



HAL
open science

CD24 : un nouvel acteur de la résistance aux traitements et de la plasticité cellulaire dans les cancers du sein

Isaline Bontemps

► **To cite this version:**

Isaline Bontemps. CD24 : un nouvel acteur de la résistance aux traitements et de la plasticité cellulaire dans les cancers du sein. Cancer. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASL082 . tel-03847872

HAL Id: tel-03847872

<https://theses.hal.science/tel-03847872v1>

Submitted on 10 Nov 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.

CD24 : un nouvel acteur de la résistance
aux traitements et de la plasticité cellulaire
dans les cancers du sein

*CD24: a new player in treatment resistance and
cell plasticity in breast cancer*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°582 : oncologie : biologie-médecine-santé (CBMS).
Spécialité de doctorat: aspects moléculaires et cellulaires de la biologie.
Unité de recherche : CEA, DRF, IBFJ, IRCM, Laboratoire de Cancérologie Expérimentale
Université Paris-Saclay, 92265 Fontenay-aux-Roses Cedex, France.
Réfèrent : Faculté de médecine.

**Thèse présentée et soutenue à Fontenay-aux-Roses,
le 25/10/2021, par**

Isaline BONTEMPS

Composition du Jury

Pr. Pierre VERRELLE Institut Curie – Université Clermont- Auvergne	Président du jury
Dr. Chann LAGADEC INSERM – Université de Lille	Rapporteur & Examineur
Dr. Anna CAMPALANS CEA – Université Paris Saclay	Examinatrice
Dr. Virginie FIRLEJ INSERM – Université Paris Est Créteil	Examinatrice
Dr. Agnès FRANCOIS IRSN – Université Paris Saclay	Examinatrice

Direction de la thèse

Dr. Jérôme LEBEAU CEA – Université Paris Saclay	Directeur de thèse
---	--------------------

« Étudie, non pas pour savoir plus, mais pour savoir mieux. »

– Sénèque –

Remerciements

Cette thèse est le fruit de trois années de travail menées au sein du Laboratoire de Cancérologie Expérimentale du Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives de Fontenay-Aux-Roses. Elle a été financée par une bourse du CEA après avoir été sélectionnée par la Commission de sélection des thèses.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury, les rapporteurs **Chann LAGADEC** et **Pierre VERELLE** ainsi que les examinatrices **Anna CAMPALANS**, **Virginie FIRLEJ** et **Agnès FRANCOIS**, pour la considération qu'ils ont portée à mon travail, pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture et l'évaluation de ce manuscrit, ainsi que pour leurs conseils.

Je souhaite ensuite remercier **Sylvie CHEVILLARD** pour son accueil pendant ces (presque) 3 années, pour sa confiance, pour sa force et pour ses encouragements si précieux.

J'aimerais particulièrement remercier mon directeur de thèse **Jérôme LEBEAU** qui est parvenu à me supporter pendant ces trois années (et inversement). Merci pour la légitimité et la confiance que tu m'as accordées dès le premier jour de ma thèse. Merci aussi pour ton soutien, ta compréhension et ta patience. Malgré nos chamailleries, nous avons formé un bon duo. Je me sens désormais prête à poursuivre ma carrière plus sereinement grâce à toi.

Je tiens à remercier tous ceux qui ont pris le temps de me former tant à la théorie qu'à la pratique de la Recherche. J'ai une pensée particulière pour mon référent de Master 2, **Hichem MERTANI**, qui m'a soutenue et poussé à aller au bout de mon cursus. Merci également à **Julien CHERFIS-VICINI** et **Charlène ILTIS** pour leur accueil, leur bonne humeur et leur bienveillance lors de mon stage dans leur équipe de l'IRCAN. Un grand merci à **Eric GILSON** de m'avoir donné l'opportunité de faire partie de son équipe depuis Nice jusqu'à Shanghai.

Merci aux membres de l'IRCM qui m'ont apporté leur aide pour ce travail : **Nathalie** pour le tri cellulaire, **Jan** pour la cytométrie, **Véronique** pour les irradiations, **Lamya** et **Thierry** pour la microscopie et à tous ceux qui m'ont aidé au détour d'un couloir ou d'une conversation.

Je tiens également à remercier les thésards de l'institut pour leur sympathie et pour nos échanges passionnés sur la science ou sur le foot. Un merci particulier à **Mérick** pour son soutien sans faille et pour tous ces moments remplis de joie, de bienveillance et de bières que nous avons partagés. J'espère que ce ne sont que les présages d'une très longue et belle amitié.

Je tiens à remercier tous mes collègues du LCE, **François, Kathy, Jozo, Marie-Noëlle, Nurià, Nicolas, Capucine, Anna, Anne-Marie**, qui m'ont fait grandir scientifiquement, culturellement et humainement. Un merci spécial à mes partenaires de bad, **Céline, Cécile** et **Emmanuelle** ces séances de sport intensif, ou plutôt de rigolade, vont me manquer. Votre gentillesse, générosité, malice et professionnalisme ont rendu ces trois années au laboratoire d'autant plus agréables.

Je souhaite remercier affectueusement mes « co-thésards », « copain-lègues » ou autres dénominations encore plus gênantes, **Dan** et **Marie**. Merci Dan d'avoir su m'écouter, m'encourager et merci aussi d'avoir pallier à mon manque de culture sur certaines sagas cinématographiques. Merci Marie pour ton aide si précieuse, pour ta justesse, pour ton honnêteté, pour tes coups de pression au moment opportun, pour ton réconfort. Merci d'être tout simplement toi, un exemple de femme qui inspire ma vie professionnelle et personnelle.

Je tiens à remercier mes chers ami(e)s de Lyon (pour la plupart de Communay) et de Paris (que j'ai connus à Lyon, mon esprit chauvin ressort même ici) : merci à **Laury** et **Clémentine** pour leur soutien, leurs encouragements quotidiens, leur compréhension face à mes absences et leur affection si précieuse, vous êtes des amies extraordinaires. Merci à **Karine**, mon amie depuis et pour toujours, tes messages et conseils ont su me remobiliser quand nécessaire. Merci à **Loïc** d'être venu me voir si souvent ici pendant ces années, j'ai découvert tant de lieux, salle de concert et spectacle de cirque grâce à toi, tu as rempli mon séjour parisien de souvenirs féériques. Merci à **Cécile, Clémentine** et **Marion** sans qui je n'aurais pas atteint cet accomplissement.

Merci à mes « vieux » amis du collège : merci à **Boris** et **Alexandre** pour ces débats passionnés qui ont duré des heures, merci d'avoir toujours répondu présent et d'avoir enrichi mon quotidien. **Rémi**, mon meilleur ami, tu es mon pilier depuis si longtemps que je n'aurai pu imaginer mon aventure sans toi. Un merci particulier à **Florian** : merci pour ton écoute, ton aide, ta patience, j'ai parfois l'impression que tu me connais mieux que je ne me connais, je te dois beaucoup.

Merci à **Isaac, Audrey** et **Anthony**, mes amis « parisiens ». Je ne me suis jamais sentie seule dans cette grande ville grâce à vous, votre soutien et présence m'ont permis de surmonter des moments de doute.

Un grand merci à celle que je n'ai pas vue pendant ces trois années et qui me manque tellement, ma **Florence**. Même depuis l'autre bout du monde, tu me donnes une force incroyable. Je suis si fière d'être l'amie de la courageuse, positive, déterminée et passionnée personne que tu es.

J'ai une pensée vraiment particulière à mes plus grands et seuls fans, ma famille. Merci à mes colocataires, mon frère **Jehan** et ma belle-sœur **Cindy** : vous avez rendu cette fin de thèse plus agréable

à vivre grâce à vos conseils et vos petits plats. Merci mon frère de montrer un tel exemple de courage et de témérité, je n'aurai pu rêver meilleur grand frère. Merci à ma grand-mère adorée, ma Mamé **Jeanne**. La fierté que je vois dans tes yeux est une source d'énergie sans faille. Merci à mon tonton **Christophe** et ma tata **Martine**, je sais que je pourrai toujours compter sur vous. Tonton, tu es un homme extraordinaire qui me rassure et m'accompagne à chaque moment de ma vie, merci pour tout ce que tu fais pour moi à chaque instant. Merci à mes grands-parents, **Vincent et Marie**, d'avoir été présents pour nous. Merci à mon père **Frédéric** de m'avoir transmis sa mémoire, sa culture et sa hargne. Enfin, merci à ma mère, **Catherine**, qui est la femme la plus forte, la plus patiente, la plus à l'écoute et la plus merveilleuse que je connaisse. L'amour et l'aide que tu m'apportes à chaque instant m'ont permis d'aller au bout de mon rêve et d'enfin devenir chercheur en cancérologie. Je crois que tu ne peux imaginer à quel point je suis fière de t'avoir pour mère.

Et enfin, il est temps de remercier celui qui partage ma vie depuis deux ans, mon amoureux, mon chéri, mon **Alexandre**. J'ai encore du mal à réaliser la chance que j'ai d'être aimée par une personne aussi douce, attentionnée, curieuse, aventureuse et belle que toi. Cet accomplissement professionnel prend une toute autre saveur à tes côtés. Je t'aime.

Je dédie cette thèse à mon grand-père, François Zaragoza.

Table des matières

Remerciements	5
Table des matières	11
Liste des abréviations	13
Liste des figures	13
Liste des tableaux	17
Introduction bibliographique	21
I. CANCERS DU SEIN : CLASSIFICATIONS ET TRAITEMENTS.....	21
1. <i>Développement et classification des cancers du sein</i>	22
1.1 Glande mammaire saine.....	22
1.2 Développement tumoral.....	24
1.3 Classification des cancers du sein.....	24
1.3.1 Classification histologique	24
1.3.2 Classification clinique	27
1.3.3 Biomarqueurs des cancers du sein	27
1.3.4 Classification moléculaire	28
1.3.5 Prédispositions génétiques et signatures génomiques	30
2. <i>Traitements des cancers du sein</i>	32
2.1 Chirurgie.....	32
2.2 Radiothérapie.....	33
2.3 Chimiothérapie.....	34
2.4 Hormonothérapie.....	35
2.5 Thérapies ciblées.....	36
II. HETEROGENEITE TUMORALE DES CANCERS DU SEIN.....	39
1. <i>Propriétés distinctives des cellules cancéreuses</i>	40
2. <i>Dissémination métastatique</i>	45
2.1 La cascade métastatique.....	46
2.2 Transition épithélio-mésenchymateuse et propriétés des cellules impliquées.....	47
3. <i>Hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle des cancers du sein</i>	54
3.1 Modèle stochastique d'évolution clonale.....	54
3.2 Modèle hiérarchique ou le concept des « cellules souches cancéreuses »	55
3.3 Modèle hiérarchique d'évolution clonale.....	56

3.4	Les cellules souches cancéreuses.....	57
4.	<i>Lien entre les CSCs et la TEM dans les cancers du sein</i>	59
4.1	Population CD44+/CD24-/low.....	60
4.2	Caractéristiques et rôles de CD24 dans les cancers du sein.....	61
III.	MECANISMES DE RESISTANCE A LA RADIO- ET CHIMIOTHERAPIE DES CELLULES CANCEREUSES MAMMAIRES.....	67
1.	<i>Mécanismes majeurs de résistance</i>	69
2.	<i>Implication des espèces réactives de l'oxygène dans la résistance</i>	76
2.1	Production et élimination des ROS.....	77
2.2	ROS et cancers.....	79
2.3	ROS et résistance thérapeutique.....	81
	Objectifs généraux	83
	<hr/>	
	Résultats	87
	<hr/>	
I.	PREMIERE PARTIE : ARTICLE	87
	LA PERTE D'EXPRESSION DE CD24 INDUIT UNE RESISTANCE AUX RADIATIONS ET AUX DROGUES ANTICANCEREUSES, EN MODIFIANT LES PROPRIETES SOUCHES ET EN REPRIMANT L'ACTIVITE MITOCHONDRIALE DANS LES CELLULES DE CANCER DU SEIN.....	87
II.	DEUXIEME PARTIE : ETUDE TRANSCRIPTOMIQUE ET MOTILITE.....	132
1.	<i>Objectifs</i>	133
2.	<i>Matériels et méthodes</i>	134
2.1	Etude transcriptomique.....	134
2.2	Analyse des transcrits RT-qPCR.....	134
2.3	Migration cellulaire.....	135
3.	<i>Résultats</i>	136
3.1	Exploration des mécanismes moléculaires et cellulaires associés à la modulation de CD24...136	
3.1.1	Analyse descriptive des résultats obtenus par l'étude du transcriptome	136
3.1.2	Analyse exploratoire des données.....	141
3.1.3	Analyse de l'expression des protéines de jonction intercellulaire	145
3.2	Etude de la migration cellulaire.....	149
4.	<i>Discussion</i>	154
	Conclusions et perspectives	163
	<hr/>	
	Annexes	167
	<hr/>	
	Références bibliographiques	181
	<hr/>	

Liste des abréviations

5-FU	5-Fluorouracile	CSEM	Cellules Souches Épithéliales Mammaires Normales
ACP	Analyse en composantes principales	CSTN	Cancer Du Sein Triple Négatifs
ADN	Acide désoxyribonucléique	CTC	Cellules Tumorales Circulantes
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire	CXCR4	C-X-C Récepteur De Chimiokines De Type 4
ALDH	Aldéhyde déshydrogénase	DAMP	Motifs Moléculaires Associés Aux Dégâts
AR	Récepteur à l'androgène	DAO	Défenses Antioxydantes
ARNm	Acide ribonucléique messenger	DNMT	Adn Méthyltransférases
ATG	Autophagy related genes	E	Epithéliale
ATM	Ataxia telangiectasia mutated	EGF	Epidermal Growth Factor
ATP	Adénosine-Triphosphate	EGFR	Récepteur Au Facteur De Croissance De L'Épiderme
ATR	Ataxie télangiectasie liée à Rad3	ER	Récepteur À L'Oestrogène
BER	Réparation par excision de base	FAK	Kinase D'Adhésion Focale
BRCA1	BReast Cancer 1	FBP1	Fructose-1,6- Bisphosphatase
BRCA2	BReast Cancer 2	FDR	False Discovery Rate
CAT	Catalase	GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inosito
CCIS	Carcinome canalaire <i>in situ</i>	GPx	Glutathione Peroxydase
CD24	Cluster de différenciation 24	GSEA	Gene-Set Enrichment Analysis
CD44	Cluster de différenciation 44	GSR	Glutathione Réductase
CDB	Cassures double brins	GST	Glutathion S-Transférase
CDK4	Cyclin dependent kinase 4	Gy	Gray
CDK6	Cyclin dependent kinase 6	HCA	Hyperplasie Canalaire Atypique
CIC	Carcinomes invasifs canalaire	HDAC	Histone Déacétylase
CIL	Carcinomes invasifs lobulaire	HER2	Human Epidermal Receptor 2
CL	Claudin-low	HH	Hedgehog
CLIS	Carcinome lobulaire <i>in situ</i>	HLA	Hyperplasie Lobulaire Atypique
CMI	Chaine mammaire interne	HMGB1	High Mobility Group Box 1)
CSC	Cellules souches cancéreuses		
CSCM	Cellules Souches Cancéreuses Mammaires		

HMLE	Human Mammary Epithelial Cells	PARP	Poly(Adp-Ribose) Polymerase
HMOX1	Hème Oxygénase 1	PCR	Polymerase Chaîne Reactive
HR	Recepteurs Hormonaux	PD-1	Programmed Cell Death 1
HSA	Heat-Stable Antigen	PDGFR-β	Récepteur Au Facteur De Croissance Dérivé Des Plaquettes
HT	Hormonothérapie	PD-L1	Programmed Death-Ligand 1
IGF-1R	Récepteur Au Facteur De Croissance Analogue À L'Insuline	PEM	Plasticité Épithélio-Mésenchymateuse
IHC	Immunohistochimie	PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
IPA	Ingenuity Pathway Analysis	PMN	Niche Pré-Métastatique
IV	Intraveineuse	PR	Récepteur À La Progestérone
JENH	Jonction D'Extrémités Non Homologues	PTEN	Phosphatase And Tensin Homolog
KEGG	Kyoto Encyclopedia Of Genes And Genomes)	RB	Retinoblastoma-Associated
LH-RH	Hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires	RE	Réticulum Endoplasmique
M	Mésenchymateuse	RH	Recombinaison Homologue
MAPK	Mitogen-Activated Kinases)	RI	Rayonnements Ionisants
mApo	Moléculaire Apocrine	RIN	Rna Integrity Number
MBC	Cancers Du Sein Métaplasiques	RMA	Robust Multiarray Average
MDR	Multi-Drug Resistance	ROS	Reactive Oxygen Species
MEC	Matrice Extracellulaire	RT	Radiothérapie
miARNs	Microarns	SBR	Scarff, Bloom Et Richardson
MMP1	Métalloprotéinase 1	SEM	Erreur Standard À La Moyenne
MRP	Multi-Drug resistance protien	SERD	Selective Estrogen Receptor Degrader
MSD	Déplacement Quadratique Moyen	SERM	Selective Estrogen Receptor Modulators
mTOR	Mechanistic Target Of Rapamycin	SHH	Sonic Hedgehog
NAC	N-Acétyl-Cystéine	SOD	Superoxyde Dismutase
NER	Réparation Par Excision De Nucléotides	SOD2	Manganèse Superoxyde Dismutase
NF2	Neurofibromatose De Type Ii	TCTP	Translational Controlled Tumour Protein
NF-κB	Nuclear Factor-Kappa B	TEM	Transition Épithélio-Mésenchymateuse
NK	Lymphocytes Cytotoxiques Naturels	TGFβ	Transforming Growth Factor Beta
		tGL1	Glioma-Associated Oncogene Homolog 1

TLR	Toll-Like Receptor		
TME	Transition Mésoenchymo- Épithéliale	UTDL	Unités Terminales Ducto- Lobulaires
TP53	Tumor Protein 53	VEGF	Facteur De Croissance De L'Endothélium Vasculaire
TRAIL	Tumor-Necrosis-Factor Related Apoptosis Inducing Ligand	VEGF-A	Facteur De Croissance De L'Endothélium Vasculaire-A
Trx	Thioredoxine		
TSA	Trichostatin A	XIAP	Protéine Inhibitrice De L'Apoptose Liée Au Chromosome X
TSP-1	Thrombospondine 1		

Liste des figures

Figure 1 - Anatomie du sein normal	23
Figure 2 - Progression morpho-histologique des cancers du sein	25
Figure 3 - Classification morpho-histologique des cancers du sein	26
Figure 4- Classification moléculaire des cancers du sein	29
Figure 5 - Propriétés distinctives des cellules cancéreuses.....	40
Figure 6- Schéma de la cascade métastatique	47
Figure 7 - Les différentes classes de la TEM.....	48
Figure 8 - Les différents acteurs de l'initiation et de la régulation de la TEM.....	50
Figure 9 - Schéma et tableau des marqueurs et propriétés des cellules associées à la TEM	52
Figure 10 - Autres propriétés de cellules générées par la TEM.....	53
Figure 11 - Modèle stochastique d'évolution clonale du développement tumoral.....	55
Figure 12 - Modèle hiérarchique du développement tumoral	56
Figure 13 - Modèle hiérarchique d'évolution clonale du développement tumoral.....	56
Figure 14 - Structure et séquence de la protéine CD24	62
Figure 15 - Régulation transcriptionnelle de CD24	63
Figure 16 - Les dommages à l'ADN et leur mécanisme de réparation associé	72
Figure 17 - Schéma simplifié des interactions entre les principales espèces réactives oxygénées	77
Figure 18 - Les différents acteurs de la production et l'élimination des ROS	78
Figure 19 — Effets cellulaires des ROS en fonction de leur niveau intracellulaire.....	80
Figure 20 - Schéma récapitulatif de mon projet de thèse.....	85
Figure 21 - Contrôle de la qualité des échantillons en utilisant l'analyse en composants principales	137
Figure 22 - Analyse descriptive des différences d'expression génique obtenus à l'aide du logiciel TAC4.0	138
Figure 23 - Schéma des différentes jonctions intercellulaires des cellules épithéliales	146
Figure 24 – Evaluation de l'expression relative des ARNm des protéines de jonctions cellulaires dans les cellules HMLE.E, HMLE.E_CD24 ⁺ , HMLE.E_CD24 ^c et HMLE.M.....	148
Figure 25 - Images en contraste de phase des cellules à 0h et 6h après traçage avec le plugin MTrackJ du logiciel ImageJ réalisé à l'aide du microscope de l'IncuCyte® (Sartorius).....	150
Figure 26 - Diagramme des trajectoires émanant de l'origine illustrant le trajet total des cellules...	151
Figure 27 - Déplacement moyen quadratique des cellules HMLE.E, HMLE.E_CD24 ⁺ , HMLE.E_CD24 ^c	152

Figure 28 - Etude de la vitesse et de la persistance de déplacement des cellules HMLE.E, HMLE.E_CD24-, HMLE.E_CD24 ^c	153
Figure 29 - Schéma bilan des principaux résultats obtenus au cours de ma thèse	165

Liste des tableaux

Tableau 1 - Scores pTNM de 8ème édition et stades cliniques associés.	27
Tableau 2 - Principaux mécanismes d'action des molécules chimiothérapeutiques cytotoxiques.....	35
Tableau 3 - Mécanismes d'action des différentes thérapies ciblées utilisées dans le traitement des cancers du sein	37
Tableau 4 - Marqueurs des cellules souches cancéreuses mammaires.....	58
Tableau 5 - Liste non exhaustive des mécanismes d'échappement à la mort cellulaire programmée	74
Tableau 6 - Classification des traitements anticancéreux en fonction de leur rôle direct et indirect sur la régulation du niveau de ROS	81
Tableau 7 - Liste des références des amorces et sondes utilisées en RT-qPCR	135
Tableau 8 - Liste des dix gènes présentant la plus grande différence d'expression entre au moins un des trois types cellulaires.	139
Tableau 9 - Liste des 30 gènes les plus significativement différentiels entre les groupes de cellules HMLE.E et HMLE.E_CD24 ⁻	140
Tableau 10 - Voies canoniques les plus significatives comprenant les gènes différentiels entre HMLE.E et HMLE.E_CD24 ⁻	142
Tableau 11 - Liste des principales fonctions moléculaires et cellulaires discordantes entre les cellules HMLE.E et HMLE.E_CD24 ⁻	143
Tableau 12 – Liste des états et processus biologiques spécifiques des cellules HMLE.E et HMLE.E_CD24 ⁻ identifiés à partir de la base de données « Hallmarks ».....	144
Tableau 13 - Liste des états et processus biologiques spécifiques des cellules HMLE.E et HMLE.E_CD24 ⁻ identifiés à partir de la base de données « KEGG ».....	145
Tableau 14 - Liste des gènes relatifs aux jonctions intercellulaires	147
Tableau 15 - Expression des facteurs régulateurs du maintien des phénotypes E/M dans les cellules HMLE.E, HMLE.M et HMLE.E_CD24 ⁻	156

Introduction bibliographique

I. Cancers du sein : Classifications et traitements

<i>1. Développement et classification des cancers du sein</i>	22
1.1 Glande mammaire saine	22
1.2 Développement tumoral	24
1.3 Classification des cancers du sein.....	24
1.3.1 Classification histologique	24
1.3.2 Classification clinique	27
1.3.3 Biomarqueurs des cancers du sein	27
1.3.4 Classification moléculaire	28
1.3.5 Prédispositions génétiques et signatures génomiques	30
<i>2. Traitements des cancers du sein</i>	32
2.1 Chirurgie.....	32
2.2 Radiothérapie.....	33
2.3 Chimiothérapie.....	34
2.4 Hormonothérapie.....	35
2.5 Thérapies ciblées	36

Un quart des nouveaux cas de cancers diagnostiqués chez la femme dans le monde en 2020 était un cancer du sein (Sung et al., 2021). Il s'agit du cancer avec le plus fort taux d'incidence dans de nombreux pays développés et ce taux ne cesse d'augmenter dans les pays en voie de développement. En 2018, plus de 58 000 cas de cancer du sein ont été diagnostiqués en France métropolitaine.

Grâce à la recherche scientifique et aux améliorations des techniques de dépistage, la prise en charge thérapeutique et la survie s'améliorent pour les patientes. En effet, la survie nette à 5 ans est passée de 80% pour les femmes diagnostiquées entre 1989 et 1993 à 87% pour celles diagnostiquées entre 2010 et 2015 (INCa, 2018). Malgré ces avancées non négligeables, le cancer du sein cause toujours le plus grand nombre de décès chez la femme en 2020 avec un pourcentage de 15,5% des décès féminins par cancer dans le monde (Sung et al., 2021). Il est donc essentiel d'améliorer nos connaissances sur les mécanismes de résistance aux traitements ainsi que sur la caractérisation de ces cellules résistantes qui sont à l'origine des récives et des métastases, phénomènes qui provoquent, à terme, le décès de l'individu.

1. Développement et classification des cancers du sein

1.1 Glande mammaire saine

Afin de comprendre l'oncogenèse mammaire, il faut connaître l'organisation histologique et cytologique de l'épithélium mammaire normal.

La glande mammaire est formée de 15 à 20 lobes drainés par des canaux galactophores chargés de transporter le lait aux mamelons lors de la lactation (Figure 1). Les canaux galactophores se ramifient en petits canaux appelés canalicules qui se terminent au niveau des unités terminales ducto-lobulaires (UTDL) constituant la partie fonctionnelle et morphologique de la glande mammaire. Ces unités sont constituées d'une part des canalicules extra-lobulaires et d'autre part du lobule comprenant les canalicules intra-lobulaires et les acini assurant la synthèse du lait (Pinamonti and Zanconati, 2018).

L'organisation cellulaire de la glande mammaire comporte une couche interne de cellules épithéliales dites luminales car bordant la lumière du canal et une couche externe de cellules en contact avec la lame basale constituée de cellules présentant des caractéristiques de cellules souches et myoépithéliales (Boute, 2004). L'existence de cellules souches épithéliales mammaires normales (CSEMN) au sein de cet organe a été suggérée du fait du perpétuel remodelage et développement de la glande mammaire au cours de la vie d'une femme. Ces CSEMN sont décrites comme des cellules

possédant des propriétés d'auto-renouveau et de différenciation en cellules luminales et myoépithéliales (Polyak, 2007).

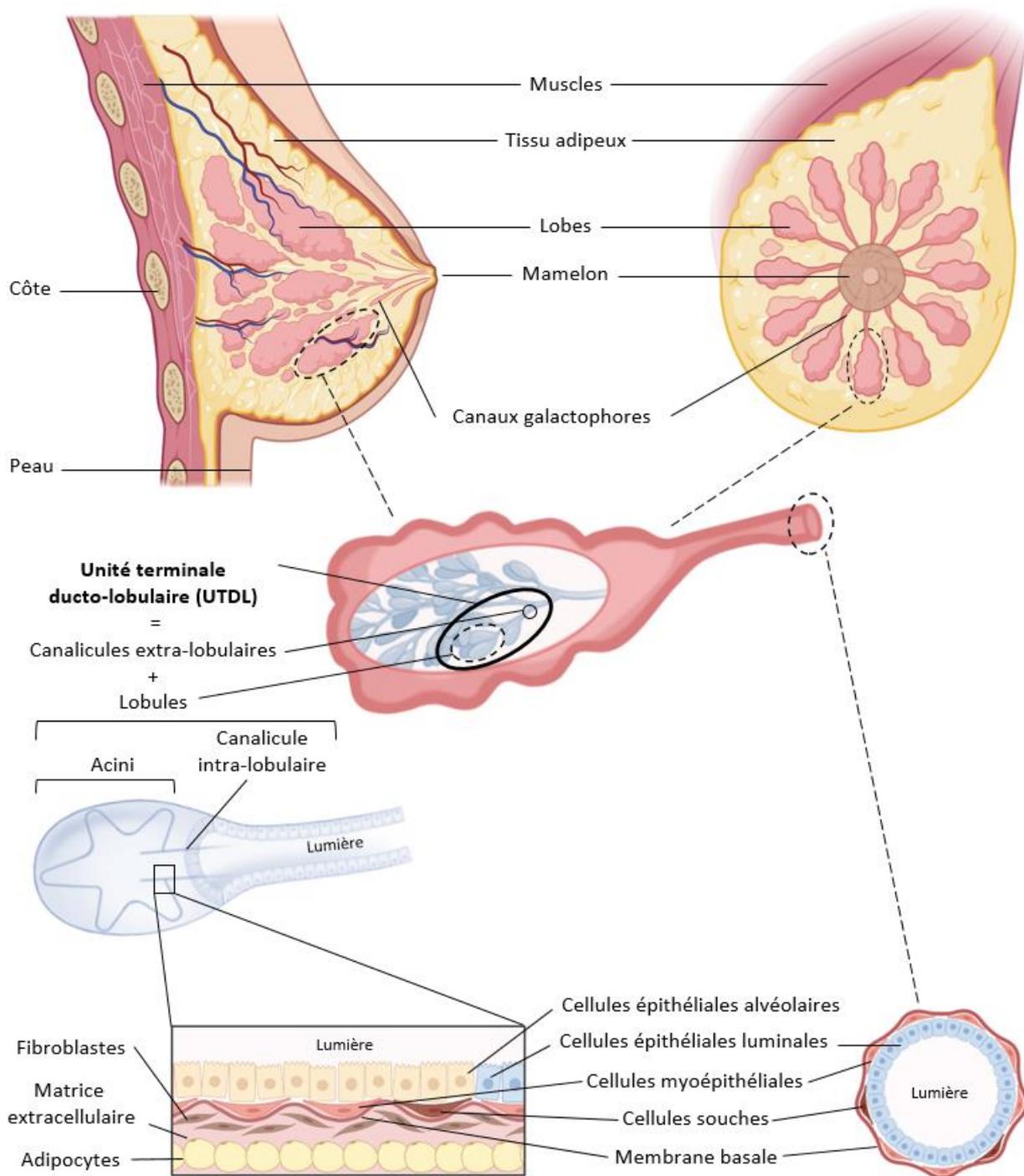


Figure 1 - Anatomie du sein normal

Schéma explicatif de l'anatomie du sein non pathologique depuis l'organisation de la glande mammaire jusqu'à la répartition cellulaire. Inspiré de « Goff and Danforth, 2021 » et réalisé sur BioRender.

1.2 Développement tumoral

Il n'existe pas un mais plusieurs types de cancers du sein et plusieurs classifications pour les décrire. Cette classification tend à s'homogénéiser afin d'assurer un traitement et un pronostic optimal.

On distingue deux grands types de cancer du sein différents en fonction des cellules touchées. A savoir les sarcomes qui sont des cancers des cellules du tissu de soutien du sein et les carcinomes qui sont des cancers des cellules épithéliales assurant la fonction de la glande mammaire. Les sarcomes mammaires sont extrêmement rares, inférieur à 1% des cancers du sein, et sont souvent des formes secondaires apparues suite à la radiothérapie du cancer primaire (Piperno-Neumann, 2013).

Les carcinomes représentent donc la grande majorité des cancers du sein et peuvent être classés en fonction du lieu d'apparition du cancer dans la glande c'est-à-dire soit au niveau du canal soit au niveau des lobules (Feng et al., 2018).

Nous nous sommes intéressés pour ce projet aux carcinomes mammaires c'est pourquoi je vais vous présenter ci-dessous les différentes classifications de ces cancers.

1.3 Classification des cancers du sein

Le cancer du sein est une maladie hétérogène présentant de nombreuses variations morphologiques et biologiques entraînant une variabilité de réponse aux traitements. La classification de ces cancers du sein est essentielle afin de permettre un diagnostic plus précis et de prédire le comportement de la tumeur face aux traitements (Tsang and Tse, 2019). Plusieurs classifications existent en fonctions de différents critères à savoir l'histologie des cellules, les caractéristiques cliniques des cancers mais aussi les spécificités moléculaires et génomiques des cellules cancéreuses.

1.3.1 Classification histologique

Cette classification est basée sur les données obtenues à partir de coupe de biopsies ou pièces chirurgicales colorées puis observées au microscope. Histologiquement, le développement d'un carcinome mammaire progresse à travers différents stades depuis l'hyperplasie des cellules épithéliales à l'intérieur de la lumière du canal ou du tubule jusqu'au carcinome *in situ* puis invasif (Figure 2) pouvant évoluer en cancer métastatique (Feng et al., 2018).

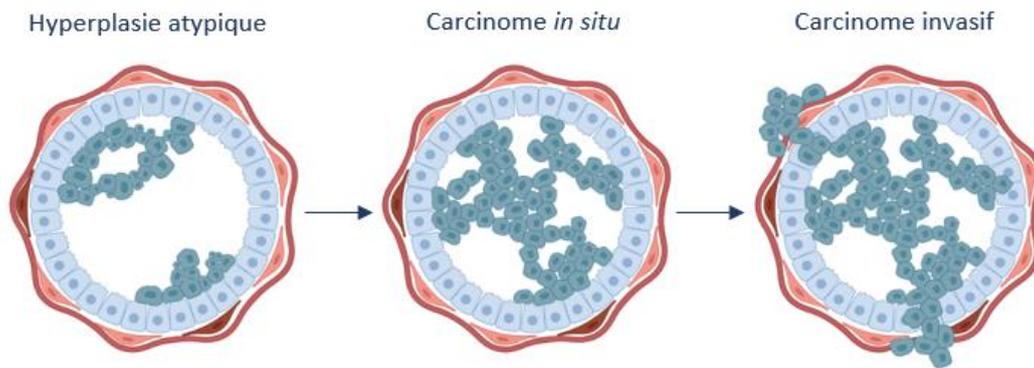


Figure 2 - Progression morpho-histologique des cancers du sein

Schéma des différents stades de progression morpho-histologique des cancers du sein réalisé sur Biorender.

- **Hyperplasie atypique** : il s'agit du stade qui fait le lien entre la glande mammaire saine et le carcinome *in situ*. L'hyperplasie atypique est une augmentation du nombre de cellules anormales dans un tissu (Figure 2). On distingue deux types d'hyperplasie dans le sein en fonction du lieu d'origine de l'hyper-prolifération cellulaire à savoir l'hyperplasie canalaire atypique (HCA) et l'hyperplasie lobulaire atypique (HLA). Les cellules de l'épithélium de la lumière du canal ou des acini des lobules vont proliférer anormalement créant des lésions dites précancéreuses (Myers and Walls, 2020). Ces lésions présentent un fort risque d'évoluer en cancer.
- **Carcinomes *in situ*** : il s'agit d'une prolifération de cellules tumorales parmi les cellules épithéliales normales. Cette prolifération se fait à l'intérieur de la lumière et sans franchissement de la membrane basale (Figure 2). Encore une fois, il existe deux types de carcinomes mammaires *in situ* en fonction de la localisation du développement du cancer. On distingue alors le carcinome lobulaire *in situ* (CLIS) et le carcinome canalaire *in situ* (CCIS) qui sont les plus fréquents (Malhotra et al., 2010). Le CCIS est quant à lui subdivisé en 5 sous-types architecturaux à savoir : comédo, cribriforme, micropapillaire, papillaire et solide (Figure 3).
- **Carcinomes invasifs** : ces carcinomes correspondent à une prolifération anormale de cellules tumorales traversant la membrane basale entraînant un envahissement du stroma et des tissus voisins. Les cancers invasifs canaux (CIC) sont les plus fréquents et sont divisés en 21 groupes en fonction du type cellulaire (carcinome apocrine), la quantité, le type et le lieu de la sécrétion (carcinome mucineux), les caractéristiques architecturales (carcinome papillaire, tubulaire et micropapillaire) et le profil immunohistochimique (carcinome neuroendocrine) (Makki, 2015). Les carcinomes invasifs lobulaires (CIL) constituent 5% à 15% des cancers invasifs et sont divisés en 5 sous-groupes différents à savoir le carcinome classique, le carcinome lobulaire pléomorphe, le carcinome histiocytoïde, le carcinome tubulo-lobulaire et le carcinome à cellules en bague à chaton (Makki, 2015) (Figure 3).

- **Carcinomes métastatiques** : il s'agit du stade auquel les cellules tumorales vont se disséminer dans la circulation entraînant une dispersion du cancer dans les ganglions et vers d'autres organes. Les sites préférentiels de ces métastases dans les cancers du sein sont les poumons, le foie, le cerveau et les os. Ces métastases peuvent être présentes dès le diagnostic ou apparaître longtemps après le premier traitement (Feng et al., 2018).

Tous les carcinomes invasifs peuvent être histologiquement gradés indépendamment de leur type histologique. Le système de gradation le plus employé est celui de Scarff, Bloom et Richardson (système SBR), modifié par Ellis et Elton (Elston and Ellis, 1991). Il est déterminé par l'évaluation d'un score allant de 1 à 3 pour les trois paramètres suivants (Mathieu, 2013) :

- **L'organisation architecturale** (agencement en tubes ou en travées) reflétant le degré de différenciation cellulaire
- **Le pléomorphisme du noyau**
- **L'activité mitotique** mesurée par le marqueur de prolifération Ki-67

Le grade 1, représentant le grade le plus bas, qualifie les tumeurs peu agressives possédant des cellules différenciées se divisant lentement. En revanche, le grade 3, qui est le plus élevé, décrit des tumeurs agressives avec des cellules peu différenciées proliférant rapidement (Tao et al., 2015).

