209 suppresses tumorigenesis and metastasis through the Wnt signaling pathway, we further examined
210 the expression of β -catenin in both cell lines. Indeed, Western Blot analysis showed that β -catenin is
211 reduced in HCC1937 but not in MDA MB 231 in cells overexpressing SHISA3. Hence, β -catenin might
212 be the target of SHISA3 regulating thereby Wnt pathway, and further studies are needed to explore
213 other targets for SHISA3 (Figure 4).

214 2.3. Overexpression of SHISA3 inhibits TNBC progression in vivo:

215 To explore the effects of SHISA3 on TNBC tumorigenesis in vivo, SHISA3 was overexpressed in
216 HCC 1937 and MDA MB 231 cell lines. Cell transfected with the SHISA3 or empty vector were
217 orthotopically injected into the fourth mammary fat pad of NMRI Nude Fox n1 nude mice, and the
218 tumor volumes were measured weekly for 33 days. No tumor has developed in mice injected with
219 HCC 1937 cell lines. Results represent exclusively the sizes of the tumors generated with the MDA
220 MB 231 cells. The evolution of the tumor volume during the time was statistically significant between
221 both conditions with a smaller tumor volume in the group overexpressing SHISA3 ($p < 0.001$) (Fig 5).
222 In addition, tumor volume was statistically significant at the last measurement at day 33 before
223 sacrifice ($p = 0.01$).
224

225 *Discussion*

226 To our knowledge, our work is the first study performing RNA sequencing to reveal
227 differentially expressed genes in mTNBCs relative to non-mTNBCs tissues. mTNBCs and non-
228 mTNBCs patients were carefully selected with a triple-negative histological profile and a follow-up
229 of five-year post-diagnosis to classify patients in the two described groups. The small but well
230 clinically defined dataset of JPC patients included in this study presents an important added value
231 to the study. Indeed, a specific selection of included patients generated a rigorous and powerful list
232 of DEGs. DEGs identified were mainly implicated in cancer cell proliferation, motility, development,
233 and death along with cell-to-cell interaction, cell surface receptor signaling, and Wnt pathway. In
234 order to further explore the potential functions of the differentially expressed genes in TNBC, we
235 performed GO, IPA, and KEGG pathway analyses of 1309 significantly dysregulated RNAs in TNBC.
236 Among the top 10 results of GO analysis in the biological process, molecular function, and cellular
237 component, enriched GO terms were mainly implicated in cell signaling surface pathway and Wnt
238 signaling pathway englobing different GO terms (cell-to-cell signaling by Wnt, canonical Wnt
239 signaling pathway, beta-catenin binding, and beta-catenin destruction complex). GO analysis results
240 demonstrate that the functions of the DEGs in mTNBCs and non-mTNBCs are correlated with
241 fundamental cell-cell adhesion processes and Wnt signaling pathways essential to the EMT
242 mechanism leading to distant metastasis. Research on the role of epithelial cell adhesion molecule
243 and EMT in TNBC was a subject of interest over the past few years. CSC marker EpCAM and EMT-
244 related marker ZEB1 are shown to be associated with poor prognosis and metastasis of TNBC [17].
245 Along with this, Integrin $\alpha 9$ depletion was shown to promote β -catenin degradation suppressing
246 TNBC development and metastasis [18]. Proteoglycans, efficient molecular effectors of cell surface
247 and pericellular microenvironments, have been revealed to act as potential pharmacological targets
248 of breast cancer [19], [20]. Proteoglycan serglycin (SRGN) proteins were demonstrated to interact with
249 TGF $\beta 2$ regulating TNBC metastasis [21]. Furthermore, among identified DEGs, a high number of
250 genes were already described in the literature to be implicated in the metastatic escape of TNBC such
251 as LIPH [22], TUFT1 [23], PLK2 [24], CRABP2 [25], ADAM17 [26], LCN2 [27], [28] and RUNX3 [29].
252 In addition, we were able to classify some DEGs in the same functional groups for instance, involved
253 genes in inflammatory mechanisms: IL2 and TCR, genes involved in the contraction of skeletal
254 muscles and cardiac muscles: MYPN, NEBL, MYORF, genes implicated in the regulation of the
255 extracellular matrix: COL2A1, HMMR, CDH19, as well as non-coding genes involved in the
256 metastatic escape mechanism: MiR661, MTA3, and OLMALINC.

257 Based on significant p-value, literature, and enrichment analysis, we selected SHISA3 gene, a
258 repressed RNA with a high fold-change and significant p-value in mTNBCs, to investigate its
259 regulatory role in TNBC tumor progression and metastasis. SHISA3 is an endoplasmic reticulum-
260 resident protein described to modulate both Wnt and FGF signaling [7]. It is a member of an eight-
261 gene family (SHISA2-SHISA9) with a critical role in head development processes in non-human
262 species [8]. The best described regulatory role for SHISA3 is the inhibition of the posttranslational
263 maturation and cell surface trafficking of Frizzles and FGF receptors [8], [9], [10]. Although less
264 explored, human SHISA3 was initially described as a tumor suppressor gene-regulating lung cancer
265 metastasis via Wnt/ β catenin signaling [11]. Later investigations revealed that SHISA3 is a novel
266 tumor suppressor gene that is suppressed in several human malignancies, including lung [11],
267 leukemia [12], colorectal [13], [14], nasopharyngeal [15], and laryngeal squamous cell carcinomas [15]
268 suggesting SHISA3 as a novel prognostic biomarker and an efficient therapeutic target. Recently,
269 Shahzad et al. demonstrated that SHISA3 is epigenetically silenced in breast cancers and that SHISA3
270 ectopic expression reduced BC cell lines proliferation and migration [16]. However, the role of
271 SHISA3 and the mechanism of action in TNBC remains largely unknown. Our study aims to
272 investigate the role of SHISA3 in the metastasis of a specific BC subtype, TNBC. Inspired by these
273 findings, we decided to explore the role of SHISA3 in TNBC tumorigenesis *in vitro* and *in vivo*. As
274 expected, SHISA3 overexpression inhibited TNBC, clonogenic forming ability, migration, and
275 invasion *in vitro* as well as tumorigenesis and metastasis formation *in vivo*. These findings are
276 consistent with the previous studies presenting SHISA3 as a key regulator in inhibiting tumor cell

277 migration and aggressiveness in different types of cancers including BCs. our study suggests SHISA3
278 as a potential TNBC prognostic biomarker and therapeutic target.

279 Recent studies suggested that DNA hypermethylation of SHISA3 is the mechanism of gene
280 inactivation responsible for the frequent suppression of SHISA3 in multiple types of tumors [30], [13],
281 [31], [14]. The same study by *Shahzad et al.* demonstrated that SHISA3 demethylation inhibits breast
282 cancer proliferation and migration [15]. In our work, we do not know if SHISA3 is hypermethylated
283 in mTNBCs comparing to non-mTNBCs. Such an epigenetic modification of SHISA3 gene inducing
284 a high metastatic ability to TNBC tumors could be a strong hypothesis to investigate. Further studies
285 targeting SHISA3 with demethylating agents in TNBC represent an interesting subject to investigate
286 its influence on distant metastasis outcome. Metastasis is a pivotal mechanism associated with TNBC
287 poor outcome and high mortality [32], [33]. EMT is the key metastasis phenomenon favoring the
288 formation of distant metastasis promoting the malignant development of human malignancies [5],
289 [34]. Moreover, multiple signaling pathways were demonstrated to cooperate with EMT transcription
290 factors affecting cell-cell adhesion and hence tumor cell migration [16], [35], [36]. Although the
291 molecular mechanisms explaining how SHISA3 acts as a metastasis regulator during TNBC
292 progression have not been fully elucidated, previous SHISA3 research suggests a blocage of FZRD
293 receptors contributing to β catenin degradation and inhibition of TCF/LEF complex [12]. Based on
294 these researches, we thought to confirm the role of SHISA3 as a regulator of Wnt pathway in TNBC.
295 According to our experiments and analysis, a decrease in the expression level of β catenin, Slug, and
296 Snail expression levels along with an increase in E cadherin expression following SHISA3
297 overexpression was revealed. These results suggested that SHISA3 may act via inhibiting Wnt/ β
298 catenin pathway supporting thereby the work of *Shahzad et al* [15]. Upcoming studies validating these
299 suggestions in TNBC are needed. These results together sheds the light on the pivotal role of SHISA3
300 in inhibiting TNBCs cell migration and invasion, regulating TNBCs development and metastasis.

301 Our findings reveal a lower level of β -catenin in SHISA3-positive TNBC cell lines. Literature has
302 also described a link between Wnt pathway and β -catenin complex in breast cancers [37], [38]. Wnt/ β -
303 catenin signaling pathway plays a pivotal role in several human malignancies [39]. Moreover, Wnt
304 signaling pathway is also known as a modulator for the EMT process in several different cancer types
305 [36], [40], [41], [42]. Aberrant canonical and non-canonical pathways Wnt signaling is a characteristic
306 of TNBC tumorigenesis and metastasis [43]. Researchers have demonstrated that the enrichment of
307 Wnt/ β -catenin signaling is evident in TNBC with a strong association with poor clinical outcomes
308 [44], [45]. Wnt signalling appears as a major regulator of EMT and cancer progression in general [6].
309 TNBC patients displaying dysregulated Wnt/ β -catenin signaling are more likely to develop lung and
310 brain secondary metastases [46]. Moreover, in vitro studies reported an increase in cell migration,
311 colony formation, stem-like features, and chemoresistance in TNBC cells with nuclear accumulation
312 of β -catenin [44]. Along with this, the accumulation of β -catenin promotes TNBC tumorigenesis in
313 mouse cancer models [47]. Thus, SHISA3 gene inducing a lower level of β -catenin acts as a tumor
314 and metastasis suppressor gene through the regulation of canonical Wnt signaling affecting TNBC
315 tumorigenesis. Moreover, Wnt/ β -catenin promotes not only the stabilization of β -catenin in the
316 cytoplasm but also can affect a subsequent transcription of genes involved in EMT [48], [49]. This is
317 consistent with our results of EMT-associated transcription factors ZEB1, ZEB2, Snail and Slug, and
318 epithelial and mesenchymal markers. SHISA3-TNBC cell lines present a higher level of E-cadherin
319 and a low level of ZEB1, ZEB2, Slug, and Snail. These results show that SHISA3 plays a major role in
320 inhibiting EMT in TNBC. In conclusion, we found that SHISA3 may contribute to TNBC
321 development by modulating the Wnt signaling pathway.

322

323 3. Materials and Methods

324 3.1. Patients and specimens:

325 Inclusion criteria for this study were as follow:

- 326 a. Metastasis-free state at diagnosis
327 b. Confirmation of all triple-negative cases by a single pathologist

- 328 c. Availability of a five-year follow-up post-diagnosis
329 d. Availability of tumor samples

330 A total of 6,340 breast cancer patients were registered at the Jean Perrin Center JPC, Clermont-
331 Ferrand, France between January 2001 and October 2014. Among them, 833 specimens of TNBC
332 patients were identified, resulting in a 13.1% fraction of TNBC similar to the expected proportion. Due
333 to limited quantities of RNA, only 26 TNBC samples were kept for whole transcriptome RNA-Seq.
334 Clinicopathological parameters of patients in the training and validation cohort are presented in Table
335 1. Written informed consent was obtained from all JPC patients. Samples were provided by Biological
336 Resource Center of Jean Perrin Comprehensive Cancer Center (No. BB-0033-00075), accredited number
337 AC-2018-3319.

338 3.2. RNA extraction and RNA sequencing

339 Total RNA was isolated from formalin fixed paraffin embedded (FFPE) tissues using AllPrep
340 DNA/RNA Micro Kit (Qiagen, France), with DNase treatment. The quality and quantity of total RNAs
341 were determined using 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). cDNA libraries were prepared using
342 KAPA RNA HyperPrep Kit with RiboErase (Roche Diagnostics). This kit removes most of ribosomal
343 RNA but keeps all other types of RNA. The procedure followed supplier recommendations, with 25 ng
344 of total RNA input. Subsequent indexed RNA sequencing of cDNA libraries with single-end reads (1 ×
345 75 bps reads) was performed according to the standard Illumina protocol using NextSeq 550 High
346 Output v2 kit (Illumina). 15 Million reads minimum were generated per sample (average 42,8 M).

347 3.3. Bioinformatic analyses:

348 Demultiplexed reads were aligned to the human reference genome (GRCh37/hg19) using Star
349 software (v2.7) with default parameters. HTSeq (v0.11.2) was used to quantify raw gene expression. R
350 package DESeq2 software v1.26.0 was used to carry out data normalization for sequencing depth
351 differences and differential expression analyses. Differentially expressed genes were identified based
352 on a significant p-value ($p < 0.05$).

353 3.4. Cell lines:

354 The human triple negative breast cancer cell lines MDA-MB-231 and HCC1937 were purchased
355 from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Cell lines were cultured in RPMI-
356 1640 medium (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco,
357 NY, USA), 2 mM glutamine, and 20 µg/ml gentamicin (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) and
358 incubated in a humidified incubator (37 °C) with 5% CO₂ atmosphere.

359 3.5. Plasmid and transfection:

360 Full-length SHISA3 cDNA (NM_001080505.2) cloned in pcDNA3.1 (pSHISA3) was provided by
361 Genscript (Leiden, the Netherlands), as well as the native plasmid (pControl) used as control.
362 Transfections were performed with final concentrations of 0.05 ng/µl of SHISA3 vector using the
363 Lipofectamine™ 3000 reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's
364 instructions.

365 3.6. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR):

366 Total mRNA was extracted from both cell lines using the mRNAeasy Kit (Qiagen, France)
367 according to the manufacturer's instructions. Complementary DNA was prepared using SuperScript
368 IV Reverse Transcriptase (ThermoFisher, Invitrogen, Waltham, Massachusetts, U.S.). SHISA3
369 expression was determined by quantitative real-time PCR using PrimeTime qPCR Probe Assay #
370 Hs.PT.58.39641562 and PrimeTime Gene Expression MasterMix from Integrated DNA technologies IDT
371 (Coralville, Iowa, USA). RealTime PCR was performed on the 7900HT Fast Real-Time PCR System

372 (Applied Biosystems). Conditions were 10 min at 95°C followed by 42 cycles composed of 15 s at 95 °C
373 and 1 min at 60 °C.

374 3.7. Western blotting and antibodies:

375 Protein extraction was realized using RIPA buffer containing a complete phosphatase (Sigma
376 Aldrich P5726) and protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich P8340). Whole cell lysates were run
377 through a Bradford protein concentration assay for protein quantification. 30µg of proteins were loaded
378 and separated onto 12.5 % SDS - PAGE and gels were transferred onto nitrocellulose membranes
379 (Merck Millipore). After blocking with 5% non-fat dry milk in 1X TBS-0.1% Tween-20, the membranes
380 were probed to the specific primary antibodies in blocking solution at 4°C overnight. After three washes
381 for 5 min with TBS-0.1% Tween-20, blots were incubated for 1h30 at room temperature with horseradish
382 peroxidase HRP-conjugated secondary antibody diluted at 1:2000 in blocking solution. Protein bands
383 were then detected and analyzed by chemiluminescence using a ChemiDoc image analyser (BioRad,
384 Richmond, CA, U.S.A.). Densitometric analyses were performed using ImageJ software program
385 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

386 3.8. Transwell invasion assay:

387 Cell invasion was examined using 24-well coated Matrigel invasion Chambers (Cat NO. 354480,
388 Corning, New York, United States). 80 000 MDA-MB-231 and 110 000 HCC1937 transfected cells diluted
389 in serum-free RPMI-1640 medium were seeded in the upper chamber of each insert, while a 10% fetal
390 bovine serum medium was placed in the lower chamber. After 27 hours of incubation, inserts were
391 washed, cells remaining on the inner surface of the membrane in the upper insert were removed and
392 cells invaded through the membrane to the bottom surface were fixed with 4% paraformaldehyde and
393 then stained with 0.5% crystal violet. 5 representative images of the membrane (representing 1/3 of the
394 surface) were taken using an inverted microscope and migrated cells were counted using ImageJ
395 software. All the assays were performed in triplicate.

396 3.9. Cell proliferation assay:

397 Cell proliferation was quantified using Resazurin reagent as a metabolic indicator for living cells.
398 25µg/ml of Resazurin in 1X RPMI medium without phenol red was added to 13 000 MDA-MB-231 or
399 17 000 HCC 1937 cells seeded and transfected in a 96-well plate. 24 hours after transfection, cell
400 absorbency at 590 nm was measured in a microplate reader (Fluoroskan, Thermofischer) to determine
401 cell viability.

402 3.10. Apoptosis analysis:

403 Cell apoptosis was analyzed using the FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with Propidium
404 Iodide (Biolegend, San Diego, CA) according to the manufacturer's instructions. 24 hours post
405 transfection, MDA-MB-231, and HCC1937 cell lines were stained with FITC and Propidium Iodide
406 followed by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis (BD Biosciences). All the assays were
407 performed three times.

408 3.11. Wound healing assay:

409 Wound healing assay was used to assess cell migration after transfection. 2×10^5 and 4×10^5 cells per
410 well were seeded in a six-well plate for MDA-MB-231 and HCC1937 respectively. 24 hours post
411 transfection, the cell mat was scratched with a sterile pipette tip and washed with phosphate-buffered
412 saline (PBS) before adding a complemented medium. The wound area was imaged every 2 hours for
413 48 hours using a ZEISS observer microscope and its size was measured using ImageJ software (NIH,
414 Bethesda, MD, USA). The percentage of closure was calculated as the wound area at 24 h divided by
415 the wound area at 0 h, in each group.

416 3.12. Soft agar colony formation assay:

417 In 6-well plates, 3 000 MDA-MB-231 cells and 5 000 HCC 1937 cells per well were plated in 0.3%
418 Noble agar in 0.5 X RPMI and they were overlaid by 0.5% Noble agar in 1X RPMI. Agar layers were
419 overlaid with 200 µl RPMI medium supplemented with 10% FBS, gentamicin (20 µg/ml), and glutamin
420 (2 mM). This medium layer was aspirated and replaced three times per week. After two weeks of
421 growth, medium was aspirated, and cells were stained with 200 µl nitrotertrazoline blue chloride (NTB)
422 overnight. Colonies were then imaged and counted using Image J software.

423 3.13. Functional Enrichment analysis of DEGs :

424 To reveal the functions of DEGs, Gene Ontology GO annotation, Ingenuity Pathway Analysis
425 IPA, and KEGG pathway enrichment analyses were conducted to obtain further insights into the
426 function of the DEGs in the biological functions and pathways most related to TNBC. The GO terms
427 were comprised of the following three divisions: biological process, cellular component and
428 molecular function. Adj. $P < 0.00005$ was regarded as statistically significant with a presentation for
429 only the top 10. Enrichment analysis was applied to all 1309 DEGs.

430 3.14. In vivo tumorigenesis and metastasis assay

431 For tumorigenesis assay, TNBC cells were transfected with SHISA3 and control plasmids for 24
432 hours. 10 Millions of MDA-MB-231 and HCC1937 transfected cells diluted in PBS were injected in the
433 mammary gland of eleven-week-old female nude mice NMRI-Foxn1 (Janvier laboratories, Saint
434 Berthevin Cedex, France). Tumorigenicity and tumor growth were assessed by measuring mice weight
435 and tumor dimensions with calipers for up to 33 days.

436 All animal studies were carried out in accordance with directive 2010/63/ EU and under evaluation
437 and approval of the institutional review board (CEEA, MENESR, authorization APAFIS#23214-
438 2020011014348971 v4). All the mice were euthanized and dissected 33 days after injection.

439 3.15. Statistical assay:

440 Statistical analyses were performed using R software (R-project, v.3.6.1, GNU GPL). The
441 hypothesis tests were two-sided with 5% significance level. Correlation between SHISA3 expression
442 level and clinico-pathological characteristics was investigated using Spearman's correlation
443 coefficient, Welch's t-test and Kruskal-Wallis test. We analyzed the influence of SHISA3 on
444 proliferative rates and on wound closure / Transwell migration using linear mixed models (replicate
445 as random effect), on cell apoptosis by chi-squared test of independence, and on colony-forming
446 ability by Student's t-test. Comparison of tumour volume evolution between the two conditions was
447 tested using linear mixed model (subject as random effect, condition × time interaction term), and
448 post-hoc Šidák-adjusted comparisons.

450 4. Conclusions

451 In conclusion, our study revealed the differential expression profiles of RNA in Metastatic triple-
452 negative breast cancer using high-throughput sequencing NextSeq. Enrichment and bioinformatic
453 analyses reported major roles of dysregulated RNAs in tumorigenesis and metastasis. Our findings
454 indicated that SHISA3 is significantly downregulated in human metastatic triple-negative breast
455 cancer tissues. We also demonstrated that the overexpression of SHISA3 inhibits TNBC cells
456 invasiveness and metastatic ability and that SHISA3 may functions as a tumor suppressor gene in
457 TNBCs via modulating Wnt/ β -catenin signaling pathway. This study provided/identified SHISA3 as
458 a valuable promising prognostic biomarker and therapeutic target for metastatic TNBC in the years
459 to come.

460 **Supplementary Materials:** Figure S1: SHISA3 expression in tumor tissues relative to their normal tissues.

461 **Author Contributions:** Conceptualization, Y.B. and N.K.; methodology, N.K., Y.B., M.P. and N.S.; software, F.P-
462 C. and I.M.; collection and assembly of data: Y.B., N.R-R., and N.K.; writing—original draft preparation, N.K.;
463 writing—review and editing, Y.B., M.P., N.S.; funding acquisition, Y.B.. All authors have read and agreed to the
464 published version of the manuscript.

465 **Funding:** This research was funded by the Auvergne State-Region planning contract (CPER) 2015-2020 and the
466 Puy de Dôme League against Cancer.

467 **Acknowledgments:** The authors gratefully acknowledge the patients who contributed to this study. The authors
468 would like to thank Nancy Uhrhammer for English editing. The authors acknowledge technical assistance from
469 Tiffany Witkowski. The authors want also to thank Christelle SOUBEYRAND-DAMON from Anipath platform
470 and Christelle BLAVIGNAC from Centre Imagerie Cellulaire Santé platform CICS for their technical assistance.

471 **Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

472

473 5. References

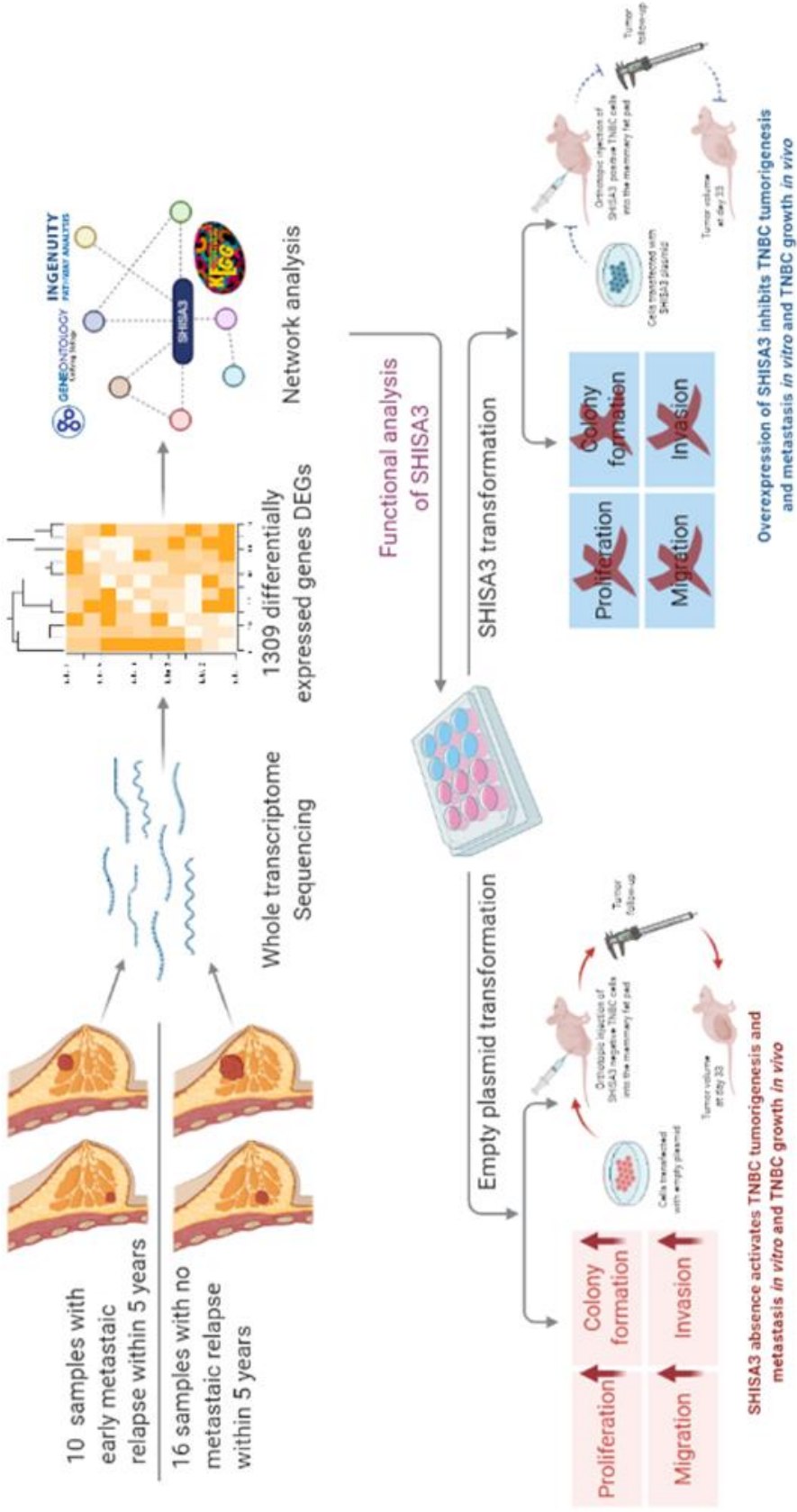
- 474 1. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer
475 statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36
476 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* **2018**, *68*, 394–424, doi:10.3322/caac.21492.
- 477 2. Damaskos, C.; Garmpi, A.; Nikolettos, K.; Vavourakis, M.; Diamantis, E.; Patsouras, A.;
478 Farmaki, P.; Nonni, A.; Dimitroulis, D.; Mantas, D.; et al. Triple-Negative Breast Cancer:
479 The Progress of Targeted Therapies and Future Tendencies. *Anticancer Res.* **2019**, *39*,
480 5285–5296, doi:10.21873/anticancer.13722.
- 481 3. Al-Mahmood, S.; Sapiezynski, J.; Garbuzenko, O.B.; Minko, T. Metastatic and triple-
482 negative breast cancer: challenges and treatment options. *Drug Deliv Transl Res* **2018**,
483 *8*, 1483–1507, doi:10.1007/s13346-018-0551-3.
- 484 4. da Silva, J.L.; Cardoso Nunes, N.C.; Izetti, P.; de Mesquita, G.G.; de Melo, A.C. Triple
485 negative breast cancer: A thorough review of biomarkers. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*
486 **2020**, *145*, 102855, doi:10.1016/j.critrevonc.2019.102855.
- 487 5. Pastushenko, I.; Blanpain, C. EMT Transition States during Tumor Progression and
488 Metastasis. *Trends Cell Biol.* **2019**, *29*, 212–226, doi:10.1016/j.tcb.2018.12.001.
- 489 6. Nieto, M.A.; Huang, R.Y.-J.; Jackson, R.A.; Thiery, J.P. EMT: 2016. *Cell* **2016**, *166*,
490 21–45, doi:10.1016/j.cell.2016.06.028.
- 491 7. Khaled, N.; Bidet, Y. New Insights into the Implication of Epigenetic Alterations in the
492 EMT of Triple Negative Breast Cancer. *Cancers (Basel)* **2019**, *11*,
493 doi:10.3390/cancers11040559.
- 494 8. Khaled, N.; Bidet, Y. New Insights into the Implication of Epigenetic Alterations in the
495 EMT of Triple Negative Breast Cancer. *Cancers (Basel)* **2019**, *11*,
496 doi:10.3390/cancers11040559.
- 497 9. Felipe Lima, J.; Nofech-Mozes, S.; Bayani, J.; Bartlett, J.M.S. EMT in Breast
498 Carcinoma—A Review. *Journal of Clinical Medicine* **2016**, *5*, 65,
499 doi:10.3390/jcm5070065.
- 500 10. Huang, J.; Li, H.; Ren, G. Epithelial-mesenchymal transition and drug resistance in
501 breast cancer (Review). *Int. J. Oncol.* **2015**, *47*, 840–848, doi:10.3892/ijo.2015.3084.
- 502 11. Ye, X.; Brabletz, T.; Kang, Y.; Longmore, G.D.; Nieto, M.A.; Stanger, B.Z.; Yang, J.;
503 Weinberg, R.A. Upholding a role for EMT in breast cancer metastasis. *Nature* **2017**, *547*,
504 E1–E3, doi:10.1038/nature22816.
- 505 12. Chen, C.-C.; Chen, H.-Y.; Su, K.-Y.; Hong, Q.-S.; Yan, B.-S.; Chen, C.-H.; Pan, S.-H.;
506 Chang, Y.-L.; Wang, C.-J.; Hung, P.-F.; et al. Shisa3 Is Associated with Prolonged
507 Survival through Promoting β -Catenin Degradation in Lung Cancer. *Am J Respir Crit*
508 *Care Med* **2014**, *190*, 433–444, doi:10.1164/rccm.201312-2256OC.