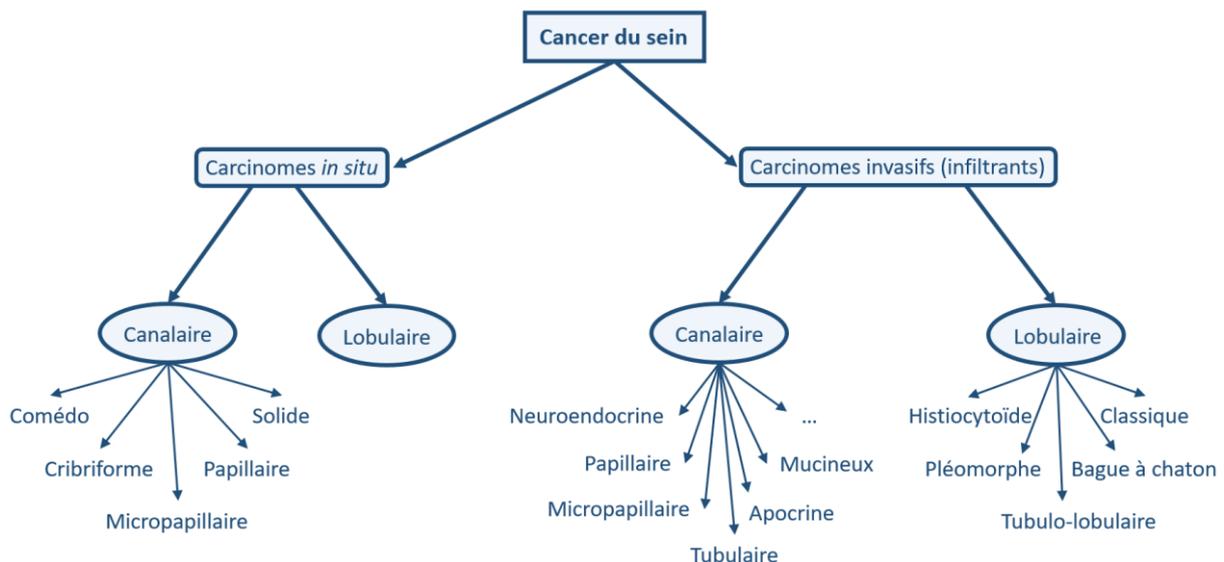


Figure 3 - Classification morpho-histologique des cancers du sein

Schéma de la classification morpho-histologique des cancers du sein, réalisé sur PowerPoint, adapté de « Malhotra et al., 2010 ».

1.3.2 Classification clinique

La classification post-opératoire « pTNM » est une évaluation clinique macroscopique du cancer du sein au moment de sa découverte. Cette classification internationale permet aux praticiens d'évaluer le pronostic, l'évolution du cancer et d'adapter les traitements. Cette classification repose sur l'appréciation de trois critères :

- **T** : décrit la taille de la tumeur primitive et sa nature infiltrante ou *in situ*.
- **N** : décrit la localisation et le degré d'envahissement ganglionnaire.
- **M** : indique la présence ou l'absence de métastases.

Chaque critère est associé à un score qui, en combinaison, permet d'établir une gradation clinique de 0 à IV conditionnant la stratégie thérapeutique (Tableau 1).

			Stade			
T	T0	Tumeur primitive non palpable	0	T0	N0	M0
	T1	Tumeur ≤ 2 cm dans sa plus grande dimension	I	T1	N0	M0
	T2	Tumeur 2 cm < T ≤ 5 cm dans sa plus grande dimension		IIA	T0	N1
	T2	Tumeur > 5 cm dans sa plus grande dimension	T1		N1	
	T4	Tumeur de toute taille avec extension directe à la paroi thoracique et/ou à la peau	T2		N0	
N	N0	Absence de signe d'envahissement ganglionnaire régional	IIB	T2	N1	M0
	N1	Envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires ou/et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique		T3	N0	
	N2	Envahissement de 4 à 9 ganglions axillaires ou envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects, en l'absence d'envahissement ganglionnaire axillaire	IIIA	T0	N2	M0
	N3	Envahissement d'au moins 10 ganglions axillaires ou envahissement des ganglions sous-claviculaires (niveau III axillaire) ou envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects avec envahissement ganglionnaire axillaire ou envahissement de plus de 3 ganglions axillaires et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique ou envahissement des ganglions sus-claviculaires homolatéraux		T1	N2	
T2				N2		
T3				N1		
M	M0	Absence de métastase à distance	IIIB	T4	N0	M0
	M1	Présence de métastase(s) à distance		T4	N1	
				T4	N2	
			IIIC	Tout T	N3	M0
			IV	Tout T	Tout N	M1

Tableau 1 - Scores pTNM de 8ème édition et stades cliniques associés.

CMI = chaîne mammaire interne. D'après « Cottu et Delaloge, 2019 », réalisé par Marie Hullo.

1.3.3 Biomarqueurs des cancers du sein

Un biomarqueur est défini comme étant « une caractéristique mesurable avec précision, utilisée comme indicateur d'une fonction du corps, d'une maladie ou de l'action d'un médicament ».

Trois biomarqueurs sont communément utilisés en clinique lors de la caractérisation de la tumeur à savoir l'expression des récepteurs hormonaux aux œstrogènes (ER), à la progestérone (PR) et au facteur de croissance épidermique humain (ERBB2 ou HER2). Grâce à l'analyse du profil d'expression de ces marqueurs par immunohistochimie (IHC) ou hybridation *in situ*, les cancers du sein peuvent être divisés en trois groupes :

- Les cancers **positifs aux récepteurs hormonaux (HR+)** : le seuil de positivité des tumeurs est défini par une expression des récepteurs supérieure ou égale à 1% des cellules cancéreuses. Le récepteur à l'œstrogène est exprimé dans 80% des tumeurs tandis que PR l'est dans 65% des tumeurs.

- Les cancers **surexprimant HER2 (HER2+)** : il peut s'agir d'une surexpression transcriptionnelle et/ou d'une amplification du gène. Ces tumeurs HER2+ représentent 15 à 20% des cancers du sein et plus de 50% sont également ER+ et/ou PR+ (Wirapati et al., 2008).

- Les cancers **triples négatifs** : les cellules cancéreuses sont négatives aux récepteurs hormonaux et à HER2. Ce groupe est extrêmement hétérogène concernant l'histologie, la génétique, le pronostic et la réponse au traitement.

Il existe des centaines d'autres biomarqueurs qui ont été testés comme le récepteur aux androgènes (AR) retrouvé exprimé dans 60 à 80% des cancers du sein (principalement les HER2+ et triples négatifs). Le récepteur au facteur de croissance de l'épiderme (EGFR), p53, c-myc et Ki-67 peuvent également être utilisés en tant que biomarqueur pour ces cancers (Turashvili and Brogi, 2017).

1.3.4 Classification moléculaire

Sur la base d'une étude pionnière de Perou *et al.* (Perou et al., 2000) validée ensuite par plusieurs analyses transcriptionnelles, les tumeurs du sein ont été classées en fonction de leur profil génique : luminales, HER2-enrichie (ou ERBB2), « normal-like » et « basal-like » (Figure 4). A chacun de ces sous-types correspond un profil d'expression spécifique de biomarqueurs moléculaires (Dai et al., 2015).

- **Luminal A** : Positives pour ER et/ou PR, négatives pour HER2 avec une faible prolifération cellulaire (Ki-67 faible). Ces tumeurs peu agressives sont de bon pronostic.
- **Luminal B** : Positives pour ER et/ou PR, avec une plus faible proportion HER2+ et une plus forte proportion HER2-, ces tumeurs présentent une plus forte prolifération cellulaire (Ki-67 supérieure ou égale à 14%). Le pronostic est moins bon que pour le groupe précédent.
- **HER2 enrichi** : Négatives pour ER et PR mais avec une surexpression de HER2. L'index de prolifération est élevé et le pronostic associé est mauvais. Ces tumeurs sont généralement mutées pour le gène *TP53*.

- « **Normal-like** » : Ce groupe a initialement été caractérisé par l'expression de gènes similaires à l'épithélium mammaire normal. Cependant, ce groupe a par la suite été considéré comme un artéfact dû à une contamination de cellules épithéliales normales (Peppercorn et al., 2008).
- « **Basal-like** » : Négatives pour ER, PR et HER2 avec un fort index de prolifération. Ces tumeurs sont EGFR+ et mutées pour *TP53*. Elles sont généralement de mauvais pronostic (Makki, 2015).

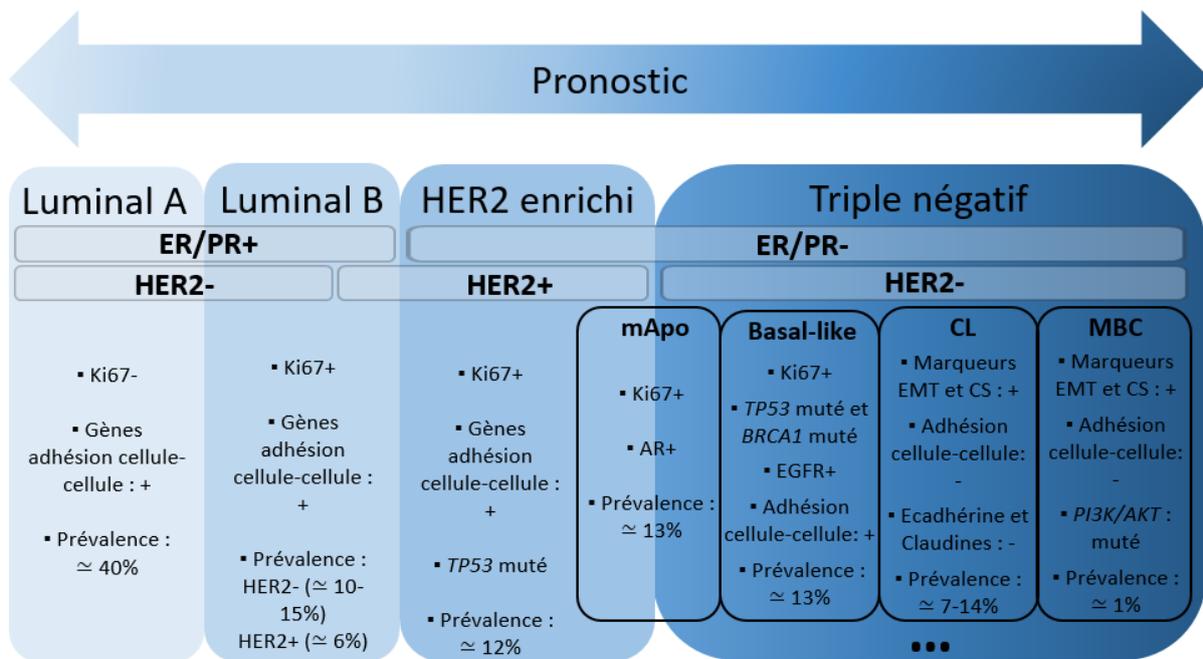


Figure 4- Classification moléculaire des cancers du sein

Figure réalisée sur PowerPoint à partir de plusieurs articles différents. Principalement inspiré de « Dai et al., 2016 ».

Cette classification est un outil permettant d'améliorer la prise en charge thérapeutique en prédisant la sensibilité des tumeurs aux thérapies hormonales (utilisées pour traiter les cancers exprimant les récepteurs hormonaux) et aux thérapies ciblées contre HER2 (Cottu & Delalogue, 2019).

D'autres propositions de classification ont été faites, soit en modifiant les sous-groupes proposés ci-dessus, soit en innovant en fonction des techniques utilisées.

En 2007, un nouveau sous-type moléculaire de cancer du sein est apparu, le groupe « **Claudin-low** » (CL). Ce groupe est caractérisé par une faible expression des gènes des jonctions serrées et des jonctions cellules-cellules incluant les claudines 3, 4 et 7 ainsi que l'occludine et la E-cadhérine (Herschkowitz et al., 2007). Ces tumeurs présentent un enrichissement des marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), des gènes associés aux cellules souches mammaires et de la réponse immunitaire et inflammatoire (Prat et al., 2010). Ces tumeurs de grade intermédiaire ou élevé sont de mauvais pronostic car répondant mal aux traitements (Sabatier et al., 2014). Elles sont majoritairement classées parmi les tumeurs triples négatives bien que de nouvelles méthodes

d'identification des tumeurs CL semblent mettre en évidence la présence de ce groupe dans chacun des sous-types originellement décrit (Fougner et al., 2020).

Un autre sous-type moléculaire décrit est le groupe **moléculaire apocrine** (mApo). Ces tumeurs surexpriment les récepteurs aux androgènes (AR), sont négatives pour ER et PR et peuvent présenter une amplification de HER2 (Farmer et al., 2005). Elles sont associées à des récives précoces mais répondent bien aux traitements (Guedj et al., 2012).

Le sous-groupe des **cancers du sein métaplasiques** (MBC) correspond à des cancers triple négatifs agressifs, chimiorésistants et associés à un mauvais pronostic (Nelson et al., 2019). Ces tumeurs montrent un enrichissement des caractéristiques des cellules souches et une activation anormale de la voie phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT (Hennessy et al., 2009). Elles sont caractérisées par la présence d'au moins deux types cellulaires qui sont le plus souvent un mélange de cellules épithéliales et mésenchymateuses (Weigelt et al., 2014).

La classification moléculaire des cancers du sein décrite ci-dessus est non exhaustive. D'autres groupes avec d'autres arrangements ont été proposés et notamment concernant les cancers triple négatifs (Wang et al., 2019).

Certaines études tentent d'appliquer la classification moléculaire à des sous-types histologiques spécifiques (Weigelt et al., 2008) permettant d'homogénéiser et d'affiner la prise de décision thérapeutique. Pour exemple, certains cancers de mauvais pronostic moléculaire ont un bon pronostic histologique. Ainsi, le choix d'un traitement qui serait basé sur la seule classification moléculaire sans prendre en compte l'aspect histologique pourrait être inutilement agressif pour le patient.

1.3.5 Prédipositions génétiques et signatures génomiques

Une faible proportion des cancers du sein (5 à 10%) sont favorisés par des prédispositions génétiques, c'est-à-dire attribuable à une ou plusieurs mutations génétiques héréditaires.

Le plus souvent, il s'agit d'une mutation des gènes **BRCA1** (BReast CAncer 1) et/ou **BRCA2** (BReast CAncer 2) qui sont des gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans la réponse et la réparation des dommages à l'ADN. Le risque de développer un cancer du sein avant l'âge de 70 ans pour une femme possédant une mutation **BRCA1** et/ou **BRCA2** est de 45 à 87% (King et al., 2003) contre 10% pour les femmes ne présentant pas de mutation pour ces gènes. Bien que plus rare, d'autres mutations génétiques sont également associées à une augmentation du risque de développer un cancer du sein. Les gènes mutés sont la plupart du temps impliqués dans le maintien de l'intégrité du génome ou dans

les mécanismes de réparation de l'ADN comme *TP53*, *ATM*, *PTEN* et *STK11/LKB1* (Turnbull and Rahman, 2008).

Les patientes avec une prédisposition familiale avérée peuvent subir des tests génétiques permettant de mettre en évidence d'éventuelles mutations de ces gènes (principalement *BRCA1* et *BRCA2*). En revanche, la présence de ces mutations n'est pas recherchée de manière routinière chez les patientes atteintes par un cancer du sein en raison, notamment, du coût élevé de ces détections. Ceci est d'autant plus vrai concernant les cancers du sein sporadiques qui représentent la grande majorité des cas. Or, des patientes avec les mêmes caractéristiques cliniques et pathologiques peuvent répondre différemment aux traitements et avoir une évolution clinique distincte. Le modèle actuel basé sur les caractéristiques personnelles des patientes et les caractères biologiques de la tumeur ne peut prédire le devenir de la maladie car il n'utilise que trop peu de paramètres. Avec les classifications précédemment énoncées, il est possible d'identifier les populations de patientes éligibles pour les traitements cibles mais il est impossible de prédire l'efficacité des thérapies (Penault-Llorca, 2014). Des techniques de génomique à haut-débit permettent d'identifier des **signatures moléculaires ou génomiques**, basées en particulier sur l'analyse de l'expression de gènes, afin de caractériser la progression et l'agressivité de la maladie. Ces signatures sont utilisées en tant qu'outil d'aide à la décision thérapeutique, à visée pronostique (apparition de métastases ou de récurrence à 10 ans) afin de prédire, si possible, la réponse aux traitements (Joyon et al., 2017). Ces tests sont essentiellement applicables aux tumeurs ER positives, HER2 négatives, avec ou sans envahissement ganglionnaire. Ces recherches de signatures moléculaires ont permis d'identifier des groupes de marqueurs permettant de réaliser des tests diagnostiques pour identifier les patientes à faible risque de rechute à distance afin de leur éviter l'administration d'une chimiothérapie adjuvante (Yann, 2019). De plus, ces signatures moléculaires apportent un bénéfice financier comparativement au coût d'une chimiothérapie agressive qui peut parfois être inefficace.

Aujourd'hui, quatre signatures génomiques, chacune basée sur l'expression d'un groupe de gènes, sont commercialisées et utilisées en France pour décider du traitement du cancer du sein :

- Les tests de 1^{ère} génération (2002/2004) : **Mammaprint**[®] (signature de 70 gènes, essai Européen MINDACT) et **Oncotype Dx**[®] (signature de 21 gènes, essais Nord-Américain TAILORx et RxPONDER) dont l'utilité a été prouvée cliniquement.
- Les tests de seconde génération (2009/2011) : **Prosigna-PAM50**[®] (signature de 50 gènes) et **Endopredict**[®] (signature de 12 gènes). L'utilité de ces tests est toujours en cours d'évaluation.

En 2019, la Haute Autorité de Santé a publié son rapport d'évaluation concernant les signatures génomiques des cancers du sein et a conclu que « aucune des quatre études retenues n'a présenté de données permettant de valider l'utilité clinique des signatures génomiques chez les femmes

pour lesquelles subsiste une incertitude dans la décision de recourir à une chimiothérapie adjuvante » (Yann, 2019). Pour l'heure, ces tests ne seront donc pas remboursés par l'Assurance maladie.

La volonté des chercheurs et cliniciens de classer le plus finement possible les cancers du sein a pour but d'améliorer la thérapeutique afin de trouver le traitement le plus efficace et confortable pour la patiente.

2. Traitements des cancers du sein

Le choix du traitement est adapté à chaque cas, il dépend des caractéristiques du cancer et du malade. Pour les cancers du sein, les soins thérapeutiques proposés sont des traitements locaux (chirurgie, radiothérapie) et systémiques (chimiothérapie, hormonothérapie, thérapies ciblées) pouvant être utilisés seuls ou en combinaison.

2.1 Chirurgie

L'intervention chirurgicale est indiquée dans toutes les formes de cancers du sein localisés. La chirurgie constitue généralement la première étape du traitement mais une chimiothérapie ou radiothérapie peut précéder ce traitement afin de réduire la taille de la tumeur pour faciliter l'intervention. Deux options thérapeutiques sont envisagées en fonction de différents facteurs :

- La **tumorectomie** ou segmentectomie : il s'agit d'une chirurgie partielle conservatrice. Elle consiste à retirer la tumeur et les tissus sains avoisinants de façon à conserver au maximum la glande mammaire. Cette chirurgie est indiquée pour les tumeurs unicentriques de petites tailles possédant des marges saines (Cottu et Delalogue, 2019). Elle sera toujours complétée par un traitement adjuvant.
- La **mastectomie** : elle consiste à retirer l'intégralité du sein, à effectuer un curage axillaire des ganglions et à conserver les muscles grands et petits pectoraux. Elle est indiquée pour des tumeurs multicentriques plus agressives possédant de petites marges. Après de possibles traitements adjuvants, une reconstruction mammaire sera proposée.

2.2 Radiothérapie

La radiothérapie (RT) est un traitement locorégional essentiel du cancer du sein car permettant de réduire considérablement le risque de récurrence après tumorectomie et mastectomie. Elle est dite curative lorsqu'elle permet de guérir totalement ou d'induire une rémission du cancer. Lorsque la RT a pour but de freiner l'évolution de la tumeur tout en soulageant la douleur, elle est appelée RT palliative ou symptomatique.

La RT utilise les rayonnements ionisants (RI) afin de générer des lésions moléculaires létales dans les cellules cancéreuses irradiées. Les RI vont provoquer des dommages **directs** à l'ADN via la déstabilisation de sa structure par les particules émises par les rayonnements ou **indirects** par interaction des RI avec des molécules d'eau provoquant la radiolyse de l'eau. Ceci est à l'origine de la production de peroxyde d'hydrogène et de radicaux libres autrement appelés espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ces ROS sont des molécules instables hautement réactives qui vont interagir avec les atomes des molécules biologiques (lipides, protéines et ADN) modifiant leur structure et leur fonction. Une forte quantité de ROS est délétère pour la cellule.

Les nombreux dommages à l'ADN infligés par les RI vont induire une instabilité génomique (création de sites abasiques, oxydation de bases, cassures simple- et double-brin) qui provoquera dans un premier temps un ralentissement de la prolifération qui entrainera ensuite la mort cellulaire (Kim et al., 2019). La radiosensibilité des cellules repose sur leur division rapide et les cellules cancéreuses à forte activité mitotique sont les cibles préférentielles de la RT, comparées aux cellules du tissu sain.

La RT peut être prescrite selon différents protocoles en fonction des caractéristiques du cancer et des traitements effectués (la radiothérapie exclusive existe pour des cas rares de maladie métastatique ou de personnes très âgées). Le protocole classique le plus largement utilisé est un protocole fractionné de 50Gy en 25 séances de 2Gy. Le protocole hypo-fractionné est proposé à des femmes de plus de 50 ans avec un cancer HR+ de faible grade (Hennequin et al., 2016). Ce protocole consiste à administrer une dose d'irradiation par séance élevée tout en réduisant la dose moyenne de 40Gy à 42,5Gy en fonction du schéma utilisé.

Dans un souci de désescalade thérapeutique, la radiothérapie peropératoire a été proposée afin de limiter les effets secondaires et d'améliorer le bien-être des patients. En pratique, après ablation de la tumeur, une dose d'irradiation est délivrée directement en contact des tissus. Cette RT est rarement suffisante et sera suivie de 5 à 8 séances complémentaires. Bien que les bénéfices cliniques restent limités, cette nouvelle approche est toujours en cours d'investigation et peut-être proposée à des patientes pour certains cas particuliers (Corradini et al., 2019).

2.3 Chimiothérapie

La chimiothérapie est un traitement systémique cytotoxique, administrée par voie intraveineuse ou orale, ciblant la division des cellules proliférant rapidement.

Ce traitement est proposé dans la grande majorité des cancers du sein infiltrants et métastatiques. Il peut être prescrit avant ou après la chirurgie. Lorsque la chimiothérapie est proposée après la chirurgie, ce qui est généralement le cas, elle est appelée adjuvante. Elle est notamment indiquée après examen clinique de la tumeur lorsque l'anatomopathologiste conclue que le risque de récurrence est important. Administrée 3 à 6 semaines après la chirurgie, elle a pour but de prévenir l'apparition des métastases non visibles lors du diagnostic et ainsi d'améliorer les chances de guérison. La chimiothérapie peut être proposée avant la chirurgie ou la radiothérapie afin de réduire le volume de la tumeur. Prescrite également pour les cancers inflammatoires, elle est alors appelée chimiothérapie néoadjuvante.

La prise en charge des cancers métastatiques repose principalement sur un traitement par chimiothérapie le plus souvent en combinaison avec d'autres traitements systémiques. Ceci est d'autant plus vrai pour les patientes ER- et HER2- (Bernard-Marty et al., 2004) qui ne répondent pas aux autres traitements médicamenteux. Ce traitement est palliatif, il a pour objectif de contrôler l'évolution de la maladie et d'améliorer la qualité de vie des patientes. On parle de chimiothérapie intensive quand les doses sont augmentées et dense quand les cures sont rapprochées.

Classiquement, le protocole d'administration comporte 4 à 6 cures espacées de 3 semaines afin de permettre aux cellules normales de récupérer des effets du traitement.

Les diverses classes de médicaments utilisées possèdent des mécanismes d'action qui leur sont propres (Tableau 2). Ces molécules anticancéreuses agissent sur l'ADN ou sur le fuseau mitotique afin de provoquer la mort cellulaire.

Les protocoles thérapeutiques favorisent l'association de molécules à mécanismes d'action différents, permettant de réduire le risque de sélectionner des clones résistants (Cottu et Delaloge, 2019). Le choix du schéma de chimiothérapie utilisé en première ligne de traitement dépend des caractéristiques de la tumeur (type de cancer, expression de marqueurs, risque de rechute, évolution) et de la patiente (âge, état de santé, préférences). Si les résultats de cette première ligne ont été jugés insuffisants ou lors du traitement des récurrences, une chimiothérapie dite de deuxième ligne est administrée. Il en est de même pour la chimiothérapie de troisième ligne qui est utilisée chez les patientes qui ne répondent pas de manière satisfaisante à la deuxième ligne et les patientes qui présentent une rechute.

Afin d'améliorer l'efficacité des traitements et la qualité de vie des patientes, des études évaluent les nouveaux traitements ou les nouvelles associations de traitements.

Cible	Classe	Mode d'action		Molécules
Acides nucléiques	Agents Alkylants	Bloque la réplication de l'ADN et la transcription de l'ARN	Fixation sur l'ADN ou sur un nucléotide	- Moutarde à l'azote : cyclophosphamide...
			Création de liaison covalente inter ou intra-brin entre deux guanines	- Sels de platine : cisplatine, carboplatine...
	Antimétabolites	Inhibe la synthèse d'acides nucléiques	Incorporation de structures analogues aux métabolites naturels ou inhibition des voies enzymatiques de la synthèse de nouvelles bases	- Antipyrimidiques : 5-Fluoruracile, gemcitabine, capecitabine - Antipuriques : 6-mercaptopurine, azathioprine, cladribine
			Inhibition voie des folates essentiels à la synthèse des bases puriques et de la thymidine	- Antifoliques : méthotrexate
			Inhibition d'une enzyme responsable de la transformation des ribonucléotides et désoxyribonucléotides	- Hydroxycarbamide (ou hydroxyurée)
	Inhibiteurs des topoisomérases	Inhibe la synthèse, l'élongation et la réplication de l'ADN	Inhibition de l'élongation et de la réplication de l'ADN en bloquant la topoisomérase I	- Irinotécan et topotecan
			Inhibition de la synthèse d'ADN par des agents intercalants s'insérant entre deux bases adjacentes	- Anthracyclines : doxorubicine, epirubicine...
			Inhibition de la topoisomérase II	- Epipodophylotoxines : etoposide
	Microtubules	Agents tubulo-affins	Bloque la division cellulaire en désorganisant le fuseau mitotique	Inhibition de la polymérisation de la tubuline en microtubules
Inhibition de la dépolymérisation de la tubuline en microtubules				- Taxanes : paclitaxel, docetaxel... - Ixabepilone

Tableau 2 - Principaux mécanismes d'action des molécules chimiothérapeutiques cytotoxiques

Tableau réalisé sur PowerPoint inspiré de « Bukowski et al., 2020 » avec l'aide du site pharmacomedicale.org. Les molécules citées sont les principales utilisées pour traiter les cancers du sein selon l'American Cancer Society.

2.4 Hormonothérapie

Ce traitement est utilisé pour les cancers du sein hormono-dépendants c'est-à-dire surexprimant les récepteurs hormonaux aux œstrogènes et à la progestérone. Ces hormones sont connues pour favoriser la prolifération des cellules cancéreuses induisant la croissance de la tumeur (Clere, 2016). Le but de ce traitement est de bloquer la synthèse et l'activation de ces récepteurs hormonaux afin de diminuer le risque de récurrence après chirurgie et l'apparition de métastases à distance. Le plus souvent prescrit en tant que traitement adjuvant pendant 5 ans, il permet de réduire le volume tumoral avant chirurgie dans certains cas plus rares.

Plusieurs classes de médicaments d'hormonothérapie peuvent être proposées en fonction du statut de la patiente vis-à-vis de la ménopause, des caractéristiques cliniques, de la réponse aux traitements et des préférences de la patiente.

Les **anti-œstrogènes** limitent la fixation des œstrogènes endogènes à leurs récepteurs par inhibition compétitive chez les patientes pré- ou post-ménopausées. Les « Selective Estrogen Receptor Modulators » (SERM) comme le tamoxifène ou le torémifène peuvent se comporter comme antagonistes ou agonistes des récepteurs ER en fonction du tissu. Dans le sein, la liaison des SERM aux ER entraîne une interaction avec des corépresseurs induisant une inhibition des gènes œstrogène-dépendants (Jordan, 2001). Ces molécules sont indiquées dans le traitement des carcinomes mammaire soit en traitement préventif soit pour les formes évoluées avec progression locale et/ou métastatique indépendamment du statut ménopausique de la patiente. Les « Selective Estrogen Receptor Degradar » (SERD) comme le fulvestrant sont des antagonistes purs des ER. Cette molécule a la capacité de se lier aux ER ce qui a pour conséquence de réduire leur dimérisation, d'augmenter la dégradation de la protéine et d'inhiber la transcription des gènes cibles (Curran and Wiseman, 2001). Ce traitement est indiqué pour les cancers du sein localement avancés ou métastasés chez la femme ménopausée.

Les **inhibiteurs de l'aromatase** sont des molécules capables de bloquer l'enzyme aromatase responsable de la transformation des androgènes surrénaliens et ovariens en œstrogènes après la ménopause. Deux types d'anti-aromatases sont utilisés dans le traitement des cancers du sein : les inhibiteurs stéroïdiens qui se fixent de manière irréversible et sélective au site actif de l'enzyme (l'exémestane) et les inhibiteurs non stéroïdiens qui se lient de façon réversible et compétitive à l'enzyme (létrozole et anastrozole) (Clere, 2016). Ces traitements utilisés comme traitements adjuvants sont préférés au tamoxifène car plus efficaces chez la femme ménopausée.

Enfin, les **analogues de la LH-RH** agissent comme castrateur ovarien réversible en supprimant la fabrication des œstrogènes chez la femme non ménopausée. Ces molécules (goséreligne, leuproréline) vont saturer les récepteurs de LH-RH sur l'hypophyse entraînant à terme sa désensibilisation à l'origine de l'inhibition de la sécrétion d'hormones gonadotropes et des stéroïdes sexuels (Daguenet et al., 2019). Ce traitement est indiqué chez les patientes non ménopausées présentant un cancer du sein à un stade précoce ou métastatique le plus souvent en association avec le tamoxifène sur une période de 3 à 5 ans afin de diminuer le risque de récurrence et d'augmenter la survie globale.

2.5 Thérapies ciblées

Les thérapies ciblées agissent plus spécifiquement sur des molécules impliquées dans les voies de signalisation oncogéniques. Ce traitement systémique cible les propriétés propres aux cellules

cancéreuses contrairement à la chimiothérapie. Grâce à l'identification et à la compréhension de ces anomalies moléculaires présentes sur les cellules tumorales et leur environnement (Dalenc et al., 2018), plusieurs classes de médicaments cibles ont été caractérisées et utilisées pour traiter les cancers du sein (Tableau 3).

Malgré l'amélioration des réponses thérapeutiques grâce à ces thérapies ciblées, des mécanismes de résistances innés ou acquis au cours/après traitements existent. Ces mécanismes sont d'autant plus complexes que les voies de signalisation impliquées sont élaborées (Magné et al., 2010). Trouver de nouvelles combinaisons associant les thérapies ciblées aux autres traitements systémiques permettraient de l'imiter l'adaptation des cellules cancéreuses afin d'améliorer la survie des patientes. En outre, l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques est une stratégie essentielle au contrôle de la maladie face à l'échappement aux traitements. Pour ce faire, décrypter les mécanismes propres aux cellules cancéreuses semble essentiel.

Classe	Cible	Mode d'action	Molécules	Prescription
Anticorps monoclonaux	HER2	- Liaison domaine extracellulaire HER2 bloquant la transduction du signal = arrêt de croissance - Induction cytotoxicité médiée par les anticorps (ADCC)	Trastuzumab	IV ou sous-cutanée, cancer précoce ou métastatique, HER2+
		- Liaison domaine extracellulaire HER2 empêchant son hétérodimérisation bloquant la transduction du signal = arrêt de croissance - Induction ADCC	Pertuzumab	IV, cancer métastatique ou localement récidivant, HER2+, 1 ^{ère} ligne de traitement
	VEGF	Inhibition fixation de VEGF à ses récepteurs	Bevacizumab	IV, cancer métastatique, HER2-, 1 ^{ère} ligne de traitement, en association au paclitaxel
Anticorps monoclonaux conjugués	HER2 puis microtubules	Fixation molécule sur HER2+, internalisation du complexe, libération de l'emtansine (poison du fuseau mitotique) = cytotoxicité	Trastuzumab-emtansine (T-DM1)	IV, cancer métastatique ou localement avancé, HER2+, prétraité, monothérapie
Inhibiteurs protéines kinases	HER2, HER1, EGFR	Blocage réversible de la protéine kinase associée aux récepteurs HER2, HER1 et EGFR	Lapatinib	Voie orale, cancer métastatique ou avancé, HER2+, prétraité, en association à la capécitabine
	mTOR	Inhibition voie transduction mTOR	Everolimus	Voie orale, cancer métastatique, HR+, HER2-, post-ménopause, prétraité anti-aromatase, en association à l'HT
	CDK4/CDK6	Inhibition des CDK4/CDK6 bloque la division cellulaire	Palbociclib	Voie orale, cancer métastatique ou avancé, HR+, HER2-, post-ménopause, prétraité HT, association avec anti-aromatase
Inhibiteurs PARP	PARP	Liaison site actif PARP inhibant fonction entraînant persistance dommages à l'ADN qui ne peuvent être réparées = létalité synthétique	Olaparib, talazoparib	Voie orale, métastatique, HER2-, HR+/-, BRCA muté, préalablement traité, monothérapie
Immuno-modulateurs	PD-1 ou PD-L1	Blocage de la liaison PD-1 (récepteur lymphocytaire) à son ligand PD-L1 (sur cellules tumorales)	Atezolisumab, pembrolizumab	IV, cancer triple négatif, métastatique, PD-L1+, lourdement prétraité, monothérapie

Tableau 3 - Mécanismes d'action des différentes thérapies ciblées utilisées dans le traitement des cancers du sein

HT = Hormonothérapie; IV= Intraveineuse; VEGF = Vascular endothelial growth factor; EGFR=epidermal growth factor receptor; CDK4 = Cyclin-dependent kinase 4; CDK6 = Cyclin-dependent kinase 6; PARP = poly(ADP-ribose) polymerase; PD-1 = Programmed cell death 1; PD-L1 = Programmed death-ligand 1. Tableau réalisé sur PowerPoint, inspiré de « Galván Morales et al., 2019 » avec l'aide du site arcagy.org. La liste des noms de molécules est non exhaustive et concerne les traitements et molécules les plus utilisés.

II. Hétérogénéité tumorale des cancers du sein

1. <i>Propriétés distinctives des cellules cancéreuses</i>	40
2. <i>Dissémination métastatique</i>	45
2.1 La cascade métastatique	46
2.2 Transition épithélio-mésenchymateuse et propriétés des cellules impliquées	
477	
3. <i>Hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle des cancers du sein</i>	54
3.1 Modèle stochastique d'évolution clonale	54
3.2 Modèle hiérarchique ou le concept des « cellules souches cancéreuses »	55
3.3 Modèle hiérarchique d'évolution clonale	56
3.4 Les cellules souches cancéreuses	57
4. <i>Lien entre les CSCs et la TEM dans les cancers du sein</i>	59
4.1 Population CD44+/CD24-/low	60
4.2 Caractéristiques et rôles de CD24 dans les cancers du sein	61

1. Propriétés distinctives des cellules cancéreuses

La carcinogenèse est un processus progressif résultant de l'accumulation d'une succession d'altérations génétiques des voies de régulation de la prolifération, de la survie et de l'apoptose des cellules normales aboutissant à leur transformation. Ces altérations correspondent en majorité à des mutations activatrices d'oncogènes et/ou répressives de gènes suppresseurs de tumeurs. De nombreuses données prouvent que des similarités existent entre les dizaines de cancers différents identifiés, ce qui a permis à Hanahan et Weinberg (Hanahan and Weinberg, 2000) de proposer un catalogue de six **caractéristiques distinctives** des cellules cancéreuses (Figure 5). Ces six atteintes physiopathologiques (ou *hallmarks*) constituent ensemble un principe d'organisation favorisant la compréhension de la diversité des cancers.

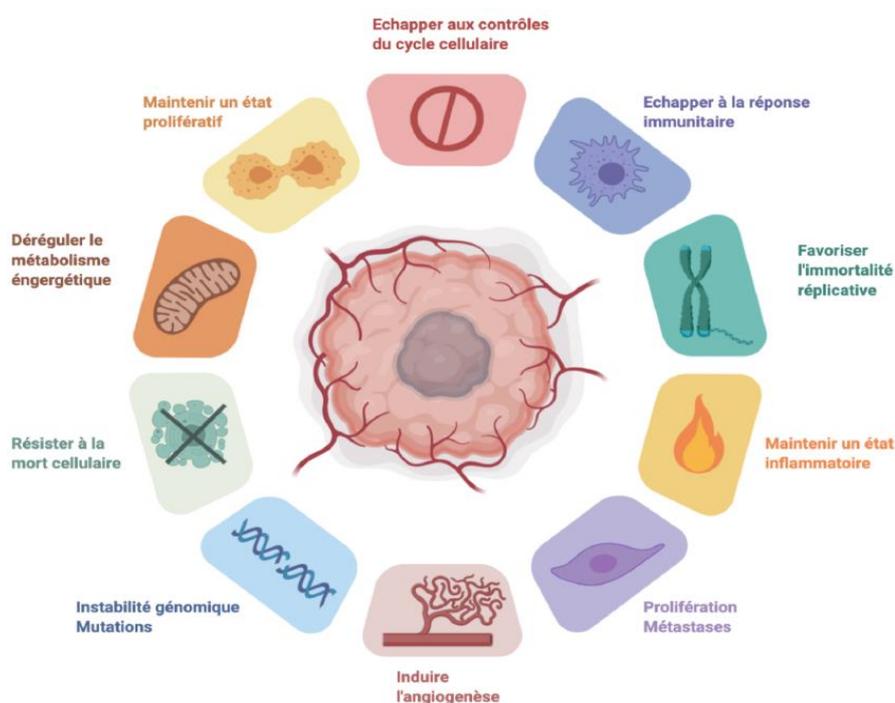


Figure 5 - Propriétés distinctives des cellules cancéreuses.

D'après « Hanahan and Weinberg, 2011 », réalisé par Marie Hullo.

▪ Auto-suffisance aux signaux de croissance

La prolifération cellulaire est gouvernée par des facteurs de croissance qui se lient à des récepteurs membranaires entraînant une cascade de signalisation responsable de la régulation du cycle cellulaire et de la croissance. Le contrôle de la production et de l'activité de ces signaux permet le maintien de l'homéostasie des cellules normales. En revanche, la division des cellules cancéreuses peut se produire indépendamment de leur stimulation par des facteurs de croissance. Plusieurs mécanismes sont à l'origine de cette prolifération anarchique des cellules cancéreuses :

- la production de ligands spécifiques de leurs propres récepteurs permettant une stimulation autocrine de la prolifération

- la sécrétion de facteurs de croissance après stimulation de cellules normales environnantes par les cellules cancéreuses

- l'augmentation du nombre et/ou de l'affinité des récepteurs

- l'activation constitutive de messagers en aval des récepteurs (mutation somatique de la protéine kinase phosphoinositide-3 (PI3K) induit l'hyper-activation de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR)

- la régulation défectueuse de l'atténuation de la prolifération assurée par une boucle de rétro-action négative (mutations de l'oncogène *Ras* et du gène suppresseur de tumeur *PTEN*)

Le maintien de la prolifération non contrôlée des cellules cancéreuses peut entraîner la formation de tumeurs.

▪ **Insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance**

La prolifération cellulaire est régulée négativement par de puissants systèmes gouvernés principalement par les protéines RB (retinoblastoma-associated), PTEN et TP53 (tumor protein 53). Ces protéines, qui jouent un rôle central dans la prise de décision du devenir de la cellule, sont retrouvées mutées dans pratiquement tous les cancers (Rivlin et al., 2011). Les voies de régulation associées font partie de plus grands réseaux fonctionnellement redondants et interconnectés.

De plus, la perte d'inhibition de contact est décrite depuis des années comme une propriété spécifique des cellules tumorales. Pour exemple, le produit du gène *NF2* est un médiateur essentiel de l'inhibition de la prolifération contact dépendant (Chiasson-MacKenzie et al., 2015). D'autres protéines et mécanismes responsables de la perte d'inhibition de contact, qui pourraient être utilisés comme nouvelles cibles thérapeutiques, restent à identifier.

▪ **Résistance à la mort cellulaire**

Plusieurs formes de mort cellulaire existent, elles agissent en tant que mécanisme anti-tumorigénique et/ou pro-tumorigénique, ceci en fonction de plusieurs paramètres.

L'**apoptose**, ou mort cellulaire programmée, est une barrière naturelle au développement des cancers. Elle a lieu lorsque la cellule est soumise à un stress important tel que les dommages à l'ADN, le déséquilibre de signalisation causé par des oncogènes, le manque d'oxygène ou le manque de stimulation par des facteurs de croissance (Samarasinghe, 2013). L'apoptose peut se dérouler par voie extrinsèque activée par des récepteurs de mort membranaires ou par voie intrinsèque activée par des signaux internes.

Des défauts de la machinerie apoptotique aboutissent à l'échappement des cellules cancéreuses à la mort cellulaire. Dans les cellules normales, p53, en tant que senseur de dommages à l'ADN, induit l'apoptose via la surexpression des protéines appelées *BH3-only* qui bloquent l'action de protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-X(L)...) ou stimule directement les facteurs pro-apoptotiques (BAX, BAD, BID...). La perte d'expression de la protéine p53, observée dans un certain nombre de cancers, permet d'échapper à ce contrôle positif de l'apoptose. Une autre stratégie des cellules cancéreuses est d'augmenter l'expression de régulateurs anti-apoptotiques ou de signaux de survies (IGF1/2) en sous-régulant les facteurs pro-apoptotiques ou en court-circuitant la voie extrinsèque de l'apoptose.

L'**autophagie** agit en tant que système de recyclage intracellulaire d'organelles ou métabolites garantissant l'homéostasie cellulaire. L'autophagie joue un rôle paradoxal dans la progression tumorale en fonction du type de cancer, du stade de la maladie et du contexte génétique. Elle limite l'apparition de dommages génomiques en contrôlant et dégradant les protéines mal repliées, les organelles endommagées et les ROS (Singh et al., 2018). Cependant, elle fournit aux cellules cancéreuses des métabolites indispensables à leur survie et leur croissance rapide.

La **nécrose** est une forme de mort cellulaire qui entraîne la libération du contenu cellulaire dans le microenvironnement. Ce relargage de signaux pro-inflammatoires permet le recrutement de cellules immunitaires qui vont activer la tumorigenèse en favorisant l'angiogenèse, la prolifération et l'invasion. Pour exemple, la libération de la cytokine Interleukine-1 α par les cellules nécrotiques stimule directement les cellules voisines survivantes induisant l'augmentation de la prolifération. Dans les cancers du sein, la nécrose a été associée à l'augmentation de la taille tumorale, à l'agressivité de la maladie, à la densité de micro-vaisseaux et à l'infiltration de macrophages dans la tumeur (Bredholt et al., 2015).

- **Immortalité répllicative**

Le raccourcissement des télomères permet de limiter le nombre de divisions cellulaires afin de garantir l'homéostasie tissulaire. Après 40 à 60 divisions, l'érosion des télomères est telle que la croissance cellulaire diminue puis s'arrête définitivement dans un état dit de sénescence répllicative. Ce phénomène de sénescence, dépendant de p53, peut être contourné dans les cellules mutées pour cette protéine. Ainsi, les cellules continuent de se diviser malgré ce raccourcissement télomérique ce qui entraîne la fusion des extrémités chromosomiques. Cette instabilité mène au phénomène dit de crise télomérique correspondant à la mort massive des cellules par apoptose (Brunori and Gilson, 2005).

Ces deux phénomènes sont des barrières au développement des cancers et à l'immortalisation répliquative des cellules. Dans les cellules cancéreuses, deux moyens permettent d'éviter le raccourcissement des télomères :

- L'expression de la télomérase, observée dans 85-90% des cancers (Kim et al., 1994), permettant la synthèse d'ADN télomérique
- Le mécanisme ALTERNATIF d'allongement des télomères basé sur la recombinaison homologue

D'autres activités non conventionnelles de la télomérase ont été identifiées et semblent également être impliquées dans la carcinogénèse. La télomérase permet l'augmentation de la prolifération, de la résistance à la mort cellulaire, de l'inflammation, de l'invasion et des métastases (Ségal-Bendirdjian and Geli, 2019).

▪ **Induction de l'angiogenèse**

En condition physiologique, la vascularisation est un processus transitoire qui apparaît lors de l'embryogenèse, de la cicatrisation et du cycle menstruel. La vascularisation de la tumeur par le processus de l'angiogenèse permet l'apport de nutriments et d'oxygène ainsi que l'évacuation des déchets métaboliques et du dioxyde de carbone. De plus, la formation de nouveaux vaisseaux entraîne la dissémination des cellules cancéreuses à l'origine de la formation des métastases.

L'angiogenèse est finement régulée par des facteurs pro- et anti-angiogéniques qui sont majoritairement des protéines de signalisation des récepteurs de surface des cellules endothéliales. La perturbation de l'équilibre entre ces différents facteurs induit l'augmentation de l'angiogenèse dans les cancers. Parmi les protéines impliquées, le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire-A (VEGF-A) est le régulateur majeur de l'induction de l'angiogenèse tandis que la thrombospondine 1 (TSP-1) est le principal facteur anti-angiogénique. Le déséquilibre pro-angiogénique se produit au niveau génétique à la suite de l'activation d'oncogènes (Ras et Myc) ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. L'induction angiogénique est également régulée par des facteurs environnementaux tels que l'hypoxie, l'hypoglycémie, le déficit en nutriments et l'acidose métabolique (Saman et al., 2020).

▪ **Invasion et métastases**

La propagation métastatique correspond à la dissémination de cellules cancéreuses de la tumeur primaire vers de nouveaux organes. Le processus métastatique comprend trois phases : l'invasion, l'intra- et l'extravasation qui seront détaillées dans le prochain paragraphe de ce manuscrit.

En 2011, Hanahan et Weinberg mettent à jour leur étude en proposant deux nouveaux mécanismes favorisant la tumorigénèse et deux nouvelles propriétés singulières émergentes acquises par les cellules cancéreuses (Hanahan and Weinberg, 2011) (Figure 5).

- **Instabilité génomique et mutations**

L'acquisition de mutations dans les cellules néoplasiques confèrent un avantage sélectif aux clones cellulaires permettant leur adaptation et dominance au sein de leur environnement.

En plus des mutations génétiques décrites précédemment, des mécanismes épigénétiques de méthylation de l'ADN et de modifications des histones induisent cette expansion clonale. Ces changements non-mutationnels régulent l'expression génique.

Ces mutations génétiques et épigénétiques inhérentes à la majorité des cancers augmentent la sensibilité des cellules aux agents mutagènes en altérant la machinerie de surveillance et de maintenance de l'intégrité de l'ADN. Les composants de cette machinerie, également appelés gènes gardiens du génome, jouent un rôle dans la détection et la réparation des dommages à l'ADN, mais aussi dans l'inactivation et l'interception de molécules mutagènes.

Grâce aux avancées des techniques de séquençage, on distingue des signatures mutationnelles spécifiques des différents types de cancer bien que pratiquement tous présentent des défauts dans le système de réparation.

- **Maintien de l'inflammation**

L'infiltration de cellules immunitaires dans la tumeur a pour but d'éradiquer les cellules cancéreuses. Cependant, ce phénomène provoque un état inflammatoire qui permet d'induire la carcinogénèse en fournissant des molécules bioactives dans le microenvironnement tumoral. En effet, l'inflammation entraîne la libération de facteurs de transcription impliqués dans le maintien de la prolifération, des facteurs de survie limitant la mort cellulaire, des facteurs pro-angiogéniques, des enzymes dégradant la MEC (matrice extracellulaire) mais aussi des signaux inducteurs de la TEM. Les cellules immunitaires à l'origine du rôle pro-tumorigène de l'inflammation sont les cellules myéloïdes suppressives, les cellules dendritiques, les macrophages et certains lymphocytes T régulateurs (Zhang et al., 2017).

L'inflammation semble apparaître au début de la transformation tumorale induisant une cancérogenèse complète. Pour exemple, les cellules inflammatoires peuvent libérer des ROS hautement mutagènes permettant d'augmenter la malignité de la maladie.

- **Dérégulation du métabolisme énergétique**

La prolifération anarchique des cellules cancéreuses nécessite un apport en composés cellulaires important. En condition d'aérobie, le métabolisme des cellules normales produit de l'énergie par la phosphorylation oxydative mitochondriale alors que la glycolyse et la fermentation lactique sont préférentiellement utilisées par les cellules cancéreuses. Ce phénomène est connu comme l'effet Warburg (Warburg et al., 1930). Ce changement métabolique en faveur de la glycolyse aérobie produit moins d'ATP (adénosine triphosphate) par molécule de glucose, comparé à la phosphorylation oxydative, mais est néanmoins beaucoup plus rapide. Elle permet ainsi la formation de composés intermédiaires utiles à la biosynthèse d'ADN, de protéines et de lipides. L'augmentation de la captation de glucose est possible par la surexpression de transporteurs membranaires comme GLUT1.

En conditions hypoxiques, l'activation préalable des oncogènes *Ras* et *Myc* permet l'augmentation de l'expression des facteurs de transcriptions HIF1 α et HIF2 α qui favorisent la glycolyse en induisant la hausse des transporteurs membranaires et des enzymes glycolytiques (DeBerardinis et al., 2008).

- **Echappement au système immunitaire**

La surveillance immunitaire est responsable de la reconnaissance et de l'élimination des cellules cancéreuses. Le système immunitaire est une barrière au développement des cancers. En effet, l'immunodéficience des organismes augmente l'incidence de la maladie (Kim et al., 2007).

En revanche, l'apparition de tumeurs présume que le système immunitaire n'a pas joué son rôle, la tumeur ayant échappé à la surveillance et à la mort. Le processus d'évasion de la tumeur au système immunitaire comprend une phase d'élimination, une phase d'équilibre entre la croissance tumorale et la suppression immunitaire puis une phase d'échappement. L'immuno-surveillance est principalement orchestrée par les lymphocytes T et les lymphocytes cytotoxiques naturels (NK). L'infiltration de ces cellules dans la tumeur est de bon pronostic. La sécrétion de facteurs suppressifs comme le TGF β (transforming growth factor β) et/ou le recrutement de cellules inflammatoires immunosuppressives (comme les lymphocytes T régulateurs et les cellules myéloïdes suppressives) paralysent le système immunitaire entraînant l'échappement et la survie des cellules cancéreuses.

2. Dissémination métastatique

Etymologiquement, le mot métastase vient du grec « changer de place ». Les métastases sont des cancers secondaires issus de la colonisation tissulaire de cellules cancéreuses provenant de la tumeur

d'origine. Il s'agit de la dernière étape de la progression tumorale responsable d'environ 90% des décès par cancer (Chaffer and Weinberg, 2011). En 1889, le chirurgien britannique Stephen Paget publie dans le *Lancet* un article exposant la théorie « de la graine et du sol » à l'origine de la compréhension des mécanismes de dissémination. Après avoir autopsié plus de 700 femmes décédées d'un cancer du sein, il observe que les métastases présentes se trouvent dans des organes particuliers et non en tout lieu. Selon lui, les cellules cancéreuses (allégories « de la graine ») se disséminent et colonisent des organes distants (allégorie « du sol ») possédant un microenvironnement favorable au développement de métastases (Paget, 1889). Cet organo-tropisme métastatique des cancers est régulé par de multiples facteurs tels que le sous-type moléculaire du cancer, le microenvironnement immunitaire de l'organe hôte et les échanges cellulaires le plus souvent médiés par des cytokines. Concernant les cancers du sein, il est estimé à 20-30% la proportion de malades diagnostiquées d'un cancer au stade précoce qui vont développer des métastases. Ces dernières vont coloniser de façon privilégiée le foie, le cerveau, les poumons et les os (Chen et al., 2018c).

2.1 La cascade métastatique

La cascade métastatique est un processus séquentiel comportant plusieurs étapes successives (Figure 6). Seul 0.01% des cellules de la tumeur primitive vont pouvoir franchir ces étapes afin de développer des métastases macroscopiques (Valastyan and Weinberg, 2011).

Durant l'**invasion**, première étape de ce processus, les cellules épithéliales cancéreuses vont subir plusieurs changements phénotypiques et génétiques afin de se détacher les unes des autres pour envahir les tissus. L'acquisition de propriétés migratoires et invasives est notamment due à la sous-régulation de protéines de jonctions, à la désorganisation du cytosquelette et au gain de fonctionnalités protéolytiques (Pascucci et al., 2016). Les cellules qui survivent à ce stress pourront migrer, de manière individuelle ou collective, dans le tissu intra- et péri-tumoral, entraînant l'invasion locale. Cette étape d'invasion est rendue possible grâce à la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) qui sera détaillée dans la prochaine partie de ce manuscrit.

L'**intravasation** correspond au franchissement de la paroi des vaisseaux lymphatiques et sanguins par les cellules cancéreuses. Ce processus favorisé par l'angiogenèse est régulé par de nombreux facteurs présents dans le microenvironnement tumoral (Fares et al., 2020). Pour exemple, les neutrophiles recrutés par les cellules endothéliales participent à la formation des clusters de cellules invasives et suppriment l'activation des leucocytes ce qui améliore leur survie (Leach et al., 2019). Une fois dans la **circulation**, les cellules tumorales circulantes (CTC) peuvent naviguer seules ou en clusters. Les composants plaquettaires sont essentiels à la protection des CTC contre les contraintes physiques et

immunitaires présentes dans la circulation (Schlesinger, 2018). Une fois arrivées au niveau du site préférentiel, les CTC vont être piégées dans les capillaires entraînant leur **extravasation** au travers des cellules endothéliales. Ce processus complexe nécessite entre autres l'implication de chimiokines, d'intégrines et de cellules circulantes non tumorales (Fares et al., 2020). Au sein de ce site privilégié se trouve un microenvironnement conditionné par la tumeur primaire avant même l'initiation du processus métastatique appelé niche pré-métastatique (PMN). Le développement de cette niche est possible grâce à la sécrétion de différents facteurs et d'exosomes par la tumeur primaire induisant la perméabilité vasculaire, le remodelage de la matrice extracellulaire et l'immunosuppression (Peinado et al., 2017). La **colonisation**, correspondant à la prolifération des cellules dans l'organe secondaire, est la dernière étape décisive responsable de la formation des métastases. Elle dépend de la sécrétion de facteurs de croissances par les cellules tumorales et stromales mais aussi de la capacité néo-angiogénique de la PMN (Pascussi et al., 2016). Ces dernières étapes de la progression métastatique semblent nécessiter une transition inverse, appelée transition mésenchymo-épithéliale (TME), qui est contrôlée par de nombreux facteurs protéiques et par des micro-ARNs (Moyret-Lalle et al., 2016).

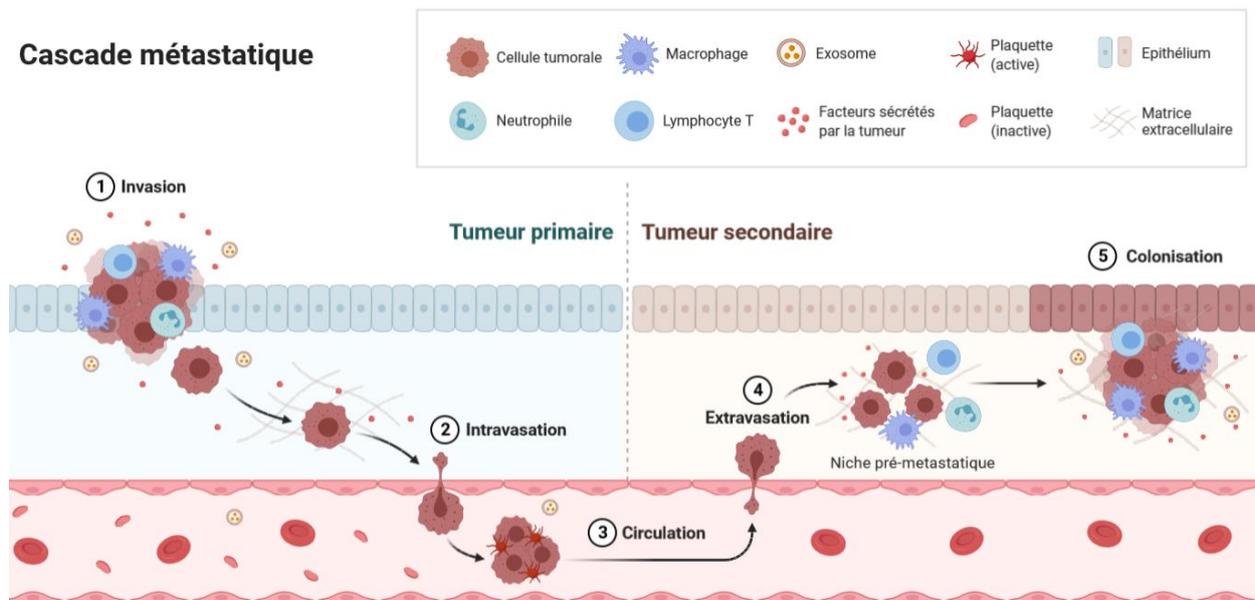


Figure 6- Schéma de la cascade métastatique

Schéma adapté d'un modèle présent sur Biorender réalisé d'après « Fares et al., 2020 ».

2.2 Transition épithélio-mésenchymateuse et propriétés des cellules impliquées

La TEM est un processus dynamique et réversible responsable de la transformation de cellules épithéliales (E) polarisées en cellules mésenchymateuses (M) migratoires à l'origine de l'invasion tissulaire. La TEM est régulée par de nombreux facteurs et est caractérisée par la perte

de la polarité cellulaire, la perte des jonctions cellulaires, la désintégration des filaments de cytokératines et par l'acquisition de propriétés invasives. Ce programme, classé en trois types, intervient en conditions physiologiques et/ou pathologiques (Figure 7).

La TEM de type 1 se produit au cours de l'embryogenèse lors du développement du mésoderme pendant la gastrulation, mais aussi entre autre lors de la migration des cellules de la crête neurale et de la formation du placenta, des valves cardiaques, et du palais (Nakaya and Sheng, 2008).

La TEM de type 2 a été décrite dans un contexte physiologique de régénération et cicatrisation tissulaire mais également dans un contexte pathologique de fibrose. Après un traumatisme, ce programme permet la génération de fibroblastes et autres cellules coordonnant la reconstruction tissulaire. Au cours d'une fibrose, la TEM de type 2 entraîne des dommages aux organes dus à une réponse inflammatoire continue (Angadi and Kale, 2015).

Et enfin, la TEM de type 3, qui est impliquée dans la progression tumorale, est associée à des événements génétiques et épigénétiques qui affectent la régulation des gènes suppresseurs de tumeurs et oncogènes spécifiques de ce programme. Les cellules mésenchymateuses générées par ce processus présentent des propriétés métastatiques et invasives élevées ce qui augmente le potentiel agressif de la tumeur.

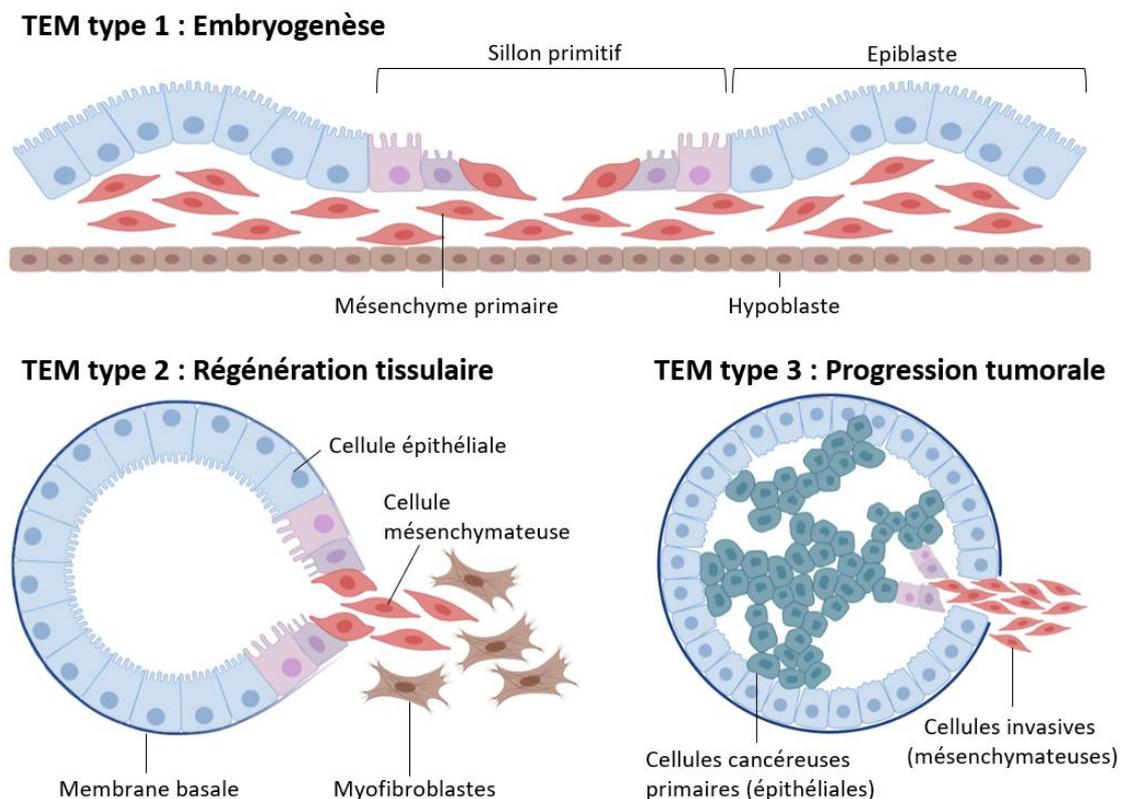


Figure 7 - Les différentes classes de la TEM

Schéma des trois différentes classes de TEM réalisé sur Biorender d'après « Kallir and Weinberg, 2009 ».

▪ Régulation de la TEM

L'initiation, la progression et le maintien des phénotypes épithéliaux et mésenchymateux requièrent la coopération spatio-temporelle d'un réseau complexe de molécules de signalisation ainsi que de régulateurs. Ces facteurs sont regroupés en trois groupes : les molécules **effectrices** qui exécutent le programme, les facteurs **régulateurs** qui orchestrent le programme et les signaux **inducteurs** qui activent le programme.

Dans un contexte de néoplasie, les signaux inducteurs sont principalement composés de facteurs extracellulaires du microenvironnement à l'origine de l'activation de voies de signalisation qui leur sont propres (Figure 8). La voie la plus étudiée et connue comme inductrice de la TEM est celle du TGF β (Moustakas and Heldin, 2014).

Ces différents inducteurs vont activer de manière directe ou indirecte les régulateurs de la TEM comprenant principalement les facteurs de transcription emblématiques associés à la TEM (EMT-TFs) ZEB1/2, TWIST1/2, SNAIL et SLUG. D'autres régulateurs peuvent agir aux niveaux transcriptionnels, post-transcriptionnels, traductionnels, post-traductionnels et épigénétiques pour moduler l'expression des gènes effecteurs de la TEM ou des EMT-TFs (Aiello and Kang, 2019). Ce réseau de molécules est fortement interconnecté. Concernant la transition inverse ou TME, des études ont récemment démontré que les facteurs de transcriptions OVOL1/2 et GRHL2 en sont des régulateurs importants. En effet, OVOL1/2 permet le maintien du phénotype épithélial en réprimant l'expression de *ZEB1* et en induisant celle de *ESRP1* (régulateur de l'épissage alternatif associé à la TME) (Roca et al., 2013). D'autre part, les membres de la famille des miR-200, également associés au renforcement de ce phénotype, jouent un rôle essentiel dans la répression des facteurs de transcriptions ZEB1/2 (Mongroo and Rustgi, 2010).

Ces différents régulateurs activent les gènes associés au phénotype mésenchymateux et répriment les gènes épithéliaux dont celui codant pour la E-cadhérine. La perte d'expression de cette protéine est considérée comme la dérégulation clé déstabilisant les jonctions adhérentes à l'origine de la TEM. Ce gène est régulé à différents niveaux incluant la répression transcriptionnelle mais aussi la méthylation du promoteur, la phosphorylation et la dégradation protéique (Vu and Datta, 2017).

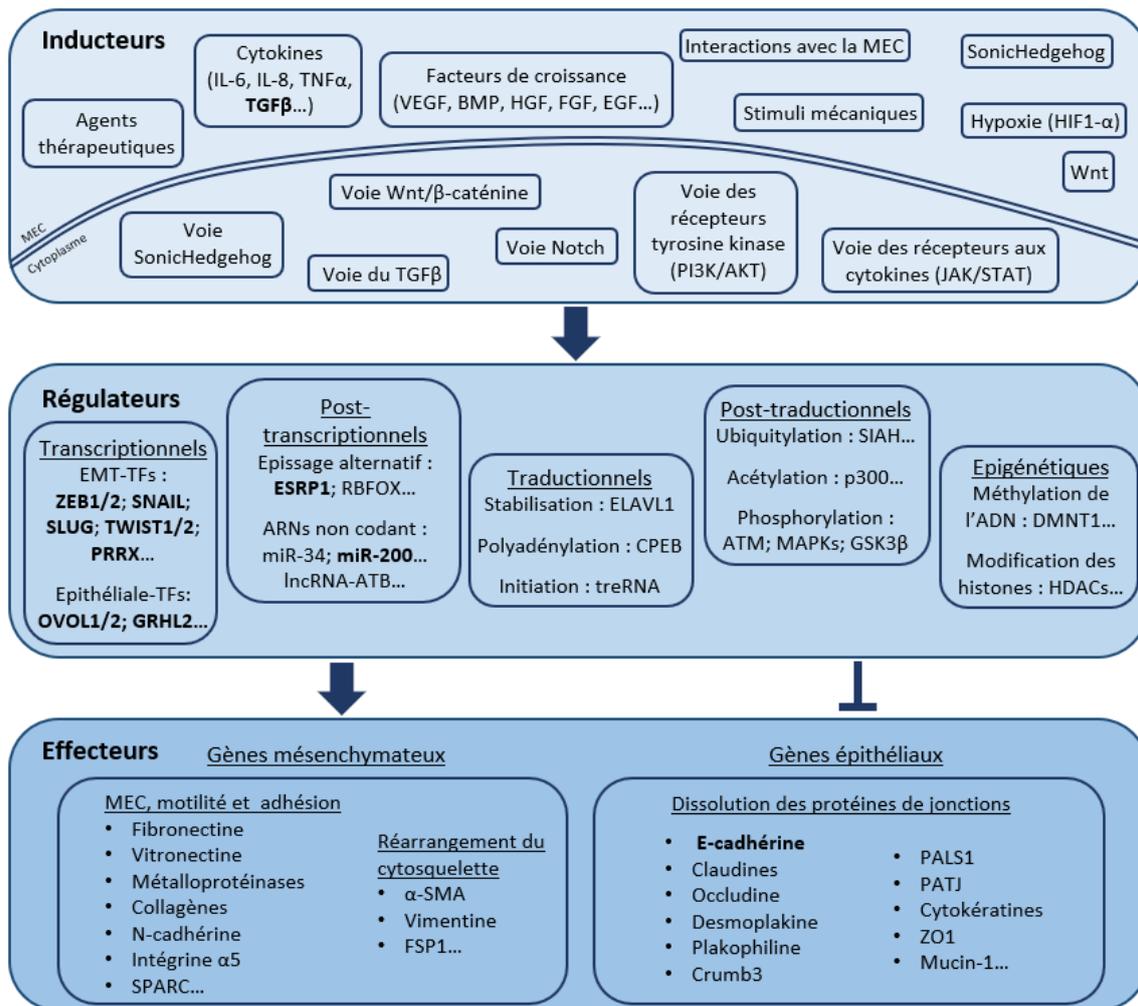


Figure 8 - Les différents acteurs de l'initiation et de la régulation de la TEM

Schéma récapitulatif des différentes molécules liées à la régulation de la TEM réalisé à partir de plusieurs sources citées dans le paragraphe associé. EMT-TFs = facteurs de transcriptions associés à la TEM. Epithélial-TFs = facteurs de transcriptions associés au phénotype épithélial. MEC = matrice extracellulaire.

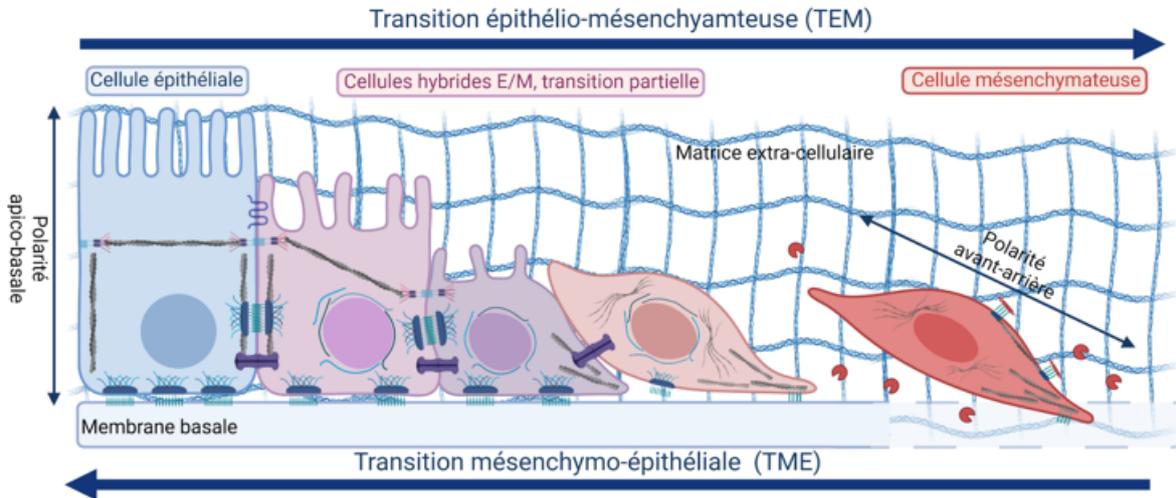
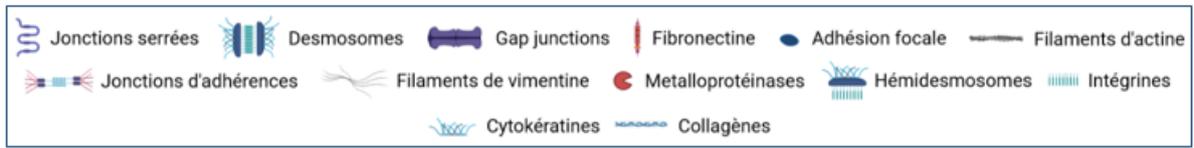
▪ Propriétés et marqueurs des cellules associées à la transition

Depuis quelques années, il est considéré que la TEM et la TME sont des processus graduels faisant passer les cellules d'un état épithélial à un état mésenchymateux et réciproquement au travers d'un spectre de différenciation et dédifférenciation produisant une grande diversité de cellules. Les cellules se trouvant dans cet état intermédiaire, appelées cellules **hybrides E/M**, sont retrouvées dans de nombreux cancers et notamment dans des lignées cancéreuses du sein (Liao and Yang, 2020). Elles sont divisées en plusieurs états (cellules hybrides précoces ou *epithelial-like* et tardives ou *mesenchymal-like*) selon la combinaison de différents marqueurs E et M qui les caractérisent (Figure 8).

Au cours de la TEM, on observe un remodelage cellulaire ainsi que des changements fonctionnels des cellules associées à ce processus (Figure 9).

Les cellules épithéliales, caractérisées principalement par l'expression des marqueurs tels que la E-cadhérine, les cytokératines et l'expression membranaire de la protéine EPCAM, sont des cellules adhérentes attachées à la membrane basale présentant une polarité apico-basale. Ces cellules de forme cuboïde vont perdre progressivement leurs jonctions intercellulaires et réorganiser leur cytosquelette ce qui induit des changements morphologiques. Les cellules mésenchymateuses exprimant la vimentine, la N-cadhérine et les EMT-TFs, sont mobiles dans leur environnement et capables de franchir la membrane basale. Elles sont de morphologie fusiforme et présentent une polarité migratoire due aux réarrangements cytosquelettiques. Les cellules hybride E/M ont à la fois des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux ainsi qu'un phénotype cellulaire intermédiaire plus ou moins proche d'un des deux états en fonction de l'avancement de la TEM (Aiello and Kang, 2019).

Les propriétés cellulaires associées aux composants de la TEM sont spécifiques des états phénotypiques (Figure 9). De manière intéressante, les propriétés des cellules E/M ne sont pas toujours à l'intermédiaire de celles des cellules E et M. Pour exemple, ces cellules sont plus efficaces pour survivre dans la circulation systémique, ainsi que pour coloniser et métastaser dans les organes secondaires. Ceci est dû à une plasticité très importante de ces cellules à l'origine d'une meilleure adaptation face à un stress. Du fait de cette plasticité, les hybrides sont capables d'induire des métastases et sont associés à un mauvais pronostic (Pastushenko et al., 2018). D'autre part, après un traitement adapté, ces cellules sont capables de se transformer en adipocytes bénins ce qui peut être exploité en thérapeutique (Ishay-Ronen et al., 2019).



Marqueurs et propriétés	Cellules épithéliales	Cellules hybrides E/M		Cellules mésenchymateuses
		Cellules épithéliales-like (stade précoce)	Cellules mésenchymateuses-like (stade avancé)	
Marqueurs emblématiques	Cdh1, Krt5, Krt14, EPCAM, ESRP1, TP63, Klf4, OVOL1/2, GRHL1-3	Krt5, Krt14, Vim, Cdh2, TP63, GRHL1-3, OVOL1/2, Zeb1/2, Twist1/2, Snail1	Krt5, Krt14, Vim, PDGFR β , Fap, Cdh2, Zeb1/2, Twist1/2, Snail1	Vim, MMP19, Cdh2, Fap, Prrx1, Zeb1/2, Twist1/2, Snail1
Jonction cellule-cellule	Jonctions serrées, adhérentes, desmosomes...	Dissolution des jonctions	Jonctions résiduelles	Minimes
Cytosquelette	Filaments d'actine alignés sur les jonctions adhérentes, filaments intermédiaires (kératines)	Réorganisation de l'actine (perte de l'alignement), kératines autour du noyau	Apparition fibres de stress et vimentine, kératines autour du noyau	Fibres de stress (actine), filaments intermédiaires (vimentine)
Morphologie	Forme très cuboïde	Forme cuboïde	Forme allongée	Forme allongée
Interactions avec la MEC	Hémidesmosomes liés à la cytokératine (intégrines $\alpha_6\beta_4$), cellules fortement adhérentes	Liaison intégrine β_4 , cellules adhérentes	Liaison intégrine β_4 , cellules faiblement adhérentes	Plaques d'adhésion liées aux fibres de stress (intégrines β_1 et β_3), cellules non adhérentes
Polarité	Polarité apico-basale	Perte polarité apico-basale	Gain polarité avant-arrière	Polarité avant-arrière (front de migration)
Prolifération	+++	+++	++	+
Invasion et migration	+	++	+++ (collective)	+++
Plasticité	+	+++	+++	++
Métastases	+	+++	+++	+

Figure 9 - Schéma et tableau des marqueurs et propriétés des cellules associées à la TEM

Réalisé sur Biorender à l'aide de nombreuses références « Lambert and Weinberg, 2021; Pastushenko and Blanpain, 2019; Liao and Yang, 2020 ».

- **Autres propriétés des cellules générées par la TEM**

En plus de l'invasion, de la migration et de la plasticité, la TEM participe au renforcement d'autres propriétés des cellules cancéreuses (Figure 10). Ainsi, on retrouve des cellules mésenchymateuses avec des **propriétés souches** à haut potentiel initiatrice de tumeurs et **résistantes aux traitements** (Mani et al., 2008). De manière intéressante, les cellules hybrides E/M présentent également une accentuation de ces capacités (Bierie et al., 2017).

Une autre caractéristique des cellules mésenchymateuses générées par la TEM est **l'altération du métabolisme**. En effet, la transition induit notamment une perte de l'expression de la fructose-1,6-bisphosphatase (FBP1) ce qui entraîne une inhibition de la consommation d'oxygène et de la production de ROS, ainsi qu'une augmentation de l'absorption de glucose, de la biosynthèse de macromolécules et de la glycolyse aérobie (Dong et al., 2013). De plus, la TEM induit un **blocage de la sénescence** via l'action des protéines TWIST1 et TWIST2 sur les voies de régulation dépendantes de p53 et Rb (Ansieau et al., 2008). Enfin, les cellules qui ont subi une TEM échappent à l'action cytotoxique du **système immunitaire** (Terry et al., 2017).