- 509 13. Tsai, M.-H.; Chen, W.-C.; Yu, S.-L.; Chen, C.-C.; Jao, T.-M.; Huang, C.-Y.; Tzeng, S.-
510 T.; Yen, S.-J.; Yang, Y.-C. DNA Hypermethylation of SHISA3 in Colorectal Cancer: An
511 Independent Predictor of Poor Prognosis. *Ann Surg Oncol* **2015**, *22*, 1481–1489,
512 doi:10.1245/s10434-015-4593-1.
- 513 14. Shen, Z.; Zhou, C.; Li, J.; Ye, D.; Deng, H.; Cao, B.; Hao, W.; Lin, L.; Zhang, Y. SHISA3
514 Promoter Methylation Is a Potential Diagnostic and Prognostic Biomarker for Laryngeal
515 Squamous Cell Carcinoma. *Biomed Res Int* **2017**, *2017*, doi:10.1155/2017/9058749.
- 516 15. Shahzad, N.; Munir, T.; Javed, M.; Tasneem, F.; Aslam, B.; Ali, M.; Mutahir, Z.; Akhtar
517 Ali, M.; Umer, M.; Ahmad, M.; et al. SHISA3, an antagonist of the Wnt/ β -catenin
518 signaling, is epigenetically silenced and its ectopic expression suppresses growth in
519 breast cancer. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0236192, doi:10.1371/journal.pone.0236192.
- 520 16. Lamouille, S.; Xu, J.; Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal
521 transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2014**, *15*, 178–196, doi:10.1038/nrm3758.
- 522 17. Wu, Q.; Wang, J.; Liu, Y.; Gong, X. Epithelial cell adhesion molecule and epithelial-
523 mesenchymal transition are associated with vasculogenic mimicry, poor prognosis, and
524 metastasis of triple negative breast cancer. *International Journal of Clinical and*
525 *Experimental Pathology* **2019**, *12*, 1678.
- 526 18. Wang, Z.; Li, Y.; Xiao, Y.; Lin, H.-P.; Yang, P.; Humphries, B.; Gao, T.; Yang, C.
527 Integrin α 9 depletion promotes β -catenin degradation to suppress triple-negative breast
528 cancer tumor growth and metastasis. *Int J Cancer* **2019**, *145*, 2767–2780,
529 doi:10.1002/ijc.32359.
- 530 19. Iozzo, R.V.; Sanderson, R.D. Proteoglycans in cancer biology, tumour
531 microenvironment and angiogenesis. *J Cell Mol Med* **2011**, *15*, 1013–1031,
532 doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01236.x.
- 533 20. Salanti, A. Targeting Common but Complex Proteoglycans on Breast Cancer Cells and
534 Stem Cells Using Evolutionary Refined Malaria Proteins Available online:
535 /paper/Targeting-Common-but-Complex-Proteoglycans-on-Cells-
536 Salanti/d1d63a7ebac90ec007c24e79ea941a1022e2cab2 (accessed on Oct 15, 2020).
- 537 21. Zhang, Z.; Deng, Y.; Zheng, G.; Jia, X.; Xiong, Y.; Luo, K.; Qiu, Q.; Qiu, N.; Yin, J.;
538 Lu, M.; et al. SRGN-TGF β 2 regulatory loop confers invasion and metastasis in triple-
539 negative breast cancer. *Oncogenesis* **2017**, *6*, e360, doi:10.1038/oncsis.2017.53.
- 540 22. Zhang, Y.; Zhu, X.; Qiao, X.; Gu, X.; Xue, J.; Han, Y.; Sun, L.; Cui, M.; Liu, C. LIPH
541 promotes metastasis by enriching stem-like cells in triple-negative breast cancer. *J Cell*
542 *Mol Med* **2020**, *24*, 9125–9134, doi:10.1111/jcmm.15549.
- 543 23. Liu, W.; Chen, G.; Sun, L.; Zhang, Y.; Han, J.; Dai, Y.; He, J.; Shi, S.; Chen, B. TUFT1
544 Promotes Triple Negative Breast Cancer Metastasis, Stemness, and Chemoresistance by
545 Up-Regulating the Rac1/ β -Catenin Pathway. *Front Oncol* **2019**, *9*, 617,
546 doi:10.3389/fonc.2019.00617.
- 547 24. Maire, V.; Némati, F.; Richardson, M.; Vincent-Salomon, A.; Tesson, B.; Rigaiil, G.;
548 Gravier, E.; Marty-Prouvost, B.; De Koning, L.; Lang, G.; et al. Polo-like kinase 1: a
549 potential therapeutic option in combination with conventional chemotherapy for the
550 management of patients with triple-negative breast cancer. *Cancer Res* **2013**, *73*, 813–
551 823, doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2633.

- 552 25. Feng, X.; Zhang, M.; Wang, B.; Zhou, C.; Mu, Y.; Li, J.; Liu, X.; Wang, Y.; Song, Z.;
553 Liu, P. CRABP2 regulates invasion and metastasis of breast cancer through hippo
554 pathway dependent on ER status. *J Exp Clin Cancer Res* **2019**, *38*, 361,
555 doi:10.1186/s13046-019-1345-2.
- 556 26. Caiazza, F.; McGowan, P.M.; Mullooly, M.; Murray, A.; Synnott, N.; O'Donovan, N.;
557 Flanagan, L.; Tape, C.J.; Murphy, G.; Crown, J.; et al. Targeting ADAM-17 with an
558 inhibitory monoclonal antibody has antitumour effects in triple-negative breast cancer
559 cells. *Br J Cancer* **2015**, *112*, 1895–1903, doi:10.1038/bjc.2015.163.
- 560 27. Cheng, G.; Sun, X.; Wang, J.; Xiao, G.; Wang, X.; Fan, X.; Zu, L.; Hao, M.; Qu, Q.;
561 Mao, Y.; et al. HIC1 silencing in triple-negative breast cancer drives progression through
562 misregulation of LCN2. *Cancer Res* **2014**, *74*, 862–872, doi:10.1158/0008-5472.CAN-
563 13-2420.
- 564 28. Guo, P.; Yang, J.; Jia, D.; Moses, M.A.; Auguste, D.T. ICAM-1-Targeted, Lcn2 siRNA-
565 Encapsulating Liposomes are Potent Anti-angiogenic Agents for Triple Negative Breast
566 Cancer. *Theranostics* **2016**, *6*, 1–13, doi:10.7150/thno.12167.
- 567 29. Bai, X.; Han, G.; Liu, Y.; Jiang, H.; He, Q. MiRNA-20a-5p promotes the growth of
568 triple-negative breast cancer cells through targeting RUNX3. *Biomedicine &*
569 *Pharmacotherapy* **2018**, *103*, 1482–1489, doi:10.1016/j.biopha.2018.04.165.
- 570 30. Chen, C.-C.; Tsai, M.-H.; Chen, W.-C.; Yu, S.-L.; Jao, T.-M.; Huang, C.-Y.; Tzeng, S.-
571 T.; Yen, S.-J.; Yang, Y.-C. DNA hypermethylation of SHISA3 as a mechanism of gene
572 inactivation and as a novel prognostic biomarker in colorectal cancer. *JCO* **2015**, *33*,
573 e14532–e14532, doi:10.1200/jco.2015.33.15_suppl.e14532.
- 574 31. Zhang, J.; Li, Y.-Q.; Guo, R.; Wang, Y.-Q.; Zhang, P.-P.; Tang, X.-R.; Wen, X.; Hong,
575 X.-H.; Lei, Y.; He, Q.-M.; et al. Hypermethylation of SHISA3 Promotes Nasopharyngeal
576 Carcinoma Metastasis by Reducing SGSM1 Stability. *Cancer Res* **2019**, *79*, 747–759,
577 doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-1754.
- 578 32. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57–70,
579 doi:10.1016/s0092-8674(00)81683-9.
- 580 33. Neophytou, C.; Boutsikos, P.; Papageorgis, P. Molecular Mechanisms and Emerging
581 Therapeutic Targets of Triple-Negative Breast Cancer Metastasis. *Front Oncol* **2018**, *8*,
582 31, doi:10.3389/fonc.2018.00031.
- 583 34. Aiello, N.M.; Kang, Y. Context-dependent EMT programs in cancer metastasis. *J Exp*
584 *Med* **2019**, *216*, 1016–1026, doi:10.1084/jem.20181827.
- 585 35. Komiya, Y.; Habas, R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* **2008**, *4*, 68–
586 75.
- 587 36. Basu, S.; Cheriyaundath, S.; Ben-Ze'ev, A. Cell–cell adhesion: linking Wnt/ β -catenin
588 signaling with partial EMT and stemness traits in tumorigenesis. *F1000Res* **2018**, *7*,
589 doi:10.12688/f1000research.15782.1.
- 590 37. Howard, B.; Ashworth, A. Signalling pathways implicated in early mammary gland
591 morphogenesis and breast cancer. *PLoS Genet* **2006**, *2*, e112,
592 doi:10.1371/journal.pgen.0020112.

- 593 38. Yin, P.; Wang, W.; Zhang, Z.; Bai, Y.; Gao, J.; Zhao, C. Wnt signaling in human and
594 mouse breast cancer: Focusing on Wnt ligands, receptors and antagonists. *Cancer Sci*
595 **2018**, *109*, 3368–3375, doi:10.1111/cas.13771.
- 596 39. Zhan, T.; Rindtorff, N.; Boutros, M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene* **2017**, *36*, 1461–
597 1473, doi:10.1038/onc.2016.304.
- 598 40. Zhang, J.; Tian, X.-J.; Xing, J. Signal Transduction Pathways of EMT Induced by TGF-
599 β , SHH, and WNT and Their Crosstalks. *J Clin Med* **2016**, *5*, doi:10.3390/jcm5040041.
- 600 41. Teeuwssen, M.; Fodde, R. Wnt Signaling in Ovarian Cancer Stemness, EMT, and
601 Therapy Resistance. *J Clin Med* **2019**, *8*, doi:10.3390/jcm8101658.
- 602 42. Yang, S.; Liu, Y.; Li, M.-Y.; Ng, C.S.H.; Yang, S.-L.; Wang, S.; Zou, C.; Dong, Y.; Du,
603 J.; Long, X.; et al. FOXP3 promotes tumor growth and metastasis by activating Wnt/ β -
604 catenin signaling pathway and EMT in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer* **2017**, *16*,
605 124, doi:10.1186/s12943-017-0700-1.
- 606 43. Pohl, S.-G.; Brook, N.; Agostino, M.; Arfuso, F.; Kumar, A.P.; Dharmarajan, A. Wnt
607 signaling in triple-negative breast cancer. *Oncogenesis* **2017**, *6*, e310,
608 doi:10.1038/oncsis.2017.14.
- 609 44. Fc, G.; M, L.-T.; K, S.; M, A.; Mb, L.; A, M.; R, N.; Js, R.-F. β -Catenin pathway
610 activation in breast cancer is associated with triple-negative phenotype but not with
611 CTNNB1 mutation. *Mod Pathol* **2010**, *24*, 209–231, doi:10.1038/modpathol.2010.205.
- 612 45. Khramtsov, A.I.; Khramtsova, G.F.; Tretiakova, M.; Huo, D.; Olopade, O.I.; Goss, K.H.
613 Wnt/ β -Catenin Pathway Activation Is Enriched in Basal-Like Breast Cancers and
614 Predicts Poor Outcome. *Am J Pathol* **2010**, *176*, 2911–2920,
615 doi:10.2353/ajpath.2010.091125.
- 616 46. Dey, N.; Barwick, B.G.; Moreno, C.S.; Ordanic-Kodani, M.; Chen, Z.; Oprea-Ilies, G.;
617 Tang, W.; Catzavelos, C.; Kerstann, K.F.; Sledge, G.W.; et al. Wnt signaling in triple
618 negative breast cancer is associated with metastasis. *BMC Cancer* **2013**, *13*, 537,
619 doi:10.1186/1471-2407-13-537.
- 620 47. Xu, J.; Prosperi, J.R.; Choudhury, N.; Olopade, O.I.; Goss, K.H. β -Catenin Is Required
621 for the Tumorigenic Behavior of Triple-Negative Breast Cancer Cells. *PLoS One* **2015**,
622 *10*, doi:10.1371/journal.pone.0117097.
- 623 48. Wu, Z.-Q.; Li, X.-Y.; Hu, C.Y.; Ford, M.; Kleer, C.G.; Weiss, S.J. Canonical Wnt
624 signaling regulates Slug activity and links epithelial-mesenchymal transition with
625 epigenetic Breast Cancer 1, Early Onset (BRCA1) repression. *Proc Natl Acad Sci U S A*
626 **2012**, *109*, 16654–16659, doi:10.1073/pnas.1205822109.
- 627 49. Lazarova, D.; Bordonaro, M. ZEB1 Mediates Drug Resistance and EMT in p300-
628 Deficient CRC. *J Cancer* **2017**, *8*, 1453–1459, doi:10.7150/jca.18762.
- 629





Graphical abstract

Variables	JCP group (N=26)
Age (Mean \pm SD)	53.0 \pm 12.4
Metastatic state	
Positif	0.384
Negatif	0.616
T stage	
T1	0.5384
T2	0.2692
T3	0.1153
T4	0.0769
N stage	
N0	0.5384
N1	0.2692
N2	0.0769
N3	0.1153
Histologic grade	
1	0
2	0.423
3	0.5769
Ki-67 (%)	
< ou égale 50%	0.46153
> 50%	0.53846
Localization	
Infiltrating Ductal Carcinoma	0.923
In situ Ductal Carcinoma	0.077

Table 1. Clinical summary of patients characteristics in JPC datasets

	log2FoldChange	Padj	Regulation
CDH19	-6.338559637	5.06771E-06	Down
LCN8	-5.871648287	0.019340481	Down
COL2A1	-5.592419049	3.01272E-05	Down
IGHV1-45	-5.498887485	0.01157546	Down
RP5-887A10,1	-5.121944635	0.025136582	Down
RP11-927P21,2	-5.121072061	0.000963901	Down
CMTM5	-5.089100867	0.032019477	Down
RP4-601P9,2	-5.030837943	0.009260712	Down
AC105402,4	-4.903065775	0.007790738	Down
CR2	-4.828943604	0.001168588	Down
TCN1	11.17243743	0.009346551	Up
LINC01511	9.495083743	0.000181268	Up
DHRS2	8.644242252	9.96015E-15	Up
S100A7A	8.186221784	2.45844E-08	Up
PADI3	8.007493764	8.11258E-12	Up
UGT2B28	7.914714995	0.002934248	Up
SPINK8	7.594703075	0.002440415	Up
HSD3BP2	7.272657702	0.014425552	Up
S100A7	7.269045169	1.19712E-08	Up
PNLIPRP3	6.908248743	0.015976542	Up

Table 2. Top 10 downregulated RNAs and top 10 upregulated RNAs in mTNBCs.

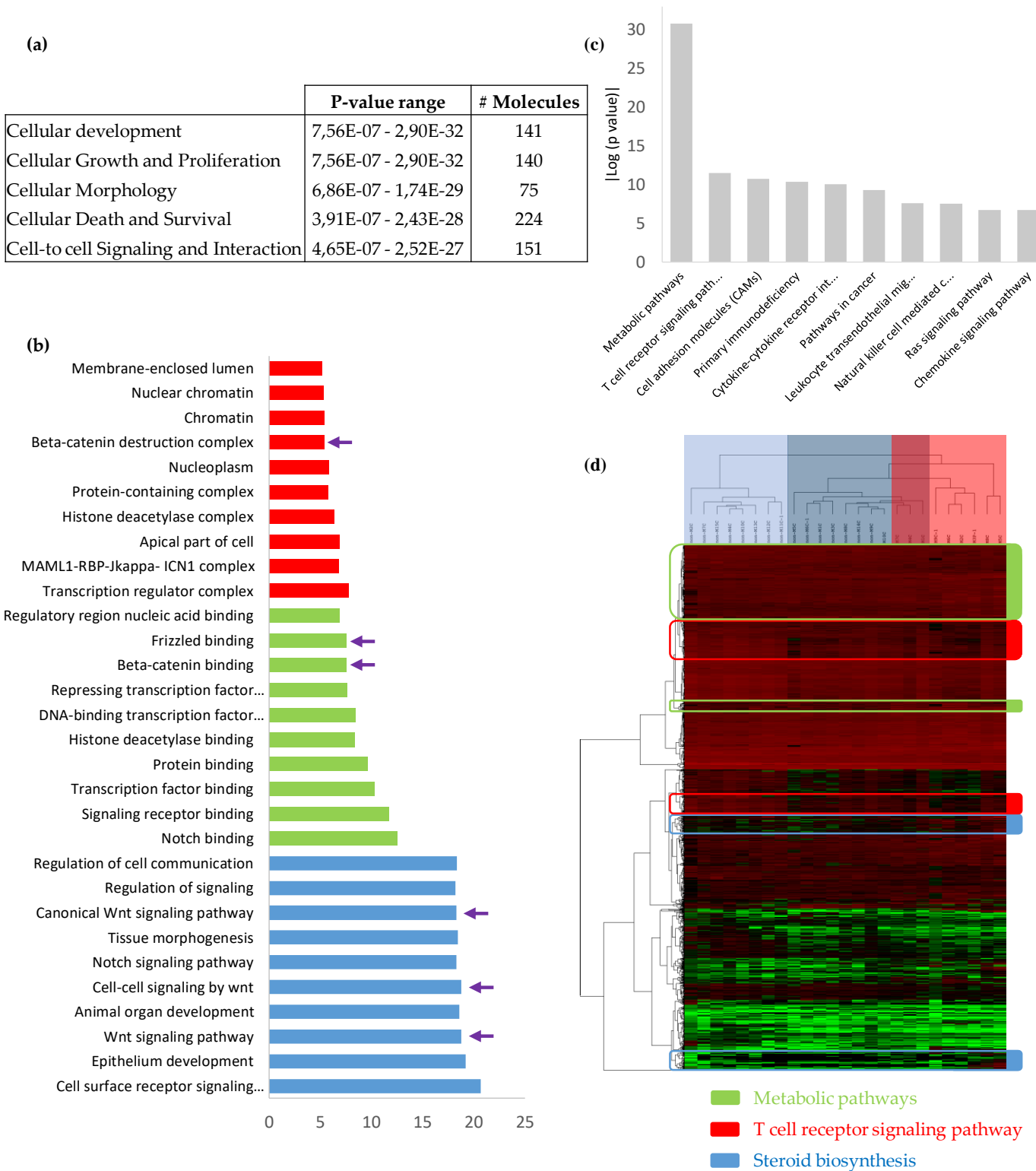


Figure 1. Gene Ontology of DEG between mTNBC and non-mTNBC

(a) Top 5 significantly enriched molecular and cellular functions in mTNBCs by IPA. **(b)** GO functional analysis of DEGs. The 10 most significantly ($p < 0.05$) enriched GO terms in cellular component (red), molecular function (green), and biological process (blue). All the adjusted statistically significant values of GO terms were negative 10-base log-transformed. **(c)** Top 10 canonical pathways obtained with KEGG. **(d)** Unsupervised clusterization, using complete linkage with a centered absolute correlation of 1309 DEG. Red represents upregulated genes, green represents downregulated genes in mTNBC *vs* non-mTNBC. Clusters of genes highlighted in green are enriched in members of metabolic pathways, clusters of genes highlighted in red are enriched in members of the T cell receptor signaling pathway, clusters of genes highlighted in blue are enriched in members of steroid biosynthesis.

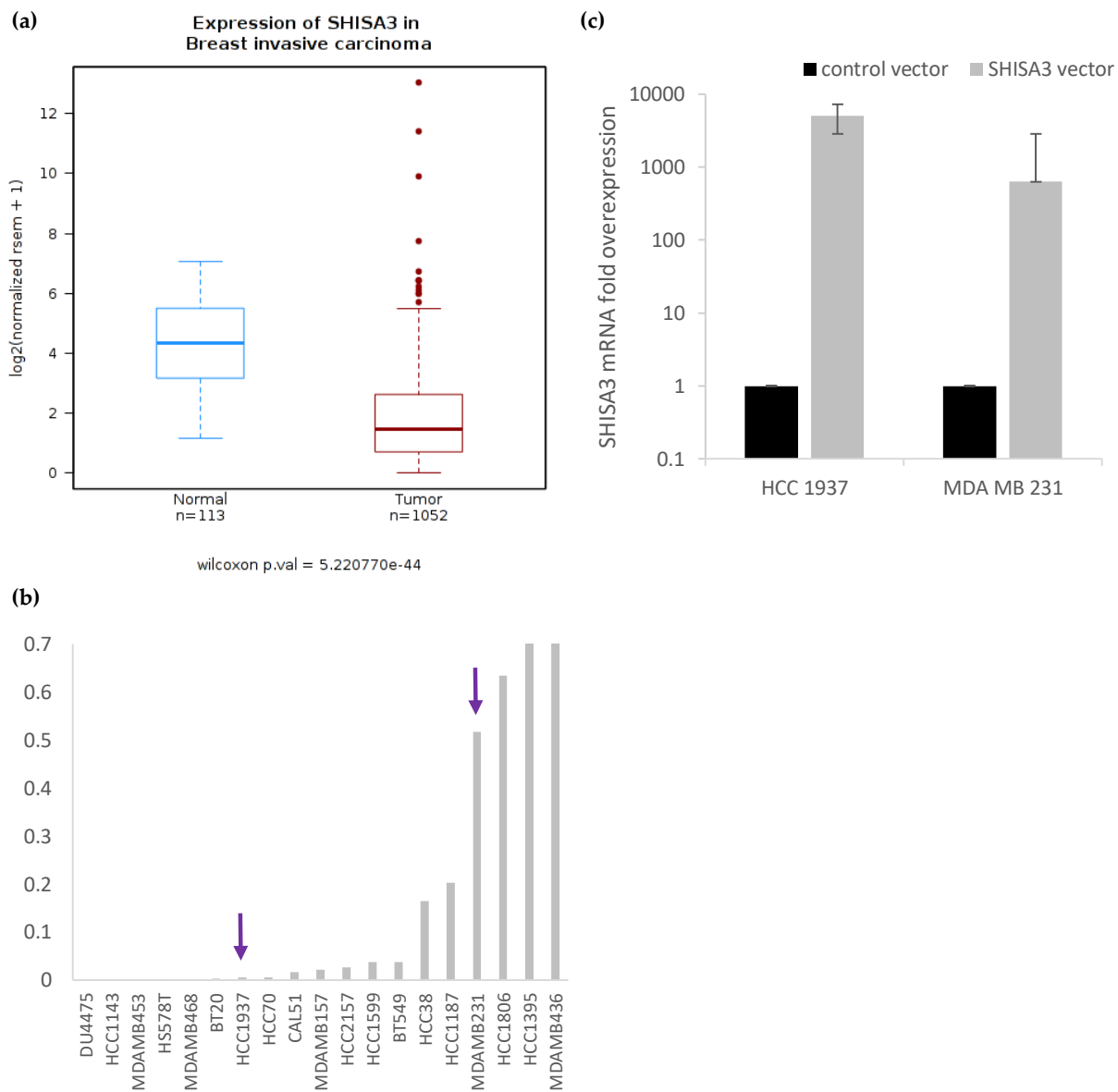


Figure 2. Expression of SHISA3 in human triple negative breast cancer TNBC. (a) SHISA3 mRNA level was downregulated in breast invasive carcinomas relative to normal tissues (*TCGA Wanderer*). (b) Expression of SHISA3 mRNA across various breast cancer cell lines. (c) qRT-PCR was used to detect SHISA3 overexpression efficiency in HCC 1937 and MDA MB 231 cells.

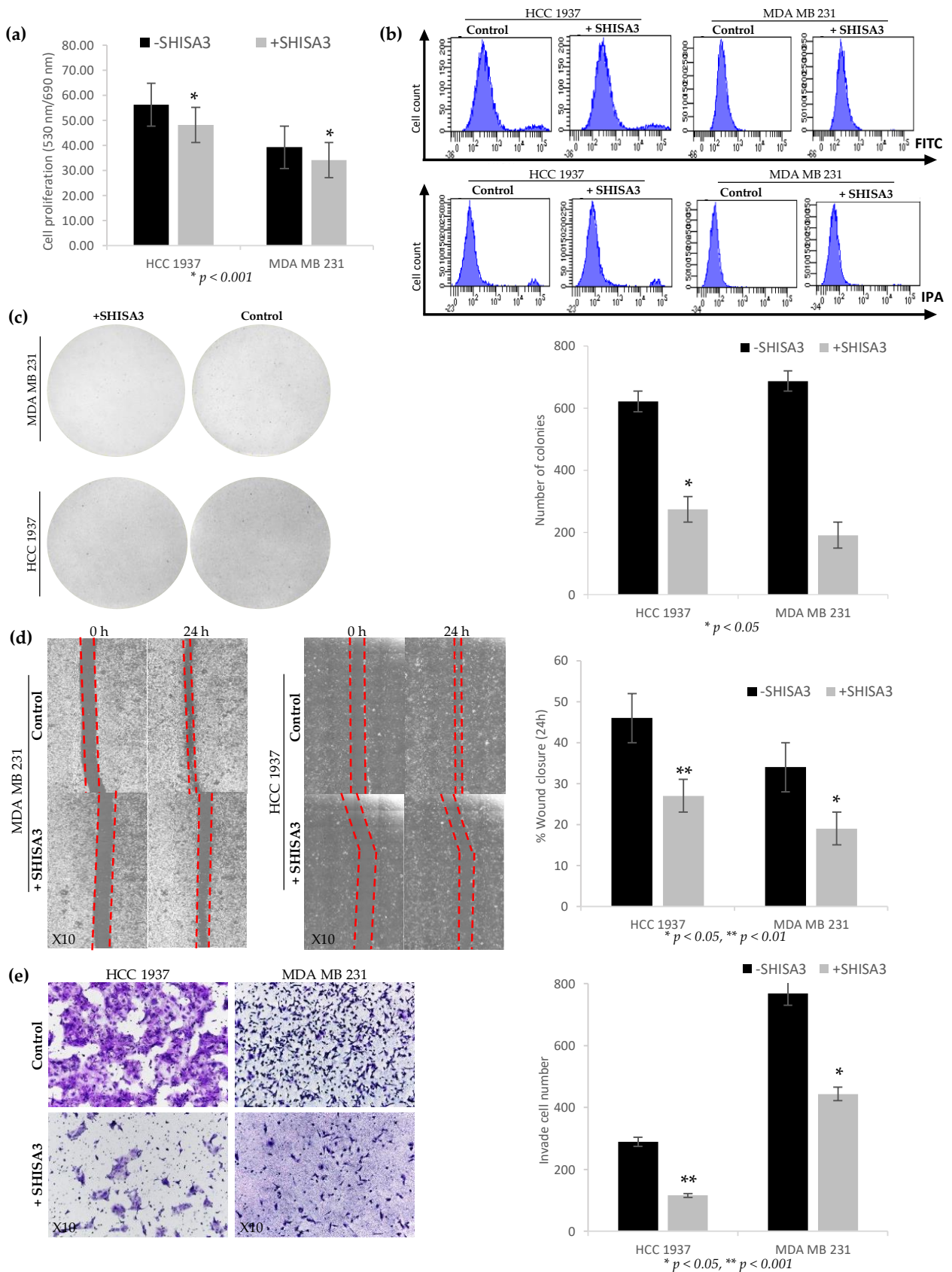


Figure 3. Overexpression of SHISA3 in triple-negative breast cancer cell lines. (a) Cell growth rate from parental and SHISA3 upregulation HCC 1937 cells (left) and MDA MB 231 cells (right) at 24h post-transfection were determined by Resazurin cell proliferation assay * $P < 0.001$. (b) No significant effect of SHISA3 overexpression on TNBC cell apoptosis compared to the control. (c) Anchorage-independent colony formation on soft agar assay for HCC 1937 and MDA MB 231 cells. Data are means \pm SD from three independent experiments; * $P < 0.05$. (d) Wound healing assays were performed to investigate the role of SHISA3 in HCC 1937 and MDA MB 231 cell migration. Observations by Zeiss microscopy were recorded at 0 and 24h after the scratch of the cell surface. The panel shows the quantitative analysis of the wound closure of the empty vector and SHISA3 overexpressing cells presented as the means \pm SD. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$. (e) Transwell assays were performed to explore the role of SHISA3 in HCC 1937 and MDA MB 231 cell invasion. The images were obtained 24 h after seeding. The number of cells was counted in five representative fields per Transwell (X10). Quantitative analysis of the number of invasive cells is presented in the corresponding panel. Error bars represent the mean \pm SD of 3 different fields.