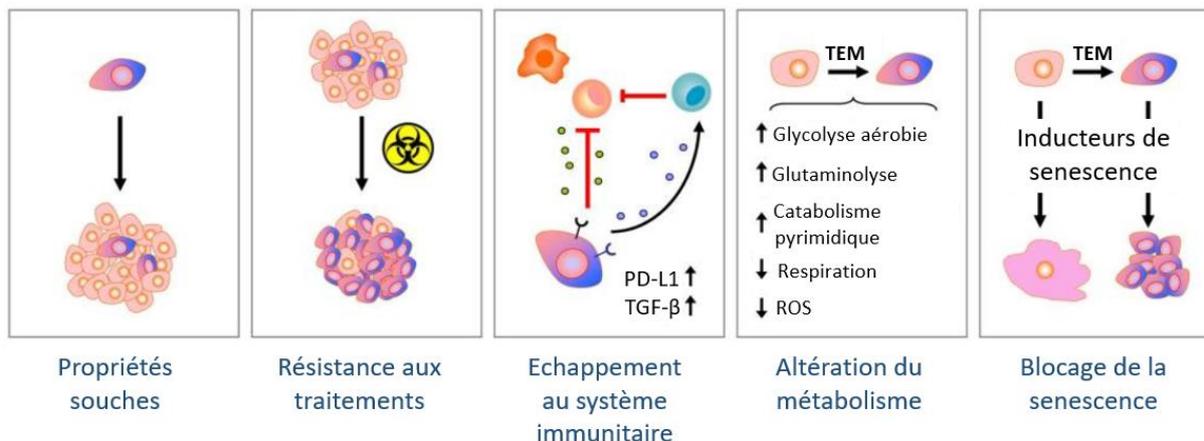


Figure 10 - Autres propriétés de cellules générées par la TEM

D'après « Lu and Kang, 2019 ».

Ainsi, le processus de la TEM permet la formation d'un large panel de cellules cancéreuses plus ou moins différenciées pouvant coexister au sein même de la tumeur (Turashvili and Brogi, 2017).

3. Hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle des cancers du sein

Les cancers du sein sont des maladies présentant une hétérogénéité cellulaire élevée. En effet, les tumeurs sont très différentes d'une patiente à l'autre (hétérogénéité inter-tumorale) et cette variabilité s'observe également spatialement et temporellement à l'intérieur d'une même masse tumorale (hétérogénéité intra-tumorale). Ainsi, l'hétérogénéité intra-tumorale s'exprime par la présence d'un spectre de cellules cancéreuses dans la tumeur qui sont différentes au niveau morphologique, phénotypique, génomique et épigénétique (Marusyk et al., 2012). Cette variabilité cellulaire, associée à une réponse thérapeutique différentielle à l'origine des résistances et récurrences, pourrait découler d'une combinaison de deux modèles de progression tumorale : le **modèle stochastique** d'évolution clonale et le **modèle hiérarchique** ou « cellules souches cancéreuses » (Ginestier, 2017).

3.1 Modèle stochastique d'évolution clonale

Le modèle stochastique, inspiré de l'évolution clonale Darwinienne, est le premier modèle de progression tumorale historiquement décrit (Nowell, 1976). Il suppose que l'apparition de la tumeur résulte de l'instabilité génomique à l'origine de l'induction et du maintien de mutations successives et séquentielles permettant la formation de clones. Par la suite, les sous-clones possédant un avantage sélectif vont se développer et prendre le dessus sur les autres moins performants qui disparaissent naturellement par sélection négative (Zardavas et al., 2015). Ce modèle suppose l'existence de tumeur homogène composée du clone le plus apte à former une tumeur. En revanche, si le clone naissant ne supplante pas mais coexiste avec les autres préexistants, l'hétérogénéité tumorale est augmentée (Franchet and Lacroix-Triki, 2016) (Figure 12). Les trajectoires évolutives émergentes de ce modèle sont complexes et ramifiées à l'image des arbres phylogéniques de Darwin (Greaves and Maley, 2012). En plus des propriétés intrinsèques de la cellule, les facteurs extrinsèques tels que l'environnement tumoral et les traitements prodigués entraînent une pression de sélection des clones les plus agressifs et l'apparition de nouveaux clones. La résistance thérapeutique et la progression de la maladie seraient médiées par une résistance primaire dû aux aberrations génétiques de la cellule cancéreuse et par une résistance secondaire acquise par de nouvelles mutations après un stress (Zardavas et al., 2015). Néanmoins, cette théorie a depuis lors été contestée car elle considère que toutes les cellules peuvent contribuer de manière équivalente à la formation et au développement de la tumeur. De ce fait, elle

ne tient pas en compte des mécanismes de régulation épigénétiques et des phénomènes de plasticité cellulaire.

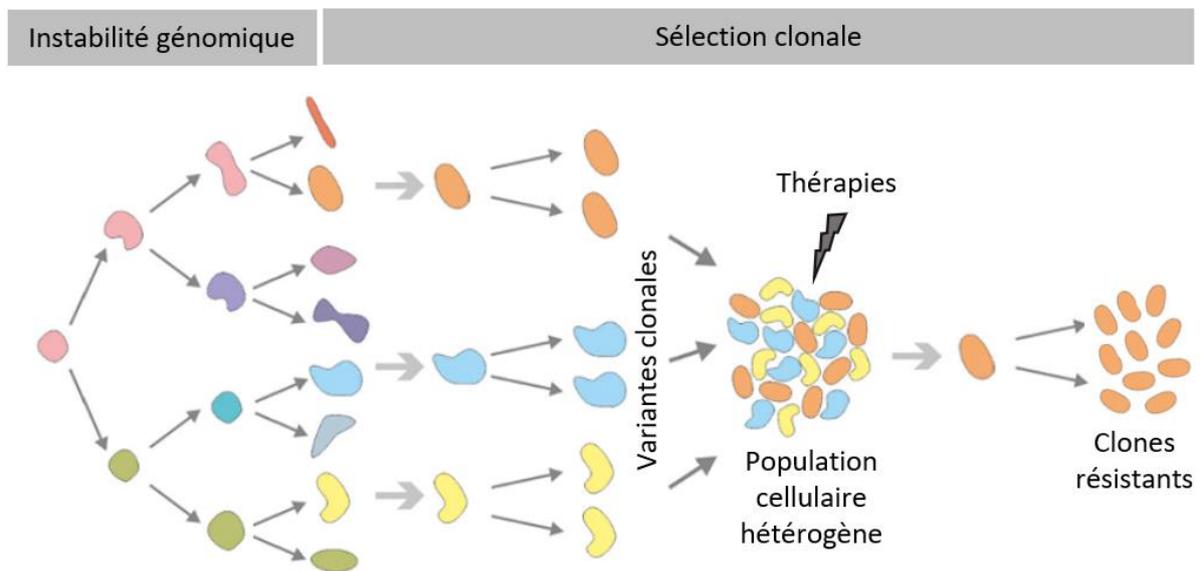


Figure 11 - Modèle stochastique d'évolution clonale du développement tumoral

D'après « Fulawka et al., 2014 ».

3.2 Modèle hiérarchique ou le concept des « cellules souches cancéreuses »

Le **modèle hiérarchique** du développement tumoral suppose que seule une petite sous-population de cellules est capable d'initier et de propager la tumeur : les cellules souches cancéreuses (CSC). Cette théorie est le reflet de l'organisation hiérarchique des tissus sains avec la différenciation progressive d'une cellule souche en plusieurs progéniteurs de phénotypes différents et de potentiel prolifératif limité (Shackleton et al., 2009). De ce fait, les CSCs possèdent des propriétés similaires aux cellules souches normales multipotentes à savoir la capacité de s'auto-renouveler, afin de maintenir un réservoir de CSCs, et de se différencier en cellules progénitrices tumorales moins tumorigènes. Ces dernières vont à leur tour se différencier en cellules tumorales incapables d'initier une tumeur ni de produire d'autres types cellulaires (modèle unidirectionnel) (Ginestier, 2017). Dans ce modèle (Figure 12), l'hétérogénéité intra-tumorale provient donc de la production de tous les types de cellules cancéreuses à partir des différenciations successives d'un groupe de CSCs génotypiquement identique. Ainsi, seule les CSCs, au sommet de la hiérarchie cellulaire, ont la capacité de résister aux traitements et de provoquer des rechutes (Zardavas et al., 2015).

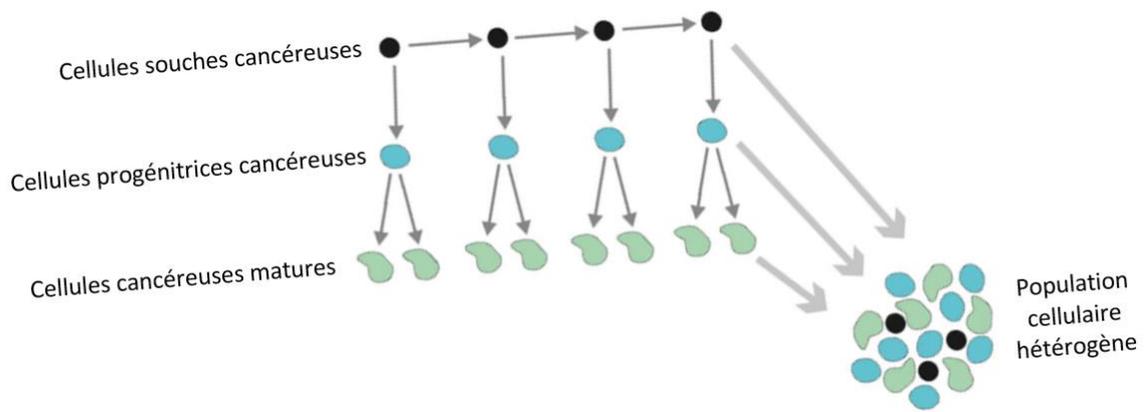


Figure 12 - Modèle hiérarchique du développement tumoral

D'après « Fulawka et al., 2014 ».

3.3 Modèle hiérarchique d'évolution clonale

Indépendamment l'une de l'autre, ces deux théories ne peuvent expliquer l'intégralité de l'hétérogénéité intra-tumorale observée. Bien que différents, ces concepts ne sont pas exclusifs et ont été mutuellement reconsidérés pour proposer un **modèle hiérarchique d'évolution clonale**. Les CSCs sont toujours placées en haut de la hiérarchie de différenciation mais elles sont également soumises à l'évolution clonale ce qui entraîne l'acquisition de nouvelles mutations à l'origine de sous-populations hétérogènes de CSCs de la tumeur (Figure 13) (Niekerk et al., 2017). En plus des aspects génétiques et épigénétiques, ce modèle prend en compte le **microenvironnement tumoral** et la notion de **plasticité cellulaire** (Kreso and Dick, 2014). Ainsi, suite à un stress comme la radiothérapie ou chimiothérapie, les cellules cancéreuses non-souches sont capables de devenir des CSCs. Ce processus de reprogrammation participe aux phénomènes de résistances et de rechutes notamment dans les cancers du sein (Ginestier, 2017; Lagadec et al., 2012).

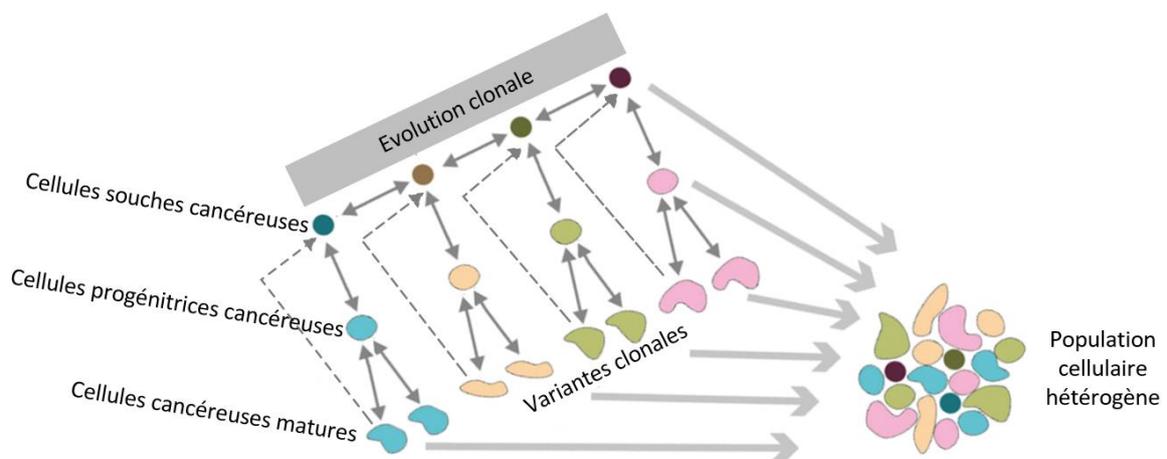


Figure 13 - Modèle hiérarchique d'évolution clonale du développement tumoral

D'après « Fulawka et al., 2014 ».

3.4 Les cellules souches cancéreuses

A l'instar des cellules souches normales, les CSCs forment une petite sous-population de cellules **quiescentes** aux propriétés intrinsèques spécifiques d'**auto-renouveau** et de **différenciation** via des divisions symétriques et asymétriques (Najafi et al., 2018). La division symétrique permet de donner deux CSC filles identiques et la division asymétrique permet de fournir une CSC et une cellule fille différenciée. Ainsi, la définition fonctionnelle d'une CSC repose principalement sur leur capacité à régénérer indéfiniment une tumeur hétérogène similaire à la tumeur initiale. Cette fonctionnalité d'**initiation** et de **maintien** de la tumorigenèse s'exprime *in vitro* par la formation de sphère en suspension et *in vivo* par la génération de tumeurs après xénogreffe dans des animaux immuno-déficients (Golan et al., 2018). En plus de posséder d'autres caractéristiques similaires aux cellules souches normales, comprenant un potentiel prolifératif illimité et un système de réparation de l'ADN efficace, les CSCs sont généralement définies comme plus résistantes aux traitements et peuvent générer des cellules filles qui s'arrêtent à différents stades de différenciation (Wicha et al., 2006).

L'existence de cette sous-population de cellules a d'abord été découverte dans les leucémies myéloïdes aiguës puis dans les tumeurs solides dont le cerveau, le foie, les poumons, le colon, les ovaires, le pancréas, la prostate, le mélanome, la vessie et le sein (Najafi et al., 2018).

L'origine des cellules souches cancéreuses est sujet à controverse. L'hypothèse la plus admise est que ces CSCs proviennent d'un changement génétique ou épigénétique des cellules souches et progénitrices normales. Dans les cancers du sein, les CSCs et les cellules progénitrices partagent des marqueurs phénotypiques identiques démontrant une connexion entre ces deux types cellulaires (Visvader and Stingl, 2014). Une autre théorie explique que les cellules non souches cancéreuses peuvent se différencier en CSC par une reprogrammation oncogénétique principalement médiée par le microenvironnement tumoral et les traitements (Lagadec et al., 2012). Finalement, l'apparition des caractères souches dans les cancers semble résulter de ces différents mécanismes.

La régulation des propriétés des CSCs est à la fois gouvernée par des forces intrinsèques et extrinsèques. Les mécanismes intrinsèques fréquemment reportés sont (Zhang et al., 2018):

- des régulations **génétiques** avec l'activation des facteurs de transcription de la TEM (Snail, Zeb, Twist...) et des cellules souches (Sox2, Oct-3/4, Nanog...) mais aussi des voies de signalisation développementales (Notch, Hedgehog, Wnt, PI3K...)

- des régulation **épigénétiques** comprenant la méthylation de l'ADN, la modification des histones et les miARNs (famille miR200)

- des régulations **métaboliques** (homéostasie des ROS (Zhu et al., 2020))

- des altérations dans la **régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose** (perte notamment des protéines p53 et Rb et amplification des cyclines D1 et E1) (Zhang et al., 2018).

Des mécanismes extrinsèques contrôlent également le caractère souche des cellules cancéreuses. Les cellules souches normales et cancéreuses doivent résider dans un microenvironnement spécifique appelé « **niche** ». La niche des CSCs est composée de cellules cancéreuses non-souches et de nombreuses cellules non-cancéreuses (dont les fibroblastes et les cellules immunitaires) interagissant ensemble via un réseau de cytokines, chimiokines et de facteurs de croissances (Zhang et al., 2018). Ces molécules et facteurs facilitent la survie de la tumeur et favorisent la génération de CSCs invasives. Pour exemple, l'activation de la voie du TGFβ et l'expression de l'interleukine IL-8 induit une augmentation de la proportion de cellules souches cancéreuses mammaires (CSCM) dans les cancers du sein triple négatifs (Bhola et al., 2013).

L'identification des CSCs impliquent trois catégories de marqueurs : des **marqueurs intracellulaires** comprenant des facteurs de transcriptions, des **voies de signalisation** et des **molécules surfaciques** (Lee et al., 2017). L'expression de ces marqueurs permet d'identifier les CSCs spécifiques de chaque cancer. Dans les cancers du sein, le premier biomarqueur décrit pour identifier et isoler la sous-population enrichie en CSCs est une association de l'expression de la protéine membranaire EpCAM (ou ESA), du cluster de différenciation CD44 et de l'absence d'expression de CD24 (Al-Hajj et al., 2003). En effet, seule une centaine de cellules présentant le phénotype **CD44⁺/CD24^{-/low}/ESA⁺** sont capables de régénérer une nouvelle tumeur hétérogène après injection dans une souris NOD/SCID. En plus d'autres antigènes de surface, des biomarqueurs cytosoliques ont par la suite été assimilés à la détection des CSCMs (Tableau 4) dont l'activation de l'enzyme **aldéhyde déshydrogénase 1** (ALDH1) notamment impliquée dans l'oxydation du rétinol en acide rétinoïque essentielle à la différenciation cellulaire (Ginestier et al., 2007).

	Marqueurs intracellulaires	Voies de signalisation	Marqueurs surfaciques
Marqueurs emblématiques des CSCM	ALDH+ Facteurs de transcription : Nanog, Oct-3/4, Sox2, C- Myc, KLF4	Wnt/β-caténine, Notch, Hedgehog, BMI1, Hippo, JAK/STAT	CD24 ^{-/low} , CD44 ⁺ , EPCAM ⁺ , CD133 ⁺ , CD49f ⁺ , CD90 ⁺ , Lgr5 ⁺ ...

Tableau 4 - Marqueurs des cellules souches cancéreuses mammaires

ALDH+ = activité aldéhyde déshydrogénase. D'après « Crabtree and Miele, 2018; Walcher et al., 2020 ».

Le plus souvent, une combinaison de ces différents marqueurs est utilisée afin d'améliorer la détection des CSCs. Par ailleurs, ces marqueurs sont souvent sujet à débat car ils peuvent être associés à

différentes fonctions et semblent dépendre du modèle cellulaire. Par exemple, bien que considérée toutes deux comme des CSCMs, la population ALDH1+ est plus proliférative et tumorigénique que la population CD44⁺/CD24^{-/low} qui possède un plus grand pouvoir migratoire et métastatique (Ginestier et al., 2007). Il est alors admis que les CSCMs existent sous deux formes développementales distinctes mais modulables grâce à leur plasticité : l'état « *mesenchymal-like* » caractérisé par le profil antigénique CD44⁺/CD24^{-/low} et l'état « *epithelial-like* » exprimant l'ALDH. Une faible proportion de chacune de ces populations cellulaires se superposent ce qui se traduit par l'apparition d'une population CD44⁺/CD24^{-/low}/ALDH+, exprimant à la fois des marqueurs mésenchymateux et épithéliaux, appelée cellules souches cancéreuses « hybrid E/M » (Sulaiman et al., 2018). De manière intéressante, ces CSCM possèdent le plus grand pouvoir initiateur de tumeurs (Liu et al., 2014).

4. Lien entre les CSCs et la TEM dans les cancers du sein

Le premier lien théorique apparu entre ces deux processus s'est fait au travers de la compréhension des mécanismes de cicatrisation tissulaire. Lors de la régénération de tissus épithéliaux, une petite sous-population de cellules souches donne naissance à des cellules progénitrices nécessaires aux remplacements des dommages. De plus, le programme de TEM de type 2 permet la génération de myofibroblastes indispensables au recrutement des acteurs de la cicatrisation à partir de cellules épithéliales (Dvorak, 1986).

C'est dans ce contexte qu'à partir du milieu des années 2000 de nombreuses études ont démontré une association entre la plasticité épithélio-mésenchymateuse (PEM) et le concept des CSCs dans les cancers du sein.

Le programme de la **TEM**, qui est indispensable aux premières étapes de la cascade métastatique, génère des CSCs. En effet, l'induction d'une TEM dans les cellules épithéliales mammaires humaines immortalisées (HMLE), par expression ectopique de Twist et Snail mais également par traitement au TGFβ1, entraîne un enrichissement en cellules CD44⁺/CD24^{-/low} et surtout une augmentation de la formation de mammosphères, caractéristique des CSCs (Mani et al., 2008). Dans les cellules HMLER (HMLE transfectées avec l'oncogène H-Ras), seule cette sous-population de cellules CD44⁺/CD24^{-/low} est capable d'induire une tumeur chez les souris immuno-déficientes (Morel et al., 2008). Une fois dans la circulation, le sous-groupe de **CTC** qui est capable d'initier des métastases exprime plus fortement des marqueurs de CSCM (Bacelli et al., 2013). Enfin, l'activation de la **TME** au site métastatique est

essentielle à la formation d'une tumeur secondaire hétérogène et s'apparente à la différenciation de CSC en cellules non-souches (Shibue and Weinberg, 2017).

Ainsi, après des années de recherche, l'hypothèse émise est que les différents états phénotypiques des cellules au cours du processus métastatique correspondent aux plusieurs niveaux de différenciation des CSCM.

Enfin, cette hypothèse est renforcée par le fait que de nombreuses voies de signalisation telles que Notch, Hedgehog, Wnt, et le TGF β régulent les CSCs et induisent la TEM (Scheel and Weinberg, 2012).

Néanmoins, ce lien entre la PEM et les CSCs doit être nuancé. Une activation complète du programme de la TEM génère des cellules mésenchymateuses dans un état phénotypiquement stable ce qui entraîne une forte diminution de leur plasticité (Chaffer et al., 2016). Ceci suggère que les cellules hybrides E/M et non les états extrêmes de différenciation (épithéliaux) et de dédifférenciation (mésenchymateux) possèderaient des propriétés souches (Pastushenko et al., 2018).

4.1 Population CD44⁺/CD24^{-/low}

Comme énoncé précédemment et admis par un grand nombre d'études, le couple de marqueurs de surface CD44⁺/CD24^{-/low} permet d'identifier un type de CSCM (Al-Hajj et al., 2003; Liu et al., 2014). Or, une étude réalisée sur 13 lignées de cancers du sein démontre que le marquage CD44⁺/CD24^{-/low} caractérise les cellules qui présentent des propriétés invasives élevées (surexpression de gènes pro-invasifs) pouvant être alors classées parmi les cellules basales/mésenchymateuses (Sheridan et al., 2006). Ainsi, dans les cancers du sein, la sous population de cellules CD44⁺/CD24^{-/low} serait à la fois caractéristique des CSCs et des cellules mésenchymateuses. Une connaissance plus précise des rôles et implications des protéines CD44 et CD24 dans les cancers du sein aiderait au ciblage thérapeutique des cellules les plus résistantes aux traitements.

La molécule CD44 est une glycoprotéine transmembranaire surexprimée dans des sous-populations de cellules cancéreuses et reconnue en tant que marqueur des CSC dans de nombreux cancers dont celui du sein (Chen et al., 2018). Chez l'homme, le gène codant pour CD44 comporte 19 exons dont 10 ne sont jamais épissés et donc systématiquement traduits composant ainsi la forme standard de la protéine (CD44s). Les variantes d'isoformes CD44v sont générées par épissage alternatif et sont constituées des 10 exons constants plus d'une combinaison des 9 exons restants (Screaton et al., 1992). Ces différentes isoformes expliquent la diversité structurale et fonctionnelle de cette protéine.

Le ligand principal de toutes les isoformes de CD44 est l'acide hyaluronique, un composant important de la MEC, exprimé par les cellules du stroma et par les cellules cancéreuses. La liaison entre CD44 et ses différents ligands active des voies de signalisation telles que la voie Rho GTPases, Ras-MAPK et PI3K/Akt ce qui induit la prolifération, l'adhésion, la migration et l'invasion des cellules (Al-Othman et al., 2020). Ainsi, CD44 participe à de multiples processus physiologiques mais joue également un rôle dans l'initiation et la progression tumorale lorsque cette dernière est dérégulée. Pour exemples, dans les cellules cancéreuses colorectales, celles positives pour CD44 présentent une augmentation des capacités initiatrices de tumeurs comparées aux cellules CD44- dans un modèle de souris immuno-déficientes (Okuyama et al., 2020). De plus, CD44 peut servir de stimulateur ou promoteur de la TEM en régulant les voies qui lui sont associées (Xu et al., 2015). La sous-population de cellules cancéreuses mammaires exprimant fortement CD44 montrent une augmentation des capacités de migration et d'invasion collective par comparaison aux cellules n'exprimant pas CD44 (Yang et al., 2019).

Mon projet de thèse s'articulant autour du rôle de la protéine CD24 dans les cancers du sein, le paragraphe suivant se focalisera sur ses caractéristiques et fonctions.

4.2 Caractéristiques et rôles de CD24 dans les cancers du sein

▪ Structure et séquence de la protéine CD24

Identifié pour la première fois en 1978 (Springer et al., 1978), le cluster de différenciation (CD)24 a été désigné comme antigène résistant aux fortes températures (« heat-stable antigen » ou HSA) et utilisé pour examiner le degré de maturation des cellules hématopoïétiques et neuronales chez la souris (Rougon et al., 1991). Le gène humain *CD24* a été cloné pour la première fois en 1990 révélant ainsi qu'il code pour un très petit peptide de 31 à 34 acides aminés, qui est homologue de HSA chez la souris (Kay et al., 1990) (Figure 14). Après détermination par hybridation *in situ*, le gène *CD24* a été localisé sur le chromosome 6q21 (Mr et al., 1994). Chez l'humain, CD24 est une petite protéine de type mucine car elle possède de nombreux sites de *N*- et *O*-glycosylations potentielles, dues à la présence de sérines et thréonines supplémentaires. Le poids moléculaire attendu de cette protéine est de 3 kDa approximativement mais son profil variable de glycosylation explique un poids réel compris entre 20 et 70 kDa mesuré après extraction de la protéine des tissus (Fang et al., 2010a; Rougon et al., 1991). CD24 ne possède pas de domaine transmembranaire mais se trouve rattachée à la membrane externe de la bicouche lipidique via une ancre glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI). Elle est retrouvée préférentiellement au niveau d'un micro-domaine membranaire riche en cholestérol et en sphingolipides appelé radeau lipidique (Runz et al., 2008). La séquence peptidique de CD24 fait 81

acides aminés avant de subir des modifications post-traductionnelles dans le réticulum endoplasmique (RE) dont les clivages de la partie peptide signal qui permet l'adressage de la protéine à la membrane et des 23 acides aminés en C-terminal qui permettent l'attachement de l'ancre GPI (Altevogt et al., 2021a). La variabilité des modifications post-traductionnelles de glycosylation est dépendante du type cellulaire et du tissu ce qui explique la diversité fonctionnelle de CD24 décrite dans la littérature (Ohl et al., 2003).

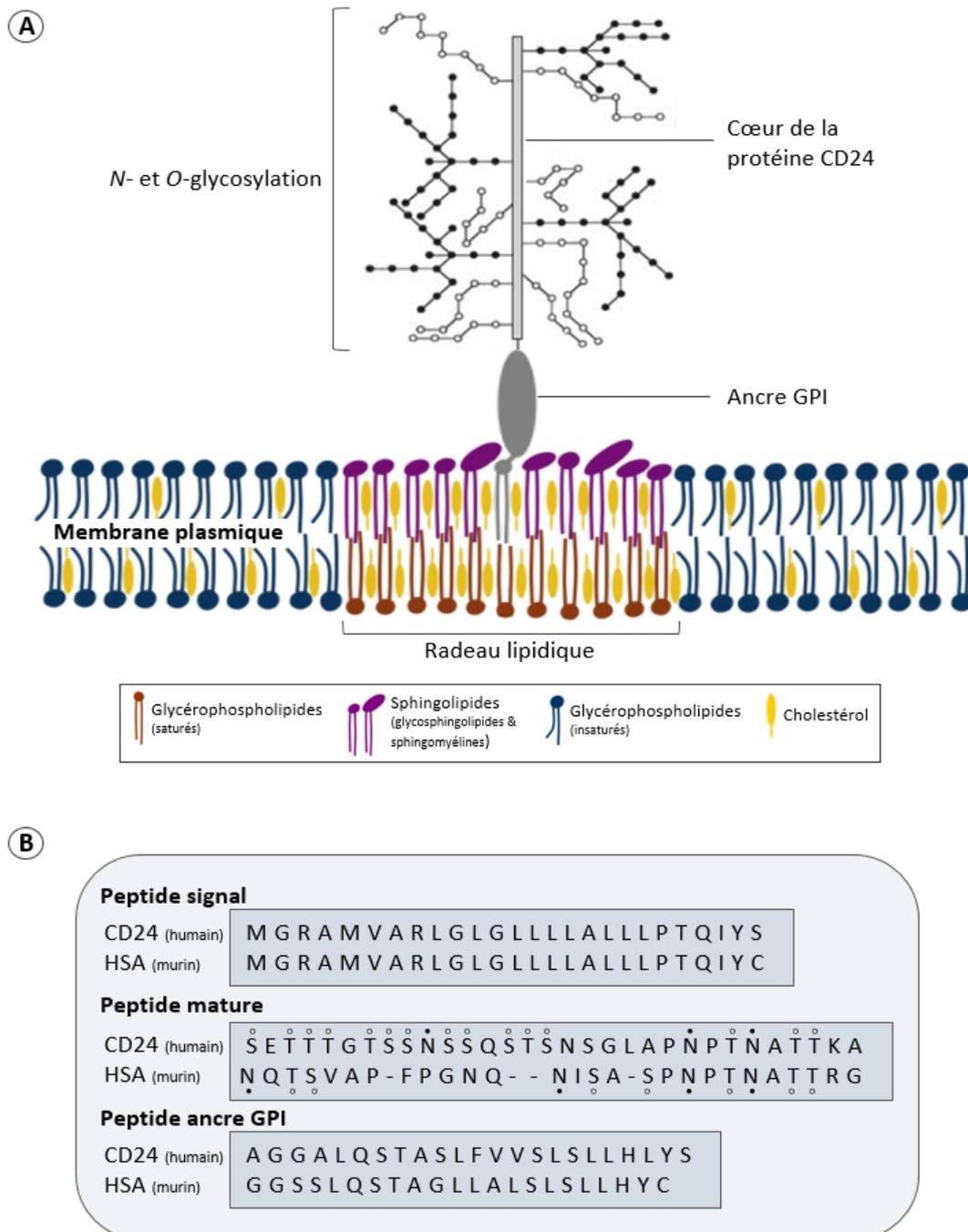


Figure 14 - Structure et séquence de la protéine CD24

(A) Structure de la protéine CD24 bordée de N- et O-glycosylation et localisation au niveau des radeaux lipidiques. D'après « Waheed and Freed, 2010 ». (B) Comparaison des séquences humaines et murines de CD24. HSA: « heat stable antigen »; GPI : glycosyl-phosphatidyl-inositol; ● site de N-glycosylation ; ○ site de O-glycosylation. Adapté de « Sagiv and Arber, 2008 ».

- **Facteurs régulateurs de la protéine CD24**

La régulation de l'expression de CD24 dans les cancers du sein est principalement assurée par des facteurs génétiques et épigénétiques (Figure 15). Le facteur de transcription **Twist** (Vesuna et al., 2009) ainsi que la liaison de l'**oestrogène** avec son récepteur à l'oestrogène α (ER- α) (Kaiparettu et al., 2008) sont des éléments répréresseurs de la transcription de CD24. De plus, un traitement des cellules par l'inhibiteur trichostatin A (TSA) de l'histone déacétylase (**HDAC**) entraîne une augmentation de l'expression de CD24 (Kwon et al., 2015). Concernant l'activation de cette protéine, il a été démontré que l'effecteur terminal de la voie de signalisation Hedgehog (**HH**) sous sa forme tronquée appelé tGL1 (glioma-associated oncogene homolog 1) augmente l'expression de CD24 (Cao et al., 2012). Une autre voie de signalisation identifiée comme régulateur positif de CD24 est la voie **Wnt** (Shulewitz et al., 2006). CD24 est surexprimée dans de nombreux cancers et sa régulation diffère d'un organe à l'autre. Une étude récente indique que la surexpression de cette protéine dans les cancers du sein peut également être corrélée avec l'amplification du gène *CD24* (Zhang et al., 2019).

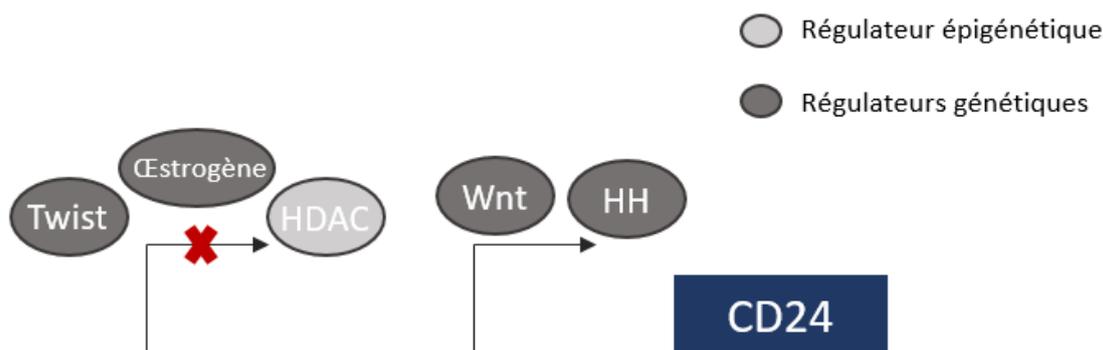


Figure 15 - Régulation transcriptionnelle de CD24

HDAC : histones déacétylases ; HH : Hedgehog.

- **Ligands de la protéine CD24**

Chez l'humain, plusieurs partenaires pouvant se lier à CD24 ont été identifiés. Le premier ligand décrit est la **Sélectine P** qui est une protéine exprimée à la surface des cellules endothéliales et des plaquettes activées (Aigner et al., 1997). L'interaction entre ces deux protéines repose sur l'ajout de l'épitope Sialyl-Lewis (x) sur CD24 et entraîne le glissement des cellules cancéreuses sur la Sélectine P ce qui est une étape clé de l'initiation de la dissémination métastatique (Friederichs et al.). La **Sélectine E**, exprimée à la surface des cellules endothéliales, a été récemment reportée comme ligand de CD24 dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et semble également impliquée dans le processus métastatique (Myung et al., 2011). Deux autres partenaires de CD24 ont été identifiés chez l'homme, les récepteurs **Siglec-5** (Kristiansen et al., 2010a) et **Siglec-10** (sialic acid-binding immunoglobulin-like

lectin) (Barkal et al., 2019) . Ce sont des protéines qui se lient aux glycanes et qui sont exprimées différemment à la surface des cellules immunitaires (Crocker et al., 2007).

- **Signalisations associées à la protéine CD24 dans les cancers**

Bien que la signalisation de CD24 ne soit pas clairement élucidée, plusieurs interactions entre cette protéine et diverses voies de signalisation sont connues dans les cancers. Je vais ici en exposer quelques-unes en me concentrant sur celles décrites dans les cancers du sein.

La voie MAPK (mitogen-activated kinases)

L'influence de CD24 sur la phosphorylation et l'activation des composants de la voie des MAPK a été démontrée dans les cellules cancéreuses et les lymphocytes B. La famille des protéines tyrosine kinases Src comprend 9 membres et joue un rôle clé dans la régulation de la transduction du signal, après activation par différents récepteurs membranaires, via la phosphorylation de résidus tyrosine sur une grande variété de substrats (Gilliam et al., 2017). Il a été montré que plusieurs membres de ce groupe interagissent physiquement avec CD24 dans différents cancers. Pour les carcinomes mammaires, CD24 s'associe et active préférentiellement la protéine **c-Src** au niveau des rafts lipidiques (Baumann et al., 2011). Parallèlement, CD24 semble responsable du recrutement de l'**intégrine-β1** à ce même endroit particulier de la membrane plasmique (Runz et al., 2008). Ce tri-complexe spécifique favorise l'adhésion, la prolifération et la migration des cellules tumorales mammaires et cette fonctionnalité repose sur la présence et la dépendance des trois acteurs les uns avec les autres. En effet, l'activation de c-Src par CD24 entraîne l'interaction de l'intégrine-β1 avec les composants de la matrice extracellulaire (Eyvazi et al., 2018) et stabilise la kinase d'adhésion focale (FAK) impliquée dans l'adhésion médiée par les intégrines (Baumann et al., 2011). De plus, l'activation de la voie de signalisation Raf/MEK/ERK, impliquée dans la prolifération et la différenciation cellulaire, par phosphorylation gouvernée par les protéines Src/FAK est médiée par l'intégrine-β1 (Lee et al., 2012).

La voie NF-κB

La voie NF-κB (nuclear factor-kappa B) se réfère à la famille de facteurs de transcription qui gouverne les réponses cellulaires entre autres face à un stress ou à la présence d'un antigène pathologique (Meffert and Baltimore, 2005). Un lien entre la régulation de CD24 et de NF-κB a été mis en évidence ces dernières années notamment lors des réponses inflammatoires après une lésion (W et al., 2013). Une autre connexion entre ces deux protagonistes en association avec le ligand Siglec-10 a été démontrée. La liaison entre Siglec-10 et son récepteur CD24 est impliquée dans l'inhibition de NF-κB

entraînant la suppression de certains motifs moléculaires associés aux dégâts (DAMP) tels que HMGB1 (high mobility group box 1), HSP70 et HSP90 (heat shock protein) (Chen et al., 2009). Les DAMPs peuvent également se fixer au complexe CD24/Siglec-10 permettant la répression de la signalisation TLR (Toll-Like Receptor) initiée par ces derniers (Liu et al., 2009). Ainsi, la surexpression de CD24 est à l'origine de signaux anti-phagocytaires entraînant l'échappement des cellules cancéreuses au système immunitaire.

Voie Notch et Hedgehog

Comme indiqué précédemment, les voies de signalisation Notch et Hedgehog sont impliquées dans la régulation des CSCs. Dans les cellules néoplasiques mammaires, une inhibition de CD24 inactive p38MAPK ce qui entraîne une diminution de la stabilité de l'ARNm et donc de l'expression de Notch1, à l'origine de la réduction des propriétés souches et de la TEM (Lim et al., 2014). De plus, CD24 peut influencer la signalisation Hedgehog en inhibant **STAT1** ce qui cause la diminution de la transcription de SHH (Sonic Hedgehog) (Suyama et al., 2016).

Autres voies

Dans les cellules du cancer du sein, CD24 active à la fois l'expression et la signalisation en aval de HER2 à savoir PI3K/Akt (Hosonaga et al., 2014). Une autre étude démontre que l'absence de CD24 augmente l'association du C-X-C récepteur de chimiokines de type 4 (CXCR4) dans les radeaux lipidiques et intensifie le niveau cholestérol cellulaire (Schabath, 2006). Récemment, il a été montré que CD24 régule positivement l'invasion des ganglions lymphatiques par les cellules tumorales et l'angiogenèse à travers l'induction de la voie EGFR/STAT3/Src par l'EGF et l'activation de la cascade de signalisation Met/STAT3/Src par l'HGF (hepatocyte growth factor). Ceci favorise la croissance de la tumeur primaire ainsi que les métastases pulmonaires des cancers du sein triple négatifs (Chan et al., 2019).

▪ Pronostiques dans les cancers du sein

L'utilisation de CD24 en tant que biomarqueur pronostique dans les carcinomes mammaires humains reste controversée et contradictoire entre les différentes études. En effet, la surexpression de CD24 est plus commune dans les cellules cancéreuses en comparaison aux cellules normales (Jing et al., 2018) et elle est de mauvais pronostic spécialement dans les cancers Luminal A et triple négatifs (Kwon et al., 2015). L'expression de CD24 dans les cancers du sein primaires semble être considérée comme marqueur d'agressivité (Kristiansen et al., 2003). En revanche, la diminution de l'ARNm et du niveau protéique de CD24 dans les lignées cellulaires invasives comparées aux lignées non-invasives a été

observée (Schindelmann et al., 2002). Plus récemment, un article démontre que les cellules CD24-acquièrent les propriétés souches de migration, d'invasion et de plasticité requises pour la colonisation des tissus à distance. Ainsi, la perte de CD24 est associée à la progression tumorale et l'apparition de métastases (Ortiz-Montero et al., 2018).

Plusieurs raisons peuvent expliquer ces contradictions notamment certains anticorps monoclonaux utilisés pour détecter la protéine CD24 ne sont pas spécifiques du cœur de la protéine mais des résidus d'acides sialiques (Kristiansen et al., 2010a). Il faut également avoir en mémoire que l'expression de CD24 peut varier entre les différents stades de la progression tumorale. Enfin, plusieurs de ces études ont été réalisées chez la souris et non l'humain ce qui peut être à l'origine de différences.

III. Mécanismes de résistance à la radio- et chimiothérapie des cellules cancéreuses mammaires

1. Mécanismes majeurs de résistance.....	69
2. Implication des espèces réactives de l'oxygène dans la résistance	76
2.1 Production et élimination des ROS	777
2.2 ROS et cancers.....	7979
2.3 ROS et résistance thérapeutique	8

L'optimisation des techniques de dépistage ainsi que l'évolution des stratégies thérapeutiques ont permis d'améliorer le bien-être et la survie des patientes. Malgré ces avancées, les cancers du sein demeurent les plus mortels chez la femme en 2018 dans le monde (Gautier Defossez et al., 2019). Les métastases cancéreuses sont les premières causes de morbidité et mortalité car elles sont responsables d'environ 90% des décès par cancer (Chaffer and Weinberg, 2011). Les cancers du sein peuvent être métastatiques au moment du diagnostic (appelés cancer du sein métastatique de novo et représentant 6% des cas) ou le devenir après rechute d'un cancer invasif localisé (20 à 30 % des cas) (Malmgren et al., 2018). Chez de nombreuses patientes, l'évolution de la maladie vers un stade métastatique est due à la résistance des cellules cancéreuses aux traitements utilisés.

On distingue deux types de résistance aux traitements dans les cancers : la résistance innée ou intrinsèque et la résistance acquise ou secondaire. La résistance innée est définie comme l'absence de réponse des tumeurs au traitement initial. La résistance acquise correspond à l'insensibilité progressive des cellules cancéreuses au cours des différents traitements : la tumeur est d'abord réceptive au protocole thérapeutique puis devient résistante et recommence à croître entraînant ainsi l'apparition de rechutes. Ces récurrences sont attribuées à des mutations acquises possiblement causées par le traitement lui-même (Moulder, 2010). De nouveaux protocoles sont alors proposés lorsque l'état du patient le permet mais les disponibilités thérapeutiques sont limitées.

Combattre ces phénomènes de résistance constitue un enjeu majeur de la recherche actuelle. Pour lutter contre la résistance innée, il est essentiel de comprendre les caractéristiques moléculaires spécifiques des cancers et de trouver de nouveaux biomarqueurs afin de prescrire la meilleure thérapeutique dès la première ligne de traitement (Gottesman, 2002). Afin de se battre contre les résistances acquises, une meilleure compréhension des mécanismes de résistance ainsi que la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques sont nécessaires.

Comme énoncé précédemment, beaucoup d'études ont montré que les CSCs sont plus résistantes à une grande variété de thérapies conventionnelles que les non-CSCs (Shibue and Weinberg, 2017). Dans certains cancers, dont les cancers du sein, la plasticité cellulaire responsable de la différenciation/dédifférenciation des CSCs en non-CSCs est en grande partie attribuée à l'activation du programme de la TEM (Medema, 2013; Polyak and Weinberg, 2009). En nous concentrant sur les carcinomes mammaires, nous allons décrire dans ce manuscrit les mécanismes de résistances majeures observées dans les cellules cancéreuses chimiorésistantes et/ou radiorésistantes, correspondant donc en majorité aux CSCs associées au processus de TEM (Shibue and Weinberg, 2017; Singh and Settleman, 2010). Ces mécanismes peuvent être spécifiques du traitement (*e.g.* transporteurs membranaires) ou communs aux deux thérapeutiques (*e.g.* réparation de l'ADN).

1. Mécanismes majeurs de résistance

▪ Absorption et activation des drogues

La « multi-drug resistance » ou MDR est un phénomène permettant aux cellules cancéreuses de survivre contre une grande variété de molécules cytotoxiques en réduisant leur import et en favorisant leur export. Les transporteurs d'efflux dépendant de l'ATP, autrement appelés transporteurs ABC, ont pour rôle d'activer la translocation de substrats variés à travers un canal protéique présent à la membrane plasmique grâce à l'hydrolyse de l'ATP (Lainetti et al., 2020). Ces transporteurs sont à l'origine de l'efflux des agents cytotoxiques depuis le cytoplasme des cellules cancéreuses jusqu'à l'espace extracellulaire. Parmi les transporteurs ABC, la glycoprotéine P (ou ABCB1), la protéine associée à la résistance multi-drogues (MRP ou ABCC) et la protéine associée à la résistance des cancers du sein (BCRP ou ABCG) sont surexprimées dans les cellules cancéreuses résistantes aux traitements (Chen et al., 2018b). Ainsi, ce système d'efflux peut expliquer la chimiorésistance et la survie des cellules cancéreuses, notamment des cellules tumorales mammaires (Ji et al., 2019).

L'efficacité et l'activité des médicaments de chimiothérapie dépendent de leur métabolisation par des enzymes métaboliques. La diminution de l'activité cytotoxique des molécules peut entraîner la résistance des cellules cancéreuses aux traitements. Pour exemple, les enzymes de la famille Glutathion S-transférase (GST) ont pour rôle de détoxifier les agents cytotoxiques ce qui diminuent les dommages infligés à la cellule la protégeant de la mort cellulaire (Mansoori et al., 2017).

▪ Voies de signalisation

les diverses voies de signalisation présentes dans la cellule peuvent être définies comme un réseau interconnecté d'acteurs modulateurs de phénomènes complexes associés notamment à la survie, la croissance et l'invasion (Lainetti et al., 2020). Les dérégulations de ces voies de maintien de l'homéostasie cellulaire peuvent entraîner la progression tumorale et la résistance thérapeutique. Les voies les plus souvent impliquées dans ces mécanismes de chimio- et radiorésistances sont :

- la signalisation apportée par les **facteurs de croissance** qui ouvre sur de multiples voies de transduction impliquée dans la différenciation, la prolifération, la survie et la transformation (Zheng, 2017). Pour exemple, la voie du **TGF- β** , qui est notamment impliquée dans le contrôle de l'apoptose et de la TEM, est retrouvée surexprimée dans de nombreux cancers et contribue à la résistance thérapeutique (Panda and Biswal, 2019). La signalisation aberrante de l'**EGFR** est observée au cours du processus de cancérogenèse et se retrouve amplifiée dans les sous-types cancéreux les plus résistants aux traitements comme les cancers du sein triple négatifs (Park et al., 2014). La transduction du signal

est liée à l'hétérodimérisation de l'EGFR avec d'autres récepteurs dont le **PDGFR-β** (récepteur au facteur de croissance dérivé des plaquettes) et l'**IGF-1R** (récepteur au facteur de croissance analogue à l'insuline) ce qui induit l'activation continue des signalisations associées à savoir :

- la voie **PI3K/Akt/mTOR**, qui permet le contrôle de la survie, la prolifération et la motilité, est fréquemment hyperactivée dans les cellules cancéreuses résistantes principalement à cause de la perte de son régulateur négatif **PTEN** (Phosphatase and TENSin homolog) (Nedeljković and Damjanović, 2019). De plus, en réponse aux dommages à l'ADN induit par les radiations ionisantes, PI3K est activée ce qui entraîne la phosphorylation de Akt qui stimule à son tour d'autres effecteurs (tels que Bcl-2 et mTOR) influençant ainsi la radiosensibilité des cellules (Wu et al., 2015).

- la voie **Grb2/RAS/MAPK/ERK** agit sur la prolifération et la survie mais favorise également le phénotype de chimiorésistance (Yeldag et al., 2018).

- la voie **JAK/Stat3** gouverne de nombreux processus liés à la progression tumorale et à la chimiorésistance une fois surexprimée (Nedeljković and Damjanović, 2019).

- la voie **Src/FAK** entraîne notamment la phosphorylation de la Cavéoline-1 qui est un modulateur important de la radio- et chimiorésistance des cellules cancéreuses (Hehlgans and Cordes, 2011).

- la voie **NF-κB** est essentielle à la régulation de la résistance car elle est impliquée dans l'apoptose, le contrôle de la réponse inflammatoire et l'angiogenèse (Nedeljković and Damjanović, 2019). Pour exemple, les radiations ionisantes peuvent entraîner l'activation de NF-κB qui initie la signalisation de voie de survie cellulaire (Wu et al., 2015).

- la voie **Wnt/β-caténine** joue un rôle crucial dans la résistance thérapeutique des cancers du sein notamment via la régulation des pompes d'efflux, la métabolisation des drogues et la génération de CSCs (Xu et al., 2020).

- la signalisation **Notch** est un régulateur majeur des voies de survie et de la production de CSCs ce qui suggère que l'activation de cette voie confère une résistance accrue des cellules à la chimiothérapie et à la radiothérapie (Ranganathan et al., 2011).

Ainsi, ces altérations des voies de signalisation font parties des mécanismes de défense des cellules face aux traitements. Beaucoup d'études ont démontré l'association entre une grande partie de ces voies et la chimio- et/ou radorésistance. Comprendre pourquoi et comment ces voies se retrouvent hyperactivées dans les cellules résistantes aussi bien avant qu'après traitement pourrait améliorer la thérapeutique.

▪ Réparation de l'ADN

La réparation de l'ADN est un processus biologique par lequel la cellule identifie et corrige les dommages à l'ADN induits par plusieurs acteurs dont les ROS endogènes, les radiations ultra-violetes, les rayonnements X et γ , les produits chimiques mutagènes et les agents de chimiothérapie. Ces derniers provoquent des lésions de l'ADN de différents types en fonction du mécanisme d'action de la molécule : modifications de bases, liaisons intra- ou inter-brins, cassures simple et double brin (Fallet, 2014). De plus, le traitement avec une grande partie de ces agents entraîne la génération de ROS qui vont à leur tour endommager l'ADN. Les mécanismes de réparation de ces divers dommages sont la voie de réparation par excision de base (BER) gouvernée notamment par les protéines PARP1 et XRCC1 et la voie de réparation par excision de nucléotides (NER) médiée par les protéines RPA et XPA (Figure 16). L'association entre ces voies de réparation et la résistance thérapeutique a été démontré dans les cancers du sein. Pour exemple, une étude de 2020 montre que les protéines associées aux systèmes BER et NER sont surexprimées dans les cancers du sein triple négatifs ce qui contribue à l'altération de la sensibilité aux drogues (Lee et al., 2020).

La radiothérapie, quant à elle, induit une instabilité génomique en provoquant des cassures double brin (CDB) soit directement sous l'effet des radiations ionisantes soit indirectement après création de radicaux libres. Ces CDB, considérées comme les lésions les plus toxiques à l'ADN, peuvent être réparées par deux mécanismes différents : la recombinaison homologue (RH) ou la jonction d'extrémités non homologues (JENH). Au cours de la RH, les protéines ATM (ataxia telangiectasia mutated) et ATR (ataxie télangiectasie liée à Rad3) détectent la CDB et recrutent le complexe de réparation de l'ADN associé. Les cancers du sein radio-résistants présentent une hyperactivation de ATM entraînant la déubiquitylation de CHK1 induisant l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire favorisant leur survie (Zhang et al., 2014a). La surexpression de la machinerie JENH comprenant les protéines Ku70/Ku80 et DNA-PK est corrélée à la résistance des cellules aux traitements et a été retrouvée dans de nombreux cancers, notamment dans les cancers du sein (Sishc and Davis, 2017).

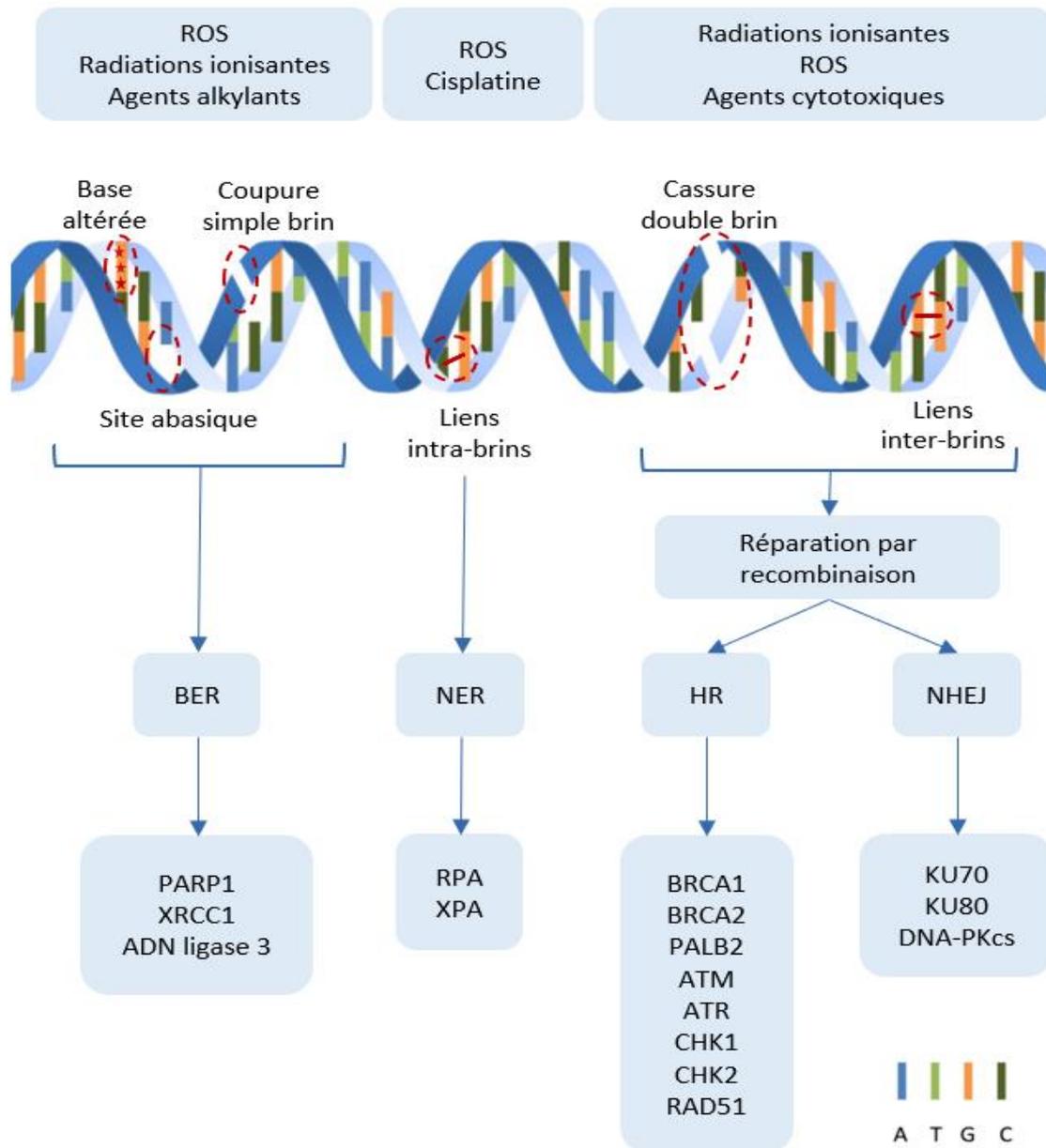


Figure 16 - Les dommages à l'ADN et leur mécanisme de réparation associé

Schéma des différents types de dommages à l'ADN et leur voie de réparation associée. D'après « Fallet, 2014 ; He et al., 2020 ».

- **Mort cellulaire**

L'induction de la mort cellulaire est l'un des principes majeurs des thérapies anticancéreuses. L'efficacité limitée des traitements repose en partie sur l'échappement des cellules cancéreuses à la mort cellulaire radio- et chimio-induite. Comme énoncé dans le chapitre sur les caractéristiques distinctives des cellules, il existe plusieurs formes de mort cellulaire et chacune d'entre elles peut être à l'origine de la résistance thérapeutique.

L'**autophagie** est le processus biologique à l'origine de la dégradation d'organelles ou de particules endommagés par un stress tels que le déficit en nutriments, l'hypoxie, la chimiothérapie ou la radiothérapie. Ce mécanisme, principalement protecteur, est régulé par les gènes *ATG* (autophagy related genes) et permet de maintenir l'homéostasie et d'assurer la croissance des cellules dans son nouvel environnement (Sia et al., 2020).

L'induction de l'autophagie après irradiation est plus élevée dans les cellules du cancer du sein radorésistantes ce qui suggère que ce processus permet la défense des cellules face à la radiothérapie (Liang et al., 2015). Une autre étude menée par Amani et al. a prouvé que l'inhibition de l'autophagie dans les cellules cancéreuses mammaires MCF7 résistantes à la doxorubicine entraîne l'augmentation de l'apoptose à l'origine de la resensibilisation thérapeutique (Amani et al., 2019).

La **nécrose** est une forme de mort cellulaire chaotique déclenchée en conditions défavorables telles que lors de changements extrêmes de pH, de la perte d'énergie et d'un déséquilibre ionique entre l'intérieur de la cellule et le microenvironnement apparaissant après traitements (Sia et al., 2020). Ces dernières années, il a été proposé que l'induction de la nécrose serait un programme de mort alternatif permettant de tuer les cellules cancéreuses lorsque les autres mécanismes sont dérégulés (Thakur et al., 2019). Ainsi, dans plusieurs cancers dont ceux du sein, le ciblage de la nécrose est en cours d'expérimentation en tant que stratégie thérapeutique (Wu et al., 2010).

En revanche, des dérégulations dans les voies de signalisation de la nécrose ont été observées dans de nombreux cancers et peuvent être associées à une diminution de la survie des patients en lien avec la résistance cellulaire aux traitements (Thakur et al., 2019). En effet, dans les cancers du sein, l'inhibition d'expression de gènes nécrotiques réduit la tumorigenèse et sensibilise les tumeurs à la radiothérapie (Liu et al., 2016).

L'**apoptose** est impliquée dans la régulation de nombreux processus physiologiques et pathologiques. L'activation des voies intrinsèques et extrinsèques apoptotiques est finement régulée par une grande variété de régulateurs positifs et négatifs principalement issus de la famille Bcl-2 regroupant des protéines pro (BAX, BCL-XS, BCL-xL, BAK, BIK et BID, NOXA, PUMA) et anti-apoptotiques (BCL-2, BCL-XL, MCL-1, A1/BFL et BCL-W) (Moulder, 2010). L'initiation de ces deux voies repose sur l'activation de protéines de la famille des protéases à cystéine appelées caspases. La voie intrinsèque mitochondriale nécessite l'assemblage d'un complexe nommé apoptosome essentiel à l'activation de caspases effectrices.

La sensibilité à l'apoptose est déterminée par le ratio entre les membres pro- et anti-apoptotiques plutôt que par le niveau d'expression de chacune de ces molécules. Dans les cancers, les mécanismes anti-apoptotiques sont souvent sur-régulés entraînant ainsi l'échappement des cellules à la mort

cellulaire en réponse aux traitements. L'insensibilité à l'apoptose joue un rôle important dans l'acquisition de résistances. Une grande partie des différents mécanismes pouvant être à l'origine de l'inhibition de l'apoptose aboutissant à la survie des cellules cancéreuses après traitements sont regroupés dans le tableau 5 ci-dessous.

Type d'inhibition apoptotique	Mécanismes d'échappement à l'apoptose	Exemples dans les cancers du sein
Déséquilibre du ratio pro vs anti-apoptotique	Surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2	Le blocage des protéines Bcl-2 et Bcl-XL annule la radiorésistance des cellules cancéreuses mammaires (Li et al., 2012)
	Inactivation des protéines pro-apoptotique tel que Bim	L'inhibition d'une protéine régulant négativement le niveau de Bim sensibilise les cellules des CSTN (Byerly et al., 2020)
Défaut d'assemblage de l'apoptosome	Diminution ou inhibition de la protéine APAF-1 possiblement par la protéine TCTP	Dans les cancers du sein, un niveau d'ARNm élevé de TCTP est associé à une survie raccourcie et est de mauvais pronostic (Fischer et al., 2021)
Inhibition des caspases endogènes	Expression ou fonction aberrante des protéines inhibitrices de l'apoptose (IAPs) comprenant notamment les protéines XIAP et survivine	L'expression de la protéine nucléaire XIAP est associée à la croissance cellulaire et la résistance thérapeutique et est de mauvais pronostic pour les cancers du sein (Delbue et al., 2020)
Inhibition de l'apoptose extrinsèque	Blocage de l'activation et/ou de la signalisation des facteurs de nécrose tumorale (TNF) comprenant FAS (ou CD95) et TRAIL ainsi que leurs récepteurs correspondant	La modulation de l'expression de FAS dans les lignées cellulaires du cancer du sein modifie la réponse aux radiations en améliorant la radiosensibilité des lignées résistantes (Horton et al., 2015)
Inhibition de l'apoptose via des molécules de signalisation	Les protéines kinase JNK et p38 MAPK contrôlent l'expression de la famille Bcl-2	L'inhibition de JNK diminue l'autophagie et favorise l'apoptose aboutissant à la radiorésistance des lignées cellulaire mammaires MDA-MB-231 et MCF-7 (Li et al., 2016)
	IGF-1 bloque l'activation des caspases via les voies PI3K/Akt et caséine kinase 2	
	La mutation de p53 altère les fonctions mitochondriales	La voie IGF-1 joue un rôle dans le processus de résistance à la chimiothérapie dans les cancers du sein via divers mécanismes dont l'inhibition de l'apoptose. L'administration d'inhibiteurs de l'IGF-1 entraîne une réponse très efficace à la doxorubicine (Ianza et al., 2021)
	Surexpression de MMP1 diminue la sensibilité cellulaire via les voies PI3K/Akt et NF-κB	
	La protéine Fascine augmente l'expression des protéines anti-apoptotiques et supprime les caspases-3 et -9	
	Notch-1 inhibe l'apoptose en activant les facteurs de survie PI3K/Akt, survivine et Bcl-X _L	
	La protéine Fascine est impliquée dans la chimiorésistance des cancers du sein en jouant un rôle sur la signalisation PI3K/Akt, en augmentant la phosphorylation de FAK et l'expression de XIAP et en supprimant les caspases-3 et -9 et PARP (Ghebeh et al., 2014)	

Tableau 5 - Liste non exhaustive des mécanismes d'échappement à la mort cellulaire programmée

CSTN = cancer du sein triple négatifs ; TCTP = Translational Controlled Tumour Protein ; XIAP = protéine inhibitrice de l'apoptose liée au chromosome X ; TRAIL = tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand ; MMP1 = métalloprotéinase 1. D'après « Pan et al., 2016 ».

▪ **Altérations métaboliques**

Comme décrit précédemment, les cellules cancéreuses utilisent préférentiellement la glycolyse comme source principale d'énergie plutôt que la phosphorylation oxydative (OXPHOS) comme c'est le cas pour les cellules normales en condition aérobie. L'altération métabolique est une caractéristique commune aux cancers du sein naïf et résistant aux traitements (Gandhi and Das, 2019).

Beaucoup de facteurs intrinsèques (oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs) et extrinsèques (disponibilité en nutriments, l'hypoxie, l'acidose et l'interaction avec le microenvironnement tumoral) conduisent à la reprogrammation métabolique. Cette balance glycolyse-OXPHOS semble être dépendante du sous-type de cancer avec une préférence pour l'OXPHOS dans les cellules plus sensibles aux traitements Luminal A et B comparé aux CSTNs (Pelicano et al., 2014). En effet, les CSTNs résistants à la doxorubicine présentent une augmentation du métabolisme glycolytique ainsi que des voies de biosynthèses. Il a été publié que le ciblage de la glycolyse rétablit la sensibilité de ces cellules cancéreuses à la doxorubicine (Zhang and Bai, 2016). La plasticité métabolique est adaptative et se base sur le stade de la progression tumorale, le site métastatique et le type de traitement administré. Un autre niveau de complexité naît de la présence de signaux extrinsèques qui dictent le programme métabolique des cellules cancéreuses. Le microenvironnement tumoral est souvent modifié par les cellules cancéreuses pour les aider à leur reprogrammation métabolique ce qui facilite leur croissance et prolifération.

▪ **Modifications épigénétiques**

Les modifications épigénétiques sont des mécanismes moléculaires qui régulent l'expression génique sans altérer la séquence et la structure de l'ADN. En fonction du gène régulé, ces mécanismes peuvent induire ou inhiber le développement et la progression tumorale, mais également favoriser la sensibilisation ou la résistance des cellules cancéreuses aux traitements. Les régulations épigénétiques sont principalement causées par la méthylation de l'ADN, la modification des histones et l'action de microARNs (Sher et al., 2020).

Les **microARNs** (miARNs) sont des molécules d'ARN simple brin non codant qui régulent des processus biologiques au niveau post-transcriptionnel en réprimant la traduction protéique. Dans le cancer du sein triple négatif, la surexpression de miR-301b entraîne l'inhibition de l'apoptose induite par le 5-FU (Song et al., 2018) tandis que miR-5195-9p favorise la sensibilisation des cellules au Taxol en diminuant la régulation du facteur d'initiation de la traduction EIF4A2 (Liu, 2019). Les signatures d'expression des miARNs sont caractéristiques du type de cancer. En effet, un même miARN peut jouer un rôle antagoniste en fonction de l'organe dans lequel il s'exprime. Dans les cancers du sein, miR-205

inhibe la réparation des dommages à l'ADN induit par les IR (Zhang et al., 2014) aboutissant à la mort des cellules cancéreuses tandis que ce même miARN contribue à la radiorésistance des carcinomes du nasopharynx en inhibant l'expression de *PTEN* (Qu et al., 2012).

La **méthylation de l'ADN** est une modification chimique gouvernée par des enzymes ADN méthyltransférases (DNMTs) qui ajoutent de manière covalente un groupement méthyl sur une région spécifique (îlot CpG) du promoteur de la séquence cible entraînant sa répression. Dans les cancers du sein triple négatif, le statut de méthylation des cellules cancéreuses est associé au développement de résistance aux docetaxel (Gómez-Miragaya et al., 2019).

L'**acétylation et la méthylation des histones** sont des changements post-traductionnels de la partie N-terminale des histones entraînant une modification de la structure de la chromatine à l'origine de la régulation de l'expression génique. Ces changements sont régulés par de nombreuses enzymes dont les histones méthyltransférases, déméthylases, acétyltransférases et déacétylases. Dans les cellules cancéreuses mammaires, l'augmentation de l'activité de l'histone déacétylase leur confère un phénotype de radiorésistance (Sharda et al., 2020).

2. Implication des espèces réactives de l'oxygène dans la résistance

Les espèces réactives oxygénées, autrement appelées ROS, désignent un large groupe de petites molécules dérivées de l'oxygène incluant des espèces radicalaires et non-radicalaires. Les espèces radicalaires, comprenant entre autres l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle (HO^{\cdot}), les peroxydes (RO_2^{\cdot}) et le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}), sont hautement instables et extrêmement réactives car elles possèdent un électron non apparié sur leurs orbitales électroniques externes qui va interagir avec des molécules ou atomes voisins. Les molécules non radicalaires incluent quant à elles l'acide hypochloreux (HOCl), l'oxygène singulet (1O_2), le peroxyde d'azote ($ONOO^{\cdot}$) et le plus pertinent biologiquement, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ces molécules ne sont pas des radicaux libres mais peuvent en être les précurseurs du fait de leur réactivité élevée.

L'étape initiale de la formation de ces molécules est la réduction électronique de la molécule d'oxygène O_2 pour former l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ qui va à son tour être transformé spontanément ou via l'action d'enzyme superoxyde dismutase en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (Figure 17). Le peroxyde d'hydrogène,

bien que non radicalaire, est une molécule toxique capable de donner naissance à d'autres dérivés dont la plus délétère des espèces radicalaires, le radical hydroxyle HO^\bullet (Migdal and Serres, 2011).

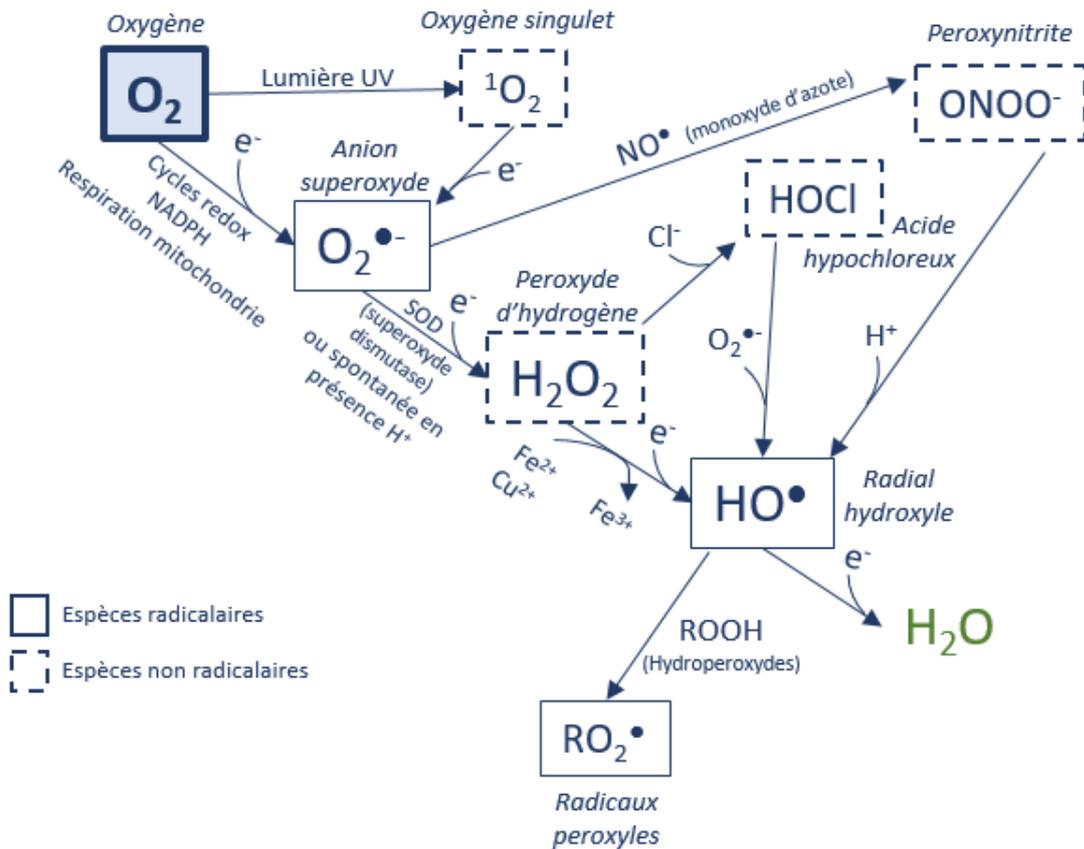


Figure 17 - Schéma simplifié des interactions entre les principales espèces réactives oxygénées

Schéma de la cascade de réduction à l'origine de l'apparition des ROS depuis la réduction de l'oxygène jusqu'à la transformation en eau. Principalement inspiré de « Favier, 2003 ».

La production contrôlée des ROS est considérée depuis plusieurs années comme un processus essentiel de la régulation et signalisation cellulaire participant au maintien de l'homéostasie redox intracellulaire (Hecht et al., 2016).

2.1 Production et élimination des ROS

La génération des ROS est assurée par des facteurs endogènes enzymatiques et non-enzymatiques ainsi que par des facteurs exogènes (Figure 18).

La majorité des ROS endogènes sont produits par la réaction non-enzymatique réalisée par la **mitochondrie** lors de la production d'ATP par la chaîne respiratoire mitochondriale. Durant la respiration, la plupart des molécules d'oxygènes consommées par la cellule sont complètement

réduites en molécules d'eau par le cytochrome c. Cependant, environ 1 à 2% de l'oxygène consommé au niveau mitochondriale est transformé en radicaux superoxydes $O_2^{\cdot-}$ (Handy and Loscalzo, 2012). En parallèle de cette production mitochondriale, l'activité enzymatique NAD(P)H oxydase membranaire (**NOX**) catalyse la réduction de l' O_2 en radicaux superoxydes (Sarniak et al., 2016). D'autres sources cytosoliques ou présentes dans les organites sont considérées comme productrices de ROS tels que la xanthine oxydase, les enzymes du réticulum endoplasmique (comprenant la famille des cytochromes P_{450}), les enzymes de la voie de l'acide arachidonique, les peroxyosomes, les lysosomes et le noyau (Migdal and Serres, 2011).

Les ROS peuvent également être produits par de nombreux processus exogènes ayant pour source des facteurs environnementaux comprenant par exemple les rayons ultraviolets, les radiations ionisantes ainsi que les polluants, la fumée de cigarette et les xénobiotiques (Krumova and Cosa, 2016).

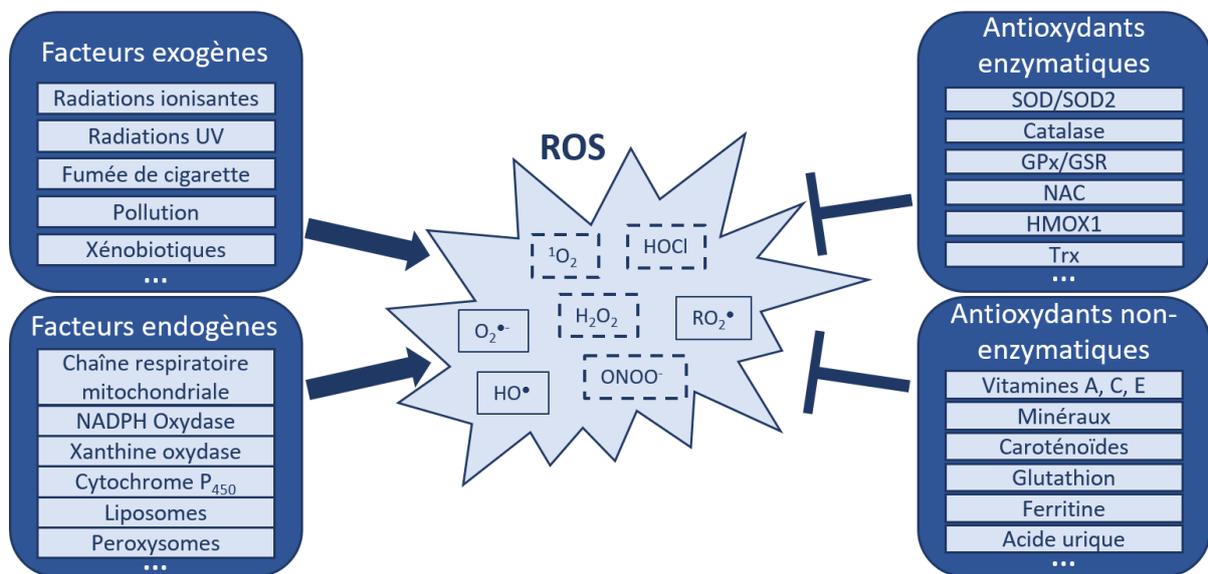


Figure 18 - Les différents acteurs de la production et l'élimination des ROS

SOD = superoxyde dismutase ; SOD2 = manganèse superoxyde dismutase ; GPx = glutathione peroxydase ; GSR = glutathione réductase ; NAC= N-acétyl-cystéine ; HMOX1 = hème oxygénase 1 ; Trx = thioredoxine. Principalement inspiré de « Aggarwal et al., 2019 ».

La régulation de l'élimination des ROS intracellulaires est gouvernée par des systèmes antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques.

Les systèmes antioxydants enzymatiques sont en partie composés de la superoxyde dismutase (SOD), la manganèse superoxyde dismutase (SOD2), la catalase (CAT), la glutathione peroxydase (GPx) et réductase (GSR), la N-acétyl-cystéine (NAC), l'hème oxygénase 1 (HMOX1) et la thioredoxine (TRX) (He et al., 2017). Ces enzymes, dont la fonction est de convertir des métabolites oxydés en peroxyde

d'hydrogène H₂O₂ puis en eau à l'aide de cofacteurs, sont les plus efficaces pour protéger la cellule des ROS (Moussa et al., 2019).