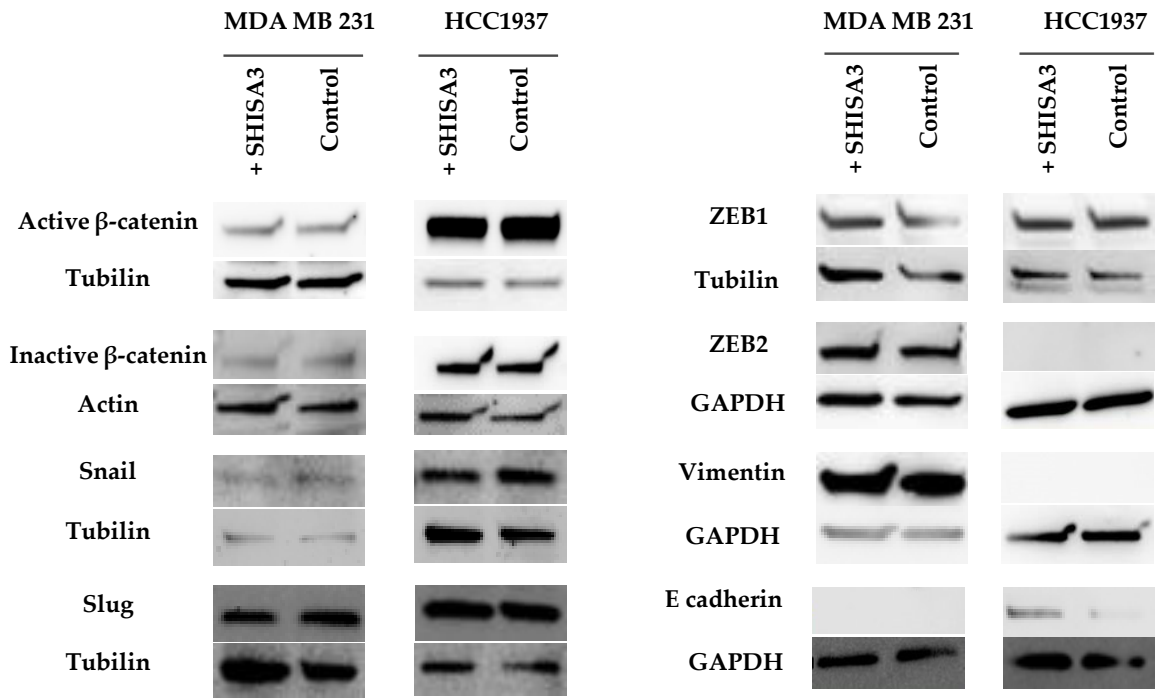


Figure 4. SHISA3 was associated with EMT and Wnt signaling pathway in triple-negative breast cancer cells. Western blotting analysis of EMT markers and transcription factors in HCC1937 and MDA MB 231 cell lines with SHISA3 overexpressed. β -catenin expression was revealed to investigate the regulating role of SHISA3 in the Wnt signaling pathway. Image J was used for quantification.

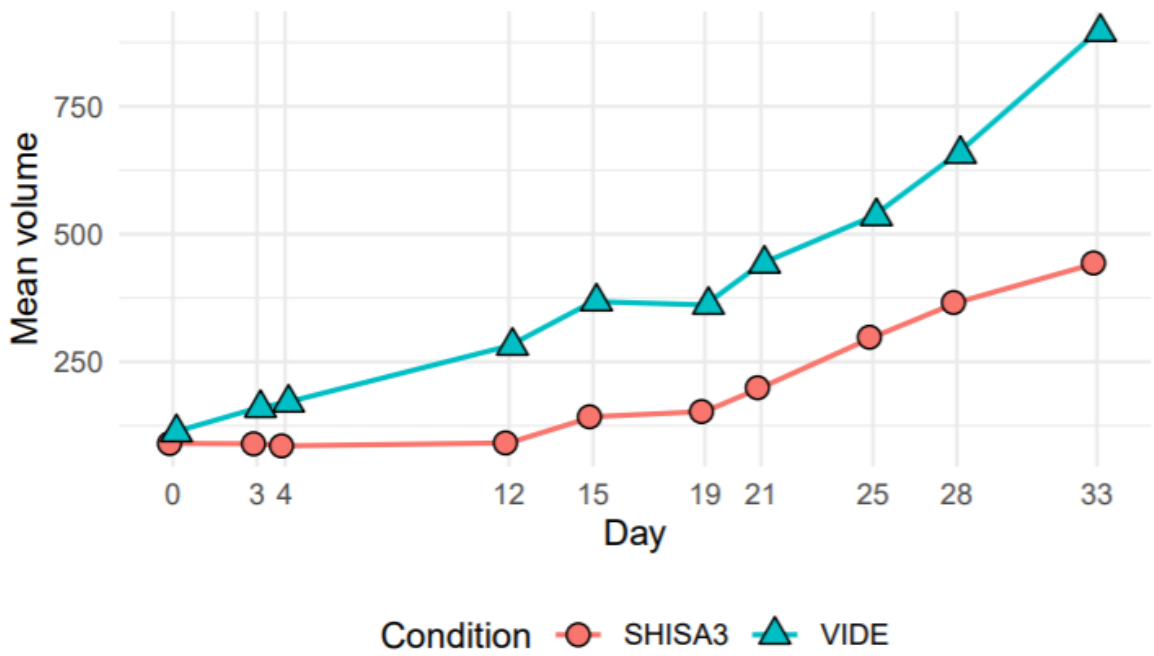


Figure 5. Average tumor volume during time.

The sizes of the tumors from the SHISA3 overexpressed group were significantly smaller than those of the control group ($p < 0.001$).

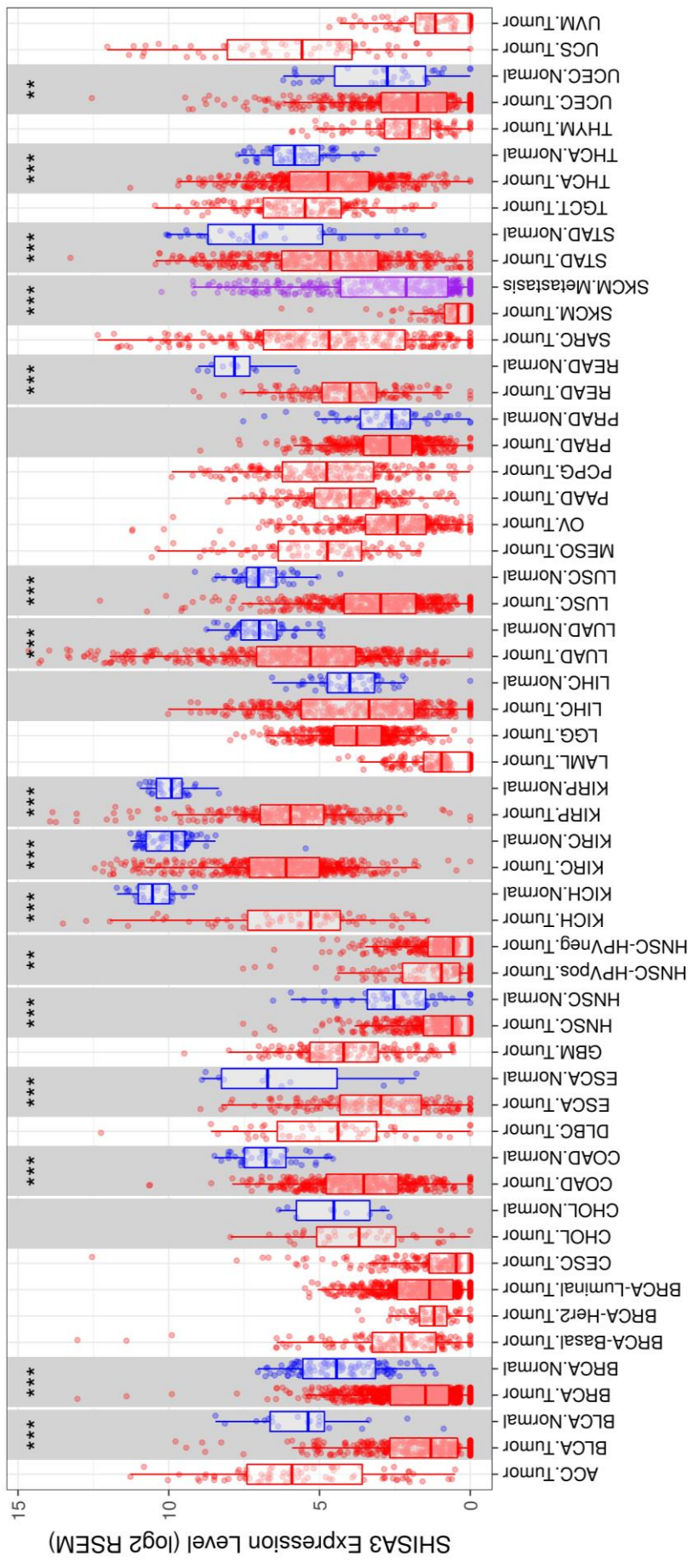


Figure S1. SHISA3 expression in tumor tissues relative to their normal tissues.

Data comparing the expression of SHISA3 in different human tissues to their corresponding tumors showed that the mRNA level of SHISA3 is significantly downregulated in human breast tumors.

Article N°2 :

Transcriptome profiling reveals a metastatic relapse
prognostic signature in triple negative breast cancer

Transcriptome profiling reveals a metastatic relapse prognostic signature in triple negative breast cancer

Noura Khaled¹, Arnaud Cougoul², Flora Ponelle-Chachuat², Nina Radosevic-Robin^{1,2}, and Yannick Bidet^{1,2,*}

¹ Université Clermont Auvergne, Inserm, IMoST UMR 1240, F-63000 CLERMONT-FERRAND, FRANCE

² Centre Jean Perrin, Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, IMoST UMR 1240, F-63000 CLERMONT-FERRAND, FRANCE

* Correspondence: Yannick.Bidet@uca.fr

**Les résultats présentés dans cet article font l'objet d'un brevet en cours de dépôt.
Merci de les traiter de manière confidentielle.**

Contexte et objectifs

Les carcinomes mammaires triple négatifs sont caractérisés par l'absence d'expression des récepteurs aux œstrogènes (ER) et à la progestérone (PR) et l'absence de surexpression du récepteur au facteur de croissance épidermique humain-2 (HER2)³⁴². Cette définition négative exclut donc tout recours à une thérapie ciblée. Le CSTN est un sous-type clinique connu pour être agressif. Il répond donc bien au traitement par chimiothérapie mais son mauvais pronostic est lié à un risque élevé de récurrence à distance^{93, 343, 344}. Cependant, près de la moitié de ces cancers ne progressent pas en métastases et répondent efficacement et durablement au traitement, signe d'une nouvelle hétérogénéité au sein de ce sous-groupe. Une stratification des patients atteints de CSTN paraît donc capitale pour personnaliser et améliorer leur parcours de soins. En effet, les métastases et les récurrences tumorales sont des déterminants majeurs non seulement pour la sélection des stratégies de traitement mais aussi pour le pronostic global des patients. Ainsi, l'identification d'une signature moléculaire définissant le pronostic individuel des patientes CSTNs en termes d'évolution métastatique pourrait faciliter le choix des stratégies thérapeutiques et améliorer leur efficacité. Des signatures existent pour certains sous-types du

cancer du sein, certains ont de bons résultats mais toutes sont décevantes sur le CSTN. Une signature du même type, mais performante sur le CSTN, est donc indispensable aux cliniciens. Notre étude visait donc à construire une nouvelle signature moléculaire capable de prédire la rechute métastatique des patientes atteintes de cancer du sein triple négatifs.

Méthodes

Cette étude rétrospective a porté sur 64 tumeurs triple négatives identifiées et sélectionnées en s'appuyant exclusivement sur des données de suivi clinique complètes des patientes. Ces patientes ont été classées en deux groupes : avec ou sans rechute métastatique dans les 5 ans suivant le diagnostic. Cette collection de 64 échantillons est composée des données des 25 tumeurs issues du Centre Jean Perrin assemblées à 39 profils d'expression génique disponibles grâce au projet TCGA. Qu'elles aient été générées localement au Centre Jean Perrin ou par les équipes du Cancer Genome Atlas, toutes proviennent de RNA-Seq qui permet une analyse transcriptomique complète et sans *a priori*. Les 64 transcriptomes ont été intégrés dans un modèle de régression de Cox pénalisée LASSO. 100 itérations de validation croisée ont été réalisées afin de sélectionner les transcrits les plus pertinents. La construction d'un score a permis de déterminer un risque de rechute métastatique. Le seuil pronostique de la signature générée a été déterminé par analyse de courbe ROC (receiver operating characteristic), calculée pour la survie spécifique à 5 ans post-diagnostic. Cette survie a été analysée grâce aux courbes de Kaplan-Meier.

Résultats

Nous avons développé avec succès une signature pronostique de six ARNs : AC006539.2, AC010096.1, AC092106.1, CCL28, IVL, and RHOV. Le score de risque que nous avons développé est capable de prédire la rechute métastatique des patientes atteintes de CSTNs dans les cinq ans avec une sensibilité de 100%, une spécificité de 89.7% et une précision de 93.8%. La valeur d'AUC de la signature à six gènes atteint 0,969 (IC à 95%: 0,935-1). Les courbes de Kaplan-Meier classent les patientes en groupe à haut risque associées à une faible survie globale et survie sans métastase ($p < 0.0001$).

Conclusion

Nos résultats ont permis la construction d'une signature moléculaire pronostique du risque métastatique chez les patientes atteintes d'un cancer du sein triple négatif. Elle permet de stratifier de manière robuste les patientes atteintes de CSTN en groupes à faible et à haut risque métastatique à 5 ans. D'après nos connaissances, cette signature constitue la première signature moléculaire prédisant la rechute métastatique chez les patientes CSTNs. Une validation à plus grande échelle est évidemment nécessaire. Elle ouvre cependant la voie à l'optimisation de la stratégie thérapeutique et au développement de prises en charge personnalisées. Ces évolutions devront être évaluées par des essais cliniques à grande échelle avant passage en routine médicale.

Transcriptome profiling reveals a metastatic relapse prognostic signature in triple negative breast cancer

Noura Khaled ^{1,2}, Arnaud Cougoul ², Flora Ponelle-Chachuat ², Nina Radosevic-Robin ^{1,2}, and Yannick Bidet ^{*1,2}

¹ Université Clermont Auvergne, Inserm, IMoST UMR 1240, F-63000 CLERMONT-FERRAND, FRANCE

² Centre Jean Perrin, Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, IMoST UMR 1240, F-63000 CLERMONT-FERRAND, France

* Correspondence: Yannick.Bidet@uca.fr

Abstract

Triple-negative breast cancer (TNBC) is associated with the worse metastasis-free and overall survival in breast carcinoma. However, it is a highly heterogeneous disease from a clinical, histological, and molecular perspective. While more than 40% of these patients rapidly escape from chemotherapy and develop metastases within 2 to 3 years, almost 60% are good responders to therapy. Therefore, it is of prime importance to stratify TNBC patients and define a molecular signature predicting their metastasis outcome. 6340 patients from the Jean Perrin Center (JPC) and 1084 samples from TCGA were filtered for negativity to estrogen, progesterone, and HER2 receptors, comprehensiveness of their clinical data and a > five-year follow-up. Whole transcriptome RNA-Seq was performed on 26 samples from the JPC and data were normalized along with 39 TCGA samples. Transcriptomic profiles of 65 TNBCs patients were divided into two main groups: metastatic and non-metastatic TNBCs. Complementary statistical approaches (PLS-DA, LASSO regressions) were used to select the most metastatic predictive genes. Multivariate Cox proportional hazards regression model analyses were used to construct a transcriptomic signature predicting the metastatic recurrence of TNBC patients and to evaluate its performance. We have successfully constructed a transcriptomic prognostic relapse signature based on six mRNAs (AC006539.2, AC010096.1, AC092106.1, CCL28, IVL, and RHOV). All the metastatic relapses of the TNBC high-risk group within five years were predicted by our signature (sensitivity = 100%, accuracy of 93.75%). Based on whole transcriptomic expression profiling, we developed a robust innovative prognosis signature predicting metastasis risk with clinical value in TNBC patients. This signature enables an efficient stratification of TNBC patients into low and high-risk groups of distant metastases and paves the way to optimized care.

Keywords: Triple-negative breast cancer TNBC; Metastasis; Transcriptomic; Signature; Prognosis; Multivariate Cox proportional hazards regression.

Background

Breast cancer (BC) is the most frequent malignancy in women worldwide with 2 million new cases in 2018. According to the recent cancer statistic report, breast cancer is the first leading cause of cancer-related mortality among women with approximately 630,000 deaths every year [1]. BC is yet a heterogeneous disease, and it englobes five major molecular subtypes with variable clinical outcomes and therapeutic responses [2]. As an example, luminal tumours express a high level of hormone receptors and thus present a good response rate to hormonotherapy. However, the triple-

negative breast cancer (TNBC) subtype, accounting for 10-15% of all BCs, was demonstrated to be correlated with the worst survival outcome and the highest recurrence ability [3], [4], [5], [6]. TNBC represents an aggressive entity characterized by the absence of the expression of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and the lack of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) overexpression [7]. As a result, TNBC lacks an identified therapeutic targets and chemotherapy is the standard treatment protocol nowadays [8], [9], [10]. As proof of heterogeneity within the subtype, half of these cancers do not progress to metastases. Stratification of the TNBC patients is thus an essential step to improve the health care pathway. For this reason, biomarkers predicting the recurrence of distant metastasis remain crucial for a better clinical outcome in TNBC.

Multiple studies seeking prognostic biomarkers for the prediction of breast cancer have been made over the past years with the aim of developing efficient clinical tools and enhancing biological understanding of BCs [11], [12], [13], [14], [15]. Prognostic signatures based on gene expression have been systematically evaluated in several BC subtypes (*MammaPrint*, *EndoPredict assay*) [16], [17]. Although some perform well on specific subtypes, none are effective on TNBC. Lately, intense research has been focused on TNBC directed towards characterizing TNBCs molecular profiles and identifying novel implicated pathways and therapeutic targets [18], [19]. Promising molecular targets have been elucidated such as polyadenosine ribose polymerase inhibitors (PARPi) [20], [21], androgen pathway [22], and DNA repair pathway [23], [24]. Moreover, a number of prognosis, diagnosis, and survival TNBC biomarkers have been described [25], [26], [27], [28]. Nevertheless, molecular mechanisms underlying TNBC relapse remain unclear and single biomarkers on their own do not predict efficiently metastatic relapse. It is now well established that a set of multi-factorial biomarkers performs better than a single gene biomarker.

Following this path, signatures have been reported to predict the fate of patients. For more convenience, most studies focus on one type of RNA to build the signature. This leads to signatures with no overlap with each other. For example, a signature by Zhong et al. who compared the gene expression profile of triple-negative tumours versus non-triple negative tumours identified a two-gene signature associated with the overall survival of TNBC patients [29]. Another study proposed a panel of six mRNAs as a signature capable of predicting overall survival in TNBC [30]. Using Whole Genome Sequencing WGS, a characterization of the genetic alterations between primary tumours and their underlying lung metastases generated a signature of four genes with prognostic value for tumour recurrence at the pulmonary level in TNBCs [31]. Recently, an epigenetic signature of six miRNAs was described as a robust predictive model for TNBC patient relapse [32]. Another one with three miRNAs has been described in correlation with the survival rate of TNBC patients [33]. All the signatures described above correlate with survival but none aims to predict metastatic relapse in TNBC patients. This prediction is highly required for oncologists in order to personalize the treatments of CSTNs patients.

In this study, we developed a prognostic RNA signature, predictive of metastatic progression in triple-negative breast cancer patients, and based on global gene expression. Our dataset assembled RNA-Seq transcriptomic data generated locally with a publicly available. Statistical methods adapted to the high dimension of the transcriptomic data were used. In a first preselection step, we have performed a PLS-DA regression with the objective of prioritizing genes by their potential for discrimination. Using the regularised version of the logistic regression method and the Cox proportional hazards regression model, we identified a combination of six RNAs able to discriminate tumours that will develop metastases from others. This signature significantly correlates with patient metastasis-free survival (MFS) and overall survival (OS). Our results present this six-RNA signature as an essential tool for predicting metastatic risk in triple-negative breast cancer patients and could shed light on further individualized treatments.

Materials and Methods

1. Sample selection

This study included two main clinical cohorts with a total of 7424 TNBC patients.

Inclusion criteria for this study were as follow:

- a. Confirmation of TN character by immunohistochemistry tools by a single pathologist, or basal-like classification according to expression profile.
- b. Availability of a five-year follow-up post diagnosis
- c. Availability of tumour samples
- d. Successful transcriptomic sequencing data
- e. Metastasis-free state at diagnosis
- f. Availability of clinicopathological characteristics

According to these inclusion criteria, 6340 patients treated between 2001 and 2014 in the Jean Perrin Center (JPC) were filtered into 26 TNBC patients as described in Figure 1. 1082 breast cancer transcriptomic profiles were downloaded from The Cancer Genome Atlas (TCGA) online cohort. Triple negative samples were defined as previously described [34] and 39 cases were kept to be used in our study (Figure 1). The study is being reviewed by the regional ethic committee and it should get an agreement number by the end of January 2021.

2. Data preparation of JPC samples

a. RNA preparation and sequencing

Whole Transcriptome Sequencing was performed on the 25 JPC samples. Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tumours from TNBC patients were used in our study. Specific regions with a high percentage of cancer cells were selected by a pathologist. Total RNA was isolated from these regions using AllPrep DNA/RNA Micro Kit (Qiagen), according to supplier instructions, including on-column DNase treatment. The quality and quantity of total RNA were evaluated through the 2100 Bioanalyzer instrument, with the RNA 6000 pico kit (Agilent Technologies). cDNA libraries were prepared using KAPA RNA HyperPrep Kit with RiboErase (Roche Diagnostics). This kit removes most ribosomal RNA but keeps all other types of RNA. The procedure followed supplier recommendations, with 25 ng of total RNA input. Subsequent indexed RNA sequencing of cDNA libraries with single-end reads (1 × 75 bps reads) was performed according to the standard Illumina protocol using NextSeq 550 High Output v2 kit (Illumina). 15-Million reads minimum were generated per sample (average 42,8 M).

b. Bioinformatic analyses

Demultiplexed reads were aligned to the human reference genome (GRCh37/hg19) using Star software (v2.7) with default parameters. HTSeq (v0.11.2) was used to quantify raw gene expression. R package DESeq2 software v1.26.0 was used to carry out data normalization for sequencing depth differences and differential expression analyses.

3. Signature construction

Gene expressions of JPC and TCGA datasets were scaled independently. The annotation of the sequencing data of the downloaded TCGA patients was converted from Ensembl to refGene based on the human GTF file in order to match the JPC data formula. Gene expressions of 26 JPC and 39 TCGA samples were combined together and genes without expression in all 65 samples were removed. In total, the level of gene expression for all samples was available for 27,887 genes. The 65 TNBC patients were composed of 25 metastatic TNBC within 5 years (mTNBC) and 40 non-metastatic

TNBC (non-mTNBC). The signature was constructed in different steps: (a) a gene preselection with use of PLS-DA, (b) Cox, and (c) Logistic regression with gene selection based on regularization of the coefficients, and (d) obtaining a robust signature by pooling these results.

a. PLS-DA for gene preselection

To construct the signature, we first performed gene preselection to reduce data size with PLS-DA analysis in order to further select the best predictive genes. Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) (*ropls* R package [35]) was employed to identify the genes that discriminate between mTNBC and non-mTNBC patients. Variable Importance in Projection (VIP) was calculated subsequently [36]. VIP is an established parameter reflecting the variability of the response explained by each gene in the segregation of our two clusters in the PLS-DA model. The mean squared VIP being equal to 1, the genes with $VIP > 1$ were selected for the rest of the study as the best representatives of the discrimination between metastatic and non-metastatic TNBC patients.

b. Cox regression to predict the instant risk of metastasis

Multivariate Cox proportional hazards regression model analyses were used to assess candidate genes that were associated with metastasis-free survival (MFS). To select genes, a LASSO regularisation was also used, as described by *Simon et al.* [37]. As in the logistic regression analysis, a similar selection of robust genes by repeated cross-validation was proceeded in order to obtain a list of biomarkers associated with instant risks of metastasis.

c. Logistic regression to predict the probability of metastasis development during 5 years

In order to develop our signature, we applied a logistic regression model combined with the Least Absolute Shrinkage and Selection Operator LASSO (*glmnet* R package), an L1 regularisation method of automatic variable selection [38]. The penalty parameter was estimated by 7-fold cross-validation (CV). This cross-validation was repeated 100 times in order to avoid uncertainties due to a sampling effect. At each of the 100 cross-validation repeats, the selected genes were counted and the frequency of appearance of the genes made it possible to identify the first list of biomarkers to predict the development of metastasis in 5 years.

d. Prognosis gene signature of metastasis risk

The genes obtained with logistic regression and those obtained using Cox regression were combined together in order to select a final list of robust genes constituting the signature. Based on the expression level and model coefficient of each robust gene calculated by multivariate Cox proportional hazards regression analysis, a novel reliable prognostic gene signature was established. To avoid statistical bias such as overfitting, multicollinearity, and non-convergence of the model, ridge regularized regressions were used to infer soft coefficients of the model and the predictive scores of metastasis risk.

4. Signature analysis

Hazard ratios (HRs) were computed from the soft coefficient of the signature with the equation $HR = \exp(\text{coefficient})$, and were used to identify protective ($HR < 1$) and risky genes ($HR > 1$). A time-dependent receiver operating characteristic (ROC) curve analysis, using the R package *pROC* [39], was constructed to assess the predictive accuracy of the gene signature. The area under the curve (AUC) was calculated to evaluate the predictive ability of the gene signature for clinical outcomes. The TNBC patient samples were further divided into low- or high-risk groups based on the optimal cut-off point on the ROC curve (closest topleft criterion). Kaplan–Meier curves were used to assess

the prognostic value of these two risk groups using the R package *survival* [40]. Proportional assumptions for Cox proportional hazard model were examined by Kaplan-Meier analysis.

Results

To smooth out any genetic variability due to a geographic effect, we combined normalised RNA-Seq profiles of two datasets, 26 JPC patients and 39 TCGA patients, in a unique 65-sample dataset. The expression level for all samples was available for 27,887 genes. The workflow of the study is shown in Figure 1 and the clinicopathological parameters of the full dataset are shown in Table 1. Samples were sorted into 25 metastatic TNBC (m-TNBC) and 40 non-metastatic TNBC (non-mTNBC). The full dataset, such as both populations, distributes into 40% of m-TNBC and 60% non-TNBC, very similar to clinical observations for this pathology.

1. Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) discriminates metastatic from non-metastatic TNBC

PLS-DA is well adapted for the visualization of high dimensional data and the description of features that best describe the differences between the experimental groups. PLS-DA plot clearly clusters our training cohort into 2 distinct groups, suggesting that variations of whole RNA expression in primary tumour could be used as biomarkers of metastatic relapse (Supplementary Figure 1). Calculation of the Variable Importance in Projection (VIP) enables to summarize the importance of every single gene in the PLS-DA model. In a preliminary step based on thresholding the VIP scores, 10 428 genes involved in the discrimination between metastatic and non-metastatic TNBC patients were identified with this model. These 10 428 genes will be used for further analysis. This analysis also pointed out an outlier sample, that has been removed to construct the signature (Supplementary Figure 2).

2. Cox regression and logistic regression with Lasso penalization of RNA-Seq data unveils a list of common candidate genes

To further refine the list of genes significantly involved in the metastatic relapse of TNBC, a least absolute shrinkage and selection operator (LASSO) Cox regression model was constructed and applied to the combined cohort JCP and TCGA samples. The model aims to generate the best combination of gene expression from the 10 428 genes, classifying the samples according to their metastasis status. After performing 100 iterations of cross-validation (CV), the best prognostic models of metastasis occurrence comprise between six to nine genes (Figure 3a). The five most-called genes are part of more than 90% of the models discriminating mTNBC from non-mTNBC. The sixth gene is represented in 71% of the cox model. However, following genes down in the list are less consensual as they were called in less than 59% of the models. The number of times each gene was included in the best model is reported in Figure 3b. Thus, we decided to use the newly identified six best candidate genes to construct our prognostic signature. These genes cover BCL2/Adenovirus E1B Interacting Protein 3 (BNIP3) Pseudogene (AC006539.2), Lnc-OSR1-2 (AC010096.1), Splicing factor, arginine/serine-rich 3 (SFRS3) pseudogene (AC092106.1), C-C Motif Chemokine Ligand 28 (CCL28), Involucrin (IVL), and Ras Homolog Family Member V (RHOV).

In parallel, logistic regression analysis with lasso penalization of the assembled gene expression profiles showed that combinations of eight to twelve genes had the most significant prognostic value with very similar efficiency (Figure 3c). The percentage of inclusion in the best logistic model of each gene is mentioned in Figure 3d. Interestingly, the six most-called genes of the cox regression model (AC006539.2, AC010096.1, AC092106.1, CCL28, IVL, and RHOV) are all included in the top eight-gene list identified by the logistic regression mentioned in $\geq 98\%$ of the logistic model. These

converging results reinforced the suggestion to use these six predictive genes, common to the two statistical approaches and the most-called in cross-validations, in order to build a sparse signature. Based on these results, all the six identified mRNAs will be used to construct a transcriptomic prognosis signature predicting a five years metastatic relapse.

3. Six-genes signature construction

Our aim is to develop a novel metastatic prognosis signature to improve metastasis risk stratification of TNBC patients. Using the coefficients from the multivariate Cox proportional hazards model, we derived an mRNA-only prognostic signature based on the expression levels of the six mRNAs determined by RNA-Seq in the combined set of 64 TNBCs. An instant metastasis risk score was calculated for the signature. The risk score for each gene was weighted by the regression coefficients. It was calculated based on the equation $\sum \text{Coefficient(mRNA)} \times \text{Expression(mRNA)}$ described by the sum of the coefficients of each mRNA multiplied by the corresponding expression. The risk score formula was established as follows:

$$\text{Risk score} = \exp \left(\begin{array}{c} +0.121 * \text{IVL} \\ -0.792 * \text{AC006539.2} \\ +0.274 * \text{AC010096.1} \\ +0.077 * \text{CCL28} \\ +0.346 * \text{RHOV} \\ -0.371 * \text{AC092106.1} \end{array} \right)$$

As the model shows, the coefficient of AC006539.2 and AC092106.1 were negative pointing out a protective role for patients' survival (HR= 0.45 and 0.69 respectively) while the coefficient of AC010096.1, CCL28, IVL, and RHOV were positive indicating that they are risk factors for TNBC metastasis (HR = 1.32, 1.08, 1.13, and 1.41 respectively) (Figure 4a).

4. Signature performance

According to the formulas, a score was attributed to every TNBC patient stratifying patients into low- or high-risk groups (n=39 and n=25 respectively) based on the cut-off point of 1.341 obtained from ROC curve analysis. The risk scores in the low-risk group ranged from 0.021 – 1.339 and those in the high-risk group ranged from 1.343 – 12.82 (Figure 4.a). TNBC patients with high-risk scores had a higher risk for distant metastasis than those with a low-risk score.

To test the predictive performance of the developed prognostic signature for clinical outcomes, we performed time-dependent receiver operator characteristic (ROC) analyses and calculated the area under the curve (AUC) values. The survival-ROC demonstrated that the six-mRNA signature risk score could effectively predict the five-year metastatic recurrence of TNBC patients with high sensitivity (100%), specificity (89.7%), and accuracy (93.8%) (Figure 4.b). The AUC value of the six-gene signature was 0.969 (95% CI: 0.935-1) demonstrating the great performance of the six-gene signature for predicting TNBC metastasis. These results further support that the association of the 6-mRNA signature significantly improving the prognostic value of TNBC patients. Similar results were obtained by the logistic regression algorithm (supplementary file 1).

Moreover, the association between the signature risk score with the overall survival OS and metastasis-free survival MFS of TNBC patients was measured using Kaplan-Meier survival analysis. As shown in figures 4.c and 4.d, Kaplan-Meier survival curves revealed a worse death rate and higher metastasis relapse within five years in patients with a high-risk score of the six-gene signature than the low-risk group (p<0.0001 both). This analysis shows that our signature defines our two populations with high sensitivity.

In addition, the expression profile of the six-gene prognostic signature distinguishing mTNBCs from non-mTNBCs is presented in a heatmap (Figure 4.d). The expression levels of AC010096.1, CCL28, IVL, and RHOV were upregulated, and the expression level of AC006539.2 and AC092106.1 were downregulated revealing that the differences were statistically significant in the combined cohort. This data visualization approved that these six candidate mRNAs are very different among the two groups of TNBC patients. Overall, these results strengthen the importance of this six-gene signature to identify TNBC patients with high metastatic risk groups who require improved care and active personalized treatment in order to increase their survival rate.

Discussion

NBC is the most lethal breast cancer subtype due to its malignant progression capacity and the potential metastatic ability. New tools improving our prognostic capability to the metastasis and clinical outcome as well as predicting response to therapy in TNBCs are urgently required. In this study, we presented the first RNA – Seq metastasis prognostic signature in TNBCs. Using the transcriptomic profiles of a combined cohort of patients from two geographically different populations, we identified six mRNAs signature to be associated with the metastasis-free survival MFS and overall survival OS of TNBCs patients via a multivariate Cox proportional hazards regression algorithm. This signature was further evaluated by a logistic regression analysis validating the robustness of this six-gene signature. A metastasis risk score of our signature defines perfectly our two populations with high and low scores. Kaplan Meier survival analysis indicated definite segregation of our two groups of patients with low-risk and high-risk scores. A worse OS and MFS were strongly associated with high-risk-score TNBC patients elucidating the predictive power of our six-gene signature. These findings recommend the six-gene signature as a robust and reproducible metastasis prognosis signature providing biological insights into the progression mechanism of TNBC.

The generated six-gene metastasis signature (AC006539.2, AC010096.1, AC092106.1, CCL28, IVL, and RHOV) consists of three pseudogenes and three genes engendering a sensitive and efficient prediction of TNBC metastasis. RHOV (Ras Homolog Family Member V) known as an atypical Rho GTPase is mainly studied in lung cancer. A study by *Shepelev & Korobko* showed that RHOV is overexpressed in non-small cell lung cancer [41]. Likewise, RHOV was suggested as a cancer biomarker by a prognostic signature in lung adenocarcinoma [42]. However, to our knowledge, there is no research on RHOV in TNBC. CCL28 (mucosa-associated epithelial chemokine), is a CC subfamily chemokine known to be overexpressed in metastatic tumour cell as well as a potential biomarker predicting cancers such as colorectal cancer [43], [44], its role in BC remain a problematic subject [45]. Even though CCL28 was defined as a good prognostic biomarker in luminal breast cancers, it was described as a potential harmful biomarker in TNBC [45]. Moreover, CCL28 was suggested as a potential therapeutic target due to its role in promoting triple-negative breast cancer growth and metastasis via the activation of the pro-metastasis and anti-apoptotic ERK/MAPK signaling pathway [46]. In addition, although Involucrin IVL, a protein involved in the terminal differentiation of keratinocytes, was shown to be overexpressed in the metaplastic breast cancers, the invasive carcinomas with central acellular zones [47] and the invasive micropapillary carcinoma [48], we are not aware of any specific study on IVL in TNBC.

Our signature revealed a number of pseudogenes as potential biomarkers for the metastasis of TNBCs even though the role of pseudogenes is not fully understood yet. The function of pseudogenes, principally implicated in gene regulatory network, have been investigated recently. Researchers have demonstrated that pseudogenes can act as competitive endogenous RNAs (ceRNAs) to their corresponding protein-coding genes and thereby altering gene

regulation [49], [50], [51]. Furthermore, pseudogenes, as members of the non-long coding RNAs family, can mediate gene regulation through RNA methylation [52], [53]. Aberrant expression of a set of pseudogenes has been revealed in multiples types of cancer including breast cancer suggesting a potential role in tumorigenesis [54]. As a matter of fact, pseudogenes were studied in multiple types of cancer where they act as oncogenes or tumour suppressors [55], [56], [57], [58]. These studies report the role of pseudogenes in cancer development and highlight ultimately the fact that pseudogenes represent potential cancer biomarkers and therapeutic targets. These findings shed light on the significance of our identified pseudogenes in TNBCs cell gene regulation affecting TNBC progression. Further characterization of these pseudogenes allows us to underline their specific regulatory mechanism and function in order to better understand their impact on TNBCs progression and metastasis. In another context, *McDonnell & Drouin* shows that the level of parent gene expression influence pseudogene production level [59]. Our study illuminates the implication of an additional set of genes referring to the corresponding parental gene expression of the pseudogenes identified by our metastasis prognosis signature in TNBC. Experimental functional characterization of their implication in TNBC evolution represents an additional trail identifying plausible biomarkers and therapeutic targets.

This signature is considered as a reliable gene expression signature predicting the outcome of metastasis and the death rate in TNBC patients due to the fact that we have chosen to screen transcriptomic profiles between two TNBC tumour tissues, metastatic or non-metastatic TNBCs. Using non-mTNBCs tissues as a control instead of normal tissues allows us to eliminate the bias of using the bulk transcriptome profiling of cell populations and so to ensure the identification of a metastatic TNBC – specific signature by reducing the signal-to-noise ratio. Our signature was designed from the transcriptomic profiles of a combined cohort of JPC and TCGA patients. Our population of 64 patients is therefore not limited to a single geographic population but includes an ethnic diversification which increases the chances that this signature is robust for a large part of the population. 100 cross-validation iterations were applied during the signature construction steps to generate a high-performance signature. Despite its great importance, this validation remains internal to the training dataset. A second validation on an independent dataset is crucial. In addition, our study evaluates for the first time a TNBC signature using a high-throughput sequencing system. Reconstructing a virtual entire transcriptome via RNA sequencing approach influence the cancer understanding and enhance the ability to discover innovative and low abundance transcripts [60]. These results with high specificity and sensitivity propose the RNA-Seq method as a powerful tool identifying significant biomarkers with a potential clinical value that can be rapidly incorporated into clinical sequencing programs. Metastatic genes identified by our signature represents potential TNBC metastasis biomarkers predicting the clinical and relapse metastasis outcomes in TNBC patients.

Conclusion

In summary, we constructed the first TNBC metastasis-associated signature providing a set of valuable prognostic biomarkers. The novel six-gene prognostic signature, significantly associated with MFS and OS, refine the decision-making process of physicians and pave the way to the development of personalized therapies via its ability to robustly stratify TNBC patients into low and high-risk metastatic groups improving thereby patient care.

Authors' Contributions

Conception and design: Yannick Bidet, Arnaud Cougoul, and Noura Khaled. Collection and assembly of data: Yannick Bidet, Nina Radosevic-Robin, and Noura Khaled. Data analysis and interpretation: Yannick Bidet, Arnaud Cougoul, Flora Ponelle-Chachuat, and Noura Khaled. Manuscript writing: Noura Khaled. Writing-review and editing: Yannick Bidet and Arnaud Cougoul.

Funding

This work is performed within the framework of CPER Epicure 2016 project by the Region Auvergne-Rhone-Alpes and was supported by the “Ligue contre le cancer du Puy de Dôme”.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge Nancy Uhrhammer for her kind grammatical/spelling review of this paper. The authors are thankful to the patients for their contribution.

Disclosure statement

The authors declare no competing interests.

Consent for publication

Working on existing tumours, written informed consent from patients is not required. However, all patients were informed about the study on 9th October 2019 and none expressed opposition.

References

1. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2018**, *68*, 394–424, doi:10.3322/caac.21492.
2. Al-Mahmood, S.; Sapiezynski, J.; Garbuzenko, O.B.; Minko, T. Metastatic and Triple-Negative Breast Cancer: Challenges and Treatment Options. *Drug Deliv Transl Res* **2018**, *8*, 1483–1507, doi:10.1007/s13346-018-0551-3.
3. Cejalvo, J.M.; Martínez de Dueñas, E.; Galván, P.; García-Recio, S.; Burgués Gasió, O.; Paré, L.; Antolín, S.; Martinello, R.; Blancas, I.; Adamo, B.; et al. Intrinsic Subtypes and Gene Expression Profiles in Primary and Metastatic Breast Cancer. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 2213–2221, doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-2717.
4. Santonja, A.; Sánchez-Muñoz, A.; Lluch, A.; Chica-Parrado, M.R.; Albanell, J.; Chacón, J.I.; Antolín, S.; Jerez, J.M.; de la Haba, J.; de Luque, V.; et al. Triple Negative Breast Cancer Subtypes and Pathologic Complete Response Rate to Neoadjuvant Chemotherapy. *Oncotarget* **2018**, *9*, 26406–26416, doi:10.18632/oncotarget.25413.
5. Elsayaf, Z.; Sinn, H.-P. Triple-Negative Breast Cancer: Clinical and Histological Correlations. *Breast Care (Basel)* **2011**, *6*, 273–278, doi:10.1159/000331643.
6. Li, X.; Yang, J.; Peng, L.; Sahin, A.A.; Huo, L.; Ward, K.C.; O'Regan, R.; Torres, M.A.; Meisel, J.L. Triple-Negative Breast Cancer Has Worse Overall Survival and Cause-Specific Survival than Non-Triple-Negative Breast Cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **2017**, *161*, 279–287, doi:10.1007/s10549-016-4059-6.
7. Collignon, J.; Lousberg, L.; Schroeder, H.; Jerusalem, G. Triple-Negative Breast Cancer: Treatment Challenges and Solutions. *Breast Cancer (Dove Med Press)* **2016**, *8*, 93–107, doi:10.2147/BCTT.S69488.
8. Khaled, N.; Bidet, Y. New Insights into the Implication of Epigenetic Alterations in the EMT of Triple Negative Breast Cancer. *Cancers* **2019**, *11*, 559, doi:10.3390/cancers11040559.

9. Schneider, B.P.; Winer, E.P.; Foulkes, W.D.; Garber, J.; Perou, C.M.; Richardson, A.; Sledge, G.W.; Carey, L.A. Triple-Negative Breast Cancer: Risk Factors to Potential Targets. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 8010–8018, doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1208.
10. O'Reilly, E.A.; Gubbins, L.; Sharma, S.; Tully, R.; Guang, M.H.Z.; Weiner-Gorzal, K.; McCaffrey, J.; Harrison, M.; Furlong, F.; Kell, M.; et al. The Fate of Chemoresistance in Triple Negative Breast Cancer (TNBC). *BBA Clin* **2015**, *3*, 257–275, doi:10.1016/j.bbacli.2015.03.003.
11. Ng, C.K.Y.; Schultheis, A.M.; Bidard, F.-C.; Weigelt, B.; Reis-Filho, J.S. Breast Cancer Genomics From Microarrays to Massively Parallel Sequencing: Paradigms and New Insights. *J Natl Cancer Inst* **2015**, *107*, doi:10.1093/jnci/djv015.
12. Liu, X.; Bi, L.; Wang, Q.; Wen, M.; Li, C.; Ren, Y.; Jiao, Q.; Mao, J.-H.; Wang, C.; Wei, G.; et al. MiR-1204 Targets VDR to Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis in Breast Cancer. *Oncogene* **2018**, *37*, 3426–3439, doi:10.1038/s41388-018-0215-2.
13. Lou, Y.; Fallah, Y.; Yamane, K.; Berg, P.E. BP1, a Potential Biomarker for Breast Cancer Prognosis. *Biomark Med* **2018**, *12*, 535–545, doi:10.2217/bmm-2017-0212.
14. Duffy, M.J.; Walsh, S.; McDermott, E.W.; Crown, J. Biomarkers in Breast Cancer: Where Are We and Where Are We Going? *Adv Clin Chem* **2015**, *71*, 1–23, doi:10.1016/bs.acc.2015.05.001.
15. Joyce, D.P.; Kerin, M.J.; Dwyer, R.M. Exosome-Encapsulated MicroRNAs as Circulating Biomarkers for Breast Cancer. *Int. J. Cancer* **2016**, *139*, 1443–1448, doi:10.1002/ijc.30179.
16. Bao, X.; Anastasov, N.; Wang, Y.; Rosemann, M. A Novel Epigenetic Signature for Overall Survival Prediction in Patients with Breast Cancer. *J Transl Med* **2019**, *17*, 1–12, doi:10.1186/s12967-019-2126-6.
17. Deva Magendhra Rao, A.K.; Patel, K.; Korivi Jyothiraj, S.; Meenakumari, B.; Sundersingh, S.; Sridevi, V.; Rajkumar, T.; Pandey, A.; Chatterjee, A.; Gowda, H.; et al. Identification of LncRNAs Associated with Early-stage Breast Cancer and Their Prognostic Implications. *Mol Oncol* **2019**, *13*, 1342–1355, doi:10.1002/1878-0261.12489.
18. Craig, D.W.; O'Shaughnessy, J.A.; Kiefer, J.A.; Aldrich, J.; Sinari, S.; Moses, T.M.; Wong, S.; Dinh, J.; Christoforides, A.; Blum, J.L.; et al. Genome and Transcriptome Sequencing in Prospective Metastatic Triple-Negative Breast Cancer Uncovers Therapeutic Vulnerabilities. *Mol Cancer Ther* **2013**, *12*, 104–116, doi:10.1158/1535-7163.MCT-12-0781.
19. Fusco, N.; Geyer, F.C.; Filippo, M.R.D.; Martelotto, L.G.; Ng, C.K.Y.; Piscuoglio, S.; Guerini-Rocco, E.; Schultheis, A.M.; Fuhrmann, L.; Wang, L.; et al. Genetic Events in the Progression of Adenoid Cystic Carcinoma of the Breast to High-Grade Triple-Negative Breast Cancer. *Mod Pathol* **2016**, *29*, 1292–1305, doi:10.1038/modpathol.2016.134.
20. Caparica, R.; Lambertini, M.; de Azambuja, E. How I Treat Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *ESMO Open* **2019**, *4*, e000504, doi:10.1136/esmoopen-2019-000504.
21. Geenen, J.J.J.; Linn, S.C.; Beijnen, J.H.; Schellens, J.H.M. PARP Inhibitors in the Treatment of Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Pharmacokinet* **2018**, *57*, 427–437, doi:10.1007/s40262-017-0587-4.
22. Gucalp, A.; Traina, T.A. Targeting the Androgen Receptor in Triple-Negative Breast Cancer. *Curr Probl Cancer* **2016**, *40*, 141–150, doi:10.1016/j.currprobcancer.2016.09.004.
23. Zhang, Y.; He, Q.; Hu, Z.; Feng, Y.; Fan, L.; Tang, Z.; Yuan, J.; Shan, W.; Li, C.; Hu, X.; et al. Long Noncoding RNA LINP1 Regulates Repair of DNA Double-Strand Breaks in Triple-Negative Breast Cancer. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2016**, *23*, 522–530, doi:10.1038/nsmb.3211.

24. Dong, Y.; Liao, H.; Fu, H.; Yu, J.; Guo, Q.; Wang, Q.; Duan, Y. PH-Sensitive Shell-Core Platform Block DNA Repair Pathway To Amplify Irreversible DNA Damage of Triple Negative Breast Cancer. *ACS Appl Mater Interfaces* **2019**, *11*, 38417–38428, doi:10.1021/acsami.9b12140.
25. Bao, C.; Lu, Y.; Chen, J.; Chen, D.; Lou, W.; Ding, B.; Xu, L.; Fan, W. Exploring Specific Prognostic Biomarkers in Triple-Negative Breast Cancer. *Cell Death Dis* **2019**, *10*, 1–14, doi:10.1038/s41419-019-2043-x.
26. Jin, J.; Zhang, W.; Ji, W.; Yang, F.; Guan, X. Predictive Biomarkers for Triple Negative Breast Cancer Treated with Platinum-Based Chemotherapy. *Cancer Biol. Ther.* **2017**, *18*, 369–378, doi:10.1080/15384047.2017.1323582.
27. Zavala, V.; Pérez-Moreno, E.; Tapia, T.; Camus, M.; Carvallo, P. MiR-146a and MiR-638 in BRCA1-Deficient Triple Negative Breast Cancer Tumors, as Potential Biomarkers for Improved Overall Survival. *Cancer Biomark* **2016**, *16*, 99–107, doi:10.3233/CBM-150545.
28. Bahnassy, A.; Mohanad, M.; Ismail, M.F.; Shaarawy, S.; El-Bastawisy, A.; Zekri, A.-R.N. Molecular Biomarkers for Prediction of Response to Treatment and Survival in Triple Negative Breast Cancer Patients from Egypt. *Exp. Mol. Pathol.* **2015**, *99*, 303–311, doi:10.1016/j.yexmp.2015.07.014.
29. Zhong, G.; Lou, W.; Shen, Q.; Yu, K.; Zheng, Y. Identification of Key Genes as Potential Biomarkers for Triple-Negative Breast Cancer Using Integrating Genomics Analysis. *Mol Med Rep* **2020**, *21*, 557–566, doi:10.3892/mmr.2019.10867.
30. Lv, X.; He, M.; Zhao, Y.; Zhang, L.; Zhu, W.; Jiang, L.; Yan, Y.; Fan, Y.; Zhao, H.; Zhou, S.; et al. Identification of Potential Key Genes and Pathways Predicting Pathogenesis and Prognosis for Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Cell International* **2019**, *19*, 172, doi:10.1186/s12935-019-0884-0.
31. Xie, G.; Yang, H.; Ma, D.; Sun, Y.; Chen, H.; Hu, X.; Jiang, Y.-Z.; Shao, Z.-M. Integration of Whole-Genome Sequencing and Functional Screening Identifies a Prognostic Signature for Lung Metastasis in Triple-Negative Breast Cancer. *International Journal of Cancer* **2019**, *145*, 2850–2860, doi:10.1002/ijc.32329.
32. Hong, H.-C.; Chuang, C.-H.; Huang, W.-C.; Weng, S.-L.; Chen, C.-H.; Chang, K.-H.; Liao, K.-W.; Huang, H.-D. A Panel of Eight MicroRNAs Is a Good Predictive Parameter for Triple-Negative Breast Cancer Relapse. *Theranostics* **2020**, *10*, 8771–8789, doi:10.7150/thno.46142.
33. Wu, X.; Ding, M.; Lin, J. Three-microRNA Expression Signature Predicts Survival in Triple-negative Breast Cancer. *Oncology Letters* **2020**, *19*, 301–308, doi:10.3892/ol.2019.11118.
34. Lehmann, B.D.; Bauer, J.A.; Chen, X.; Sanders, M.E.; Chakravarthy, A.B.; Shyr, Y.; Pietenpol, J.A. Identification of Human Triple-Negative Breast Cancer Subtypes and Preclinical Models for Selection of Targeted Therapies. *J. Clin. Invest.* **2011**, *121*, 2750–2767, doi:10.1172/JCI45014.
35. Thévenot, E.A.; Roux, A.; Xu, Y.; Ezan, E.; Junot, C. Analysis of the Human Adult Urinary Metabolome Variations with Age, Body Mass Index, and Gender by Implementing a Comprehensive Workflow for Univariate and OPLS Statistical Analyses. *J Proteome Res* **2015**, *14*, 3322–3335, doi:10.1021/acs.jproteome.5b00354.
36. Galindo-Prieto, B.; Eriksson, L.; Trygg, J. Variable Influence on Projection (VIP) for Orthogonal Projections to Latent Structures (OPLS). *Journal of Chemometrics* **2014**, *28*, 623–632, doi:10.1002/cem.2627.