Les antioxydants non-enzymatiques neutralisent les ROS en favorisant l'action des antioxydants enzymatiques ou en transformant directement la réaction en chaîne oxydative (He et al., 2017). Ils sont notamment composés de vitamines A, C et E, de minéraux (principalement le zinc et le sélénium), de flavonoïdes, de caroténoïdes, du glutathion, de l'acide urique et des polyamines (Moussa et al., 2019).

2.2 ROS et cancers

Dans les cellules normales, le niveau de ROS intracellulaire est constant et finement régulé permettant ainsi le maintien de l'homéostasie radicalaire de la cellule. En effet, un niveau modéré de ROS dans la cellule contribue au contrôle de la prolifération et la différenciation cellulaire via leur rôle de messenger secondaire de la signalisation (Figure 19) (Perillo et al., 2020). Cependant, une production excessive de ROS qui ne peut être contrebalancée par les systèmes antioxydants (souvent dû à une diminution des défenses antioxydantes) entraîne la rupture de l'équilibre rédox aboutissant à l'apparition du **stress oxydant** impliqué dans de nombreuses pathologies dont les cancers (Hecht et al., 2016). L'augmentation de la quantité de ROS intracellulaire dans les cellules cancéreuses est induite par des toxines extérieures liées aux cancers (tels que les UV, la fumée de cigarette, les radiations ionisantes...) mais aussi par des mécanismes internes comme l'accentuation des fonctions mitochondriales, de la glycolyse, des signaux de croissance et la diminution des antioxydants, conséquences de l'activation d'oncogènes (Yang et al., 2018). Le stress oxydatif favorise à son tour la progression tumorale de par l'interaction des ROS avec un large spectre de constituants cellulaires comprenant des petites molécules inorganiques, des protéines, des lipides et des acides nucléiques. Ces composants cellulaires sont alors oxydés de manière non spécifique et irréversible ce qui altèrent leurs structures et fonctions, interférant ainsi avec la transduction des voies de signalisation (Aggarwal et al., 2019). La surproduction de ROS dans les cellules cancéreuses leur confère un avantage de survie via la stimulation de la signalisation des voies dépendantes aux facteurs de croissance, la régulation du métabolisme énergétique cellulaire, l'inhibition des systèmes antioxydants et le maintien de l'instabilité génétique (Perillo et al., 2020; Yang et al., 2018).

De ce fait, les ROS sont habituellement considérés comme des médiateurs du développement tumoral. En revanche, il a été démontré qu'au-delà d'un certain seuil de concentration de ROS intracellulaire, les cellules cancéreuses subissent de lourds dommages non réparables entraînant le déclenchement de la mort cellulaire (Vučetić et al., 2017). Les ROS vont induire l'apoptose notamment

via la perturbation de la membrane mitochondriale possiblement par la régulation des voies de signalisation Akt/Famille Bcl-2 et JNK, entraînant le relargage du Cytochrome-c à l'origine de l'activation des caspases (Aggarwal et al., 2019). Depuis cette découverte, l'implication des ROS comme régulateur d'autres types de mort cellulaire tels que l'autophagie et la nécrose a été démontrée (Redza-Dutordoir and Averill-Bates, 2016).

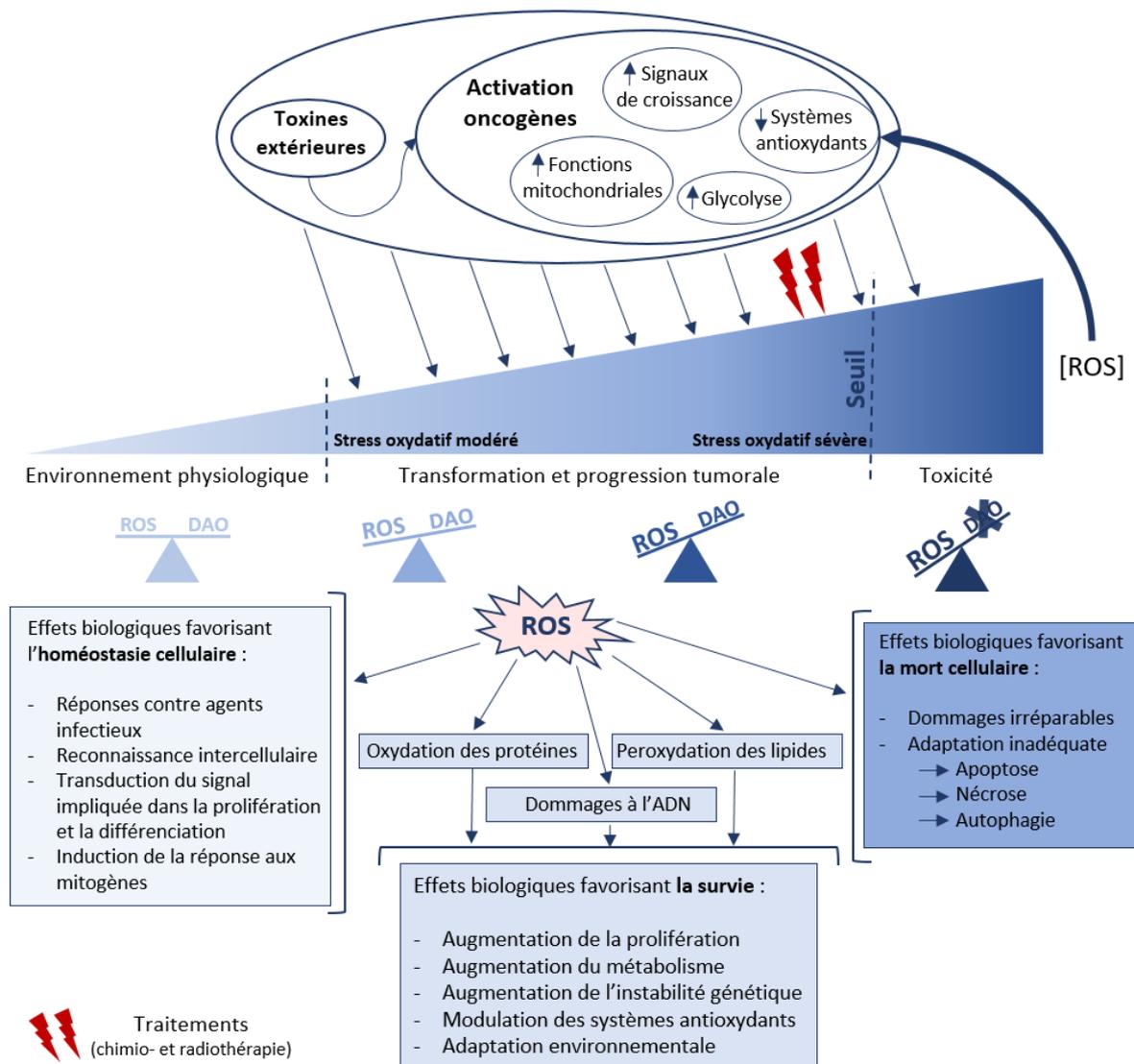


Figure 19 – Effets cellulaires des ROS en fonction de leur niveau intracellulaire

Schéma récapitulatif des différents effets des ROS. Dans les cellules normales, les ROS permettent le maintien de l'homéostasie cellulaire. Des facteurs environnementaux ainsi que des mécanismes internes passant par l'activation d'oncogènes entraînent une augmentation progressive du niveau de ROS ce qui joue un rôle essentiel dans la survie cellulaire. Au début de l'apparition du stress oxydatif reflété par une augmentation de la concentration de ROS, les défenses antioxydantes (DAO) sont également sur-régulées permettant ainsi de contenir ce stress à un niveau modéré. Au cours de la progression, le niveau de ROS ne cesse de croître ce qui entraîne l'inhibition croissante des DAO amplifiant le phénomène et aboutissant à l'apparition d'un stress sévère. Au-delà d'un certain seuil, le plus souvent atteint après traitements par chimio- et/ou radiothérapie, le niveau de ROS est tel qu'il devient toxique pour la cellule et induit la mort cellulaire. Inspiré de « Moloney and Cotter, 2018; Vučetić et al., 2017; Yang et al., 2018 ».

2.3 ROS et résistance thérapeutique

La plupart des agents utilisés en chimiothérapie ainsi que les radiations ionisantes génèrent des ROS intracellulaires. En effet, la radiothérapie entraîne l'augmentation du niveau de ROS à la suite de l'hydrolyse de l'eau et des dommages à l'ADN (Rowe et al., 2008) provoqués par les radiations ionisantes (Tableau 6). Concernant la chimiothérapie, l'élévation des ROS est causée par l'action des médicaments soit directement via l'augmentation des fonctions mitochondriales et/ou l'inhibition des systèmes antioxydants majoritairement, soit indirectement en conséquence de leurs interventions spécifiques sur leurs cibles (Marullo et al., 2013).

Nom	Effets sur la production ROS	Références
Cisplatine	Inflige des dommages à l'ADN mitochondriale entraînant une altération de la chaîne respiratoire	(Marullo et al., 2013)
5-fluorouracile (5-FU)	Induit l'augmentation de $O_2^{\bullet-}$ intracellulaire	(Longley et al., 2003)
Taxanes (dont le paclitaxel)	Favorise le relargage du cytochrome-c et interfère avec la chaîne de transport d'électron entraînant l'augmentation de $O_2^{\bullet-}$ intracellulaire	(Kaufmann and Earnshaw, 2000)
Radiations ionisantes	Les photons et particules affectent les liaisons chimiques et produisent des radicaux libres et des ROS hautement réactifs qui endommagent l'ADN et d'autres composants cellulaires	(Yoshida et al., 2012)

Tableau 6 - Classification des traitements anticancéreux en fonction de leur rôle direct et indirect sur la régulation du niveau de ROS

L'amplification du niveau de ROS par ces thérapies pousse les cellules cancéreuses, dont la quantité est déjà élevée, au-delà d'un seuil induisant la mort cellulaire. Pour exemple, l'inhibition de l'expression de la protéine UCP2, impliquée dans la sous-régulation des ROS, sensibilise les cellules cancéreuses mammaires aux agents thérapeutiques via l'augmentation du stress oxydatif (Pons et al., 2015). Une autre étude de 2018 démontre que dans les CSTNs, les cellules les plus radiorésistantes ont un niveau de ROS plus faible que celles sensibles aux radiations ionisantes. De plus, la combinaison de la radiothérapie avec le composé niclosamide augmente le niveau de ROS ce qui induit l'apoptose cellulaire permettant ainsi de restaurer la sensibilité thérapeutique dans les cellules et dans les xénogreffes de tumeurs (Lu et al., 2018).

Ainsi, la faible induction de ROS intracellulaire après traitements par radio et/ou chimiothérapie est un mécanisme par lequel les cellules cancéreuses résistent aux traitements.

Objectifs généraux

Comme nous l'avons vu dans l'introduction bibliographique, l'hétérogénéité tumorale est une caractéristique clé des cancers, et joue un rôle fondamental dans la réponse aux traitements anticancéreux. Depuis presque 20 ans, la présence d'une sous-population spécifique de cellules, qui jouent un rôle majeur dans la croissance tumorale et la résistance thérapeutique à l'origine des récurrences et propagation des cancers, a été mise en évidence dans la tumeur primaire. Selon un nombre croissant de données, ces cellules tumorales singulières sont définies en tant que cellules souches cancéreuses (CSCs) et semblent être transposables à la majorité des cancers solides. La plasticité cellulaire observée en réponse à des stimuli intrinsèques et extrinsèques expliquerait la réversibilité de ce caractère « souche ». Ce modèle hiérarchique permet de décrire de manière satisfaisante la réponse des cancers solides aux traitements anti-cancéreux. Les marqueurs utilisés pour détecter les CSCs peuvent être spécifiques ou communs entre les différents cancers. Concernant les CSCs mammaires (CSCMs), plusieurs protéines de surface permettent d'isoler cette sous-population cellulaire dont les plus communément utilisées sont le double marquage $CD44^+/CD24^-$ (Al-Hajj et al., 2003). D'autres marqueurs membranaires ou intracellulaires, tels que CD133, PROCR, ESA, CXCR4 ou encore l'ALDH, sont également associés aux CSCMs (Hwang-Versluis et al., 2009). Cependant, il est important de noter que ces différents marqueurs, possiblement en combinaison les uns avec les autres, ne définissent pas rigoureusement les mêmes sous-populations cellulaires.

De manière intéressante et comme évoqué précédemment, le marquage membranaire de la protéine CD24 est également important pour caractériser les cellules métastatiques dans les cancers du sein. En effet, les cellules mésenchymateuses responsables de la propagation du cancer vers d'autres organes sont généralement désignées par le marquage $CD44^+/CD24^-$ tandis que les cellules épithéliales sont $CD44^-/CD24^+$. Le passage progressif et réversible d'un état cellulaire épithéliale (E) vers un état mésenchymateux (M) en passant par l'état d'hybridité E/M est possible grâce à la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) ainsi que par sa réciproque la transition mésenchymato-épithéliale (TME). Classiquement, l'acquisition d'une résistance aux traitements est associée à la TEM (Santamaría et al., 2019), bien que certains papiers aboutissent parfois à des conclusions divergentes soit sur cette résistance, soit sur les mécanismes impliqués dans cette résistance.

Ainsi, de nombreuses preuves mettent en évidence une interconnexion entre le concept de CSCMs et la TEM (Mani et al., 2008). Ce lien passe notamment par l'acquisition de caractéristiques communes dont une résistance accrue à la chimio- et radiothérapie.

La thématique de l'équipe au sein de laquelle s'est déroulé ce travail de recherche porte sur la caractérisation des cellules cancéreuses mammaires résistantes aux traitements et pouvant expliquer les échecs récurrents des thérapeutiques anti-tumorales actuelles. Il a été montré au laboratoire que parmi les différents marqueurs décrits dans la littérature pour caractériser les CSCs mammaires, seule la perte d'expression membranaire de la protéine CD24 permettait de définir une sous population résistante aux fortes doses d'irradiation (Bensimon et al., 2013). En outre, il a également été postulé que CD24 ne serait pas qu'un simple marqueur, mais pourrait également jouer un rôle dans la réponse à l'irradiation (Bensimon et al., 2016). Le niveau de CD24 pourrait notamment influencer sur le niveau de ROS intracellulaire, par un mécanisme inconnu. Il apparaît donc que les cellules CD24^{-/low} pourraient jouer un rôle délétère dans le processus de rechute après radiothérapie. Considérant leur radiorésistance intrinsèque, les cellules CD24^{-/low} irradiées survivantes pourraient donc contribuer à l'acquisition par la tumeur d'un caractère plus agressif.

De plus, à l'aide du modèle cellulaire créé par l'équipe du Dr. Weinberg au sein duquel les cellules E et M partagent le même fond génétique (Elenbaas et al., 2001), il a été mis en évidence au laboratoire une radiorésistance des cellules M comparées aux cellules E en lien avec une baisse de l'apoptose radio-induite (Konge et al., 2018). Cette différence pourrait s'expliquer par un niveau de ROS plus faible dans les cellules M, et qui est corrélé à une augmentation des mécanismes de détoxication. En revanche, dans le cas de la TEM, cette radiorésistance acquise n'est pas reliée directement au seul gène *CD24* du fait du nombre très important de voies et de gènes dérégulés au cours de cette transition.

Face à l'ensemble des données et travaux réalisés au laboratoire, plusieurs questions se sont posées au sein de l'équipe de recherche. Puisque la perte de CD24 entraîne une radiorésistance des cellules mammaires, en est-il de même pour la chimiorésistance dans les cancers du sein ? En effet, nous avons vu dans l'introduction bibliographique le rôle essentiel des ROS dans l'apoptose induite par les drogues utilisées en chimiothérapie. Donc si CD24 module le niveau de ROS, la perte d'expression de cette protéine influence-t-elle la résistance aux drogues ?

Quels sont les mécanismes impliqués dans la modulation du niveau de ROS cellulaire par CD24 ? En effet, il a été prouvé au laboratoire que l'abaissement du niveau de ROS dans les cellules M comparé aux cellules E était corrélé à une augmentation des systèmes de détoxication mais est-ce spécifique de CD24 ou de l'état M ?

Est-ce que le niveau d'expression de CD24 peut influencer d'autres caractéristiques cellulaires ? La perte d'expression de CD24 au cours de la TEM suggère une influence de CD24 sur cette transition. De plus, bien qu'il existe beaucoup de données dans la littérature reliant l'expression de CD24 aux CSCMs

et à la TEM, les fonctions précises de cette protéine dans les cancers du sein restent très mal définies. Les quelques études menées à ce sujet sont assez contradictoires ce qui s'explique notamment par l'utilisation d'un anticorps peu spécifique contre la protéine CD24 dans un certain nombre d'entre elles.

Mon projet de thèse a pour but d'essayer de répondre à certains aspects de ces questions (Figure 20).

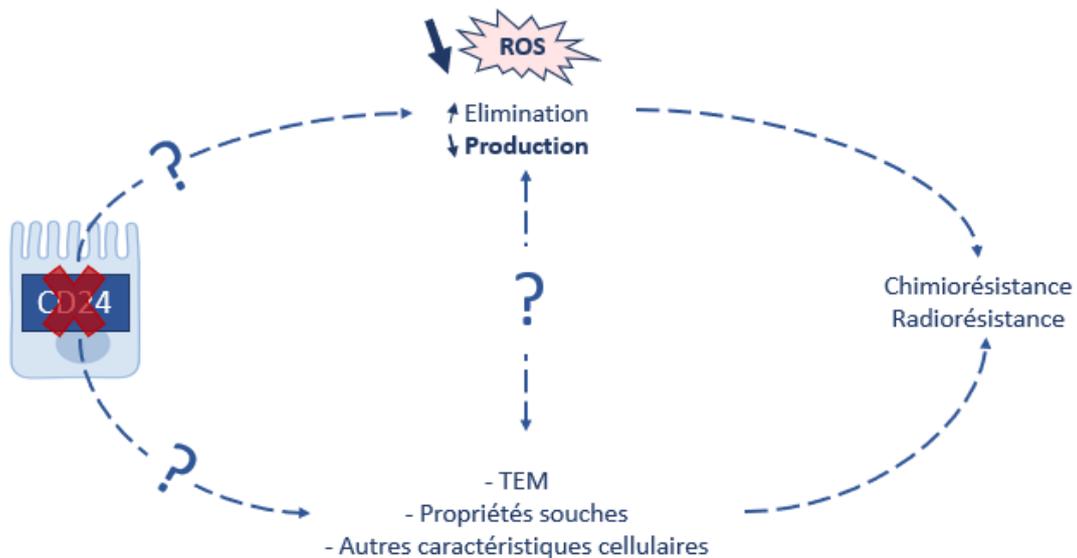


Figure 20 - Schéma récapitulatif de mon projet de thèse

Dans la première partie de mon travail, nous avons réutilisé le modèle de cellules épithéliales mammaires immortalisées et transformées en cellules cancéreuses développé par l'équipe du Dr. Robert Weinberg. Ces cellules appelées HMLE.E peuvent être traitées au TGF β ce qui entraîne l'induction de cellules mésenchymateuses HMLE.M de même fond génétique. Nous avons modulé artificiellement l'expression de CD24 dans les cellules HMLE.E à l'aide de vecteurs fabriqués par le Dr. Biard aboutissant à l'apparition de cellules n'exprimant plus CD24 appelées HMLE.E_CD24⁻. Afin de s'assurer de la singularité du rôle de CD24 dans nos observations, nous avons réexprimé cette protéine grâce à une nouvelle transfection d'un vecteur codant pour son ADNc. Les cellules obtenues complémentées pour CD24 ont été appelées HMLE.E_CD24^c.

Après nous être interrogé sur l'éventuelle modification phénotypique du caractère épithélial de ces cellules, nous nous sommes intéressés au statut ALDH de nos différentes constructions afin de déterminer le caractère souche de ces dernières.

Ces cellules ont été exposées à une forte dose d'irradiation ainsi qu'à différentes drogues couramment utilisées dans le traitement des cancers du sein afin d'évaluer la réponse aux traitements. Afin de comprendre si le niveau de ROS intracellulaire pouvait être impliqué dans la résistance, nous avons effectué l'étude du stress oxydant dans les différentes constructions. Enfin, nous nous sommes intéressés aux différents mécanismes régulant la quantité de ROS dans la cellule à savoir leur élimination par les systèmes de détoxification et/ou leurs niveaux de production principalement par les mitochondries. L'ensemble de ce travail a fait l'objet d'un article scientifique, bientôt soumis pour publication, présenté dans ce manuscrit dans la première partie des résultats.

Dans la deuxième partie de mon travail de thèse, afin d'élucider le rôle direct ou indirect de cette protéine dans la progression tumorale et la résistance aux traitements, nous avons réalisé une étude transcriptomique des cellules HMLE.E et HMLE.E_CD24⁻ non traitées, en collaboration avec l'institut Cochin. Une analyse préliminaire des résultats obtenus, nous a permis de mettre en évidence un ensemble de gènes, regroupés dans différentes voies, dérégulés après la perte d'expression de CD24. Nous nous sommes alors focalisés, en première intention, sur l'expression des protéines impliquées dans les jonctions intercellulaires. Ces gènes sont classiquement reliés à la motilité et aux propriétés migratoires des cellules, qui ont été décrites comme altérées au cours des stades précoces de la TEM (et notamment dans les cellules hybrides E/M). La dérégulation de l'expression de certains de ces acteurs des jonctions intercellulaires a commencé à être étudiée par qRT-PCR. Parallèlement, nous avons réalisé une analyse quantitative de la migration cellulaire afin d'évaluer le rôle de la perte de CD24 dans la motilité cellulaire.

Les données présentées dans cette deuxième partie sont préliminaires, mais permettent d'améliorer la compréhension du rôle de CD24 dans la progression tumorale des cancers du sein.

Résultats

I. Première partie : article

La perte d'expression de CD24 induit une résistance aux radiations et aux drogues anticancéreuses, en modifiant les propriétés souches et en réprimant l'activité mitochondriale dans les cellules de cancer du sein

Loss of CD24 expression promotes radio- and chemo-resistance by inducing stemness properties and mitochondrial repression in breast cancer cells

Loss of CD24 expression promotes radiation- and chemo-resistance by inducing stemness properties and mitochondrial repression in breast cancer cells

Isaline Bontemps¹, Céline Lallemand¹, Denis Biard², Nathalie Deschamps, Emmanuelle Bourneuf¹, Capucine Siberchicot^{1,3}, Sylvie Chevillard¹, Anna Campalans^{1,3}, and Jérôme Lebeau¹

¹ CEA, Institut de Biologie François Jacob, IRCM, Université Paris-Saclay, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France.

²CEA, Institut de Biologie François Jacob, SEPIA, Team Cellular Engineering and Human Syndromes, Université Paris-Saclay, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France.

³ Université de Paris, UMR Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations (UMRE008), F-92265 Fontenay-aux-Roses, France.

Correspondence to: Jérôme Lebeau, e-mail: jerome.lebeau@cea.fr

Keywords: breast cancer, cancer stem cells, CD24, resistance, epithelial-mesenchymal transition

Abstract

There is compelling evidence that cancer stem cells (CSCs) play an essential role in failure of conventional antitumor therapy. In breast cancer, CD24^{-/low}/CD44⁺ phenotype as a high aldehyde dehydrogenase activity (ALDH⁺) are widely associated to CSC subtypes. Furthermore, CD24^{-/low}/CD44⁺ pattern is also characteristic of the mesenchymal cells generated by an epithelial-mesenchymal transition (EMT). CD24 is a surface marker expressed in any tumor types, however, its biological functions and role in cancer progression and treatment resistance remain poorly documented. Our previous data indicated that loss of CD24 expression in breast cancer cells is associated to radiation resistance, in relationship with the control of oxidative stress. Because ROS are known to mediate the effects of anticancer drugs as well as ionizing radiation, we investigated if CD24 could be defined as an actor of radiation- and chemo-resistance of breast cancer cells. Using the HMLE breast cancer cell model, we observed that high dose of ionizing radiation or chronic exposure to high concentration of anticancer drugs lead to the enrichment of CD24^{-/low} cells in the cell culture, indicating that the CD24^{-/low} cells subpopulation was intrinsically more radiation- and chemo-resistant than CD24⁺ cells. This resistance was also observed after artificial modulation of CD24 expression. Loss of CD24 expression did not modify overall epithelial characteristics of HMLE cells, but increased ALDH⁺ CSCs subpopulation, indicating that CD24 knock-down could influence stemness properties, by positioning the cells in a E/M hybrid state. Finally, therapeutic resistance was linked to a lower level of ROS in CD24^{-/low} cells, and CD24 controlled ROS level through the regulation of mitochondrial functions independently of antioxidant activity. Finally, for the first time, we showed that CD24 expression level might be a key factor in the transition between different subtypes of breast CSCs and that loss of CD24 expression is connected to a de-differentiation process.

Introduction

Tumor heterogeneity is a key characteristic of cancer and the presence of cancer stem cells (CSCs) has become increasingly associated with tumor invasion and metastasis^{1,2}. CSCs are operationally defined as a subset of cancer cells that is capable of self-renewal, has tumor-initiating ability and is resistant to ionizing radiation and chemotherapy. Altogether, these features contribute to CSC survival after one or multiple therapeutic approaches, thus leading to treatment failure and tumor progression/relapse. In breast cancers, CSCs can be identified by various markers. CSCs from human breast tumors, characterized as having a $CD24^{-/low}/CD44^{+}$ phenotype, were first identified for their tumorigenic potential in xenotransplanted immune-deficient mice³. Additional markers have been also associated with CSC characteristics: $PROCR^{+}$, ESA^{+} (EpCAM⁺), $CXCR4^{+}$, $CD133^{+4}$, and aldehyde dehydrogenase activity (ALDH⁺), a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome⁵. Each of these markers have been first studied individually, and the subpopulations detected by these markers only partially overlap, indicating that different lineages of CSCs could coexist within the same tumor⁴.

In addition, the heterogeneity and plasticity of breast CSCs are closely associated to metastasis and recurrence. Much evidence connects epithelial-mesenchymal transition (EMT) with the acquisition of stem cell properties. Many dysregulated pathways in breast CSCs, including Notch, hedgehog, Wingless (Wnt), transforming growth factor β (TGF β) and nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF κ B), through the activation of several mesenchymal transcription factors (Twist, Snail, Zeb...), are capable of inducing EMT⁶. In breast cancer, most if not all of the mesenchymal cells generated by EMT acquired a $CD24^{-/low}/CD44^{+}$ pattern, the phenotype that has been ascribed to CSCs⁷⁻⁹. Therefore,

numerous studies indicate that the EMT confers many of the properties of CSCs, allowing to define CD24^{-/low}/CD44⁺ Mesenchymal-like CSCs. On the other hand, recent studies clearly showed the existence of Epithelial-like breast CSCs, with a CD24⁺/CD44^{low} phenotype and essentially characterized by high ALDH activity¹⁰. Finally, several transition states occurring during EMT have been identified, and a hybrid epithelial/mesenchymal (E/M) phenotype is associated with increased tumor stemness^{11,12}. In breast cancer, CSCs are endowed with a plasticity that enables them to reverse transition between E and M states and increased metastatic or tumorigenic potential as well as poor clinical prognosis have been associated to CSCs residing in a E/M hybrid state^{11,13}.

By definition, CSCs are associated to treatments resistance. Numerous studies indicated that breast CSCs are relatively resistant to traditional cancer therapies, including chemotherapy and radiation therapy¹⁴, and this resistance has been observed essentially for CD24^{-/low}/CD44⁺ M CSCs but also for ALDH⁺ E CSCs¹⁵⁻¹⁸. Different mechanisms have been proposed to explain the genotoxic stress survival of CSCs¹⁹, including cell quiescence, increased ability to repair DNA damages, increased antiapoptotic defenses, deregulation of autophagy, metabolic changes, and resistance to reactive oxygen species (ROS), and many of these pathways are mediated by redox imbalance²⁰.

Our group showed previously that high-dose irradiation of breast cancer cell lines leads to the transitory selection of a CD24^{-/low} subpopulation, independently of CD44 expression²¹, and that loss of CD24 expression promotes radiation resistance in relationship with a decreased ROS level²². A lower intrinsic level of ROS, associated to radioresistance, is also a characteristic of CD24^{-/low}/CD44⁺ M breast CSCs^{23,15,9}.

CD24 is a small cell surface protein molecule anchored by glycosyl-phosphatidylinositol, and frequently overexpressed in human cancers²⁴. CD24 is thought to function as an adhesion molecule, but due to variable glycosylation pattern, it acts as a versatile ligand in various cells including cancer cells with diverse physiological functions, making its mechanisms complex to understand. If CD24 is a marker strongly associated to EMT in breast cancers, its biological functions and role in cancer progression and treatment resistance remain poorly documented. Moreover, clinical studies associating CD24 expression and breast tumor progression are conflicting, especially due to the poor specificity of CD24 antibodies used in these studies²⁵. Because ROS are known to mediate the effects of anticancer drugs as well as ionizing radiation, and we previously observed a relationship between CD24 expression and ROS levels, we wondered if CD24 could play a role in the radio- and chemo- resistance of breast cancer cells.

To test this hypothesis, we have studied CD24 expression in epithelial HMLE breast cells after high dose irradiation and after treatment with drugs with different mechanisms of action (5FU, Cisplatin and Paclitaxel). The HMLE cell model has been developed by A. Weinberg's team⁷ to study EMT in breast cancer cells and the main advantage of that model is to use E and M cells in the same genetic background. We showed that CD24^{-/low} cells were selected after treatment and the CD24^{-/low} cells subpopulation was intrinsically more radio- and chemo-resistant than CD24⁺ cells. In order to know if CD24 was functionally implicated in the resistance, we have artificially modulated the expression of CD24 and observed that reduced CD24 expression alone promotes radio- and chemo-resistance of HMLE E cells. This resistance was linked to a lower level of ROS in CD24^{-/low} cells. While antioxidant activity seemed not to be affected by the down-regulation of CD24, our results suggested that CD24 controls ROS

levels through the regulation of mitochondrial functions. Finally, loss of CD24 expression did not modify overall epithelial characteristics of HMLE cells, but increased ALDH1+ CSCs subpopulation, indicating that CD24 knock-down could influence stemness properties, by positioning the cells in a E/M hybrid state.

Results

CD24 low expression defines a radio- and chemo- resistant subpopulation of breast cancer cells

To investigate the involvement of CD24 in the resistance to γ -irradiation and widely used anticancer drugs, we have studied the CD24 expression in epithelial HMLE cells after high dose irradiation (IR), and after treatment with high doses of three drugs with different mechanisms of action: 5-Fluorouracil (5-FU) (Pyrimidine antagonist inducing an imbalance of the nucleotide pool), Cisplatin (alkylating agent) and Paclitaxel (mitotic inhibitor). CD24 expression was analyzed by flow cytometry and CD24^{-/low} subpopulation was defined as the 10% of cells expressing the lowest level of fluorescence in untreated cells.

5 days after irradiation, we observed a dose dependent cell death, previously characterized as a delayed apoptotic process⁹ (Figure 1A, left). As expected considering our previous results²¹, IR selectively enriches the CD24^{-/low} cells subpopulation (Figure 1A, right), indicating that these cells are selected by high dose of ionizing radiation. Similarly, 3 days chronic exposure with increased concentrations of anticancer drugs, leads to a dose dependent cell death (Figure 1B-D, left). As for IR, drug-induced cell death has been strongly associated to late apoptosis in breast cancer²⁶⁻²⁸. For the 3 drugs used, a clear increase in the percentage of CD24^{-/low} cells was observed after 3 days of chronic exposure (Figure 1B-D, right), again in correlation with cell death. Therefore, these data suggest that CD24^{-/low} expression could define a cell population resistant to radio and chemotherapy, independently of the mechanisms of action of the drugs used.

We next investigated if CD24^{-/low} cells are more radio- and chemo- resistant than CD24⁺ cells. These two populations were isolated by FACS (Figure 1E left) and grown separately in order

to study and compare their intrinsic resistance. RT-qPCR analysis clearly showed that the membrane expression level of CD24 observed by FACS was directly correlated to CD24 mRNA expression level in CD24^{-/low} and CD24⁺ (Figure 1E right). 5 days after an irradiation at 6 and 10 Gy, we observed that cell death rate was significantly lower in CD24^{-/low} cells than in CD24⁺ cells (Figure 1F). In the same way, 3 days after treatment with high doses of anticancer drugs, cell death rate was strongly reduced in CD24^{-/low} cells compared with CD24⁺ cells. Therefore, CD24^{-/low} cells have an enhanced ability to survive after irradiation and chronic exposure to chemotherapeutic agents.

Taken together, these results indicate that the CD24^{-/low} cells subpopulation is intrinsically more radio- and chemo-resistant than CD24⁺ cells. Hence, irradiation or drug exposures lead to the enrichment of the CD24^{-/low} cells subpopulation in the whole cell culture.

CD24 down-regulation in epithelial HMLE cells

In order to know if CD24 is an actor more than a simple marker of the radio- and chemo-resistance of breast cancer cells, we transfected epithelial HMLE (E) cells with a p-EBV- plasmid expressing an siRNA against CD24 (E_CD24⁻). As control, the parental CD24⁺/CD44^{low} HMLE cells were transfected with empty p-EBV vector (E_vec). Flow cytometry analyses confirmed the loss of surface expression of CD24 in E_CD24⁻ cells, compared to E cells, while CD24 expression was not affected in control E_vec cells (Figure 2A). We also used a purified population of mesenchymal HMLE (M) cells, obtained after FACS sorting of CD24^{-/low}/CD44⁺ cells induced after prolonged exposure to TGFβ1⁹. The levels of expression of CD24 in E_CD24⁻

cells was similar to that observed in M cells. In order to discard any possible off-target effects of the siRNA, we generated CD24 complemented E cells (E_CD24^c) by transfecting E_CD24⁻ cells with a p-EBV-plasmid coding for the CD24 ORF. A high level of CD24 was observed at the membrane of E_CD24^c cells (Figure 2A). Modulation of CD24 expression levels was further validated by RT-qPCR analysis, showing a down-regulation of about 20 times in E_CD24⁻ cells compared with E or E_vec cells, while an up-regulation of 1.5 times was observed in CD24^c cells. As expected, levels of CD24 mRNA were barely detectable in M cells (Figure S1).

Loss of CD24 expression does not modify overall epithelial features of HMLE cells, but place cells in an E/M hybrid state associated to ALDH1⁺ CSC phenotype.

We next examined the influence of CD24 expression on cellular phenotypes classically associated with EMT and CSCs in breast cancer. E_CD24⁻ cells, as E_CD24^c cells, kept the cuboidal-like epithelial morphology of the parental E cells and formed cobblestone cell islands (Figure 2B). This cobblestone morphology remained different from that observed for the fibroblast-like M cells. There was no significant difference in anchorage-dependent proliferation between transfected cells (E_CD24⁻, E_CD24^c and E_vec) and parental E cells (data not shown).

To further confirm that silencing of CD24 does not modify the epithelial characteristics of transfected HMLE E cells, the expression of multiple EMT-associated genes was measured by qRT-PCR (Figure 2C). The results were normalized to expression levels measured in E cells. ESA (Ep-CAM) and E-cadherin, detectable at very low levels in M cells compared to E cells were not affected by the down or up-regulation of CD24. In the same way, CD44, N-cadherin and

fibronectin mRNAs expression levels, were markedly increased in M cells but not in transfected E cells. The expression of mRNAs encoding the main transcription factors driving EMT was also studied (Twist-1, Twist-2, Snail-1, Snail-2, Zeb-1 and Zeb-2) (Figure 2D). Expression of all these mRNAs was increased in M cells but not in E transfected cells except for Snail-1, overexpressed when CD24 expression was reduced. However, expression of other markers suggested that E_CD24⁻ cells were not in a completely epithelial state (Figure 2E). Keratin 14, a classical epithelial marker in breast cancer²⁹, was down-regulated in E_CD24⁻ cells as in M cells compared to E cells. Vimentin was weakly up regulated and the epithelial transcription factors p63 and OVOL2 were weakly under expressed in E_CD24⁻ cells but at a lower level than in M cells. Therefore, these results indicated that artificial loss of CD24 expression does not modify overall epithelial characteristics of HMLE.E cells, but induces an intermediate E/M hybrid state, close to the full E state.

Stemness properties acquisition during EMT have been associated to the appearance of cells in an intermediate state, also characterized as epithelial- like CSCs displaying an increased ALDH1 activity. ALDH1 is a common marker of breast CSCs and the presence of ALDH⁺ cells is correlated with poor clinical outcome⁵. CD24^{-/low}/CD44⁺ staining and ALDH1 activity identified overlapping but non-identical cell populations, each associated to CSC properties¹⁰. We have studied if ALDH1 activity could be related to CD24 expression in HMLE cells (Figure 2F and supplementary figure S2). About 15-20% of ALDH⁺ cells are present in parental E cells, this subpopulation reached to 40% in E_CD24⁻ cells and re-expression of CD24 (E_CD24^c cells) abolished this increase. ALDH⁺ subpopulation is totally absent in CD24^{-/low}/CD44⁺ M cells.

Altogether, these results indicated that down-expression of CD24 induces the transition of cells from a full Epithelial state to an hybrid E/M state. Indeed, the resulting cells are

phenotypically close to the E phenotype even if they share some features with mesenchymal cells such as the overexpression of the EMT transcription factor Snail-1 and the down-regulation of MET transcription-factors p63 and OVOL2. Moreover, CD24 expression modulates the proportion of the ALDH⁺ subpopulation in the cell culture. Thus, CD24 knock-down could influence stemness properties, leading to ALDH⁺ epithelial-like CSCs rather than CD24^{-/low}/CD44⁺ mesenchymal-like CSCs.

Forced extinction of CD24 expression alone promotes radio- and chemo-resistance of HMLE.E cells

To determine effects of CD24 on radiation and drug sensitivity in HMLE model, E/E_{vec}, E_{CD24⁻}, E_{CD24^c} and M cells were irradiated at 10 Gy or treated with high doses of 5-FU, Cisplatin and Paclitaxel. Differential delayed cell death was observed between E and M cells during 6 days after 10 Gy irradiation (Figure 3A). In CD24^{-/low}/CD44⁺ M cells, cell death was significantly delayed and remained lower than in E (or E_{vec}) cells. Cell death rate after irradiation was also significantly reduced in E_{CD24⁻} cells compared to parental E cells, and reexpression of CD24 (E_{CD24^c} cells) abolished this resistance, indicating that CD24 controls radiation response. In the same way, differential cell death was also observed between E and M cells after 3 days chronic exposure with high doses of anticancer drugs (Figure 3B). For the 3 drugs used, the level of cell death was always lower for M cells than for E (or E_{vec}) cells. The loss of CD24 expression in E_{CD24⁻} cells clearly induced a resistance to the tested drugs similar to that observed in M cells. When CD24 was re-expressed in these cells (E_{CD24^c}

cells), the complemented cells clearly became drug sensitive again, at the same level as the parental cells. These data indicate that E_CD24⁻ cells have an enhanced ability to survive after irradiation and a chronic treatment with anticancer drugs.