37. Simon, N.; Friedman, J.H.; Hastie, T.; Tibshirani, R. Regularization Paths for Cox's Proportional Hazards Model via Coordinate Descent. *Journal of Statistical Software* **2011**, *39*, 1–13, doi:10.18637/jss.v039.i05.
38. Friedman, J.; Hastie, T.; Tibshirani, R. Regularization Paths for Generalized Linear Models via Coordinate Descent. *J Stat Softw* **2010**, *33*, 1–22.
39. Robin, X.; Turck, N.; Hainard, A.; Tiberti, N.; Lisacek, F.; Sanchez, J.-C.; Müller, M. PROC: An Open-Source Package for R and S+ to Analyze and Compare ROC Curves. *BMC Bioinformatics* **2011**, *12*, 77, doi:10.1186/1471-2105-12-77.
40. Therneau, T.M.; Grambsch, P.M. *Modeling Survival Data: Extending the Cox Model*; Statistics for Biology and Health; Springer-Verlag: New York, 2000; ISBN 978-0-387-98784-2.
41. Shepelev, M.V.; Korobko, I.V. The RHOV Gene Is Overexpressed in Human Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Genet* **2013**, *206*, 393–397, doi:10.1016/j.cancergen.2013.10.006.
42. Shukla, S.; Evans, J.R.; Malik, R.; Feng, F.Y.; Dhanasekaran, S.M.; Cao, X.; Chen, G.; Beer, D.G.; Jiang, H.; Chinnaiyan, A.M. Development of a RNA-Seq Based Prognostic Signature in Lung Adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* **2016**, *109*, doi:10.1093/jnci/djw200.
43. Karnezis, T.; Farnsworth, R.H.; Harris, N.C.; Williams, S.P.; Caesar, C.; Byrne, D.J.; Herle, P.; Macheda, M.L.; Shayan, R.; Zhang, Y.-F.; et al. CCL27/CCL28-CCR10 Chemokine Signaling Mediates Migration of Lymphatic Endothelial Cells. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 1558–1572, doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-1858.
44. Chen, L.; Lu, D.; Sun, K.; Xu, Y.; Hu, P.; Li, X.; Xu, F. Identification of Biomarkers Associated with Diagnosis and Prognosis of Colorectal Cancer Patients Based on Integrated Bioinformatics Analysis. *Gene* **2019**, *692*, 119–125, doi:10.1016/j.gene.2019.01.001.
45. Gong, D.-H.; Chen, Y.-Y.; Ma, D.; Chen, H.-Y.; Ding, K.-F.; Yu, K.-D. Complicated Prognostic Values of CCL28 in Breast Cancer by Subtype. *J Thorac Dis* **2019**, *11*, 777–787, doi:10.21037/jtd.2019.02.26.
46. Yang, X.L.; Liu, K.Y.; Lin, F.J.; Shi, H.M.; Ou, Z.L. CCL28 Promotes Breast Cancer Growth and Metastasis through MAPK-Mediated Cellular Anti-Apoptosis and pro-Metastasis. *Oncol. Rep.* **2017**, *38*, 1393–1401, doi:10.3892/or.2017.5798.
47. Yamaguchi, R.; Tanaka, M.; Kondo, K.; Yokoyama, T.; Maeda, I.; Tsuchiya, S.-I.; Yamaguchi, M.; Takahashi, R.; Ogata, Y.; Abe, H.; et al. Immunohistochemical Study of Metaplastic Carcinoma and Central Acellular Carcinoma of the Breast: Central Acellular Carcinoma Is Related to Metaplastic Carcinoma. *Med Mol Morphol* **2012**, *45*, 14–21, doi:10.1007/s00795-010-0536-x.
48. Yamaguchi, R.; Tanaka, M.; Kondo, K.; Yokoyama, T.; Kaneko, Y.; Yamaguchi, M.; Ogata, Y.; Nakashima, O.; Kage, M.; Yano, H. Characteristic Morphology of Invasive Micropapillary Carcinoma of the Breast: An Immunohistochemical Analysis. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **2010**, *40*, 781–787, doi:10.1093/jjco/hyq056.
49. Poliseno, L.; Marranci, A.; Pandolfi, P.P. Pseudogenes in Human Cancer. *Front Med (Lausanne)* **2015**, *2*, 68, doi:10.3389/fmed.2015.00068.
50. Poliseno, L. Pseudogenes: Newly Discovered Players in Human Cancer. *Sci Signal* **2012**, *5*, re5, doi:10.1126/scisignal.2002858.
51. Poliseno, L.; Salmena, L.; Zhang, J.; Carver, B.; Haveman, W.J.; Pandolfi, P.P. A Coding-Independent Function of Gene and Pseudogene MRNAs Regulates Tumour Biology. *Nature* **2010**, *465*, 1033–1038, doi:10.1038/nature09144.

52. Liu, N.; Dai, Q.; Zheng, G.; He, C.; Parisien, M.; Pan, T. N(6)-Methyladenosine-Dependent RNA Structural Switches Regulate RNA-Protein Interactions. *Nature* **2015**, *518*, 560–564, doi:10.1038/nature14234.
53. Wang, X.; Lu, Z.; Gomez, A.; Hon, G.C.; Yue, Y.; Han, D.; Fu, Y.; Parisien, M.; Dai, Q.; Jia, G.; et al. N6-Methyladenosine-Dependent Regulation of Messenger RNA Stability. *Nature* **2014**, *505*, 117–120, doi:10.1038/nature12730.
54. Hu, X.; Yang, L.; Mo, Y.-Y. Role of Pseudogenes in Tumorigenesis. *Cancers (Basel)* **2018**, *10*, doi:10.3390/cancers10080256.
55. Breyer, J.P.; Dorset, D.C.; Clark, T.A.; Bradley, K.M.; Wahlfors, T.A.; McReynolds, K.M.; Maynard, W.H.; Chang, S.S.; Cookson, M.S.; Smith, J.A.; et al. An Expressed Retrogene of the Master Embryonic Stem Cell Gene POU5F1 Is Associated with Prostate Cancer Susceptibility. *Am. J. Hum. Genet.* **2014**, *94*, 395–404, doi:10.1016/j.ajhg.2014.01.019.
56. Hayashi, H.; Arao, T.; Togashi, Y.; Kato, H.; Fujita, Y.; De Velasco, M.A.; Kimura, H.; Matsumoto, K.; Tanaka, K.; Okamoto, I.; et al. The OCT4 Pseudogene POU5F1B Is Amplified and Promotes an Aggressive Phenotype in Gastric Cancer. *Oncogene* **2015**, *34*, 199–208, doi:10.1038/onc.2013.547.
57. Lian, Y.; Xiao, C.; Yan, C.; Chen, D.; Huang, Q.; Fan, Y.; Li, Z.; Xu, H. Knockdown of Pseudogene Derived from LncRNA DUXAP10 Inhibits Cell Proliferation, Migration, Invasion, and Promotes Apoptosis in Pancreatic Cancer. *J. Cell. Biochem.* **2018**, *119*, 3671–3682, doi:10.1002/jcb.26578.
58. Yang, W.; Du, W.W.; Li, X.; Yee, A.J.; Yang, B.B. Foxo3 Activity Promoted by Non-Coding Effects of Circular RNA and Foxo3 Pseudogene in the Inhibition of Tumor Growth and Angiogenesis. *Oncogene* **2016**, *35*, 3919–3931, doi:10.1038/onc.2015.460.
59. McDonnell, L.; Drouin, G. The Abundance of Processed Pseudogenes Derived from Glycolytic Genes Is Correlated with Their Expression Level. *Genome* **2012**, *55*, 147–151, doi:10.1139/g2012-002.
60. Yamada, A.; Yu, P.; Lin, W.; Okugawa, Y.; Boland, C.R.; Goel, A. A RNA-Sequencing Approach for the Identification of Novel Long Non-Coding RNA Biomarkers in Colorectal Cancer. *Sci Rep* **2018**, *8*, 575, doi:10.1038/s41598-017-18407-6.

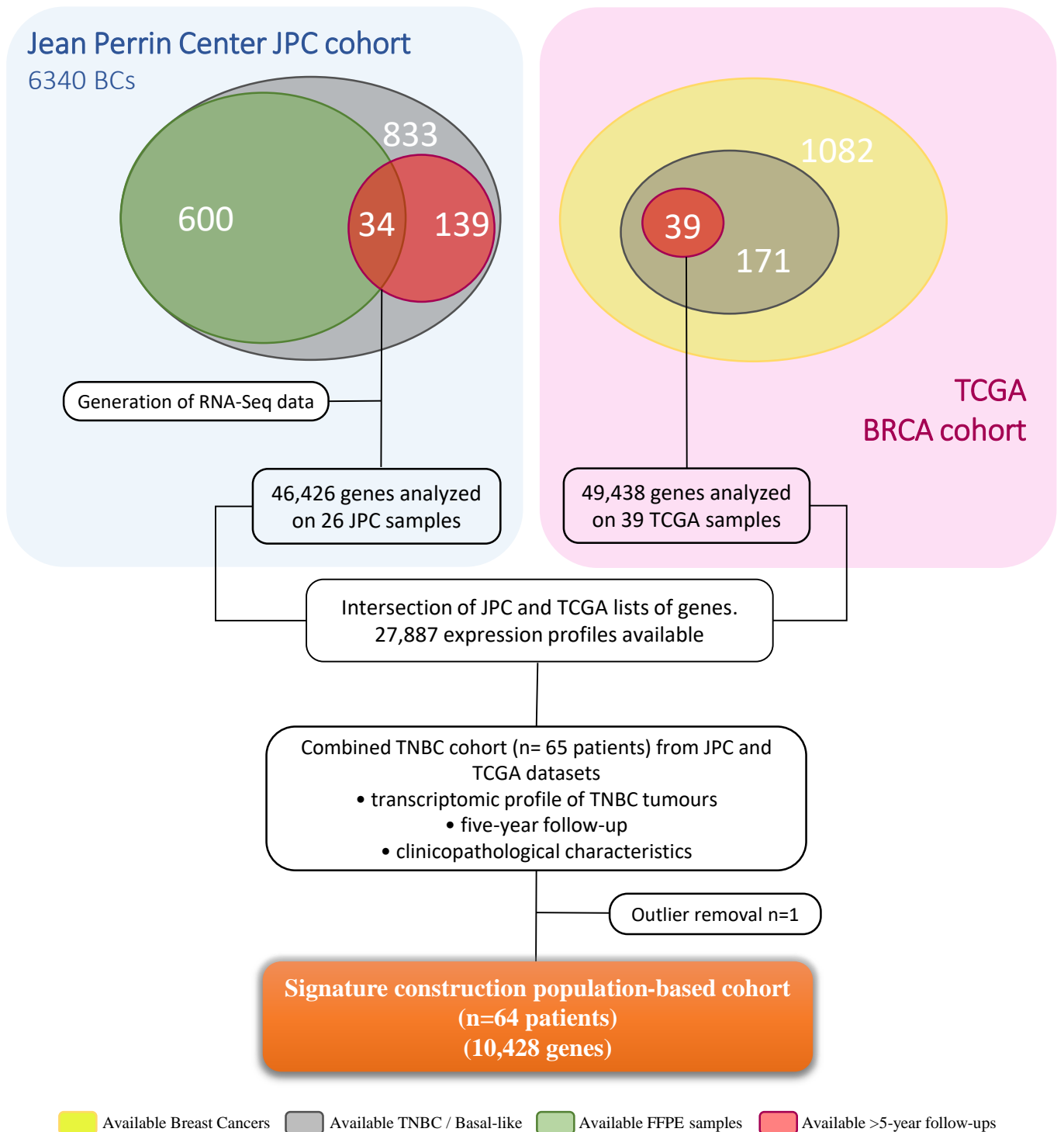


Figure 1: Study design.

This diagram shows sampling and signature population-based cohort construction.

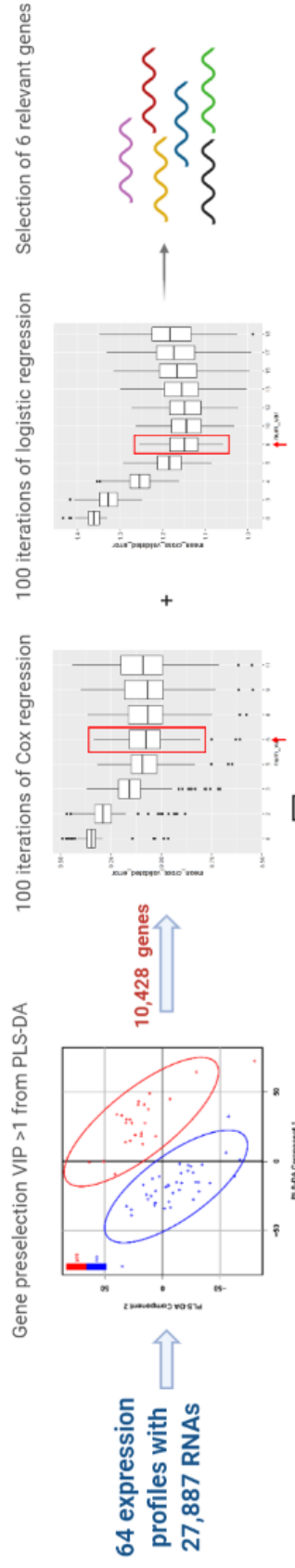
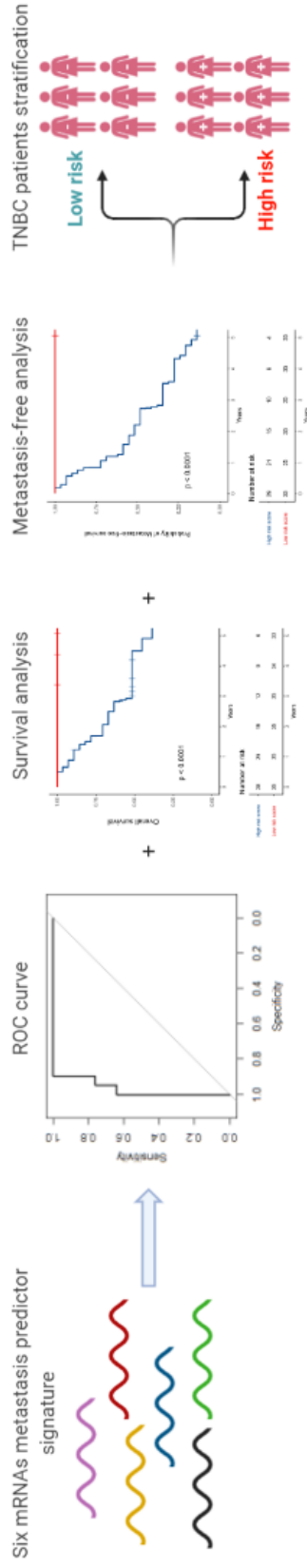
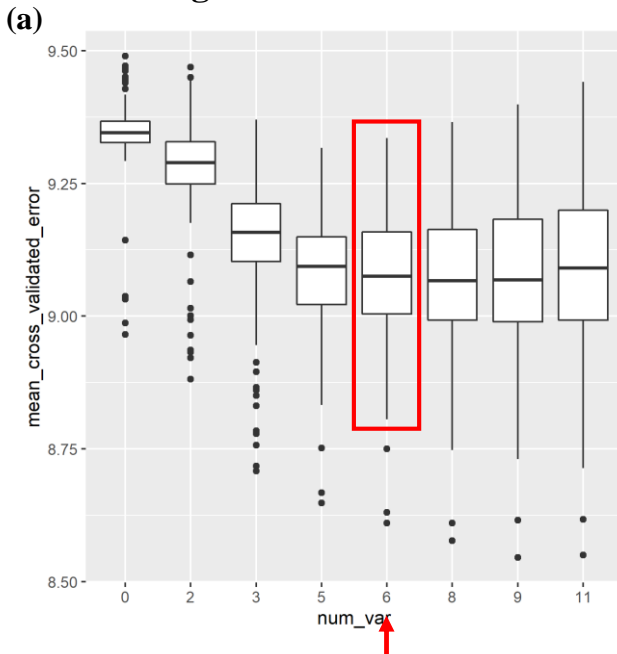
A**SIGNATURE CONSTRUCTION****B****SIGNATURE EVALUATION**

Figure 2. Study workflow identifying a transcriptomic prognosis signature predicting a five-year relapse of TNBC patients. A. Signature construction based on Lasso penalization using two different models: Cox regression and logistic regression. A combination of six-genes was identified with the best prognostic value for five-year distant metastasis prediction. B. Evaluation of the six-gene signature performance. Survival analysis and ROC curve confirm the metastatic predictive ability of the identified signature via the stratification of TNBC patients into low- and high-risk groups.

Variables	JPC group (N=26)	TCGA group (N=39)
Age (Mean ± SD)	53.0 ± 12.4	53.2 ± 11.8
Metastatic state		
Positif	38.40%	38.46%
Negatif	61.60%	61.54%
T stage		
T1	53.84%	17.95%
T2	26.92%	64.10%
T3	11.53%	12.82%
T4	7.69%	5.12%
N stage		
N0	53.84%	58.97%
N1	26.92%	23.07%
N2	7.69%	7.69%
N3	11.53%	10.25%
Histologic grade		
1	0%	23.07%
2	42.30%	48.71%
3	57.69%	25.64%
4	0.00%	2.56%
Localization		
Infiltrating Carcinoma	92.30%	84.62%
In situ Carcinoma	7.70%	0%
Others	0%	15.38%

Table 1. Clinicopathological features of TNBC patients in the combined dataset (JPC and TCGA samples).

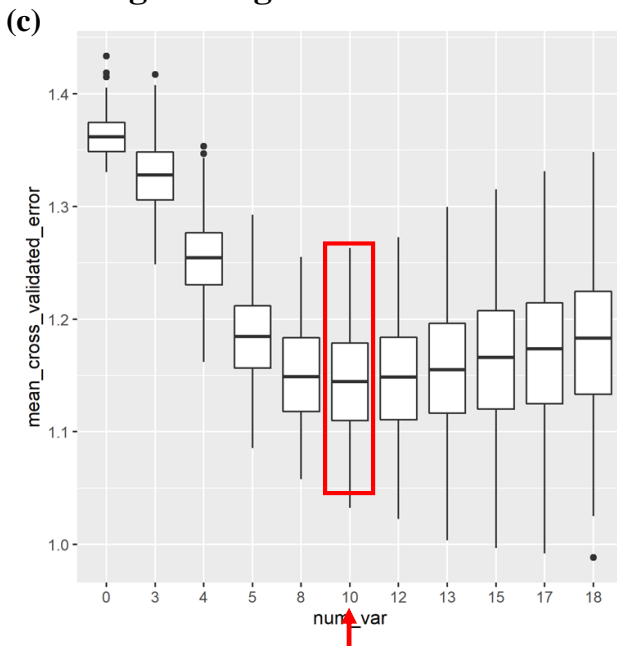
Cox regression



(b)

Gene	Recurrence
AC006539.2	100%
AC010096.1	100%
IVL	100%
CCL28	90%
RHOV	90%
AC092106.1	71%
RNU6.1054P	59%
TAX1BP3	59%
KRTDAP	41%
ARL4D	22%

Logistic regression



(d)

Gene	Recurrence
AC006539.2	100%
AC010096.1	100%
AC092106.1	100%
CCL28	100%
IVL	100%
ANKRD26P3	98%
CA15P1	98%
RHOV	98%
FOXJ1	58%
GKN2	58%

Figure 3. Selection of the most representative genes involved in the metastatic relapse of TNBC by LASSO penalization.

(a, c) Box plot demonstrating LASSO optimal number of genes discriminating m-TNBC from non-mTNBC, using Cox or logistic regression, respectively. Best description of mTNBC vs non-mTNBC is achieved with 6 genes with Cox regression and 10 genes for logistic regression. (b, d) Top 10 genes showing the best percentage of recurrence within 100 iterations of Cox or logistic regression, respectively. In bold signature selected genes.

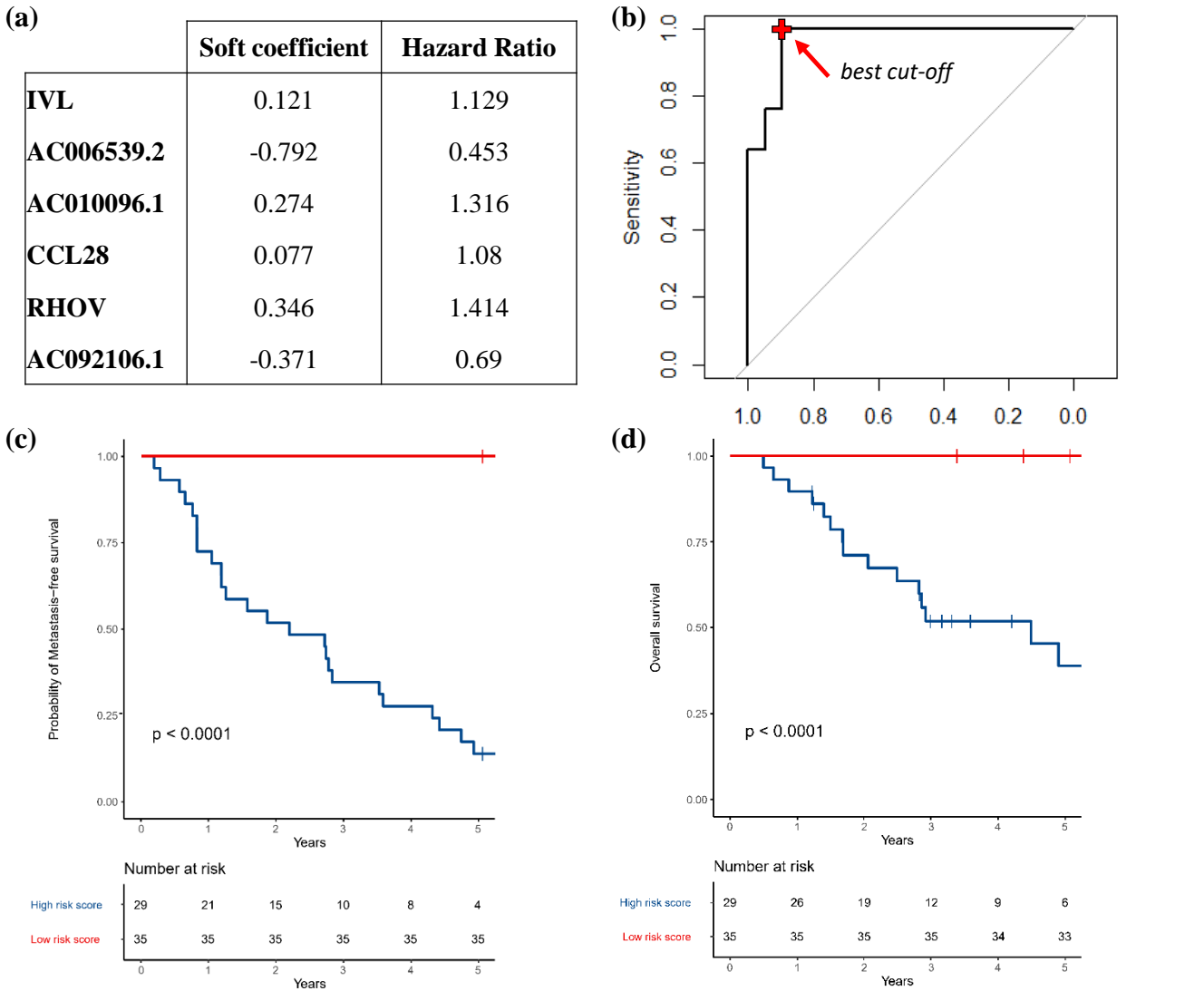
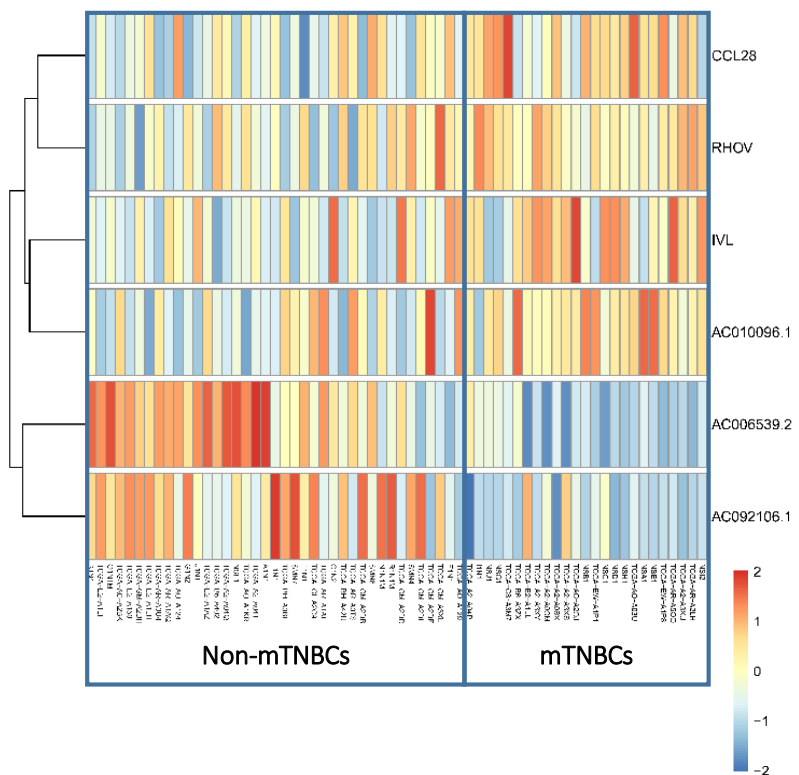
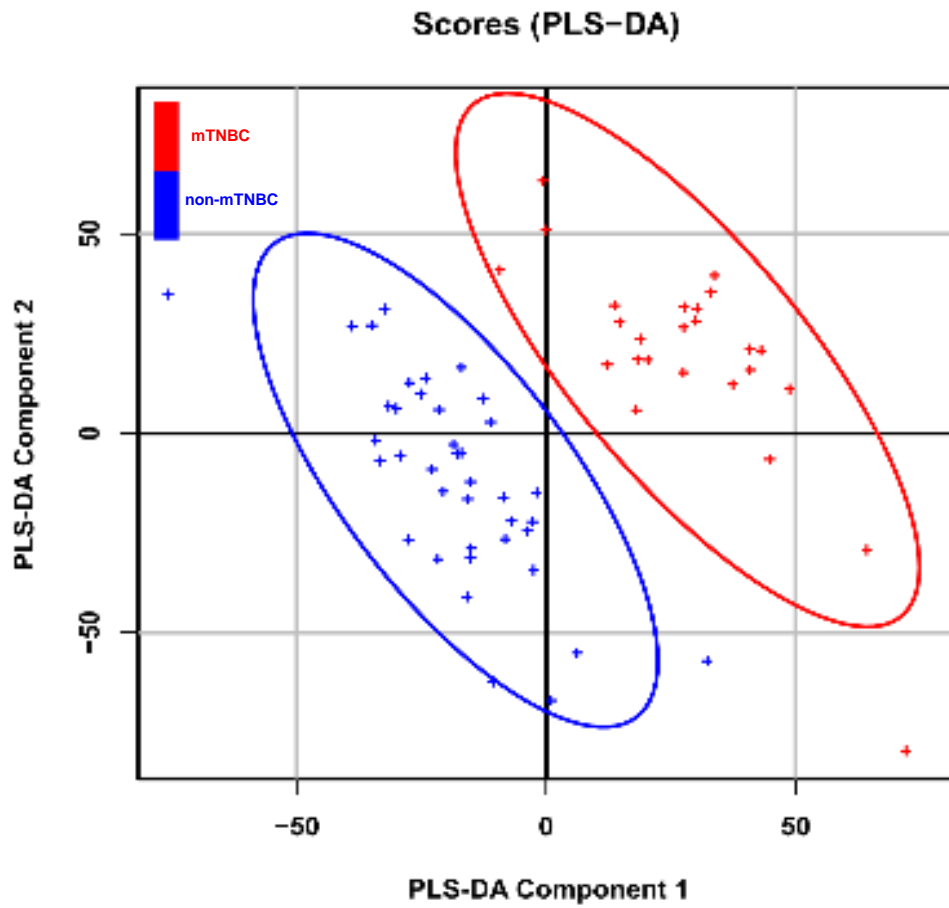


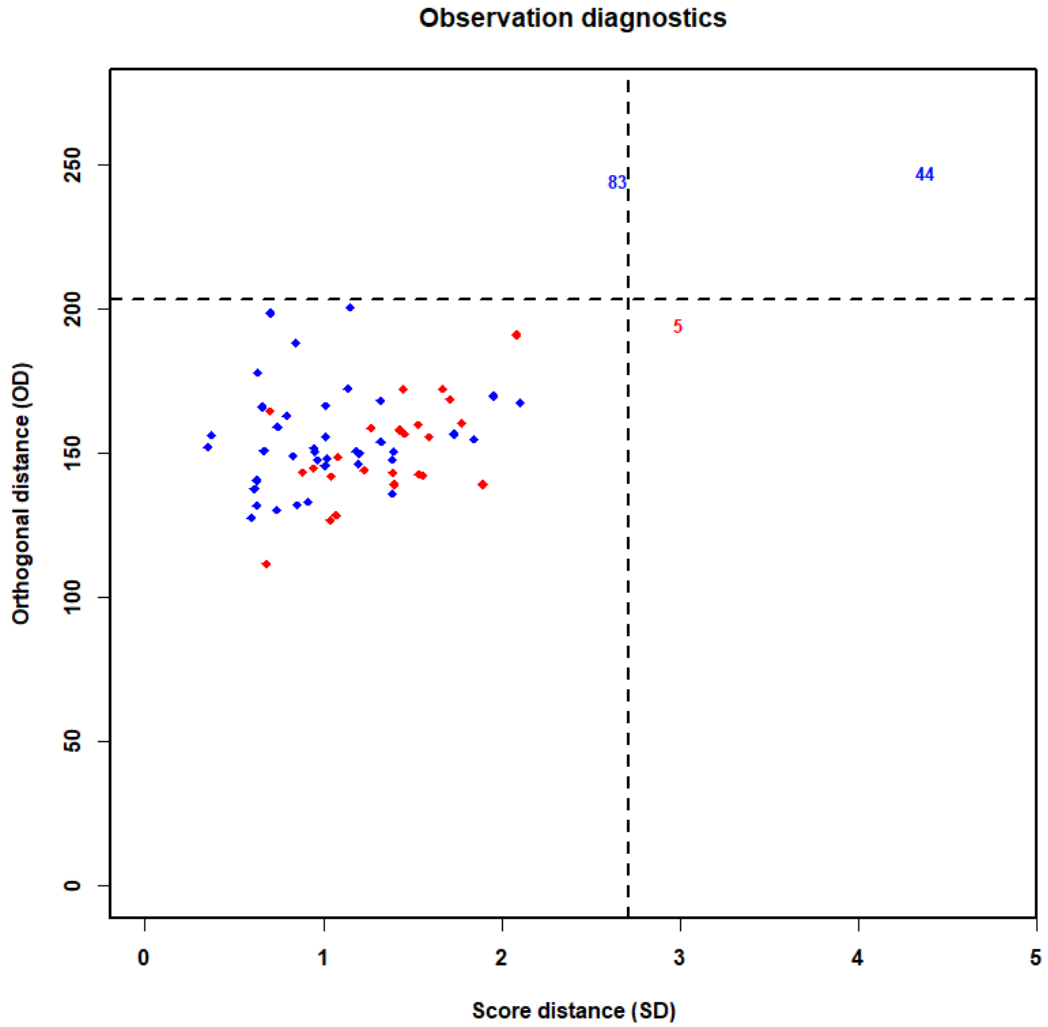
Figure 4. Evaluation of the six-gene prognosis signature performance.

(a) LASSO coefficient profiles of the six prognostic using Cox regression model. (b) ROC curve for five-years metastasis by the six-mRNA prognosis signature between mTNBC and non-mTNBC. (c) Kaplan–Meier curves estimates the correlation of the low- and high-risk groups with MFS (c) and OS (d). (e) Heat map presenting the expression levels of the six-gene prognostic signature in TNBC patients. ROC Receiver operating characteristic, OS overall survival, MFS metastasis-free survival.





Supplementary figure 1. Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) clusters TNBC dataset into 2 distinct groups corresponding to metastatic TNBC (mTNBC) and non-metastatic TNBC (non-mTNBC).



Supplementary figure 2. Outlier diagnostics from Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). Sample 44 was removed from the analysis based on the score and orthogonal distances to detect outliers (*Hubert, Rousseeuw, and Vanden Branden 2005*).

Supplementary file:

A probability index allows the prediction of the outcome of distant metastasis within five years was calculated. Corresponding coefficients were calculated using the logistic model. Weighted by their regression coefficients, a metastasis probability index for each patient was calculated according to the following formula:

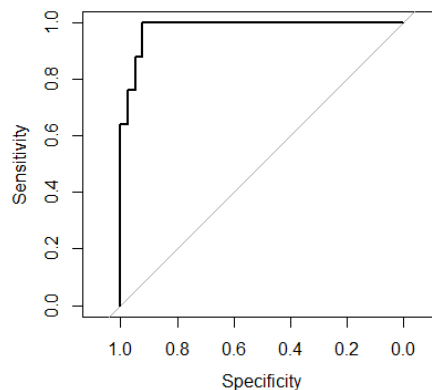
$$Probability = \text{logit}^{-1} \left(\begin{array}{c} -1.266 \\ +0.661 * IVL \\ -1.450 * AC006539.2 \\ +0.837 * AC010096.1 \\ +0.898 * CCL28 \\ +0.987 * RHOV \\ -1.103 * AC092106.1 \end{array} \right)$$

$$\text{logit}^{-1}(x) = \frac{1}{1 + \exp(-x)}$$

	Soft coefficient
(Intercept)	-1.266
IVL	0.661
AC006539.2	-1.450
AC010096.1	0.837
CCL28	0.898
RHOV	0.987
AC092106.1	-1.103

The probability score predict the metastatic outcome for TNBC patients in order to adapt therapeutic strategies. As the model shows, the coefficients are in accordance with those resulted from the Cox regression. AC006539.2 and AC092106.1 were negative and considered as protective factors while the coefficient of AC010096.1, CCL28, IVL, and RHOV were positive and considered as risk factors.

ROC curves was also calculated and the AUC Area = 0.982 (95% CI: 0.957-1) with high sensitivity (100%) and specificity (92.3%). This index allow also the classification of TNBC patients into low-risk groups (0.000 - 0.239) and high-risk groups (0.542 - 0.999) predicting the metastatic relapse of TNBC.



DISCUSSION

Discussion

Cancers particulièrement agressifs, les carcinomes mammaires triple négatifs se caractérisent par leur forte capacité métastatique potentielle. Ils sont également très hétérogènes et de nombreuses classifications ont essayé de stratifier les tumeurs qui répondent bien à la chimiothérapie et celles qui échapperont et développeront des métastases. Des outils simples pronostiques de la rechute métastatique et/ou prédisant la réponse au traitement sont toujours réclamés par les cliniciens pour les CSTNs. Le travail présenté a permis d'apporter des éléments de caractérisation les carcinomes mammaires triple négatifs et ouvrent la voie à de futures stratégies thérapeutiques pour les patientes atteintes de cancer du sein triple négatif.

A. SHISA3 comme nouveau gène suppresseur de tumeur dans le CSTN

Au cours de ce travail de thèse, un nouveau gène suppresseur des CSTNs a été découvert. Le rôle de SHISA3 est bien décrit dans le développement embryonnaire du mésoderme où il réduit les signalisations FGF et WNT. Exprimé à un niveau de base dans le sein adulte, SHISA3 est sous-exprimé spécifiquement dans les tumeurs triples négatifs métastatiques. Nos résultats dans deux lignées cellulaires triple négatives montrent que sa surexpression inhibe la prolifération, l'invasion, la migration et capacité de formation des métastases *in vitro*. Injectées de manière orthotopiques à des souris, ces cellules présentent une prolifération tumorale diminuée *in vivo*. Ces résultats sont les premiers à impliquer SHISA3 dans les CSTNs et sont confirmé par des résultats similaires obtenus dans plusieurs types tumoraux humains, y compris les leucémies ³⁴⁵, les carcinomes pulmonaire ³⁴⁶, colorectal ^{347, 348}, et du nasopharynx ³⁴⁹. SHISA3 est donc un gène suppresseur de tumeurs impliqué dans la formation des métastases dans le CSTN.

Dans ces cancers, la littérature a décrit l'hyperméthylation de l'ADN comme mécanisme source de l'inactivation génique SHISA3 ^{347, 348, 349}. Récemment, une étude par *Shahzad et al.* a démontré que la déméthylation de SHISA3 inhibe la prolifération et la migration du cancer du sein, signe indirect d'une hyperméthylation dans certains cancers du sein ³⁵⁰. Dans ce contexte, on peut poser la question d'une hyperméthylation de SHISA3 limitée aux CSTNs métastatiques et exclue des non-métastatiques. Dans un tel cas, la question suivante serait de savoir s'il est possible de cibler SHISA3 avec des agents déméthylants afin d'améliorer le pronostic des patientes atteintes de CSTN métastatique.

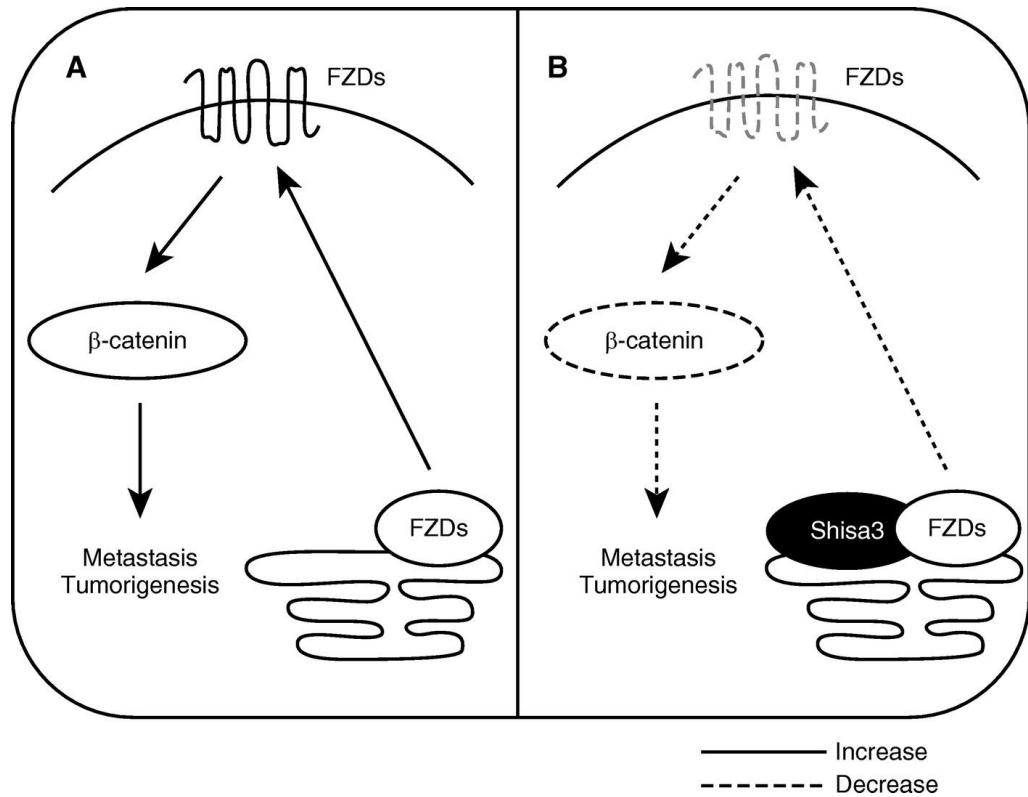


Figure 34 | Mécanisme d'action proposé pour SHISA3

Shisa3 inhibe le développement de métastases et la tumorigenèse par la voie de signalisation WNT / β -caténine. (A) Voie de signalisation WNT / β -caténine active. (B) SHISA3 favorise la dégradation de la β -caténine en séquestrant les récepteurs Frizzled (FZD) au niveau du réticulum endoplasmique (ER), diminuant leur expression de surface. Le déficit de signalisation WNT appropriée accélère la dégradation de la β -caténine par le protéasome 26S, et inhibe ainsi la formation de métastases et la tumorigenèse (*Chen et al, 2014*).

De plus, un espoir de notre étude était que l'expression de SHISA3 puisse être utilisée comme biomarqueur prédictif de rechute métastatique des CSTNs. Cependant, nous n'avons pu montrer d'association de l'expression de SHISA3 avec la survie sans métastases ni les autres caractéristiques clinico-pathologiques. Notre population étant relativement restreinte, les conclusions définitives sur le cancer mammaire triple négatif viendront d'une évaluation de l'expression de SHISA3 dans un jeu de données plus large.

Nos résultats suggèrent que SHISA3 peut agir *via* l'inhibition de la voie Wnt / β caténine afin d'inhiber la dissémination métastatique des CSTNs. Les mécanismes moléculaires d'action de SHISA3 ne sont pas complètement élucidés mais des recherches antérieures suggèrent un blocage des récepteurs FZRD contribuant à la dégradation de la β -caténine et à l'inhibition du complexe TCF / LEF³⁴⁶. Ce mécanisme est illustré dans la Figure 34. Ces suggestions sont soutenues par les travaux de *Shahzad et al.* dans les cancers du sein mais mériteraient d'être confirmées³⁵⁰.

Une des limites rencontrées durant cette étude est l'absence d'anticorps spécifiques contre SHISA3. Certains ont été publiés mais ils étaient polyclonaux et sont épuisés depuis. Nous avons testé plusieurs nouvelles productions, qui n'ont pas les qualités de celles publiées. Cette absence nous a empêché de vérifier la surexpression protéique de nos lignées cellulaires mais également de réaliser des tests immunohistochimiques non seulement sur les échantillons de nos patientes mais aussi sur les tumeurs développées *in vivo*. Ces tests ont été remplacés par une analyse des niveaux d'expression ARN qui donnent en général une bonne approximation de l'expression protéique. L'absence d'anticorps spécifiques limite cependant les études à venir en excluant les analyses de distribution morphologique ou de colocalisation, avec les facteurs de transcription de la TEM par exemple.

L'expérience *in vivo* réalisée au cours de ma thèse a démontré le rôle inhibiteur de SHISA3 sur la prolifération tumorale, sans toutefois donner de résultats sur le développement des métastases. L'UMR IMoST présente une expertise dans l'imagerie tumorale, et en particulier du petit animal. Nous avons donc tenté d'utiliser ces compétences pour détecter à différents temps des métastases à distance et plus spécifiquement dans les poumons. Aussi bien par scanner conventionnel que par traçage au ¹⁸Fluoro-désoxy-glucose (¹⁸FDG), nous n'avons pas pu détecter de métastase par imagerie. De nouvelles expériences sont nécessaires afin de préciser le rôle de SHISA3 *in vivo* : une injection initiale avec moins de cellules devrait retarder l'apparition des points limites d'euthanasie des souris, laissant peut-être le temps aux cellules

tumorales de coloniser les poumons. Dans le cadre des études *in vitro*, nous avons évalué par RT-qPCR la durée de la surexpression transitoire de SHISA3 dans les lignées cellulaires. Nos résultats ont montré une expression maximale à cinq jours post-transfection et une perte totale de l'expression au bout de 3 à 4 semaines. Si des temps plus longs sont nécessaires à l'envahissement pulmonaire, il faut considérer l'établissement de lignées stables. Il a cependant été montré qu'une intervention chirurgicale au niveau des tumeurs primaires induit l'échappement métastatique. Cette approche est sans doute à privilégier lors de l'utilisation de cellules transfectées de manière transitoire et permettrait d'évaluer les capacités de migration et d'invasion des cellules triple négatives exprimant ou non SHISA3 *in vivo*.

Enfin, notre étude a testé les deux lignées cellulaires utilisées *in vitro* mais une seule s'est implantée dans notre modèle orthotopique. Un second modèle de lignées cellulaires, avec un fort pouvoir métastatique, peut également contribuer à évaluer l'effet de SHISA3.

B. Identification d'une signature pronostique de rechute métastatique du CSTN

Nous avons présenté la première signature pronostique de rechute métastatique des CSTNs basée sur la technique RNA-Seq. Les biomarqueurs métastatiques identifiés par notre signature comprennent AC006539.2, AC010096.1, AC092106.1, CCL28, IVL, and RHOV. Un score de risque de métastase a ensuite été calculé et corrélé aux survies globale et sans métastase. Un score élevé obtenu avec cette signature correspond à une survie globale et une survie sans métastase courtes. Les bons chiffres de spécificité et de sensibilité donnent confiance dans son utilité clinique et laissent entrevoir la mise en place d'une prise en charge personnalisée.

Comme déjà décrit en introduction, aucune signature ne prédit pas la rechute métastatique des CSTNs. Notre approche a produit une signature pronostique hautement spécifique de cette rechute car les profils transcriptomiques utilisés ne diffèrent que par la présence ou l'absence de la rechute métastatique dans 5 ans. L'utilisation de tissus triple négatifs non métastatiques comme tissu de référence au lieu de tissus normaux nous a permis de travailler sur des échantillons particulièrement homogènes et de limiter ainsi le bruit de fond inhérent à toute analyse "omique".

Notre signature a été conçue à partir des profils transcriptomiques d'une cohorte combinée de patientes du CJP et de TCGA. Notre population de 64 patientes ne se limite donc pas à une

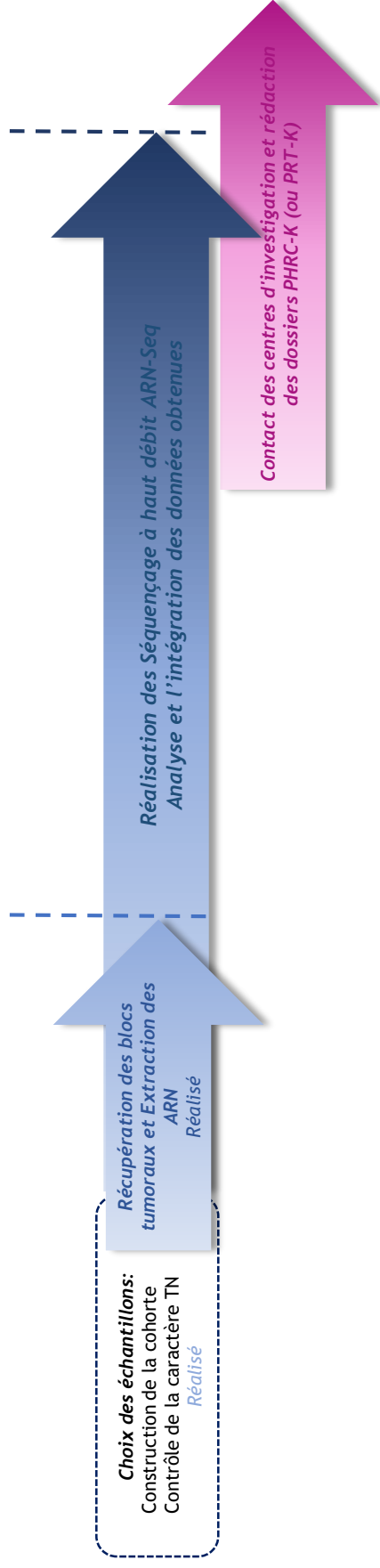


Figure 35 | Validation indépendante de la signature pronostique

Une validation sur un nouveau jeu des données a débuté sur 30 patientes atteintes de CSTN. L'étape de séquençage est prévue pour le mois de Mars de 2021. Cette étape permettra de valider la performance de la signature transcriptomique pour prédire la rechute métastatique et classer les patientes en haut- et bas- risque de formation de métastase à cinq ans.

seule population géographique mais inclut une diversification ethnique qui augmente les chances que cette signature soit robuste pour une large partie de la population.

100 itérations de validation croisée ont été appliquées durant les étapes de construction de la signature afin de générer une signature de haute performance. Malgré sa très grande importance, cette validation reste interne au jeu de données d'apprentissage. Une seconde validation sur un jeu de données indépendant est cruciale. Durant ma thèse, la construction d'une seconde cohorte locale de validation a été entreprise. Les ARNs d'une trentaine de patientes du CJP sont déjà extraits. Dans le cadre d'un "Chèque Innovation", les étapes de RNA-Seq et d'analyse des données obtenues sont planifiées pour les trois mois à venir (Figure 35). Enfin, la mise en place de projets multicentriques permettant le recrutement d'une large cohorte de validation prospective est planifiée.

Notre signature a été générée à partir d'un modèle pronostique biostatistique qui essaie d'expliquer la différence de nos deux groupes de patientes en se basant sur leur profil d'expression génique. Différents modèles statistiques existent, chacun caractérisés par des points forts et des points faibles. Dans cette étude, nous avons utilisé la régression à risques proportionnels multivariée de Cox pénalisée LASSO. Le modèle est construit de façon à produire toutes les combinaisons capables d'expliquer notre phénomène avec une valeur d'erreur. Il a ensuite été confronté à une seconde analyse de régression logistique générant le même set de gènes et validant ainsi la robustesse de notre signature à six gènes.

Cependant, différents défis statistiques peuvent de présenter et en premier lieu le petit nombre d'échantillons par rapport au grand nombre de gènes analysés. Ceci augmente mécaniquement le nombre de faux positifs découverts et par conséquent l'instabilité de la liste de gènes sélectionnés. Après 100 itérations, les gènes retenus ont cependant été sélectionnés dans plus de 98% des cas. Dans certains cas plus difficiles, une extension empirique de cette pénalisation peut être proposée permettant d'être plus restrictif sur le choix du paramètre dans le but de sélectionner moins de faux positifs.

Finalement, les six gènes de notre signature sont constitués de trois gènes et trois pseudogènes. La caractérisation fonctionnelle expérimentale de l'implication de ces trois gènes (CCL28, IVL et RHOV) dans l'évolution des CSTNs représente une piste supplémentaire d'investigation. Quant aux trois pseudogènes, il peut être intéressant de vérifier si leur expression joue un rôle dans l'évolution métastatique. Il est cependant tout à fait possible que l'apparition de leur expression ne soit qu'une conséquence d'un autre mécanisme, non identifié

à ce jour. Pourtant, leur contribution importante à la signature finale ne remet pas en question leur pertinence en tant que biomarqueur.

Enfin, la méthode RNA-Seq utilisée est un outil puissant d'analyse sans *a priori*. Bien que nous n'ayons pas approfondi cet aspect, elle permet de révéler des transcrits aberrants et des transcrits de fusions qui peuvent s'avérer de bons biomarqueurs de rechute métastatique.

CONCLUSION

Conclusion

Ce travail a utilisé plusieurs approches afin de mieux comprendre la progression métastatique des carcinomes mammaires triple négatifs. Avec la révolution récente de la génomique et la médecine stratifiée, le développement de signatures moléculaires et l'identification des nouveaux gènes suppresseurs de tumeurs deviennent de plus en plus importants pour prédire le pronostic, la survie ou l'effet d'un traitement pour chaque patiente.

Nos résultats apportent des renseignements sur la description moléculaire du sous-type triple négatif de cancer mammaire. Il dégage notamment une signature pronostique de la rechute métastatique et aboutit à l'identification de SHISA3 comme gène suppresseur de tumeur. Ces deux avancées conduisent vers une personnalisation des stratégies thérapeutiques qui constitue avec certitude la médecine de demain.

BIBLIOGRAPHIE

Références

1. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
2. Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A. & Fares, Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduct. Target. Ther.* **5**, 1–17 (2020).
3. Trelstad, R. L., Hay, E. D. & Revel, J. D. Cell contact during early morphogenesis in the chick embryo. *Dev. Biol.* **16**, 78–106 (1967).
4. Hay, E. D. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat. (Basel)* **154**, 8–20 (1995).
5. Kalluri, R. & Weinberg, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* **119**, 1420–1428 (2009).
6. Kalluri, R. & Neilson, E. G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J. Clin. Invest.* **112**, 1776–1784 (2003).
7. Dongre, A. & Weinberg, R. A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 69–84 (2019).
8. Nieto, M. A., Huang, R. Y.-J., Jackson, R. A. & Thiery, J. P. EMT: 2016. *Cell* **166**, 21–45 (2016).
9. Lamouille, S., Xu, J. & Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 178–196 (2014).
10. Paunescu, V. *et al.* Tumour-associated fibroblasts and mesenchymal stem cells: more similarities than differences. *J. Cell. Mol. Med.* **15**, 635–646 (2011).
11. Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J. & Nieto, M. A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **139**, 871–890 (2009).
12. Thiery, J. P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 442–454 (2002).
13. Hay, E. D. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev. Dyn.* **233**, 706–720 (2005).
14. Futterman, M. A., García, A. J. & Zamir, E. A. Evidence for partial epithelial-to-mesenchymal transition (pEMT) and recruitment of motile blastoderm edge cells during avian epiboly. *Dev. Dyn.* **240**, 1502–1511 (2011).

15. Kriz, W., Kaissling, B. & Le Hir, M. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in kidney fibrosis: fact or fantasy? *J. Clin. Invest.* **121**, 468–474 (2011).
16. Polyak, K. & Weinberg, R. A. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 265–273 (2009).
17. Kovacic, J. C., Mercader, N., Torres, M., Boehm, M. & Fuster, V. Epithelial- and Endothelial- to Mesenchymal Transition: from Cardiovascular Development to Disease. *Circulation* **125**, 1795–1808 (2012).
18. Gómez-Cuadrado, L., Tracey, N., Ma, R., Qian, B. & Brunton, V. G. Mouse models of metastasis: progress and prospects. *Dis. Model. Mech.* **10**, 1061–1074 (2017).
19. Fidler, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the ‘seed and soil’ hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 453–458 (2003).
20. Kondo, M. *et al.* A role for Id in the regulation of TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Cell Death Differ.* **11**, 1092–1101 (2004).
21. Huang, R. Y.-J., Guilford, P. & Thiery, J. P. Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Sci.* **125**, 4417–4422 (2012).
22. Kourtidis, A., Ngok, S. P. & Anastasiadis, P. Z. p120 catenin: an essential regulator of cadherin stability, adhesion-induced signaling, and cancer progression. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **116**, 409–432 (2013).
23. Thiery, J. P. & Sleeman, J. P. Complex networks orchestrate epithelial–mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 131–142 (2006).
24. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion | SpringerLink.
<https://link.springer.com/article/10.1007/s10555-008-9169-0>.
25. Peinado, H., Olmeda, D. & Cano, A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat. Rev. Cancer* **7**, 415–428 (2007).
26. Haynes, J., Srivastava, J., Madson, N., Wittmann, T. & Barber, D. L. Dynamic actin remodeling during epithelial-mesenchymal transition depends on increased moesin expression. *Mol. Biol. Cell* **22**, 4750–4764 (2011).
27. McNiven, M. A. Breaking away: matrix remodeling from the leading edge. *Trends Cell Biol.* **23**, 16–21 (2013).

28. Medici, D., Potenta, S. & Kalluri, R. Transforming growth factor- β 2 promotes Snail-mediated endothelial-mesenchymal transition through convergence of Smad-dependent and Smad-independent signalling. *Biochem. J.* **437**, 515–520 (2011).
29. Craene, B. D. & Berx, G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 97–110 (2013).
30. Yilmaz, M. & Christofori, G. Mechanisms of Motility in Metastasizing Cells. *Mol. Cancer Res.* **8**, 629–642 (2010).
31. Witz, I. P. & Levy-Nissenbaum, O. The tumor microenvironment in the post-PAGET era. *Cancer Lett.* **242**, 1–10 (2006).
32. Quail, D. & Joyce, J. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* **19**, 1423–1437 (2013).
33. Rønnov-Jessen, L., Petersen, O. W. & Bissell, M. J. Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. *Physiol. Rev.* **76**, 69–125 (1996).
34. Tlsty, T. D. & Coussens, L. M. Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu. Rev. Pathol.* **1**, 119–150 (2006).
35. Harris, A. L. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 38–47 (2002).
36. Xia, Y., Shen, S. & Verma, I. M. NF- κ B, an active player in human cancers. *Cancer Immunol. Res.* **2**, 823–830 (2014).
37. Yao-Borengasser, A. *et al.* Adipocyte hypoxia promotes epithelial-mesenchymal transition-related gene expression and estrogen receptor-negative phenotype in breast cancer cells. *Oncol. Rep.* **33**, 2689–2694 (2015).
38. Zhang, C., Carl, T. F., Trudeau, E. D., Simmet, T. & Klymkowsky, M. W. An NF-kappaB and slug regulatory loop active in early vertebrate mesoderm. *PloS One* **1**, e106 (2006).
39. Peng, D. H. *et al.* ZEB1 induces LOXL2-mediated collagen stabilization and deposition in the extracellular matrix to drive lung cancer invasion and metastasis. *Oncogene* **36**, 1925–1938 (2017).
40. Wei, S. C. *et al.* Matrix stiffness drives Epithelial-Mesenchymal Transition and tumour metastasis through a TWIST1-G3BP2 mechanotransduction pathway. *Nat. Cell Biol.* **17**, 678–688 (2015).
41. Wei, S. C. *et al.* Matrix stiffness drives epithelial-mesenchymal transition and tumour metastasis through a TWIST1-G3BP2 mechanotransduction pathway. *Nat. Cell Biol.* **17**, 678–688 (2015).