To ensure that these results are not specific to our HMLE cells model, two other epithelial breast cell lines, MCF7 and T47D, were also transfected with the p-EBV- plasmid expressing a CD24 siRNA, in order to obtain two cell lines with a low CD24 expression (MCF7_CD24⁻ and T47D_CD24⁻ cells). As for HMLE cells, forced extinction of CD24 expression alone promotes resistance of MCF7_CD24⁻ and T47D_CD24⁻ cells against chronic exposure to high dose of 5-FU and Cisplatin (Supplementary figure S3). So, the control of drug sensitivity by CD24 expression level seemed to be a general phenomenon in breast cancer cells.

We next investigated whether differences in the cell death rate after irradiation or drug treatment between CD24⁻ and CD24⁺ cells had an impact on long-term survival, as measured by the clonogenic cell survival assay after treatment. Clonogenic assays were performed on E/E_vec, E_CD24⁻, E_CD24⁻c and M cells. After irradiation (Figure 3C), surviving fractions at 2, 4 and 6 Gy were significantly higher in E_CD24⁻ than in control E/E_vec cells, and similar to that observed in M cells. Complementation of CD24 (E_CD24⁻c cells) led to a decrease of cloning efficiency, like that of parental E cells. After drug treatments, similar results were observed: surviving fractions for all doses of drug tested were higher in E_CD24⁻ and M cells than in parental control E cells. Again, re-expression of CD24 in E_CD24⁻ cells counterbalanced the increase of cloning efficiency. These results indicate that E_CD24⁻ cells, as M cells, generate a larger progeny than CD24⁺ parental E cells, so CD24 expression level controls the size of this progeny.

Taken together, these data provide evidence that CD24 protein controls the response to radiation and chemotherapeutic drugs. Our results have shown a perfect correlation between CD24 expression levels and cell death rate, with a higher cloning efficiency observed for CD24⁻ cells, corresponding to a global resistance to treatment. Therefore, targeting or modulating CD24 expression may overcome radio- and chemo- sensitivity in breast cancer epithelial cells.

Reduced CD24 expression decreases intracellular ROS concentration

As ROS production is reported to be an essential inducer of apoptosis, we thus studied whether changes in ROS level could be related to radio- and chemo-sensitivity observed in E/E_vec, E_CD24⁻, E_CD24^c and HMLE.M cells. First, we measured the intracellular concentrations of ROS prooxidants using dihydroethidium (DHE) staining. FACS analysis indicated that M cells contained significantly lower concentration of ROS than E/E_vec cells (Figure 4A, left), in agreement with our previous results²¹ and the recurrent observation of low ROS levels in CD24^{-/low}/CD44⁺ breast cancer cells^{15,23}. E_CD24⁻ cells also display a lower DHE staining than E control cells. Moreover, the reexpression of CD24 (E_CD24^c cells) abolished this decreased staining, indicating that CD24 plays a pivotal role in intracellular control of ROS levels. Because mitochondria is the major source of ROS in cancer cells, a similar study was performed using MitoSox-Red, a selective probe for mitochondrial superoxide (Figure 4B, left). Same results were observed: a lower mitochondrial ROS level in M cells than in their parental counterparts, a decrease of mitochondrial ROS in CD24 knockdown cells and a return to the original level when CD24 was re-expressed.

We next investigated the impact of CD24 expression on ROS levels 3 days after irradiation or 5FU treatment. After 10 Gy irradiation or a chronic treatment with 5FU, ROS level increased in all cell lines tested (Figure 4A and 4B, right), but a lower concentration of ROS was maintained in E_CD24⁻ cells (as for M cells) compared to parental E or E_CD24^c cells. Similar results were obtained with the two probes used: DHE and MitoSox-Red.

Taken together, these data indicate that CD24 down regulation leads to decreased basal level of total as well as mitochondrial ROS. After irradiation or drug treatment, we observed an increase in ROS level, but it remains lower in E_CD24⁻ cells than in parental or complemented E cells, consistent with the rate of cell death observed in the different cell lines. Therefore, CD24 could impact radio- and chemo-resistance through the control of ROS level.

CD24 controls ROS level through the regulation of mitochondrial functions independently of antioxidant activity

ROS levels in cells is the result of a balance between endogenous ROS production and the expression of scavenging pathways. A lower ROS level is commonly ascribed to the CSC phenotype in breast tumors, and has been related to enhanced ROS scavengers and/or decreased mitochondrial mass³⁰. First, we determined whether ROS modulation observed in our model could be related to differential regulation of oxidative stress-related genes. We previously showed that HMLE.M cells presented a higher antioxidant activity than HMLE.E cells and characterized a set of genes involved in ROS metabolism⁹. Thus, we studied by RT-qPCR the expression of four key genes in this model: SOD2, HMOX1, GSR, TXNRD1 (Figure 5A). The expression of all these genes is significantly increased in M cells, but not modified in

transfected E cells. These results suggest that lower ROS level observed in E_CD24⁻ cells is not related to high intracellular levels of radical scavengers.

We next studied if modulation of CD24 expression have an impact on mitochondrial functions. Mitochondrial mass was analyzed using Mitotracker Green, a mitochondrial selective probe, and mitochondrial membrane potential was quantified using tetramethylrhodamine, ethyl ester (TMRE) staining. FACS analysis indicated that mitochondrial mass was significantly lower in M cells than in parental E cells (Figure 5B, left). A similar decrease of mitochondrial mass was also observed in E_CD24⁻ cells, and this decreased staining was abolished if CD24 was re-expressed in these cells (E_CD24-c cells). In the same way, mitochondrial membrane potential decreased in M cells compared to E cells, a similar decrease was also observed for E_CD24⁻ cells, and a return to the initial level was showed in E_CD24-c cells (Figure 5C, left). The TMRE/MTG ratio is identical for all the cell lines analyzed (supplementary figure S4), indicating that variation of mitochondrial membrane potential observed in the cell lines is the direct consequence of variation of mitochondrial mass. Then, similar studies were carried out 3 days after irradiation or drug treatment (Figure 5B and 5C, right). As for untreated cells, mitochondrial mass and mitochondrial membrane potential are lower in M cells and in E_CD24⁻ cells, compared to parental E cells and E_CD24-c cells.

Taken together, these data indicated that the lower ROS levels observed in CD24 knockdown cells is related to a lower mitochondrial membrane potential associated to a lower mitochondrial mass, independently of the intrinsic antioxidant activity. Moreover, the lower ROS level in M cells has been associated to ROS scavengers as well as mitochondrial functions. So, a markedly reduced level of mitochondrial ROS production appears to be a key event in the radio- and chemo- resistance controlled by CD24 expression.

Discussion

Our data provide evidence that intrinsic radio- and chemo-resistance of breast cancer cells is directly linked to the membrane expression level of CD24, and that CD24 can be considered not only as a marker but also as an actor of this resistance. In the literature, it was shown that CD24 expression presents a dynamic regulation³¹, its expression being reversible and under epigenetic control. Expression of CD24 is heterogeneous in our HMLE cell model (Figure 1E), as it is frequently observed in breast cancer cell lines and in tumor tissues³². We observed that high dose of ionizing radiation or chronic exposure to high concentration of anticancer drugs lead to the enrichment of CD24^{-/low} cells in the cell culture, and in parallel, purified CD24^{-/low} cells are more radio- and chemo- resistant than the whole cell population.

In the literature, radio- and chemo-resistance of breast cancer cells have been highlighted using different protocols of irradiation or different classes of chemotherapeutic drugs, with different mechanisms of action. In our study, we chose to use high doses of irradiation (4 to 10 Gy) and 3 days chronic exposure with a high concentration of drugs from three categories of antitumor agents: 5FU is an antimetabolites drug, Cisplatin an alkylating agent and Paclitaxel a mitotic inhibitor. In parental HMLE.E cells (Figure 1), we observed a dose dependent cell death, 5 days after irradiation as well as 3 days after drug treatment. For irradiation as for drug exposition, cell death of breast cancer cells has been mainly associated with late apoptosis^{9,33,26-28}. In all experiments, observed cell death is concomitant with a clear increase in the percentage of CD24^{-/low} cells. This enrichment in CD24^{-/low} cells could be the consequence of a selection of CD24^{-/low} cells²¹, but also related to the induction of an active EMT program³⁴. In all cases, our observation associates CD24^{-/low} cells to a radio- and chemo-

resistant cell population, independently of the mechanism of CD24^{-/low} cells enrichment. When we compare the resistance of FACS-sorted CD24^{-/low} cells and CD24⁺ cells (Figure 1 E and F), we observed that CD24^{-/low} cells have a higher ability to survive than CD24⁺ cells after irradiation or antitumor drugs treatment. Altogether, our results associate CD24^{-/low} expression with treatment resistance.

The direct link between CD24 expression and resistance to treatment is provided by our experiments using our HMLE cell model where CD24 expression is artificially down-regulated (E_CD24⁻ cells) then re-expressed in complemented cells (E_CD24^c cells). Cell death level after irradiation and drugs treatment is always lower for E_CD24⁻ cells than for E parental cells, and this acquired resistance is lost after re-expression of CD24 (Figure 3 A and B). As a consequence of this acquired resistance, we have shown a direct impact of CD24 expression on long-term survival (Figure 3C). Clonogenic cell survival assay after treatment clearly shows that loss of CD24 expression leads to the generation of a larger progeny, as observed for M cells.

Failure of conventional treatments has commonly been associated with CSCs survival¹⁴, suggesting that E_CD24⁻ cells have acquired stemness properties. For 20 years, numerous studies have associated loss of CD24 expression with CSC phenotype and EMT, especially in breast cancer. The widely used CD24^{-/low}/CD44⁺ marker allow characterizing M cells, enriched in CSC properties compared to CD24⁺/CD44^{low} E cells^{3,7,9}. As low expression of CD24 is mainly associated to M phenotype, CD24^{-/low} labelling is generally considered as an M marker. However, in our study, E_CD24⁻ cells retain the main characteristics of E cells: cuboidal-like

epithelial morphology and formation of cobblestone cell islands. Furthermore, the expression of main EMT-associated genes (ESA, E-cadherin, CD44, N-cadherin and fibronectin) and 5 out of 6 of the transcription factors driving EMT is not modified (Figure 2). Therefore, treatment resistance observed in E_CD24⁻ cells does not seem to correlate with acquisition of M characteristics.

The development of biomarkers to identify breast CSCs made it possible to show that cells with high ALDH activity present also stemness properties and is a predictor of poor clinical outcome⁵. The percentage of ALDH⁺ cells is significantly higher for E_CD24⁻ cells than for E parental cells, and this increase is directly linked to CD24 levels, as it is not observed in complemented cells (Figure 2F and supplementary figure S2). Radiation- and chemo-resistance properties have been also associated to ALDH⁺ breast cancer cells¹⁵⁻¹⁸. Loss of CD24 expression may promote the appearance of stem characteristics allowing the genotoxic stress survival of E_CD24⁻ cells, radio- and chemo- resistance of E_CD24⁻ cells being correlated to ALDH activity.

In the literature, the view that only a “full” EMT was associated with increased stemness was challenged by later studies demonstrating the existence of Epithelial-like breast CSCs¹⁰. These E CSCs with a CD24⁺/CD44^{low} phenotype are essentially characterized by high ALDH activity. Finally, a more nuanced recent view highlights that epithelial-mesenchymal plasticity is a spectrum of transitory cell states, and tumor cells with the highest stem cell capabilities reside in a hybrid E/M state^{13,35,29,12}.

In our study, if overall epithelial characteristics of HMLE cells are maintained, deregulation of other genes associated with transition states occurring during EMT is also observed: Snail-1,

Vimentin, Keratin 14, p63 and OVOL2 (Figure 2). The strong down-regulation of keratin 14 expression (E marker) and the low but significant overexpression of vimentin (M marker), suggest that E_CD24⁻ cells have acquired few E/M characteristics (Figure 2E). Among the main EMT transcription factors, only Snail1 is strongly overexpressed in E_CD24⁻ cells (Figure 2B). Snail1 expression has been implicated in reprogramming process of somatic cells to pluripotency^{36,37}, and Snail1 also maintains stem-like properties, chemoresistance and ALDH activity in mouse breast cancer cells³⁸. Importantly, Kröger et al. have shown that, both *in vitro* and *in vivo*, breast cancer cells can reside stably and with low cell plasticity in a highly tumorigenic hybrid E/M state, which is driven mainly by Snail1 and canonical Wnt signaling¹³. Finally, the epithelial transcription factors p63 and OVOL2 were weakly but significantly down expressed in E_CD24⁻ cells but at a lower level than in M cells (Figure 2E). Repression of p63 has been implicated in EMT induction in mammary epithelial cells³⁹. OVOL2 is a key regulator of epithelial-mesenchymal plasticity as well as CSCs. Expression of OVOL2 induce MET, antagonizes TGF-β signaling and has been implicated in positioning mammary epithelial cells in an intermediate E/M state⁴⁰⁻⁴². Altogether, these data reinforced the idea that E_CD24⁻ cells display phenotypic characteristics of E cells, but the loss of CD24 expression induces a reprogramming process leading E_CD24⁻ cells to a hybrid E/M state.

In our study, the cellular model has the advantage of using cells with the same genetic background and the plasticity between E and M allows the characterization of the alterations induced by the regulation of CD24 expression levels in E cells and a fine mapping in the E/M hybrid state. This model not only allow us to generalize our previous observations²² but allow us to go much further in the understanding of the sequence of events and to measure the direct consequences of the down-regulation of CD24.

The intrinsic radio- and chemo- resistance of CSCs have been associated to many mechanisms, often mediated by redox imbalance, and ROS control appears to be a key mechanism in this resistance²⁰. Moreover, ROS production is reported to be an essential regulator or inducer for apoptosis in cancer cells, and an important increase of intracellular ROS level is known to mediate cell death induced by ionizing radiation⁴³ as well as anticancer drugs^{44–46}. In agreement with previous observations from our group and others^{9,23,15}, we confirmed in our model that CD24^{-/low}/CD44⁺ M cells present a lower level of cellular ROS than E parental cells (Figure 4). Mitochondria being the major source of ROS, same results were also observed for the quantification of mitochondrial ROS. E_CD24⁻ cells present the same decrease of total and mitochondrial ROS compared to parental cells, and this decrease is abolished by re-expression of CD24. Irradiation or 5FU treatment induces an increase in ROS levels in all the cells tested, but a lower level remains in CD24^{-/low}/CD44⁺ M cells and E_CD24⁻ cells. Taken together, a lower ROS level, associated to treatment resistance, appears to be a characteristic of both types of CSCs.

There are two major reasons for elevated ROS levels during radio- and chemo-therapy: mitochondrial ROS increased generation and an insufficient level of detoxication by the cellular antioxidant systems. Increased ROS scavenger have been associated to CD24^{-/low}/CD44⁺ M cells²³, and in our HMLE cell model, we have previously reported the overexpression of a set of ROS detoxification genes in CD24^{-/low}/CD44⁺ M cells⁹. These genes are not deregulated in E_CD24⁻ cells (Figure 5B), suggesting that enhanced ROS scavenger is a specific characteristic of CD24^{-/low}/CD44⁺ CSCs, and is not observed in ALDH⁺ CSCs. Few papers also report that EMT CSCs showed decreased mitochondrial mass and membrane potential,

consumed far less oxygen per cell, and produced markedly reduced levels of ROS⁴⁷. Our results clearly show that the mitochondrial mass and mitochondrial membrane potential observed in CD24^{-/low}/CD44⁺ M cells are lower than in E parental cells, in parallel with enhanced ROS scavenger (Figure 5). Moreover, while similar alterations in mitochondrial functions are also observed in E_CD24⁻ cells, CD24 loss is thus specifically correlated with decrease of mitochondrial mass and mitochondrial membrane potential. A link between mitochondrial repression and metabolic reprogramming has been proposed, and the mitochondrial lower levels and activity can reflect the metabolic switch that has been reported during EMT^{48,49}. Moreover, it appears that Snail plays a central role in this process. As for ROS cellular level, a similar lower decrease in mitochondrial functions is observed after irradiation and 5FU treatment. ROS overexpression observed after these treatments appears to be the consequence of an increased mitochondrial ROS production, independently of an effect on mitochondrial mass and mitochondrial membrane potential.

Altogether, our results show a direct relationship between CD24 expression and therapeutic resistance. In breast cancer cells culture, CD24 expression is heterogeneous, and CD24^{-/low} subpopulation is clearly selected after radiation and drug treatment. Artificial modulation of CD24 expression shows that radio- and chemo-resistance are directly under the control of CD24, and that loss of CD24 expression in HMLE.E cells increase the presence of ALDH⁺ Epithelial-like CSCs, in a hybrid E/M state. As for CD24^{-/low}/CD44⁺ CSCs, the resistance properties are strongly associated to a low ROS level, but for the two subtypes of CSCs the mechanisms leading to a decrease ROS level are different. For ALDH⁺ E_CD24⁻ cells, we observed a decrease of mitochondrial mass and mitochondrial membrane potential, while for

CD24^{-/low}/CD44⁺ M cells, decrease ROS level is under the control of both enhanced ROS scavenger and decrease of mitochondrial mass and mitochondrial membrane potential. These results can be resumed in a model presented in Figure 6.

In the last decade, few papers have studied the role of CD24 in human tumors, and if different functions of CD24 have been proposed, its role in cancer progression and treatment resistance remain poorly documented, and the signaling downstream of CD24 has not been clearly elucidated yet²⁴. In breast tumors, high CD24 expression is frequently associated with a terminally differentiated, luminal phenotype, while the majority of the basal-like tumors is classified as CD24^{-/low}. In parallel, studies have shown that CD44/CD24 and ALDH1 are expressed differentially in different subtypes of breast cancers. The ALDH⁺ cells are more common in HER2-overexpressing and basal/epithelial breast cancer, while the CD24^{-/low}/CD44⁺ phenotype is more associated with basal like breast cancer^{32,50}. Moreover, only a fraction of CD24^{-/low}/CD44⁺ breast cancer cells were ALDH⁺, these cells being tumorigenic^{5,10}. Our work strongly suggests that CD24 expression level may be a key factor in the transition between different subtypes of breast CSCs and that loss of CD24 expression is connected to a de-differentiation process. De-differentiation is classically related to invasion potential as well as metastasis and is also sufficient to promote resistance to a wide spectrum of chemotherapy drugs and radiation exposure⁵¹.

Materials and methods

Cell culture

All of the cell lines used for this study were cultivated in Heraeus Thermo Scientific™ BBD6220 incubator at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air. Presence of mycoplasma were regularly tested with the MycoAlert™ Mycoplasma detection kit from Lonza. Tumor breast cancer cell lines T47D and MCF7 were from the American Type Culture Collection (Rockville, MD) therefore Human Mammary Epithelial HMLE cell line was kindly provided by RA Weinberg (Cambridge, MA, USA). All cell lines were grown in adherent conditions but in different cell culture media always supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO – USA) and 1 mM antibiotic-antimycotic (Invitrogen, Carlsbad, CA – USA). For T47D and MCF7, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), high glucose, GlutaMAX™ Supplement, pyruvate (Gibco) was used therefore HMLE cells were cultured in DMEM/F-12 Nutrient Mixture, GlutaMAX™ Supplement (Gibco) extemporaneously completed by 10 ng/ml human epidermal growth factor (EGF) (Sigma), 0.5 µg/ml hydrocortisone (Sigma) and 10 µg/ml insulin (Sigma). Medium for transfected cell lines was supplemented with 0.4 µg/mL puromycin (Gibco) and 16 µg/mL blasticidin (Gibco) during the transfectant selection phase, and 0.2 µg/mL puromycin and 8 µg/mL blasticidin in routine cell culture. HMLE.M cells were induced after prolonged treatment with 2.5 ng/ml recombinant TGFβ1 (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France).

Cell proliferation and survival analyses were performed in 2 or more independent experiments, by scoring cells with a TC20 automated cell counter (BIO-RAD). Discrimination between viable and dead cells was performed by trypan blue exclusion.

Chemical, reagents, and antibodies

5-Fluorouracil (5FU), cisplatin and Paclitaxel (Taxol) were from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA). 5FU and Paclitaxel were diluted in dimethylsulfoxid (DMSO) solution at concentration stock of 400mM and 1mM respectively. Cisplatin was thinned with sodium chloride at concentration stock of 1Mm. Each drug was used at different concentrations depend on the experiments. Antibodies against CD24 (clone ML5), CD44 (clone G44-26), and isotypic controls were from BD Biosciences (San Jose, CA, USA).

Plasmid and transfection

To stably knock down the expression of CD24 in MCF-7, T47D and HMLE cells, we used replicative short hairpin (shRNA)-expressing vectors (puromycin-resistant pEBV-siRNA), which impose a very strong and stable gene silencing in human cells, even after several months in culture. siRNA design and cloning in pEBVsiRNA vectors but also establishment of stable knockdown and control clones were carried out as previously described⁵². To design shRNA sequences, we adopted the DSIR program developed by Vert *et al.*⁵³. Control cells carried a plasmid expressing an inefficient shRNA sequence called E_vec.

To complement CD24 expression into HMLE cells already depleted for CD24, open reading frame (ORF) of human CD24 was amplified from an I.M.A.G.E. clone (ID_5591617, Thermo Scientist) with the following primers: 5'- ATGGGCAGAGCAATGGTGGCCAGGCTC-3' and 5'- TTAAGAGTAGAGATGCAGAAGAGAGAG-3' and introduced into a blasticidin-resistant pEBV plasmid downstream of a CAG promoter.

After one day of seeding into 6-well plate (TPP, Dutscher), cells were transfected with jetPRIME[®] reagent (Polyplus, Illkirch, France) according to the manufacturer's recommendations. After 24-h incubation, cells were trypsinized and seeded in culture medium

supplemented with puromycin alone or with blasticidin. Experiments were performed either on the whole transfected population or on selected clones.

Irradiation

For all experiments except clonogenic assays, cells were plated at least 24h prior to irradiation. On day 0, γ -irradiations of cells were performed on a GSR D1 irradiator (Gamma Medical Service GmbH) with four sources of ^{137}Cs at a dose rate of 2.79 Gy/min. Studied cells were irradiated at 2, 4, 6 and 10 Gy and control cells were submitted to sham irradiation.

ALDEFLUOR assay

The ALDEFLUOR kit (StemCell Technologies, Durham, NC, USA) was used to analyze the population with high ALDH enzymatic activity according to the manufacturer's instructions. The cells were incubated in the ALDEFLUOR assay buffer containing ALDH substrate (BAAA, 1 $\mu\text{mol/l}$ per 1×10^6 cells) and incubated during 40 minutes at 37°C. As negative control, for each sample of cells, an aliquot was treated with 50mmol/L diethylaminobenzaldehyde (DEAB), a specific ALDH inhibitor.

Clonogenic assays

Sub-confluent cells were trypsinized using TrypLE express solution (Thermofisher). Living cells were counted using an automated cell counter (TC20, Biorad) considering trypan blue exclusion. To this point, the protocol differs slightly depending on cellular treatment. Irradiation: cells were immediately irradiated in suspension for the time required to generate a dose curve of 0, 2, 4 and 6 Gy and colony-forming assays were performed immediately after irradiation by plating cells in 60 mm diameter Petri dishes, in triplicate.

Drug treatment: after trypsinization and counting, cells were plated in 60 mm diameter Petri dishes, in triplicate. Six hours after plating, drug treatments were performed for three days, and then cells were washed and incubated with fresh medium.

Number of cells seeded increase with radiation dose or drug concentration but was identical for each cell lines tested. After 7 days, cells were fixed for 30 minutes in 4% paraformaldehyde, washed, and stained for at least two hours in methylene blue/30% methanol. Colonies containing more than 50 cells were counted. The surviving fraction at each radiation dose was normalized to that of the non-irradiated sample, and points were fitted using an exponential tendency curve. At least three independent experiments were performed.

Cell staining

Cancer stem cell marker labeling, and analysis were performed as described in Bensimon et al.^{21,22} Intracellular concentrations of ROS prooxidants were determined using dihydroethidium (DHE) probe (Invitrogen™). Adherent cells were incubated with 10µM DHE for 30 min at 37°C, then washed with PBS, trypsinized and immediately analyzed by flow cytometry. Intracellular concentrations of mitochondrial ROS were determined using MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxide Indicator (Invitrogen™). Adherent cells were incubated with 5µM MitoSOX Red for 10 min at 37°C, then washed with PBS, trypsinized and immediately analyzed by flow cytometry. Mitochondrial mass was analyzed using MitoTracker™ Green (MTG) probe (Invitrogen™). After soft trypsinization cells were loaded with 200 nM MTG and incubated for 20 min at 37°C, then immediately analyzed by flow cytometry. Mitochondrial membrane potential was quantified using tetramethylrhodamine, ethyl ester, perchlorate (TMRE) probe (Invitrogen™). After soft trypsinization cells were

loaded with 10 nM TMRE and incubated for 20 min at 37°C, then immediately analyzed by flow cytometry.

Flow cytometry

Cells were analyzed on a SORP LSR-II analyzer (Configuration: 488 nm, 561 nm, 405 nm, 355 nm, and 635 nm) or on a BD FACSCalibur (Configuration: 488 nm and 635 nm) (BD Biosciences, San Jose, CA). Data were analyzed with FlowJo v10.7.1 (Tree Star). Cells were sorted on a BD Influx sorter (BD Biosciences) (Configuration: 488 nm, 561 nm, 405 nm, 355 nm, and 635 nm).

RNA extraction and quantitative real-time PCR

Total RNA was extracted from frozen cell pellets with the « total RNA purification kit » (Norgen Biotek Corp), according to the manufacturer's instructions. DNase treatment was realized using the TURBO DNA-free Kit (Invitrogen™ Ambion™), according to the manufacturer's instructions. cDNA synthesis was performed with the SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen™) according to the manufacturer's instructions. RT-PCR was performed with an ABI Prism 7300 detection apparatus (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) using the Taqman Universal Master Mix according to the manufacturer's recommendations. The Ct value was determined with the Sequence Detection System software. All the primers were from Applied Biosystems. Levels of gene expression were determined using GENORM software and normalized using GAPDH and RPLPO.

Statistical analysis

All statistical tests were performed using GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Conflict of interest

None declared

Funding

This work was funded by Electricité de France (EDF) and by the Transverse Division n. 4 (Radiobiology) of the French Alternative Energies and Atomic Energy Commission (Segment n. 4 Radiobiologie).

References

1. Marusyk A, Almendro V, Polyak K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 323–334.
2. Pece S, Tosoni D, Confalonieri S, Mazzarol G, Vecchi M, Ronzoni S et al. Biological and Molecular Heterogeneity of Breast Cancers Correlates with Their Cancer Stem Cell Content. *Cell* 2010; 140: 62–73.
3. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *PNAS* 2003; 100: 3983–3988.
4. Hwang-Verslues WW, Kuo W-H, Chang P-H, Pan C-C, Wang H-H, Tsai S-T et al. Multiple lineages of human breast cancer stem/progenitor cells identified by profiling with stem cell markers. *PLoS One* 2009; 4: e8377.
5. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M et al. ALDH1 Is a Marker of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 555–567.
6. Zhang R, Tu J, Liu S. Novel molecular regulators of breast cancer stem cell plasticity and heterogeneity. *Seminars in Cancer Biology* 2021. doi:10.1016/j.semcancer.2021.03.008.
7. Mani SA, Guo W, Liao M-J, Eaton ENG, Ayyanan A, Zhou AY et al. The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell* 2008; 133: 704–715.
8. Morel A-P, Lièvre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. Generation of Breast Cancer Stem Cells through Epithelial-Mesenchymal Transition. *PLOS ONE* 2008; 3: e2888.
9. Konge J, Leteurtre F, Goislard M, Biard D, Morel-Altmeier S, Vaurijoux A et al. Breast cancer stem cell-like cells generated during TGF β -induced EMT are radioresistant. *Oncotarget* 2018; 9: 23519–23531.
10. Liu S, Cong Y, Wang D, Sun Y, Deng L, Liu Y et al. Breast Cancer Stem Cells Transition between Epithelial and Mesenchymal States Reflective of their Normal Counterparts. *Stem Cell Reports* 2014; 2: 78–91.
11. Pastushenko I, Blanpain C. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends Cell Biol* 2019; 29: 212–226.
12. Pasani S, Sahoo S, Jolly MK. Hybrid E/M Phenotype(s) and Stemness: A Mechanistic Connection Embedded in Network Topology. *Journal of Clinical Medicine* 2021; 10: 60.
13. Kröger C, Afeyan A, Mraz J, Eaton EN, Reinhardt F, Khodor YL et al. Acquisition of a hybrid E/M state is essential for tumorigenicity of basal breast cancer cells. *PNAS* 2019; 116: 7353–7362.
14. Luo M, Brooks M, Wicha MS. Epithelial-mesenchymal plasticity of breast cancer stem cells: implications for metastasis and therapeutic resistance. *Curr Pharm Des* 2015; 21: 1301–1310.
15. Phillips TM, McBride WH, Pajonk F. The Response of CD24^{-/low} /CD44⁺ Breast Cancer-Initiating Cells to Radiation. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 2006; 98: 1777–1785.

16. Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu M-F et al. Intrinsic Resistance of Tumorigenic Breast Cancer Cells to Chemotherapy. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 2008; 100: 672–679.
17. Kamble D, Mahajan M, Dhat R, Sitasawad S. Keap1-Nrf2 Pathway Regulates ALDH and Contributes to Radioresistance in Breast Cancer Stem Cells. *Cells* 2021; 10: 83.
18. Tanei T, Morimoto K, Shimazu K, Kim SJ, Tanji Y, Taguchi T et al. Association of Breast Cancer Stem Cells Identified by Aldehyde Dehydrogenase 1 Expression with Resistance to Sequential Paclitaxel and Epirubicin-Based Chemotherapy for Breast Cancers. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 4234–4241.
19. Palomeras S, Ruiz-Martínez S, Puig T. Targeting Breast Cancer Stem Cells to Overcome Treatment Resistance. *Molecules* 2018; 23: 2193.
20. García-Heredia JM, Carnero A. Role of Mitochondria in Cancer Stem Cell Resistance. *Cells* 2020; 9: 1693.
21. Bensimon J, Altmeyer-Morel S, Benjelloun H, Chevillard S, Lebeau J. CD24(-/low) stem-like breast cancer marker defines the radiation-resistant cells involved in memorization and transmission of radiation-induced genomic instability. *Oncogene* 2013; 32: 251–258.
22. Bensimon J, Biard D, Paget V, Goislard M, Morel-Altmeier S, Konge J et al. Forced extinction of CD24 stem-like breast cancer marker alone promotes radiation resistance through the control of oxidative stress. *Mol Carcinog* 2016; 55: 245–254.
23. Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* 2009; 458: 780–783.
24. Altevogt P, Sammar M, Hüser L, Kristiansen G. Novel insights into the function of CD24: A driving force in cancer. *International Journal of Cancer* 2021; 148: 546–559.
25. Kristiansen G, Machado E, Bretz N, Rupp C, Winzer K-J, König A-K et al. Molecular and clinical dissection of CD24 antibody specificity by a comprehensive comparative analysis. *Lab Invest* 2010; 90: 1102–1116.
26. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 330–338.
27. Tchounwou PB, Dasari S, Noubissi FK, Ray P, Kumar S. Advances in Our Understanding of the Molecular Mechanisms of Action of Cisplatin in Cancer Therapy. *JEP* 2021; Volume 13: 303–328.
28. Abu Samaan TM, Samec M, Liskova A, Kubatka P, Büsselberg D. Paclitaxel's Mechanistic and Clinical Effects on Breast Cancer. *Biomolecules* 2019; 9. doi:10.3390/biom9120789.
29. Pastushenko I, Brisebarre A, Sifrim A, Fioramonti M, Revenco T, Boumahdi S et al. Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature* 2018; 556: 463–468.
30. Peiris-Pagès M, Martinez-Outschoorn UE, Pestell RG, Sotgia F, Lisanti MP. Cancer stem cell metabolism. *Breast Cancer Res* 2016; 18: 55.
31. Meyer MJ, Fleming JM, Ali MA, Pesesky MW, Ginsburg E, Vonderhaar BK. Dynamic regulation of CD24 and the invasive, CD44posCD24negphenotype in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research* 2009; 11: R82.

32. Ricardo S, Vieira AF, Gerhard R, Leitão D, Pinto R, Cameselle-Teijeiro JF et al. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *Journal of Clinical Pathology* 2011; 64: 937–946.
33. Luce A, Courtin A, Levalois C, Altmeyer-Morel S, Romeo P-H, Chevillard S et al. Death receptor pathways mediate targeted and non-targeted effects of ionizing radiations in breast cancer cells. *Carcinogenesis* 2009; 30: 432–439.
34. Pinto CA, Widodo E, Waltham M, Thompson EW. Breast cancer stem cells and epithelial mesenchymal plasticity – Implications for chemoresistance. *Cancer Letters* 2013; 341: 56–62.
35. Bierie B, Pierce SE, Kroeger C, Stover DG, Pattabiraman DR, Thiru P et al. Integrin- β 4 identifies cancer stem cell-enriched populations of partially mesenchymal carcinoma cells. *PNAS* 2017; 114: E2337–E2346.
36. Unternaehrer JJ, Zhao R, Kim K, Cesana M, Powers JT, Ratanasirintrawoot S et al. The Epithelial-Mesenchymal Transition Factor SNAIL Paradoxically Enhances Reprogramming. *Stem Cell Reports* 2014; 3: 691–698.
37. Gingold JA, Fidalgo M, Guallar D, Lau Z, Sun Z, Zhou H et al. A Genome-wide RNAi Screen Identifies Opposing Functions of Snai1 and Snai2 on the Nanog Dependency in Reprogramming. *Molecular Cell* 2014; 56: 140–152.
38. Ma SY, Park J-H, Jung H, Ha S-M, Kim Y, Park DH et al. Snail maintains metastatic potential, cancer stem-like properties, and chemoresistance in mesenchymal mouse breast cancer TUBO-P2J cells. *Oncology Reports* 2017; 38: 1867–1876.
39. Yoh KE, Regunath K, Guzman A, Lee S-M, Pfister NT, Akanni O et al. Repression of p63 and induction of EMT by mutant Ras in mammary epithelial cells. *PNAS* 2016; 113: E6107–E6116.
40. Roca H, Hernandez J, Weidner S, McEachin RC, Fuller D, Sud S et al. Transcription Factors OVOL1 and OVOL2 Induce the Mesenchymal to Epithelial Transition in Human Cancer. *PLOS ONE* 2013; 8: e76773.
41. Wu R-S, Hong J-J, Wu J-F, Yan S, Wu D, Liu N et al. OVOL2 antagonizes TGF- β 2 signaling to regulate epithelial to mesenchymal transition during mammary tumor metastasis. *Oncotarget* 2017; 8: 39401–39416.
42. Hong T, Watanabe K, Ta CH, Villarreal-Ponce A, Nie Q, Dai X. An Ovol2-Zeb1 Mutual Inhibitory Circuit Governs Bidirectional and Multi-step Transition between Epithelial and Mesenchymal States. *PLOS Computational Biology* 2015; 11: e1004569.
43. Riley PA. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 1994; 65: 27–33.
44. Mohiuddin M, Kasahara K. Cisplatin Activates the Growth Inhibitory Signaling Pathways by Enhancing the Production of Reactive Oxygen Species in Non-small Cell Lung Cancer Carrying an EGFR Exon 19 Deletion. *Cancer Genomics & Proteomics* 2021; 18: 471–486.
45. Mosca L, Ilari A, Fazi F, Assaraf YG, Colotti G. Taxanes in cancer treatment: Activity, chemoresistance and its overcoming. *Drug Resistance Updates* 2021; 54: 100742.

46. Pan X, Zhang X, Sun H, Zhang J, Yan M, Zhang H. Autophagy Inhibition Promotes 5-Fluorouracil-Induced Apoptosis by Stimulating ROS Formation in Human Non-Small Cell Lung Cancer A549 Cells. *PLOS ONE* 2013; 8: e56679.
47. Gammon L, Biddle A, Heywood HK, Johannessen AC, Mackenzie IC. Sub-Sets of Cancer Stem Cells Differ Intrinsically in Their Patterns of Oxygen Metabolism. *PLOS ONE* 2013; 8: e62493.
48. Lee SY, Ju MK, Jeon HM, Lee YJ, Kim CH, Park HG et al. Reactive oxygen species induce epithelial-mesenchymal transition, glycolytic switch, and mitochondrial repression through the Dlx-2/Snail signaling pathways in MCF-7 cells. *Molecular Medicine Reports* 2019; 20: 2339–2346.
49. Jia D, Park JH, Kaur H, Jung KH, Yang S, Tripathi S et al. Towards decoding the coupled decision-making of metabolism and epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. *Br J Cancer* 2021; 124: 1902–1911.
50. Li W, Ma H, Zhang J, Zhu L, Wang C, Yang Y. Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis. *Sci Rep* 2017; 7: 13856.
51. Gupta PB, Pastushenko I, Skibinski A, Blanpain C, Kuperwasser C. Phenotypic Plasticity: Driver of Cancer Initiation, Progression, and Therapy Resistance. *Cell Stem Cell* 2019; 24: 65–78.
52. Biard DSF, Despras E, Sarasin A, Angulo JF. Development of New EBV-Based Vectors for Stable Expression of Small Interfering RNA to Mimick Human Syndromes: Application to NER Gene Silencing. *Mol Cancer Res* 2005; 3: 519–529.
53. Vert J-P, Foveau N, Lajaunie C, Vandenbrouck Y. An accurate and interpretable model for siRNA efficacy prediction. *BMC Bioinformatics* 2006; 7: 520.