42. Morandi, A., Taddei, M. L., Chiarugi, P. & Giannoni, E. Targeting the Metabolic Reprogramming That Controls Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Aggressive Tumors. *Front. Oncol.* **7**, (2017).
43. Peppicelli, S., Bianchini, F., Torre, E. & Calorini, L. Contribution of acidic melanoma cells undergoing epithelial-to-mesenchymal transition to aggressiveness of non-acidic melanoma cells. *Clin. Exp. Metastasis* **31**, 423–433 (2014).
44. Marín-Hernández, Á. *et al.* Hypoglycemia Enhances Epithelial-Mesenchymal Transition and Invasiveness, and Restrains the Warburg Phenotype, in Hypoxic HeLa Cell Cultures and Microspheroids. *J. Cell. Physiol.* **232**, 1346–1359 (2017).
45. Redfern, A. D., Spalding, L. J. & Thompson, E. W. The Kraken Wakes: induced EMT as a driver of tumour aggression and poor outcome. *Clin. Exp. Metastasis* **35**, 285–308 (2018).
46. Hiscox, S. *et al.* Tamoxifen resistance in MCF7 cells promotes EMT-like behaviour and involves modulation of beta-catenin phosphorylation. *Int. J. Cancer* **118**, 290–301 (2006).
47. Du, B. & Shim, J. S. Targeting Epithelial–Mesenchymal Transition (EMT) to Overcome Drug Resistance in Cancer. *Molecules* **21**, (2016).
48. Huang, J., Li, H. & Ren, G. Epithelial-mesenchymal transition and drug resistance in breast cancer (Review). *Int. J. Oncol.* **47**, 840–848 (2015).
49. Lesniak, D. *et al.* Spontaneous Epithelial-Mesenchymal Transition and Resistance to HER-2-Targeted Therapies in HER-2-Positive Luminal Breast Cancer. *PLoS ONE* **8**, (2013).
50. Alves, C. L., Elias, D., Lyng, M. B., Bak, M. & Ditzel, H. J. SNAI2 upregulation is associated with an aggressive phenotype in fulvestrant-resistant breast cancer cells and is an indicator of poor response to endocrine therapy in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res. BCR* **20**, (2018).
51. Qu, H., Fang, L., Duan, L. & Long, X. [Expression of ABCG2 and p-glycoprotein in residual breast cancer tissue after chemotherapy and their correlation with epithelial-mesenchymal transition]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* **43**, 236–240 (2014).
52. Martin, O. A. *et al.* Mobilization of viable tumor cells into the circulation during radiation therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **88**, 395–403 (2014).
53. Savagner, P. Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **23**, 912–923 (2001).

54. Berx, G., Raspé, E., Christofori, G., Thiery, J. P. & Sleeman, J. P. Pre-EMTing metastasis? Recapitulation of morphogenetic processes in cancer. *Clin. Exp. Metastasis* **24**, 587–597 (2007).
55. Valcourt, U., Kowanzetz, M., Niimi, H., Heldin, C.-H. & Moustakas, A. TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. *Mol. Biol. Cell* **16**, 1987–2002 (2005).
56. Lee, M. K. *et al.* TGF- β activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *EMBO J.* **26**, 3957–3967 (2007).
57. Yamashita, M. *et al.* TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF- β . *Mol. Cell* **31**, 918–924 (2008).
58. Bakin, A. V., Tomlinson, A. K., Bhowmick, N. A., Moses, H. L. & Arteaga, C. L. Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J. Biol. Chem.* **275**, 36803–36810 (2000).
59. Transforming Growth Factor- β 1 Mediates Epithelial to Mesenchymal Transdifferentiation through a RhoA-dependent Mechanism | Molecular Biology of the Cell. <https://www.molbiolcell.org/doi/full/10.1091/mbc.12.1.27>.
60. Zou, A. *et al.* SHCBP1 promotes cisplatin induced apoptosis resistance, migration and invasion through activating Wnt pathway. *Life Sci.* **235**, 116798 (2019).
61. Krishnamurthy, N. & Kurzrock, R. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors. *Cancer Treat. Rev.* **62**, 50–60 (2018).
62. Gonzalez, D. M. & Medici, D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci. Signal.* **7**, re8–re8 (2014).
63. EMT Regulation by Autophagy: A New Perspective in Glioblastoma Biology. <https://www-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/pmc/articles/PMC6468412/>.
64. Zhou, P. *et al.* NMIIA promotes tumor growth and metastasis by activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway and EMT in pancreatic cancer. *Oncogene* **38**, 5500–5515 (2019).
65. Valenta, T., Hausmann, G. & Basler, K. The many faces and functions of β -catenin. *EMBO J.* **31**, 2714–2736 (2012).
66. Schmalhofer, O., Brabletz, S. & Brabletz, T. E-cadherin, β -catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **28**, 151–166 (2009).

67. Aster, J. C., Pear, W. S. & Blacklow, S. C. The Varied Roles of Notch in Cancer. *Annu. Rev. Pathol.* **12**, 245–275 (2017).
68. Espinoza, I. & Miele, L. Notch inhibitors for cancer treatment. *Pharmacol. Ther.* **139**, 95–110 (2013).
69. Takebe, N. *et al.* Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **12**, 445–464 (2015).
70. Espinoza, I., Pochampally, R., Xing, F., Watabe, K. & Miele, L. Notch signaling: targeting cancer stem cells and epithelial-to-mesenchymal transition. *OncoTargets Ther.* **6**, 1249–1259 (2013).
71. Powers, C. J., McLeskey, S. W. & Wellstein, A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr. Relat. Cancer* **7**, 165–197 (2000).
72. Yang, M.-H. & Wu, K.-J. TWIST activation by hypoxia inducible factor-1 (HIF-1): implications in metastasis and development. *Cell Cycle Georget. Tex* **7**, 2090–2096 (2008).
73. Peinado, H. *et al.* A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression. *EMBO J.* **24**, 3446–3458 (2005).
74. Xu, R. P4HA1 is a new regulator of the HIF-1 pathway in breast cancer. *Cell Stress* **3**, 27–28 (2019).
75. Liu, Z.-J., Semenza, G. L. & Zhang, H.-F. Hypoxia-inducible factor 1 and breast cancer metastasis. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **16**, 32–43 (2015).
76. Huber, M. A. *et al.* NF- κ B is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J. Clin. Invest.* **114**, 569–581 (2004).
77. Yoo, Y. A., Kang, M. H., Kim, J. S. & Oh, S. C. Sonic hedgehog signaling promotes motility and invasiveness of gastric cancer cells through TGF-beta-mediated activation of the ALK5-Smad 3 pathway. *Carcinogenesis* **29**, 480–490 (2008).
78. Sahlgren, C., Gustafsson, M. V., Jin, S., Poellinger, L. & Lendahl, U. Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 6392–6397 (2008).
79. Boppart, M. D. & Mahmassani, Z. S. Integrin signaling: linking mechanical stimulation to skeletal muscle hypertrophy. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **317**, C629–C641 (2019).
80. Ip, Y. T. & Gridley, T. Cell movements during gastrulation: Snail dependent and independent pathways. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 423–429 (2002).
81. Wang, Y., Shi, J., Chai, K., Ying, X. & Zhou, B. P. The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. *Curr. Cancer Drug Targets* **13**, 963–972 (2013).

82. Wu, W.-S. *et al.* Snail collaborates with EGR-1 and SP-1 to directly activate transcription of MMP 9 and ZEB1. *Sci. Rep.* **7**, 17753 (2017).
83. Hu, Y. *et al.* Snail2 induced E-cadherin suppression and metastasis in lung carcinoma facilitated by G9a and HDACs. *Cell Adhes. Migr.* **13**, 285–292 (2019).
84. Cobaleda, C., Pérez-Caro, M., Vicente-Dueñas, C. & Sánchez-García, I. Function of the Zinc-Finger Transcription Factor SNAI2 in Cancer and Development. *Annu. Rev. Genet.* **41**, 41–61 (2007).
85. Bolós, V. *et al.* The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J. Cell Sci.* **116**, 499–511 (2003).
86. Wang, Y., Liu, J., Ying, X., Lin, P. C. & Zhou, B. P. Twist-mediated Epithelial-mesenchymal Transition Promotes Breast Tumor Cell Invasion via Inhibition of Hippo Pathway. *Sci. Rep.* **6**, 24606 (2016).
87. Puisieux, A., Valsesia-Wittmann, S. & Ansieau, S. A twist for survival and cancer progression. *Br. J. Cancer* **94**, 13–17 (2006).
88. Ansieau, S., Morel, A.-P., Hinkal, G., Bastid, J. & Puisieux, A. TWISTing an embryonic transcription factor into an oncoprotein. *Oncogene* **29**, 3173–3184 (2010).
89. Bastid, J., Puisieux, A. & Ansieau, S. Should We Consider Cancers as Embryonic Diseases or as Consequences of Stem-Cell Deregulation? *Clin. Med. Oncol.* **2**, 363–366 (2008).
90. Zhang, P., Sun, Y. & Ma, L. ZEB1: At the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance. *Cell Cycle* **14**, 481–487 (2015).
91. Browne, G., Sayan, A. E. & Tulchinsky, E. ZEB proteins link cell motility with cell cycle control and cell survival in cancer. *Cell Cycle Georget. Tex* **9**, 886–891 (2010).
92. Peng, D. H. *et al.* ZEB1 induces LOXL2-mediated collagen stabilization and deposition in the extracellular matrix to drive lung cancer invasion and metastasis. *Oncogene* **36**, 1925–1938 (2017).
93. Khaled, N. & Bidet, Y. New Insights into the Implication of Epigenetic Alterations in the EMT of Triple Negative Breast Cancer. *Cancers* **11**, (2019).
94. Metastatic Breast Cancer. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/pubmed/28500107>.
95. Harbeck, N. & Gnant, M. Breast cancer. *The Lancet* **389**, 1134–1150 (2017).

96. van 't Veer, L. J. *et al.* Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* **415**, 530–536 (2002).
97. Loi, S. *et al.* Gene expression profiling identifies activated growth factor signaling in poor prognosis (Luminal-B) estrogen receptor positive breast cancer. *BMC Med. Genomics* **2**, 37 (2009).
98. Paik, S. *et al.* A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **351**, 2817–2826 (2004).
99. Pharmacogenomic predictor of sensitivity to preoperative chemotherapy with paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide in breast... - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/pubmed/16896004>.
100. Sørlie, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10869–10874 (2001).
101. Prat, A. *et al.* Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **31**, 203–209 (2013).
102. Goldhirsch, A. *et al.* Meeting highlights: updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **21**, 3357–3365 (2003).
103. Feeley, L. P., Mulligan, A. M., Pinnaduwage, D., Bull, S. B. & Andrulis, I. L. Distinguishing luminal breast cancer subtypes by Ki67, progesterone receptor or TP53 status provides prognostic information. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **27**, 554–561 (2014).
104. Cheang, M. C. U. *et al.* Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **101**, 736–750 (2009).
105. Olayioye, M. A., Neve, R. M., Lane, H. A. & Hynes, N. E. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* **19**, 3159–3167 (2000).
106. Gutierrez, C. & Schiff, R. HER2: biology, detection, and clinical implications. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **135**, 55–62 (2011).
107. Kallioniemi, O. P. *et al.* Association of c-erbB-2 protein over-expression with high rate of cell proliferation, increased risk of visceral metastasis and poor long-term survival in breast cancer. *Int. J. Cancer* **49**, 650–655 (1991).

108. Eroles, P., Bosch, A., Pérez-Fidalgo, J. A. & Lluch, A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat. Rev.* **38**, 698–707 (2012).
109. Sorlie, T. *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 8418–8423 (2003).
110. Staaf, J. *et al.* Identification of subtypes in human epidermal growth factor receptor 2–positive breast cancer reveals a gene signature prognostic of outcome. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **28**, 1813–1820 (2010).
111. Viani, G. A., Afonso, S. L., Stefano, E. J., De Fendi, L. I. & Soares, F. V. Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials. *BMC Cancer* **7**, 153 (2007).
112. Mittendorf, E. A. *et al.* Loss of HER2 amplification following trastuzumab-based neoadjuvant systemic therapy and survival outcomes. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **15**, 7381–7388 (2009).
113. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–752 (2000).
114. Perreard, L. *et al.* Classification and risk stratification of invasive breast carcinomas using a real-time quantitative RT-PCR assay. *Breast Cancer Res.* **8**, R23 (2006).
115. Peppercorn, J., Perou, C. M. & Carey, L. A. Molecular subtypes in breast cancer evaluation and management: divide and conquer. *Cancer Invest.* **26**, 1–10 (2008).
116. Rakha, E. A., El-Sayed, M. E., Reis-Filho, J. & Ellis, I. O. Patho-biological aspects of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **113**, 411–422 (2009).
117. Livasy, C. A. *et al.* Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **19**, 264–271 (2006).
118. Joensuu, H. & Gligorov, J. Adjuvant treatments for triple-negative breast cancers. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **23 Suppl 6**, vi40–45 (2012).
119. de Ruijter, T. C., Veeck, J., de Hoon, J. P. J., van Engeland, M. & Tjan-Heijnen, V. C. Characteristics of triple-negative breast cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **137**, 183–192 (2011).
120. Prat, A. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res. BCR* **12**, R68 (2010).

121. Herschkowitz, J. I. *et al.* Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.* **8**, R76 (2007).
122. Prat, A. & Perou, C. M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol. Oncol.* **5**, 5–23 (2011).
123. Cheang, M. C. U. *et al.* Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **14**, 1368–1376 (2008).
124. Rakha, E. A. *et al.* Are triple-negative tumours and basal-like breast cancer synonymous? *Breast Cancer Res. BCR* **9**, 404 (2007).
125. Sørli, T. Introducing Molecular Subtyping of Breast Cancer Into the Clinic? *J. Clin. Oncol.* **27**, 1153–1154 (2009).
126. Mustacchi, G. & De Laurentiis, M. The role of taxanes in triple-negative breast cancer: literature review. *Drug Des. Devel. Ther.* **9**, 4303–4318 (2015).
127. Burstein, H. J. *et al.* Estimating the benefits of therapy for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Consensus Guidelines for the primary therapy of early breast cancer 2019. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **30**, 1541–1557 (2019).
128. Frank, G. A., Danilova, N. V., Andreeva, I. I. & Nefedova, N. A. [WHO classification of tumors of the breast, 2012]. *Arkh. Patol.* **75**, 53–63 (2013).
129. Lehmann, B. D. *et al.* Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J. Clin. Invest.* **121**, 2750–2767 (2011).
130. Diaz, L. K., Cryns, V. L., Symmans, W. F. & Sneige, N. Triple negative breast carcinoma and the basal phenotype: from expression profiling to clinical practice. *Adv. Anat. Pathol.* **14**, 419–430 (2007).
131. Böcker, W. *et al.* Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new cell biological concept. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **82**, 737–746 (2002).
132. Subtyping of Triple-Negative Breast Cancer: Implications for Therapy - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25043972/>.
133. Prat, A. *et al.* Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. *The Oncologist* **18**, 123–133 (2013).

134. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–752 (2000).
135. Agoff, S. N., Swanson, P. E., Linden, H., Hawes, S. E. & Lawton, T. J. Androgen receptor expression in estrogen receptor-negative breast cancer. Immunohistochemical, clinical, and prognostic associations. *Am. J. Clin. Pathol.* **120**, 725–731 (2003).
136. Bhattarai, S. *et al.* Prognostic Role of Androgen Receptor in Triple Negative Breast Cancer: A Multi-Institutional Study. *Cancers* **11**, (2019).
137. Lehmann, B. D. *et al.* Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PloS One* **11**, e0157368 (2016).
138. Burstein, M. D. *et al.* Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **21**, 1688–1698 (2015).
139. Da Silva, L. & Lakhani, S. R. Pathology of hereditary breast cancer. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **23 Suppl 2**, S46-51 (2010).
140. Jézéquel, P. *et al.* Gene-expression molecular subtyping of triple-negative breast cancer tumours: importance of immune response. *Breast Cancer Res. BCR* **17**, (2015).
141. Wang, D.-Y., Jiang, Z., Ben-David, Y., Woodgett, J. R. & Zacksenhaus, E. Molecular stratification within triple-negative breast cancer subtypes. *Sci. Rep.* **9**, (2019).
142. Zhang, L. *et al.* Enhanced Autophagy reveals vulnerability of P-gp mediated Epirubicin Resistance in Triple Negative Breast Cancer Cells. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* **21**, 473–488 (2016).
143. Pascual, T. *et al.* 378 - Response to Neoadjuvant Therapy and Disease Free Survival and Overall Survival in Patients with Triple-Negative Breast Cancer (TNBC): Single Center Experience. *Ann. Oncol.* **23**, ix134 (2012).
144. Liedtke, C. *et al.* Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **26**, 1275–1281 (2008).
145. Masuda, H. *et al.* Differential Response to Neoadjuvant Chemotherapy Among 7 Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes. *Clin. Cancer Res.* **19**, 5533–5540 (2013).
146. Gonzalez-Angulo, A. M. *et al.* Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **17**, 1082–1089 (2011).

147. Loi, S. *et al.* Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **25**, 1544–1550 (2014).
148. Adams, S. *et al.* Phase 2 study of pembrolizumab (pembro) monotherapy for previously treated metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC): KEYNOTE-086 cohort A. *J. Clin. Oncol.* **35**, 1008–1008 (2017).
149. Bardia, A. *et al.* Efficacy and Safety of Anti-Trop-2 Antibody Drug Conjugate Sacituzumab Govitecan (IMMU-132) in Heavily Pretreated Patients With Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **35**, 2141–2148 (2017).
150. Updated Phase I Data for Ladiratuzumab Vedotin in Patients with Triple Negative Breast Cancer » ADC Review. *ADC Review* <https://www.adcreview.com/news/updated-phase-data-ladiratuzumab-vedotin-patients-triple-negative-breast-cancer/> (2017).
151. Kim, S.-B. *et al.* Ipatasertib plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel as first-line therapy for metastatic triple-negative breast cancer (LOTUS): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* **18**, 1360–1372 (2017).
152. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* **69**, 89–95 (2001).
153. Biomarkers In Risk Assessment: Validity And Validation (EHC 222, 2001). <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.htm>.
154. Molecular Signatures Associated with HCV-Induced Hepatocellular Carcinoma and Liver Metastasis. <https://journals-plos-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0056153>.
155. Gupta, S. *et al.* Prioritization of anticancer drugs against a cancer using genomic features of cancer cells: A step towards personalized medicine. *Sci. Rep.* **6**, 23857 (2016).
156. Modur, V., Hailman, E. & Barrett, J. C. Evidence-based laboratory medicine in oncology drug development: from biomarkers to diagnostics. *Clin. Chem.* **59**, 102–109 (2013).
157. Sneha, P. & Doss, C. G. P. Molecular Dynamics: New Frontier in Personalized Medicine. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **102**, 181–224 (2016).

158. Brenner, D. E. & Hawk, E. Trials and Tribulations of Interrogating Biomarkers to Define Efficacy of Cancer Risk Reductive Interventions. *Cancer Prev. Res. (Phila. Pa.)* **6**, 71–73 (2013).
159. Lin, K., Lipsitz, R., Miller, T., Janakiraman, S. & U.S. Preventive Services Task Force. Benefits and harms of prostate-specific antigen screening for prostate cancer: an evidence update for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann. Intern. Med.* **149**, 192–199 (2008).
160. Weigelt, B., Peterse, J. L. & van't Veer, L. J. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 591–602 (2005).
161. Henry, N. L. & Hayes, D. F. Cancer biomarkers. *Mol. Oncol.* **6**, 140–146 (2012).
162. Kaurah, P. *et al.* Founder and recurrent CDH1 mutations in families with hereditary diffuse gastric cancer. *JAMA* **297**, 2360–2372 (2007).
163. Marsh, D. J. *et al.* PTEN mutation spectrum and genotype-phenotype correlations in Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome suggest a single entity with Cowden syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 1461–1472 (1999).
164. Hearle, N. *et al.* Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **12**, 3209–3215 (2006).
165. Shi, Y., Jin, J., Ji, W. & Guan, X. Therapeutic landscape in mutational triple negative breast cancer. *Mol. Cancer* **17**, 99 (2018).
166. Novelli, G., Ciccacci, C., Borgiani, P., Papaluca Amati, M. & Abadie, E. Genetic tests and genomic biomarkers: regulation, qualification and validation. *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* **5**, 149–154 (2008).
167. Turnbull, C. *et al.* Genome-wide association study identifies five new breast cancer susceptibility loci. *Nat. Genet.* **42**, 504–507 (2010).
168. Easton, D. F. *et al.* Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* **447**, 1087–1093 (2007).
169. Saravia, C. H. *et al.* Patterns of Mutation Enrichment in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *Clin. Med. Insights Oncol.* **13**, (2019).
170. Cai, F. F. *et al.* Mutations of mitochondrial DNA as potential biomarkers in breast cancer. *Anticancer Res.* **31**, 4267–4271 (2011).

171. Ghaffarpour, M. *et al.* The mitochondrial ATPase6 gene is more susceptible to mutation than the ATPase8 gene in breast cancer patients. *Cancer Cell Int.* **14**, 21 (2014).
172. Marabelle, A. *et al.* 1192O - Association of tumour mutational burden with outcomes in patients with select advanced solid tumours treated with pembrolizumab in KEYNOTE-158. *Ann. Oncol.* **30**, v477–v478 (2019).
173. Muller, P. A. J., Vousden, K. H. & Norman, J. C. p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion. *J. Cell Biol.* **192**, 209–218 (2011).
174. Girardini, J. E. *et al.* A Pin1/Mutant p53 Axis Promotes Aggressiveness in Breast Cancer. *Cancer Cell* **20**, 79–91 (2011).
175. Walerych, D., Napoli, M., Collavin, L. & Del Sal, G. The rebel angel: mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer. *Carcinogenesis* **33**, 2007–2017 (2012).
176. Koboldt, D. C. *et al.* Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **490**, 61–70 (2012).
177. Bae, S. Y., Lee, J. E., Lee, S. K. & Nam, S. J. Immunohistochemical status of p53 as prognostic factor in patients with node negative triple-negative breast cancer. *Ann. Oncol.* **27**, vi52 (2016).
178. Kim, J.-Y. *et al.* Association between Mutation and Expression of TP53 as a Potential Prognostic Marker of Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res. Treat. Off. J. Korean Cancer Assoc.* **48**, 1338–1350 (2016).
179. di Gennaro, A. *et al.* A p53/miR-30a/ZEB2 axis controls triple negative breast cancer aggressiveness. *Cell Death Differ.* **25**, 2165–2180 (2018).
180. Duffy, M. J., Synnott, N. C. & Crown, J. Mutant p53 in breast cancer: potential as a therapeutic target and biomarker. *Breast Cancer Res. Treat.* **170**, 213–219 (2018).
181. Synnott, N. C. *et al.* Mutant p53 as a therapeutic target for the treatment of triple-negative breast cancer: Preclinical investigation with the anti-p53 drug, PK11007. *Cancer Lett.* **414**, 99–106 (2018).
182. Synnott, N. C., O’Connell, D., Crown, J. & Duffy, M. J. COTI-2 reactivates mutant p53 and inhibits growth of triple-negative breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **179**, 47–56 (2020).
183. Camorani, S. *et al.* Inhibition of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Homing Towards Triple-Negative Breast Cancer Microenvironment Using an Anti-PDGFR β Aptamer. *Theranostics* **7**, 3595–3607 (2017).

184. Denard, B., Jiang, S., Peng, Y. & Ye, J. CREB3L1 as a potential biomarker predicting response of triple negative breast cancer to doxorubicin-based chemotherapy. *BMC Cancer* **18**, (2018).
185. Na, H. *et al.* High expression of NR1D1 is associated with good prognosis in triple-negative breast cancer patients treated with chemotherapy. *Breast Cancer Res. BCR* **21**, (2019).
186. Shi, D. *et al.* TLR5: A prognostic and monitoring indicator for triple-negative breast cancer. *Cell Death Dis.* **10**, (2019).
187. Pang, K. *et al.* RNF208, an estrogen-inducible E3 ligase, targets soluble Vimentin to suppress metastasis in triple-negative breast cancers. *Nat. Commun.* **10**, (2019).
188. Rhodes, L. V. *et al.* Regulation of triple-negative breast cancer cell metastasis by the tumor-suppressor liver kinase B1. *Oncogenesis* **4**, e168 (2015).
189. Song, H. *et al.* VGLL4 interacts with STAT3 to function as a tumor suppressor in triple-negative breast cancer. *Exp. Mol. Med.* **51**, 1–13 (2019).
190. Ou-Yang, F. *et al.* Identification of CHD4- β 1 integrin axis as a prognostic marker in triple-negative breast cancer using next-generation sequencing and bioinformatics. *Life Sci.* **238**, 116963 (2019).
191. M-Rabet, M., Bertucci, F., Birnbaum, D. & Lopez, M. Nectine-4 - Un biomarqueur pronostique et une cible thérapeutique potentielle dans le cancer du sein triple-négatif. *médecine/sciences* **33**, 936–939 (2017).
192. Yang, C. *et al.* Ki67 targeted strategies for cancer therapy. *Clin. Transl. Oncol. Off. Publ. Fed. Span. Oncol. Soc. Natl. Cancer Inst. Mex.* **20**, 570–575 (2018).
193. Viale, G. *et al.* Predictive Value of Tumor Ki-67 Expression in Two Randomized Trials of Adjuvant Chemoendocrine Therapy for Node-Negative Breast Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **100**, 207–212 (2008).
194. Nakagawa, M. *et al.* Expression of p53, Ki-67, E-cadherin, N-cadherin and TOP2A in triple-negative breast cancer. *Anticancer Res.* **31**, 2389–2393 (2011).
195. Keam, B. *et al.* Ki-67 can be used for further classification of triple negative breast cancer into two subtypes with different response and prognosis. *Breast Cancer Res. BCR* **13**, R22 (2011).
196. Munzone, E. *et al.* Prognostic significance of Ki-67 in node-negative (pN0), triple-negative (TN) breast cancer (BC). *J. Clin. Oncol.* **29**, 1056–1056 (2011).

197. Achen, M. G. & Stacker, S. A. The vascular endothelial growth factor family; proteins which guide the development of the vasculature. *Int. J. Exp. Pathol.* **79**, 255–265 (1998).
198. Toi, M., Matsumoto, T. & Bando, H. Vascular endothelial growth factor: its prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Lancet Oncol.* **2**, 667–673 (2001).
199. Gasparini, G. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *The Oncologist* **5 Suppl 1**, 37–44 (2000).
200. Chanana, P. *et al.* Significance of serum vascular endothelial growth factor and cancer antigen 15.3 in patients with triple negative breast cancer. *J. Radiother. Pract.* **13**, 60–67 (2014).
201. Taha, F. M. *et al.* Prognostic value of serum vascular endothelial growth factor in Egyptian females with metastatic triple negative breast cancer. *Clin. Biochem.* **42**, 1420–1426 (2009).
202. Saloustros, E. *et al.* Weekly Paclitaxel and Carboplatin Plus Bevacizumab as First-Line Treatment of Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. A Multicenter Phase II Trial by the Hellenic Oncology Research Group. *Clin. Breast Cancer* **18**, 88–94 (2018).
203. Miles, D. W. *et al.* Phase III Study of Bevacizumab Plus Docetaxel Compared With Placebo Plus Docetaxel for the First-Line Treatment of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Negative Metastatic Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* **28**, 3239–3247 (2010).
204. Jansson, S. *et al.* The three receptor tyrosine kinases c-KIT, VEGFR2 and PDGFR α , closely spaced at 4q12, show increased protein expression in triple-negative breast cancer. *PLoS One* **9**, e102176 (2014).
205. Thike, A. A. *et al.* Triple Negative Breast Cancer: Outcome Correlation With Immunohistochemical Detection of Basal Markers. *Am. J. Surg. Pathol.* **34**, 956–964 (2010).
206. Kanapathy Pillai, S. K., Tay, A., Nair, S. & Leong, C.-O. Triple-negative breast cancer is associated with EGFR, CK5/6 and c-KIT expression in Malaysian women. *BMC Clin. Pathol.* **12**, 18 (2012).
207. Luo, Y., Huang, W., Zhang, H. & Liu, G. Prognostic significance of CD117 expression and TP53 missense mutations in triple-negative breast cancer. *Oncol. Lett.* **15**, 6161–6170 (2018).
208. Rijn, M. van de *et al.* Expression of Cytokeratins 17 and 5 Identifies a Group of Breast Carcinomas with Poor Clinical Outcome. *Am. J. Pathol.* **161**, 1991–1996 (2002).
209. Inanc, M. *et al.* Cytokeratin 5/6, c-Met expressions, and PTEN loss prognostic indicators in triple-negative breast cancer. *Med. Oncol.* **31**, 801 (2013).

210. Park, H. S. *et al.* High EGFR gene copy number predicts poor outcome in triple-negative breast cancer. *Mod. Pathol.* **27**, 1212–1222 (2014).
211. Viale, G. *et al.* Invasive ductal carcinoma of the breast with the ‘triple-negative’ phenotype: prognostic implications of EGFR immunoreactivity. *Breast Cancer Res. Treat.* **116**, 317–328 (2009).
212. Carey, L. A. *et al.* TBCRC 001: randomized phase II study of cetuximab in combination with carboplatin in stage IV triple-negative breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **30**, 2615–2623 (2012).
213. Baselga, J. *et al.* Randomized phase II study of the anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab with cisplatin versus cisplatin alone in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **31**, 2586–2592 (2013).
214. Gasparini, P. *et al.* Androgen Receptor Status Is a Prognostic Marker in Non-Basal Triple Negative Breast Cancers and Determines Novel Therapeutic Options. *PLOS ONE* **9**, e88525 (2014).
215. Sutton, L. M. *et al.* Decreased Androgen Receptor Expression Is Associated With Distant Metastases in Patients With Androgen Receptor-Expressing Triple-Negative Breast Carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.* **138**, 511–516 (2012).
216. Hilborn, E. *et al.* Androgen receptor expression predicts beneficial tamoxifen response in oestrogen receptor- α -negative breast cancer. *Br. J. Cancer* **114**, 248–255 (2016).
217. Ichikawa, H. *et al.* Proteomic and meta-transcriptomic study on lymph node metastasis in gastric cancer. *EuPA Open Proteomics* **3**, 183–194 (2014).
218. Uemura, N. & Kondo, T. Current status of predictive biomarkers for neoadjuvant therapy in esophageal cancer. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* **5**, 322–334 (2014).
219. Duffy, D. M. J., Shering, S., Sherry, F., McDermott, E. & O’Higgins, N. CA 15–3: A Prognostic Marker in Breast Cancer: *Int. J. Biol. Markers* (2018) doi:10.1177/172460080001500410.
220. Duffy, M. J. *et al.* High Preoperative CA 15-3 Concentrations Predict Adverse Outcome in Node-Negative and Node-Positive Breast Cancer: Study of 600 Patients with Histologically Confirmed Breast Cancer. *Clin. Chem.* **50**, 559–563 (2004).
221. Duffy, M. J. CA 15-3 and related mucins as circulating markers in breast cancer. *Ann. Clin. Biochem.* **36 (Pt 5)**, 579–586 (1999).

222. Jablonska, K. *et al.* Prolactin-induced protein as a potential therapy response marker of adjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Am. J. Cancer Res.* **6**, 878–893 (2016).
223. Cheng, Q. *et al.* Amplification and high-level expression of heat shock protein 90 marks aggressive phenotypes of human epidermal growth factor receptor 2 negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* **14**, R62 (2012).
224. Pick, E. *et al.* High HSP90 Expression Is Associated with Decreased Survival in Breast Cancer. *Cancer Res.* **67**, 2932–2937 (2007).
225. Shen, M. *et al.* Tinag11 Suppresses Triple-Negative Breast Cancer Progression and Metastasis by Simultaneously Inhibiting Integrin/FAK and EGFR Signaling. *Cancer Cell* **35**, 64-80.e7 (2019).
226. Li, M., Li, A., Zhou, S., Lv, H. & Yang, W. SPAG5 upregulation contributes to enhanced c-MYC transcriptional activity via interaction with c-MYC binding protein in triple-negative breast cancer. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* **12**, (2019).
227. Giudici, F. *et al.* Elevated levels of eEF1A2 protein expression in triple negative breast cancer relate with poor prognosis. *PLoS ONE* **14**, (2019).
228. Qian, Q., Lv, Y. & Li, P. SOCS1 is associated with clinical progression and acts as an oncogenic role in triple-negative breast cancer. *IUBMB Life* **70**, 320–327 (2018).
229. Pedersen, M. H. *et al.* CYPOR is a novel and independent prognostic biomarker of recurrence-free survival in triple-negative breast cancer patients. *Int. J. Cancer* **144**, 631–640 (2019).
230. Hoque, M. O. *et al.* Detection of aberrant methylation of four genes in plasma DNA for the detection of breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **24**, 4262–4269 (2006).
231. Lee, J. T. Epigenetic Regulation by Long Noncoding RNAs. *Science* **338**, 1435–1439 (2012).
232. Kopp, F. & Mendell, J. T. Functional classification and experimental dissection of long noncoding RNAs. *Cell* **172**, 393–407 (2018).
233. Hanly, D. J., Esteller, M. & Berdasco, M. Interplay between long non-coding RNAs and epigenetic machinery: emerging targets in cancer? *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **373**, (2018).
234. Geisler, S. & Coller, J. RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 699–712 (2013).
235. Marchese, F. P., Raimondi, I. & Huarte, M. The multidimensional mechanisms of long noncoding RNA function. *Genome Biol.* **18**, 206 (2017).

236. Li, X.-X. *et al.* Identification of Long Noncoding RNAs as Predictors of Survival in Triple-Negative Breast Cancer Based on Network Analysis. *BioMed Res. Int.* **2020**, (2020).
237. Rodríguez Bautista, R. *et al.* Long non-coding RNAs: implications in targeted diagnoses, prognosis, and improved therapeutic strategies in human non- and triple-negative breast cancer. *Clin. Epigenetics* **10**, (2018).
238. Yang, F. *et al.* Co-expression networks revealed potential core lncRNAs in the triple-negative breast cancer. *Gene* **591**, 471–477 (2016).
239. Xu, Z. *et al.* Long non-coding RNA CCAT2 promotes oncogenesis in triple-negative breast cancer by regulating stemness of cancer cells. *Pharmacol. Res.* **152**, 104628 (2020).
240. Wang, X., Li, S., Xiao, H. & Deng, X. Serum lncRNA TINCR Serve as a Novel Biomarker for Predicting the Prognosis in Triple-Negative Breast Cancer. *Technol. Cancer Res. Treat.* **19**, 1533033820965574 (2020).
241. Li, P., Zhou, B., Lv, Y. & Qian, Q. LncRNA HEIH regulates cell proliferation and apoptosis through miR-4458/SOCS1 axis in triple-negative breast cancer. *Hum. Cell* **32**, 522–528 (2019).
242. Luo, L. *et al.* LINC01638 lncRNA activates MTDH-Twist1 signaling by preventing SPOP-mediated c-Myc degradation in triple-negative breast cancer. *Oncogene* **37**, 6166–6179 (2018).
243. Shi, F., Xiao, F., Ding, P., Qin, H. & Huang, R. Long Noncoding RNA Highly Up-regulated in Liver Cancer Predicts Unfavorable Outcome and Regulates Metastasis by MMPs in Triple-negative Breast Cancer. *Arch. Med. Res.* **47**, 446–453 (2016).
244. Li, S. *et al.* Long noncoding RNA GAS5 suppresses triple negative breast cancer progression through inhibition of proliferation and invasion by competitively binding miR-196a-5p. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* **104**, 451–457 (2018).
245. Song, X., Liu, Z. & Yu, Z. LncRNA NEF is downregulated in triple negative breast cancer and correlated with poor prognosis. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **51**, 386–392 (2019).
246. Youness, R. A. *et al.* The long noncoding RNA sONE represses triple-negative breast cancer aggressiveness through inducing the expression of miR-34a, miR-15a, miR-16, and let-7a. *J. Cell. Physiol.* **234**, 20286–20297 (2019).
247. Pritchard, C. C., Cheng, H. H. & Tewari, M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 358–369 (2012).

248. Piasecka, D., Braun, M., Kordek, R., Sadej, R. & Romanska, H. MicroRNAs in regulation of triple-negative breast cancer progression. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **144**, 1401–1411 (2018).
249. Camps, C. *et al.* hsa-miR-210 Is induced by hypoxia and is an independent prognostic factor in breast cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **14**, 1340–1348 (2008).
250. Zhou, M. *et al.* MicroRNA-125b confers the resistance of breast cancer cells to paclitaxel through suppression of pro-apoptotic Bcl-2 antagonist killer 1 (Bak1) expression. *J. Biol. Chem.* **285**, 21496–21507 (2010).
251. Tang, Q., Ouyang, H., He, D., Yu, C. & Tang, G. MicroRNA-based potential diagnostic, prognostic and therapeutic applications in triple-negative breast cancer. *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.* **47**, 2800–2809 (2019).
252. Ding, L. *et al.* MicroRNAs Involved in Carcinogenesis, Prognosis, Therapeutic Resistance, and Applications in Human Triple-Negative Breast Cancer. *Cells* **8**, (2019).
253. Bao, C. *et al.* Exploring specific prognostic biomarkers in triple-negative breast cancer. *Cell Death Dis.* **10**, (2019).
254. Wong, C. K. *et al.* MicroRNA-4417 is a tumor suppressor and prognostic biomarker for triple-negative breast cancer. *Cancer Biol. Ther.* **20**, 1113–1120 (2019).
255. Lee, S. J. *et al.* MicroRNA-137 Inhibits Cancer Progression by Targeting Del-1 in Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
256. Shin, V. Y., Siu, J. M., Cheuk, I., Ng, E. K. O. & Kwong, A. Circulating cell-free miRNAs as biomarker for triple-negative breast cancer. *Br. J. Cancer* **112**, 1751–1759 (2015).
257. Xu, X. *et al.* MiR-148a functions to suppress metastasis and serves as a prognostic indicator in triple-negative breast cancer. *Oncotarget* **7**, 20381–20394 (2016).
258. MacKenzie, T. A. *et al.* Stromal expression of miR-21 identifies high-risk group in triple-negative breast cancer. *Am. J. Pathol.* **184**, 3217–3225 (2014).
259. Li, H.-Y. *et al.* miR-105/93-3p promotes chemoresistance and circulating miR-105/93-3p acts as a diagnostic biomarker for triple negative breast cancer. *Breast Cancer Res. BCR* **19**, (2017).
260. Svoboda, M. *et al.* MiR-34b is associated with clinical outcome in triple-negative breast cancer patients. *Diagn. Pathol.* **7**, 31 (2012).

261. Yu, H. *et al.* Upregulation of miR-301a correlates with poor prognosis in triple-negative breast cancer. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* **31**, 283 (2014).
262. Cao, Z.-G. *et al.* Positive expression of miR-361-5p indicates better prognosis for breast cancer patients. *J. Thorac. Dis.* **8**, 1772–1779 (2016).
263. Jang, M. H., Kim, H. J., Gwak, J. M., Chung, Y. R. & Park, S. Y. Prognostic value of microRNA-9 and microRNA-155 expression in triple-negative breast cancer. *Hum. Pathol.* **68**, 69–78 (2017).
264. Vo, J. N. *et al.* The Landscape of Circular RNA in Cancer. *Cell* **176**, 869–881.e13 (2019).
265. Zheng, X. *et al.* The circRNA circSEPT9 mediated by E2F1 and EIF4A3 facilitates the carcinogenesis and development of triple-negative breast cancer. *Mol. Cancer* **19**, 73 (2020).
266. Liu, P. *et al.* circGNB1 Facilitates Triple-Negative Breast Cancer Progression by Regulating miR-141-5p-IGF1R Axis. *Front. Genet.* **11**, 193 (2020).
267. Zou, Y. *et al.* circRAD18 sponges miR-208a/3164 to promote triple-negative breast cancer progression through regulating IGF1 and FGF2 expression. *Carcinogenesis* **40**, 1469–1479 (2019).
268. Xing, L. *et al.* The circRNA circIFI30 promotes progression of triple-negative breast cancer and correlates with prognosis. *Aging* **12**, 10983–11003 (2020).
269. Chen, B. *et al.* circEPSTI1 as a Prognostic Marker and Mediator of Triple-Negative Breast Cancer Progression. *Theranostics* **8**, 4003–4015 (2018).
270. He, R. *et al.* circGFRA1 and GFRA1 act as ceRNAs in triple negative breast cancer by regulating miR-34a. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **36**, (2017).
271. Wang, S. *et al.* Upregulation of circ-UBAP2 predicts poor prognosis and promotes triple-negative breast cancer progression through the miR-661/MTA1 pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **505**, 996–1002 (2018).
272. Sang, M. *et al.* Circular RNA ciRS-7 Maintains Metastatic Phenotypes as a ceRNA of miR-1299 to Target MMPs. *Mol. Cancer Res.* **16**, 1665–1675 (2018).
273. Zeng, K. *et al.* The pro-metastasis effect of circANKS1B in breast cancer. *Mol. Cancer* **17**, (2018).
274. Wang, S. T. *et al.* Circ-ITCH regulates triple-negative breast cancer progression through the Wnt/ β -catenin pathway. *Neoplasma* **66**, 232–239 (2019).
275. Ye, F. *et al.* circFBXW7 Inhibits Malignant Progression by Sponging miR-197-3p and Encoding a 185-aa Protein in Triple-Negative Breast Cancer. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **18**, 88–98 (2019).

276. Xiao, W. *et al.* CircAHNAK1 inhibits proliferation and metastasis of triple-negative breast cancer by modulating miR-421 and RASA1. *Aging* **11**, 12043–12056 (2019).
277. Xu, J.-Z. *et al.* circTADA2As suppress breast cancer progression and metastasis via targeting miR-203a-3p/SOCS3 axis. *Cell Death Dis.* **10**, (2019).
278. Ayob, A. Z. & Ramasamy, T. S. Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. *J. Biomed. Sci.* **25**, (2018).
279. Adamczyk, A. *et al.* CD44/CD24 as potential prognostic markers in node-positive invasive ductal breast cancer patients treated with adjuvant chemotherapy. *J. Mol. Histol.* **45**, 35–45 (2014).
280. Lin, Y., Zhong, Y., Guan, H., Zhang, X. & Sun, Q. CD44+/CD24- phenotype contributes to malignant relapse following surgical resection and chemotherapy in patients with invasive ductal carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **31**, 59 (2012).
281. Zou, W. *et al.* Association of CD44 and CD24 phenotype with lymph node metastasis and survival in triple-negative breast cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **13**, 1008–1016 (2020).
282. Wang, H. *et al.* CD44+/CD24- phenotype predicts a poor prognosis in triple-negative breast cancer. *Oncol. Lett.* **14**, 5890–5898 (2017).
283. O’Conor, C. J., Chen, T., González, I., Cao, D. & Peng, Y. Cancer stem cells in triple-negative breast cancer: a potential target and prognostic marker. *Biomark. Med.* **12**, 813–820 (2018).
284. Abraham, B. K. *et al.* Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **11**, 1154–1159 (2005).
285. Collina, F. *et al.* Prognostic Value of Cancer Stem Cells Markers in Triple-Negative Breast Cancer. *BioMed Research International* vol. 2015 e158682 <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/158682/> (2015).
286. Ma, F. *et al.* Aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) expression is an independent prognostic factor in triple negative breast cancer (TNBC). *Medicine (Baltimore)* **96**, (2017).
287. Ohi, Y. *et al.* Aldehyde dehydrogenase 1 expression predicts poor prognosis in triple-negative breast cancer. *Histopathology* **59**, 776–780 (2011).

288. De Brot, M., Rocha, R. M., Soares, F. A. & Gobbi, H. Prognostic impact of the cancer stem cell related markers ALDH1 and EZH2 in triple negative and basal-like breast cancers. *Pathology (Phila.)* **44**, 303–312 (2012).
289. Panigoro, S. S., Kurnia, D., Kurnia, A., Haryono, S. J. & Albar, Z. A. ALDH1 Cancer Stem Cell Marker as a Prognostic Factor in Triple-Negative Breast Cancer. *Int. J. Surg. Oncol.* **2020**, (2020).
290. Wang, D. *et al.* Identification of multipotent mammary stem cells by protein C receptor expression. *Nature* **517**, 81–84 (2015).
291. Wang, D. *et al.* Protein C receptor is a therapeutic stem cell target in a distinct group of breast cancers. *Cell Res.* **29**, 832–845 (2019).
292. Yang Fu, N. & Visvader, J. E. Halting triple negative breast cancer by targeting PROCR. *Cell Res.* **29**, 875–876 (2019).
293. Rajabi, H. & Kufe, D. MUC1-C Oncoprotein Integrates a Program of EMT, Epigenetic Reprogramming and Immune Evasion in Human Carcinomas. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **1868**, 117–122 (2017).
294. Hata, T. *et al.* MUC1-C ACTIVATES THE NuRD COMPLEX TO DRIVE DEDIFFERENTIATION OF TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER CELLS. *Cancer Res.* **79**, 5711–5722 (2019).
295. Kennedy, S. Proteomic profiling from human samples: the body fluid alternative. *Toxicol. Lett.* **120**, 379–384 (2001).
296. Mitchell, P. S. *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 10513–10518 (2008).
297. Cuk, K. *et al.* Circulating microRNAs in plasma as early detection markers for breast cancer. *Int. J. Cancer* **132**, 1602–1612 (2013).
298. Cristofanilli, M. *et al.* Circulating Tumor Cells: A Novel Prognostic Factor for Newly Diagnosed Metastatic Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* **23**, 1420–1430 (2005).
299. Dawson, S.-J. *et al.* Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1213261> <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1213261> (2013) doi:10.1056/NEJMoa1213261.
300. Lu, Y. *et al.* The significant prognostic value of circulating tumor cells in triple-negative breast cancer: a meta-analysis. *Oncotarget* **7**, 37361–37369 (2016).

301. Liu, X. *et al.* Combined peripheral natural killer cell and circulating tumor cell enumeration enhance prognostic efficiency in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *Chin. J. Cancer Res.* **30**, 315–326 (2018).
302. Vishnoi, M. *et al.* The identification of a TNBC liver metastasis gene signature by sequential CTC-xenograft modeling. *Mol. Oncol.* **13**, 1913–1926 (2019).
303. Schwarzenbach, H., Hoon, D. S. B. & Pantel, K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 426–437 (2011).
304. Madic, J. *et al.* Circulating tumor DNA and circulating tumor cells in metastatic triple negative breast cancer patients. *Int. J. Cancer* **136**, 2158–2165 (2015).
305. Saliou, A. *et al.* Circulating tumor DNA for triple-negative breast cancer diagnosis and treatment decisions. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **16**, 39–50 (2016).
306. American Society of Clinical Oncology 2007 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Breast Cancer. *J. Oncol. Pract.* **3**, 336–339 (2007).
307. Paik, S. Development and clinical utility of a 21-gene recurrence score prognostic assay in patients with early breast cancer treated with tamoxifen. *The Oncologist* **12**, 631–635 (2007).
308. Habel, L. A. *et al.* A population-based study of tumor gene expression and risk of breast cancer death among lymph node-negative patients. *Breast Cancer Res. BCR* **8**, R25 (2006).
309. Paik, S. *et al.* Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **24**, 3726–3734 (2006).
310. Arnedos, M. & Gligorov, J. St Gallen International Consensus Guidelines in early breast cancer: experts to prevent patients' overtreatment and breaking the bank? *Ann. Oncol.* **30**, 1533–1535 (2019).
311. Tian, S. *et al.* Biological functions of the genes in the mammaprint breast cancer profile reflect the hallmarks of cancer. *Biomark. Insights* **5**, 129–138 (2010).
312. Ingoldsby, H. Identification of prognostic targets in breast cancer using immunohistochemical and in situ hybridisation methodologies. in (2011).
313. Kittaneh, M., Montero, A. J. & Glück, S. Molecular Profiling for Breast Cancer: A Comprehensive Review: *Biomark. Cancer* (2013) doi:10.4137/BIC.S9455.

314. Esteva, F. J. *et al.* Prognostic role of a multigene reverse transcriptase-PCR assay in patients with node-negative breast cancer not receiving adjuvant systemic therapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **11**, 3315–3319 (2005).
315. Knauer, M. *et al.* The predictive value of the 70-gene signature for adjuvant chemotherapy in early breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **120**, 655–661 (2010).
316. Müller, B. M. *et al.* The EndoPredict Gene-Expression Assay in Clinical Practice - Performance and Impact on Clinical Decisions. *PLoS One* **8**, e68252 (2013).
317. Denkert, C. *et al.* Decentral gene expression analysis for ER+/Her2- breast cancer: results of a proficiency testing program for the EndoPredict assay. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* **460**, 251–259 (2012).
318. Kronenwett, R. *et al.* Decentral gene expression analysis: analytical validation of the Endopredict genomic multianalyte breast cancer prognosis test. *BMC Cancer* **12**, 456 (2012).
319. Filipits, M. *et al.* A New Molecular Predictor of Distant Recurrence in ER-Positive, HER2-Negative Breast Cancer Adds Independent Information to Conventional Clinical Risk Factors. *Clin. Cancer Res.* **17**, 6012–6020 (2011).
320. Dubsky, P. *et al.* The EndoPredict score provides prognostic information on late distant metastases in ER+/HER2- breast cancer patients. *Br. J. Cancer* **109**, 2959–2964 (2013).
321. Goldhirsch, A. *et al.* Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann. Oncol.* **24**, 2206–2223 (2013).
322. Parker, J. S. *et al.* Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **27**, 1160–1167 (2009).
323. Chia, S. K. *et al.* A 50-Gene Intrinsic Subtype Classifier for Prognosis and Prediction of Benefit from Adjuvant Tamoxifen. *Clin. Cancer Res.* **18**, 4465–4472 (2012).
324. Romero, A. *et al.* Assignment of tumor subtype by genomic testing and pathologic-based approximations: implications on patient's management and therapy selection. *Clin. Transl. Oncol. Off. Publ. Fed. Span. Oncol. Soc. Natl. Cancer Inst. Mex.* **16**, 386–394 (2014).
325. Bastien, R. R. *et al.* PAM50 Breast Cancer Subtyping by RT-qPCR and Concordance with Standard Clinical Molecular Markers. *BMC Med. Genomics* **5**, 44 (2012).

326. Nielsen, T. O. *et al.* A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **16**, 5222–5232 (2010).
327. Santuario-Facio, S. K. *et al.* A New Gene Expression Signature for Triple-Negative Breast Cancer Using Frozen Fresh Tissue before Neoadjuvant Chemotherapy. *Mol. Med.* **23**, 101–111 (2017).
328. Rody, A. *et al.* A clinically relevant gene signature in triple negative and basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res.* **13**, R97 (2011).
329. Zhong, G., Lou, W., Shen, Q., Yu, K. & Zheng, Y. Identification of key genes as potential biomarkers for triple-negative breast cancer using integrating genomics analysis. *Mol. Med. Rep.* **21**, 557–566 (2020).
330. Lv, X. *et al.* Identification of potential key genes and pathways predicting pathogenesis and prognosis for triple-negative breast cancer. *Cancer Cell Int.* **19**, 172 (2019).
331. Alsaleem, M. A. *et al.* A novel prognostic two-gene signature for triple negative breast cancer. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **33**, 2208–2220 (2020).
332. Xie, G. *et al.* Integration of whole-genome sequencing and functional screening identifies a prognostic signature for lung metastasis in triple-negative breast cancer. *Int. J. Cancer* **145**, 2850–2860 (2019).
333. Tan, W. *et al.* Construction of an immune-related genes nomogram for the preoperative prediction of axillary lymph node metastasis in triple-negative breast cancer. *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.* **48**, 288–297 (2020).
334. Criscitiello, C. *et al.* A gene signature to predict high tumor-infiltrating lymphocytes after neoadjuvant chemotherapy and outcome in patients with triple-negative breast cancer. *Ann. Oncol.* **29**, 162–169 (2018).
335. Hong, H.-C. *et al.* A panel of eight microRNAs is a good predictive parameter for triple-negative breast cancer relapse. *Theranostics* **10**, 8771–8789 (2020).
336. Wu, X., Ding, M. & Lin, J. Three-microRNA expression signature predicts survival in triple-negative breast cancer. *Oncol. Lett.* **19**, 301–308 (2020).
337. Kleivi Sahlberg, K. *et al.* A serum microRNA signature predicts tumor relapse and survival in triple-negative breast cancer patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **21**, 1207–1214 (2015).

338. Fleisher, B., Clarke, C. & Ait-Oudhia, S. Current advances in biomarkers for targeted therapy in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Targets Ther.* **8**, 183–197 (2016).
339. Phillips, L., Gill, A. J. & Baxter, R. C. Novel Prognostic Markers in Triple-Negative Breast Cancer Discovered by MALDI-Mass Spectrometry Imaging. *Front. Oncol.* **9**, (2019).
340. Pineda, B. *et al.* A two-gene epigenetic signature for the prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer patients. *Clin. Epigenetics* **11**, (2019).
341. Jiang, Y.-Z. *et al.* Transcriptome Analysis of Triple-Negative Breast Cancer Reveals an Integrated mRNA-lncRNA Signature with Predictive and Prognostic Value. *Cancer Res.* **76**, 2105–2114 (2016).
342. Collignon, J., Lousberg, L., Schroeder, H. & Jerusalem, G. Triple-negative breast cancer: treatment challenges and solutions. *Breast Cancer Targets Ther.* **8**, 93–107 (2016).
343. O'Reilly, E. A. *et al.* The fate of chemoresistance in triple negative breast cancer (TNBC). *BBA Clin.* **3**, 257–275 (2015).
344. Schneider, B. P. *et al.* Triple-negative breast cancer: risk factors to potential targets. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **14**, 8010–8018 (2008).
345. Maffei, R. *et al.* Increased SHISA3 expression characterizes chronic lymphocytic leukemia patients sensitive to lenalidomide. *Leuk. Lymphoma* **59**, 423–433 (2018).
346. Chen, C.-C. *et al.* Shisa3 Is Associated with Prolonged Survival through Promoting β -Catenin Degradation in Lung Cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **190**, 433–444 (2014).
347. Chen, C.-C. *et al.* DNA hypermethylation of SHISA3 as a mechanism of gene inactivation and as a novel prognostic biomarker in colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **33**, e14532–e14532 (2015).
348. Tsai, M.-H. *et al.* DNA Hypermethylation of SHISA3 in Colorectal Cancer: An Independent Predictor of Poor Prognosis. *Ann. Surg. Oncol.* **22**, 1481–1489 (2015).
349. Zhang, J. *et al.* Hypermethylation of SHISA3 Promotes Nasopharyngeal Carcinoma Metastasis by Reducing SGSM1 Stability. *Cancer Res.* **79**, 747–759 (2019).
350. Shahzad, N. *et al.* SHISA3, an antagonist of the Wnt/ β -catenin signaling, is epigenetically silenced and its ectopic expression suppresses growth in breast cancer. *PLoS One* **15**, e0236192 (2020).