Titles and legends to Figures

Figure 1. CD24 low expression defines a radio- and chemo- resistant subpopulation of breast HMLE cells

CD24^{-/low} subpopulation was defined as the 10% of cells expressing the lowest level of fluorescence in control cells. **(A)** Percentage of dead cells (left) and of CD24^{-/low} cells (right) five days after high dose irradiation (4 to 10 Gy) of HMLE cells. **(B, C and D)** Percentage of dead cells (left) and of CD24^{-/low} cells (right) after three days exposure to increasing high concentrations of 5-FU **(B)**, cisplatin **(C)** and Paclitaxel **(D)** of HMLE cells. For **(A)** to **(D)**, results correspond to the mean \pm SD of 3 independent experiments. **(E)** CD24^{-/low} and CD24⁺ HMLE cell subpopulations were FACS sorted after CD24/CD44 staining (left) and CD24 expression was analyzed by qRT-PCR (right), results correspond to the mean \pm SD of 3 independent experiments. **(F)** Percentage of CD24^{-/low} and CD24⁺ dead cells five days after 4 and 6 Gy irradiation and after three days exposure to 400 μ M 5FU, 15 μ M Cisplatin and 10nM Paclitaxel.

Figure 2. Characterization of E, M and E-transfected HMLE cells

(A) Flow cytometry characterization after CD24/CD44 labelling of parental E cells (E), E cells transfected with a control p-EBV vector (E_vec), E cells transfected with a p-EBV- plasmid expressing a CD24 siRNA (E_CD24⁻), E_CD24⁻ cells transfected with a p-EBV-plasmid expressing CD24 mRNA (E_CD24^c), and M cells obtained after FACS sorting of CD24^{-/low}/CD44⁺ cells induced after prolonged exposure to TGF β 1. **(B)** Phase –contrast images of E / E_vec cells, E_CD24⁻ cells, E_CD24^c cells and M cells. **(C, D and E)** Analysis by qRT-PCR of the relative

expression of the mRNAs encoding EMT-associated actors (CD44, ESA, E-cadherin, N-cadherin and fibronectin) (C), encoding the main transcription factor driving EMT (Twist-1, Twist-2, Snail-1, Snail-2, Zeb-1 and Zeb-2). (D), and encoding other actors of EMT (Vimentin, Keratin 14, TP63 and OVOL2) (E), in E_CD24-, E_CD24-c and M cells, compared to E cells. Normalization was performed as indicated in material and methods. Results were normalized to the expression levels measured in E cells. Each value corresponds to the mean value of 3 independent PCRs performed from 3 independent experiments. Error bars correspond to SEM. (F) Percentages of the Aldefluor positive subpopulation defined by the Aldefluor assay (see material and methods). Results correspond to the mean \pm SD of 3 independent experiments.

Figure 3. Reduced CD24 expression enhances radio- and chemo-resistance in HMLE.E cells

(A) Time course of cell death of 10 Gy-irradiated cells. Results correspond to the mean \pm SD of 3 independent experiments. **P<0.01, ***P<0.001. (B) Percentage of dead cells after three days exposure to 400 μ M 5FU, 15 μ M Cisplatin and 10nM Paclitaxel. Results correspond to the mean \pm SD of 4 to 12 independent experiments. **P<0.01, ***P<0.001 and ****P<0.0001. (C) Clonogenic cell survival curves after: 2 to 6 Gy irradiation, 4 to 16 μ M exposition to 5FU, 2 to 6 μ M exposition to Cisplatin and 1 to 3 μ M exposition to Paclitaxel.

Figure 4. CD24 down regulation decreases total as well as mitochondrial ROS level

(A) Cellular ROS level was assessed by DHE probe and (B) mitochondrial ROS level was assessed by MitoSox-Red probe. For (A) and (B), ROS level were studied in untreated cells (left), three

days after 10 Gy irradiation (middle) and three days after exposure to 400 μ M 5FU (right). Results correspond to the mean \pm SD of 4 to 10 independent experiments. **P<0.01, ***P<0.001 and ****P<0.0001.

Figure 5. CD24 down regulation have no impact on ROS scavenger but decreases mitochondrial mass and mitochondrial membrane potential.

(A) Analysis by qRT-PCR of the relative expression of the mRNAs encoding stress-related actors involved in ROS metabolism in E_CD24-, E_CD24-c and M cells, compared to E cells. Normalization was performed as indicated in materiel and methods. For each gene, expression in E cells was normalized to 1 and the ratio of relative mRNA level of E cells to E_CD24-, E_CD24-c and M cells was presented. Each value corresponds to the mean value of 3 independent PCRs performed from 3 independent experiments. Error bars correspond to SEM. (B) Mitochondrial mass was assessed by Mitotracker Green probe and (C) mitochondrial membrane potential was assessed using tetramethylrhodamine, ethyl ester (TMRE) staining. For (B) and (C), mitochondrial mass and mitochondrial membrane potential were studied in untreated cells (left), three days after 10 Gy irradiation (middle) and three days after exposure to 400 μ M 5FU (right). Results correspond to the mean \pm SD of 4 to 10 independent experiments. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 and ****P<0.0001.

Figure 6. Proposed model of the relationships between CD24 expression and EMT, stemness properties, ROS level, ROS scavengers and mitochondrial functions.

Figures

Figure 1

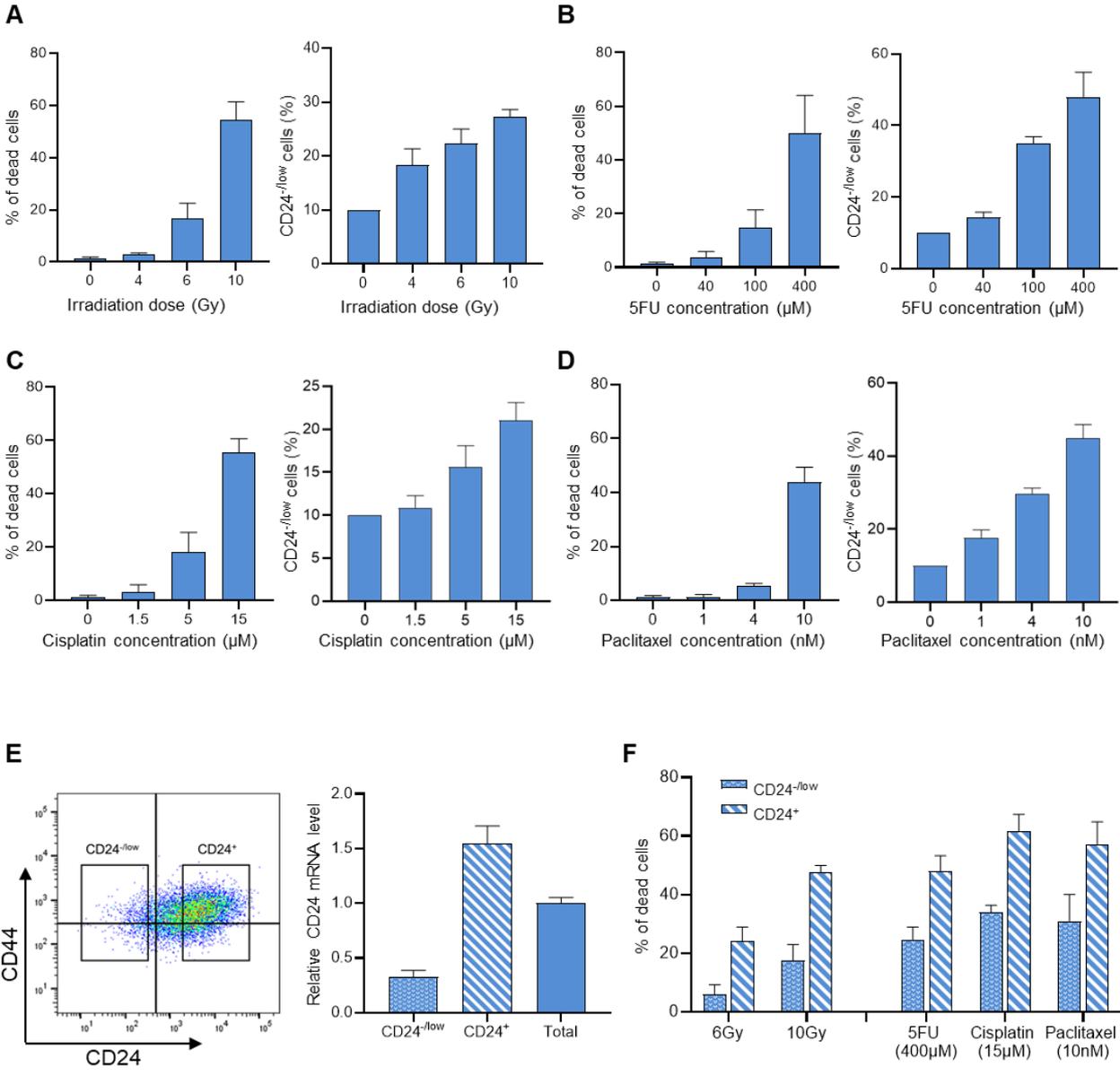


Figure 2

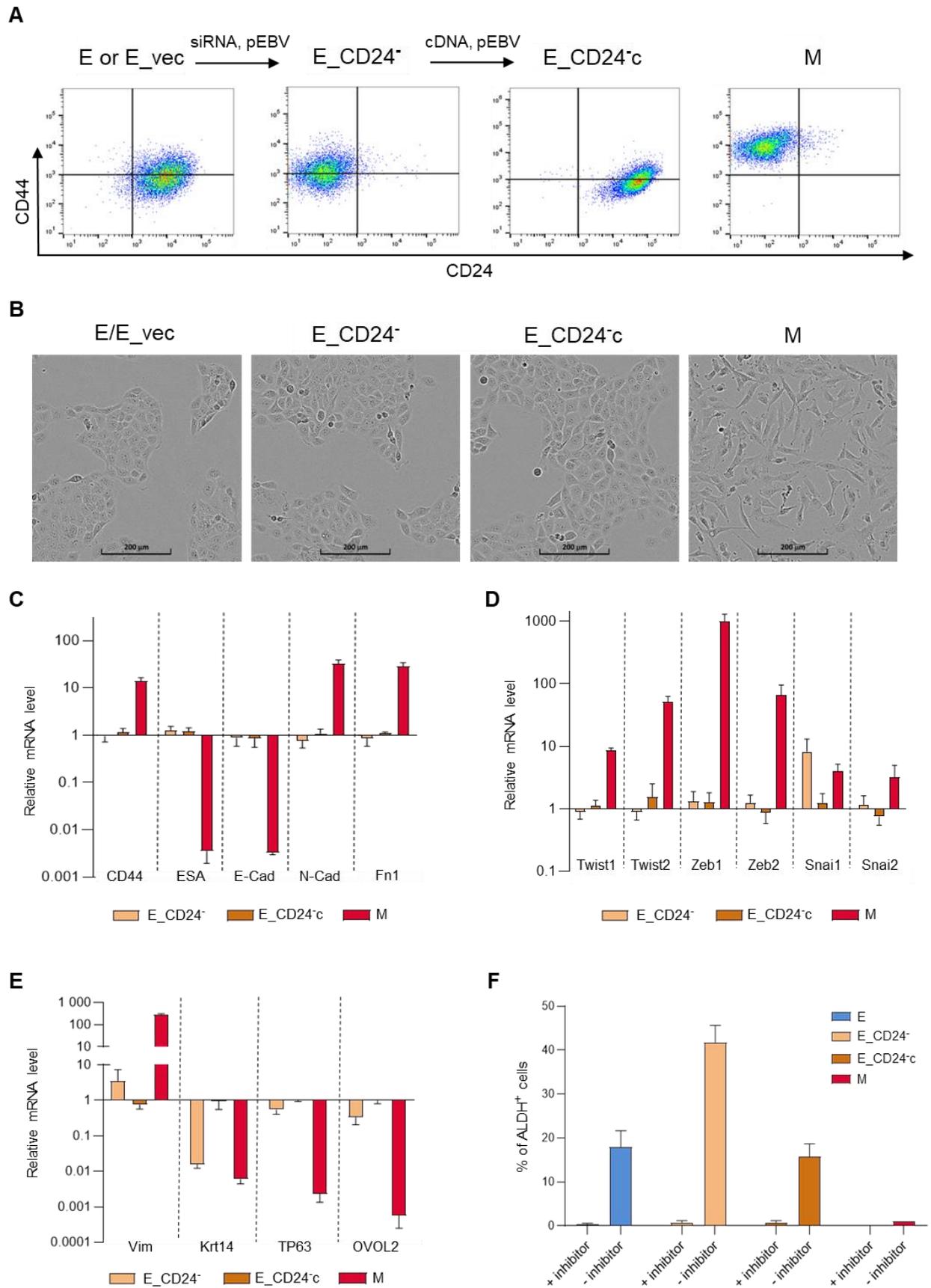


Figure 3

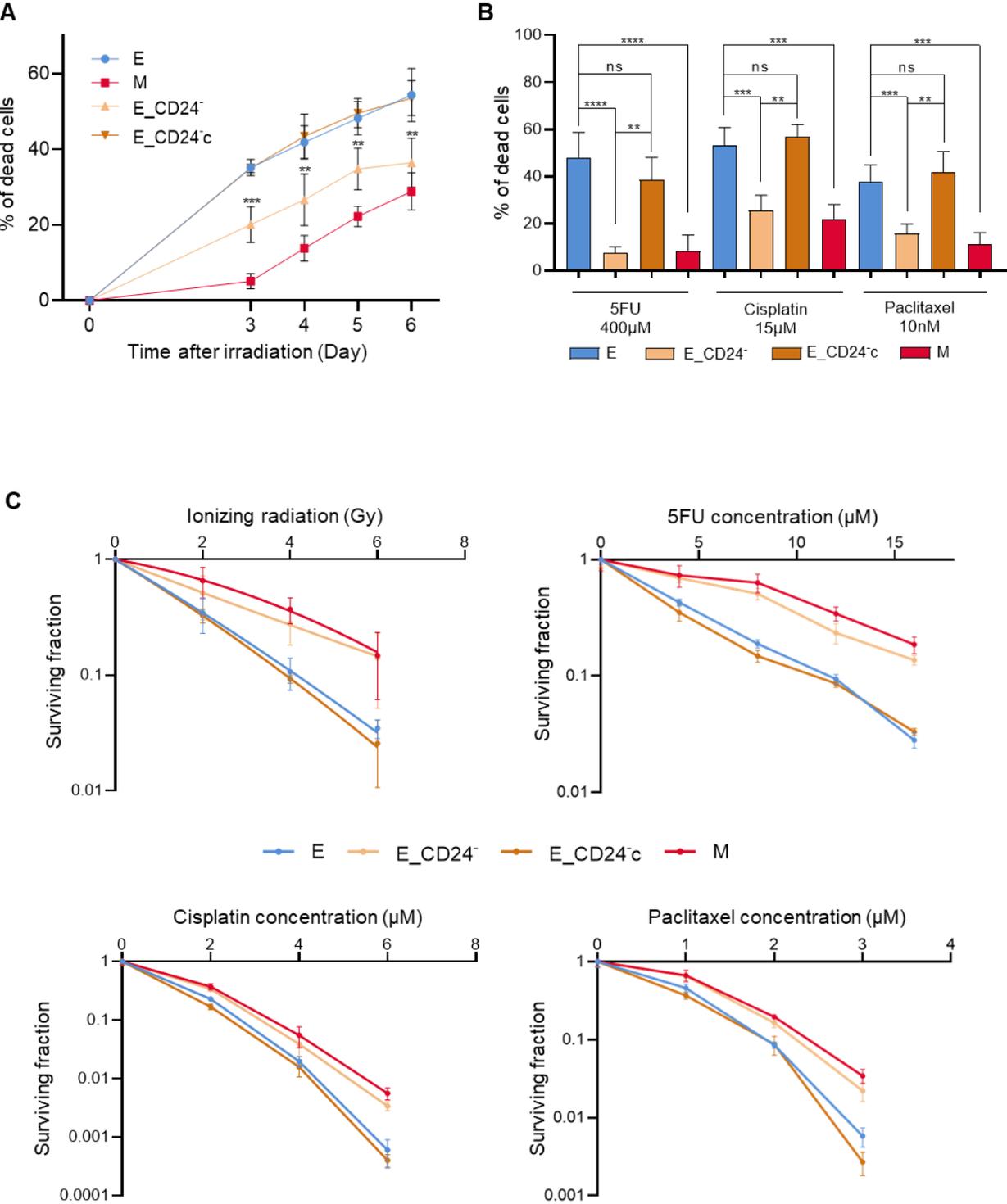


Figure 4

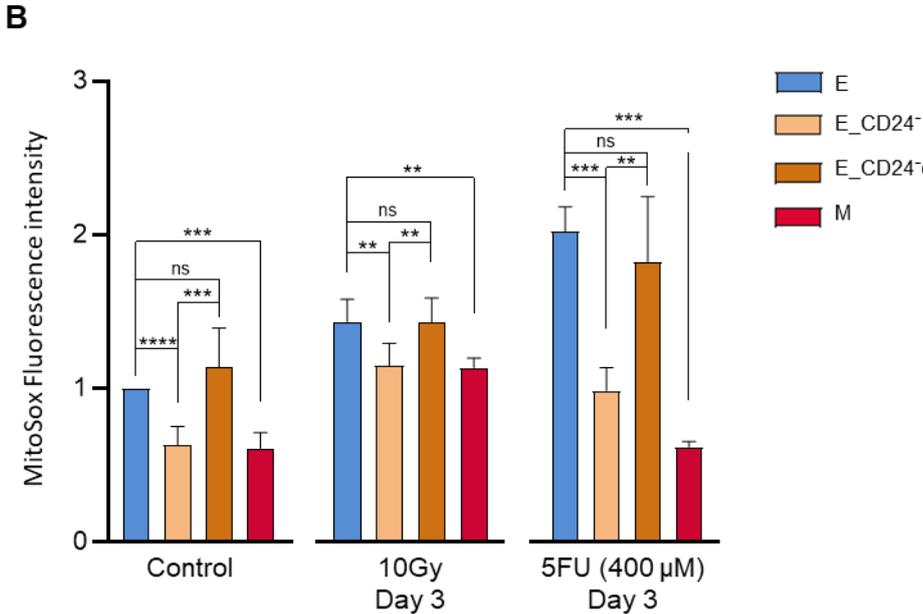
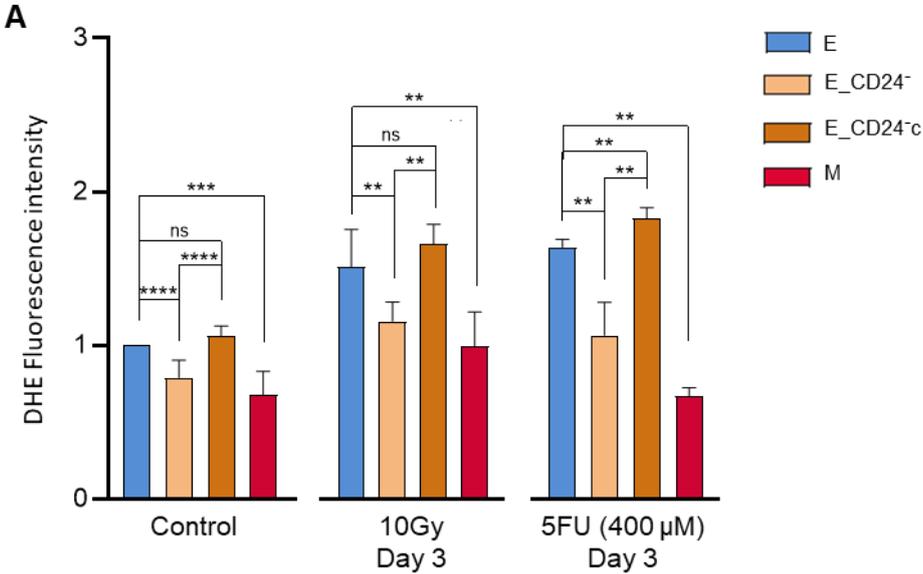


Figure 5

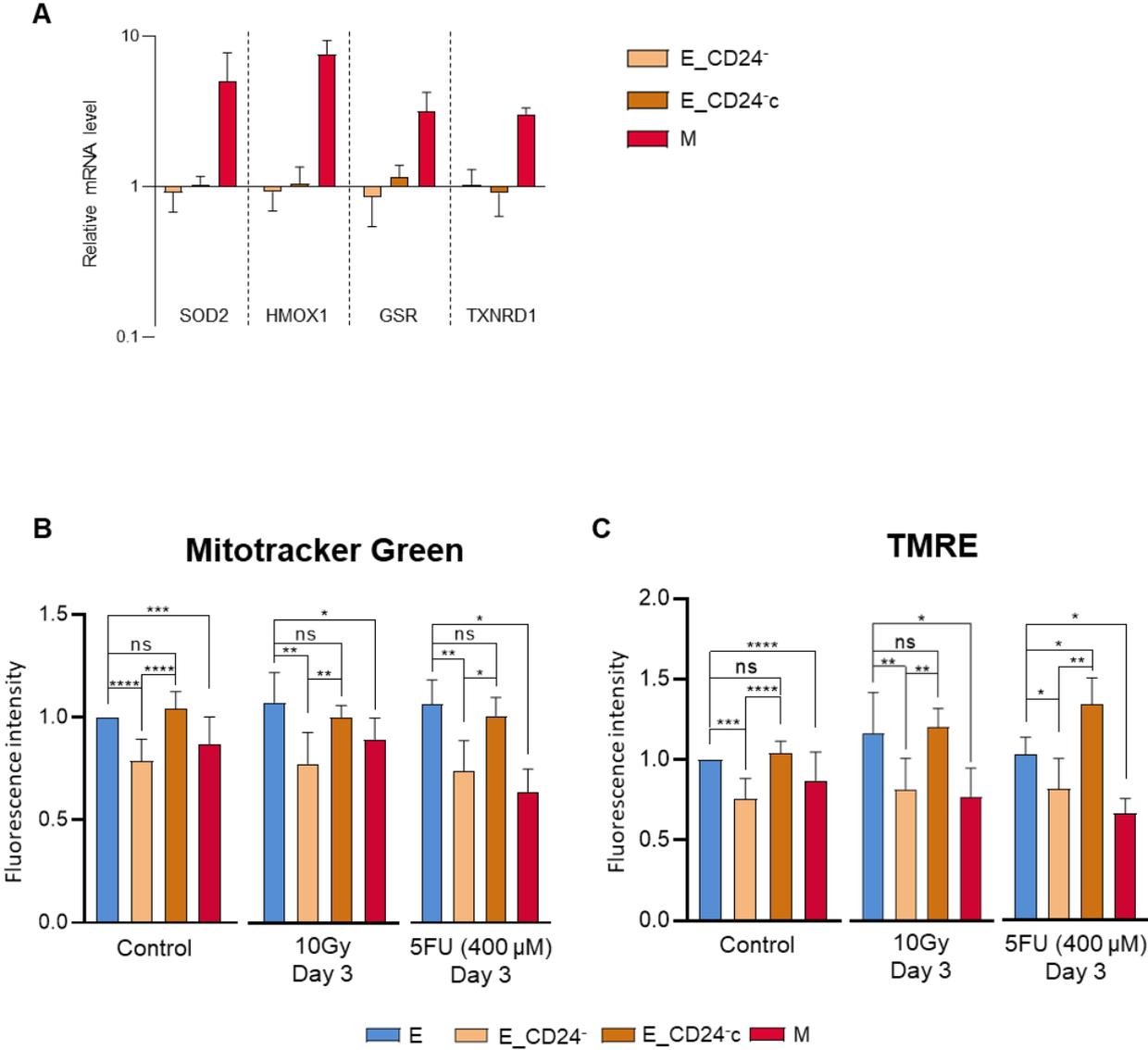
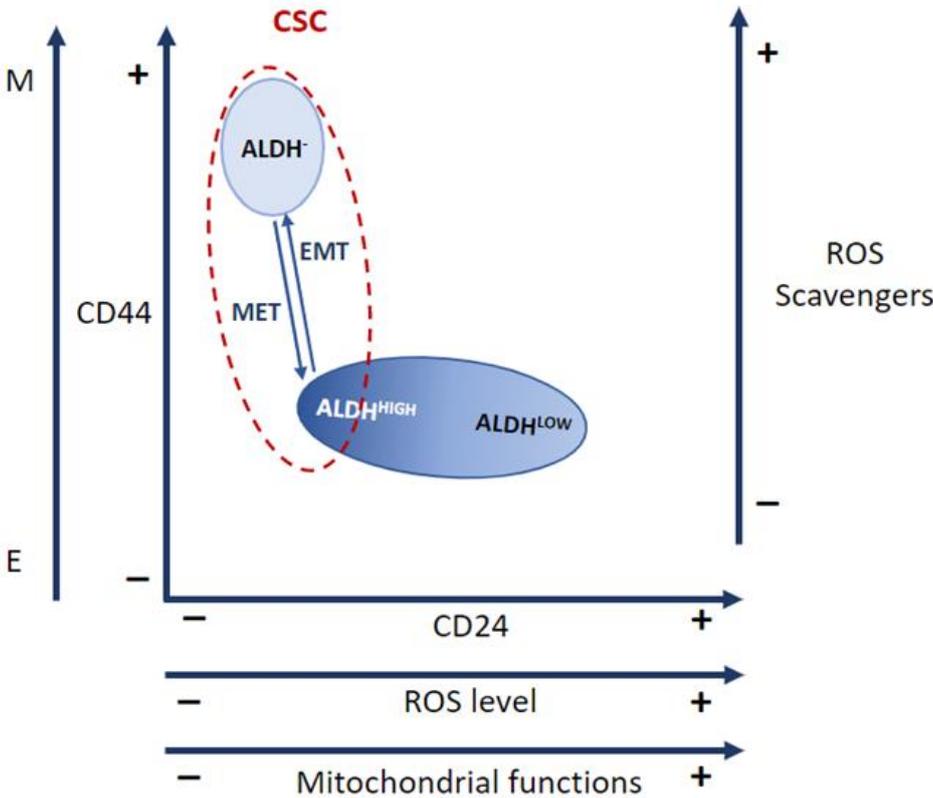
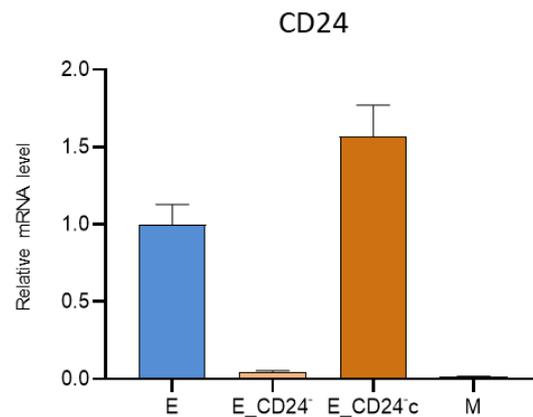


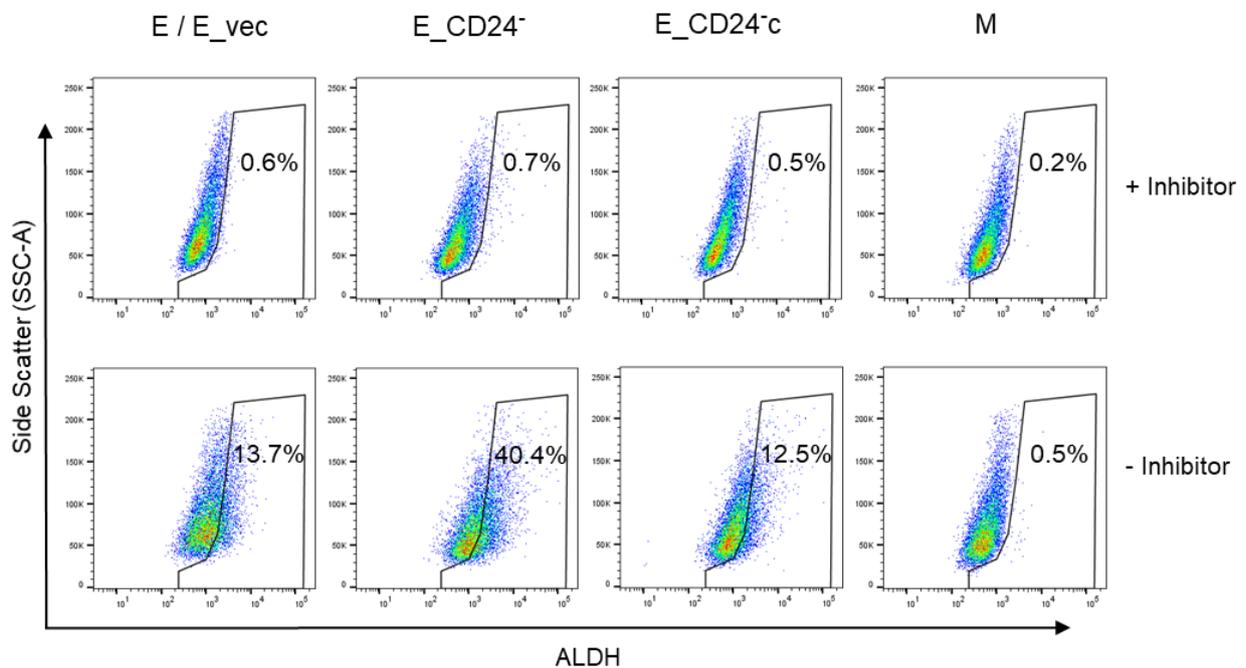
Figure 6



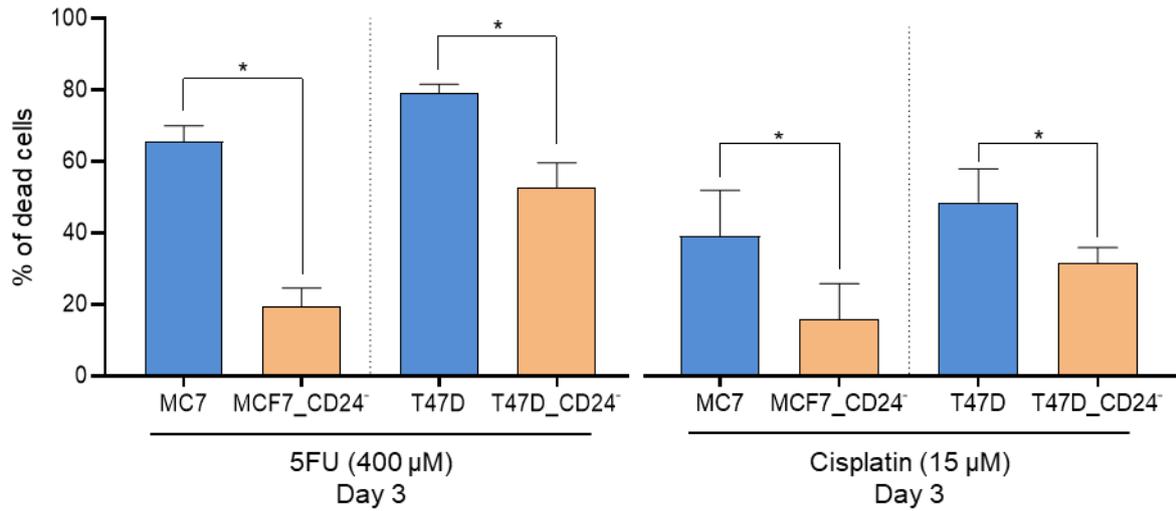
Supplementary figures



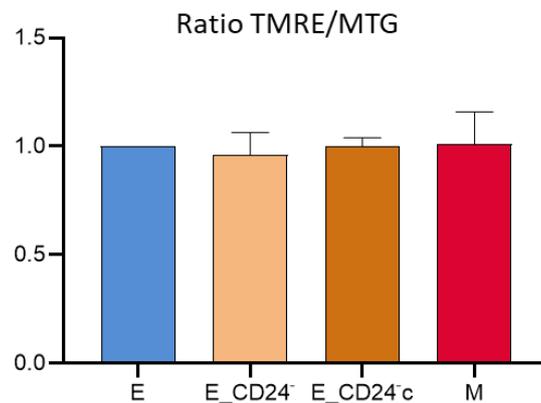
Supplementary figure S1: Analysis by qRT-PCR of the relative expression of the CD24 mRNA in E, E_CD24⁻, E_CD24^c and M cells. Normalization was performed as indicated in material and methods. Expression in E cells was normalized to 1. Each value corresponds to the mean value of 3 independent PCRs performed from 3 independent experiments. Error bars correspond to SEM.



Supplementary figure S2: Representative FACS analysis of the ALDH⁺ subpopulation using the Aldefluor assay. Cells incubated with the specific inhibitor of ALDH, DEAB, were used to establish the baseline fluorescence of these cells and to define the ALDH positive population.



Supplementary figure S3: Forced extinction of CD24 expression alone promotes chemoresistance of two epithelial breast cell lines: MCF7 and T47D. The two cell lines were transfected with the p-EBV- plasmid expressing a CD24 siRNA, in order to obtain MCF7_CD24⁻ and T47D_CD24⁻ cells. The parental and the transfected cell lines were exposed three days to 400μM 5FU and 15μM Cisplatin, and the percentage of dead cells was analyzed. Results correspond to the mean ± SD of 3 independent experiments. *P<0.05.



Supplementary figure S4: Ratio of fluorescence between TMRE and Mitotracker Green analysis for E, E_CD24⁻, E_CD24⁻c and M cells.

II. Deuxième partie : étude transcriptomique et motilité

Mise en place d'une étude transcriptomique des cellules HMLE.E et HMLE.E_CD24⁻ : dérégulation des voies impliquées dans la motilité et la migration cellulaire

Mise en évidence d'une augmentation de la motilité cellulaire liée à la perte d'expression de CD24

1. Objectifs

Comme nous l'avons vu dans l'introduction bibliographique, si différents travaux ont attribué un vaste rôle et différentes fonctions à CD24 dans la réponse immune adaptative, l'inflammation ou les maladies auto-immunes, son rôle dans la cancérogenèse humaine reste fortement ambigu (Fang et al., 2010b; Jaggupilli and Elkord, 2012). Le constat faisant part des différentes fonctions attribuées à CD24 provient notamment du fait que le niveau de glycosylation de cette petite protéine est très variable. Enfin, cette complexité est accrue à cause de l'absence de domaine transmembranaire, rendant plus difficile la mise en évidence de son implication dans différentes voies de signalisation intracellulaire. Sa localisation dans la membrane au niveau des rafts lipidiques, considérés comme d'importantes « plateformes » pour les molécules de signalisation, comme les tyrosine kinases Src ou les protéines G, permettrait en partie d'expliquer ses mécanismes d'action (Altevogt et al., 2021b).

De nombreuses études ont mis en évidence une surexpression de CD24 dans un grand nombre de tumeurs (Altevogt et al., 2021b; Fang et al., 2010b). Quelques papiers ont proposé que cette surexpression de CD24 se traduirait notamment par son accumulation dans le cytoplasme et même dans le noyau (Altevogt et al., 2021b). Cette présence intracellulaire pourrait être importante pour expliquer son rôle dans la progression tumorale bien que la faible et non spécificité des anticorps utilisés rend ces résultats difficiles à interpréter (Kristiansen et al., 2010b).

Il apparait donc que malgré la découverte importante de nouvelles fonctionnalités de CD24, de nombreuses zones d'ombre restent à éclaircir quant au(x) rôle(s) de cette petite protéine membranaire dans la cancérogenèse mammaire. Dans la première partie des résultats, nous avons mis en évidence que la perte d'expression de CD24 induit une résistance aux radiations et aux drogues anticancéreuses. Cette résistance apparait liée à l'acquisition de propriétés souches, en lien avec l'acquisition d'un phénotype hybride E/M, et à la répression de l'activité mitochondriale dans les cellules de cancer du sein. Cependant, nous n'avons pas d'idées précises des voies de signalisation et/ou des mécanismes moléculaires impliqués.

C'est pourquoi, afin de nous orienter sur les grandes voies moléculaires et cellulaires dérégulées par l'absence de CD24 dans les cellules épithéliales, nous avons réalisé une étude transcriptomique sur le modèle HMLE présenté dans l'article 1. Le but de cette expérience est d'identifier les voies de signalisation et les fonctionnalités modulées par CD24 à partir de l'analyse de l'expression d'un très grand nombre de gènes afin de nous affranchir de toute idée préconçue.

2. Matériels et méthodes

2.1 Etude transcriptomique

Nous avons réalisé des cultures des 3 lignées cellulaires HMLE.E, HMLE.E_CD24⁻ et HMLE.M, en triplicats. A un niveau de confluence d'environ 60% (annexe 1), nous avons récolté des culots cellulaires de plus d'un million de cellules par échantillon. Nous avons ensuite extrait les ARN totaux de ces culots à l'aide du kit Norgen Biotek (Total RNA purification kit) puis traité les échantillons obtenus à la DNase avec le kit DNA removal kit (Thermofisher) selon les recommandations du fournisseur. Nous avons contrôlé la qualité des ARN obtenus avec le Nanodrop et le Bioanalyzer 2100 (Agilent RNA6000 Nano kit). Tous les échantillons utilisés avaient des RIN (RNA Integrity Number) de 10 (Annexe 2). Ces derniers ont alors été envoyés à la plateforme de génomique de l'institut Cochin de Paris. Ils ont d'abord réalisé l'étape de rétro-transcription sur 250ng d'ARN à l'aide du GeneChip® WT Plus Reagent Kit (Thermofisher). Après la purification recommandée par le protocole de Thermofisher, 5,5µg d'ADNc ont été fragmentés et marqués à la biotine. Après le contrôle de la qualité de la fragmentation à l'aide du Bioanalyzer 2100, l'ADNc est hybridé sur des puces Affymetrix de type GeneChip® Clariom S Humain (Thermofisher) à 45°C pendant 17 heures. Après une nuit d'hybridation, les puces ont été lavées dans une station fluide F450 en suivant un protocole spécifique du fournisseur (Thermofisher) puis scannées par la station GeneChip 3000 7G. Les images numérisées ont été ensuite analysées avec le logiciel Expression Console (Thermofisher) afin d'obtenir des données brutes et des mesures pour les contrôles de qualité. La normalisation des données brutes par les algorithmes Robust Multiarray Average (RMA) (Bolstad et al., 2003) et l'analyse statistique ont été effectuées à l'aide du logiciel TAC4.0 (Applied Biosystems, Thermofisher).

2.2 Analyse des transcrits RT-qPCR

La reverse transcription est réalisée à partir de 1µg d'ARN à l'aide du kit « SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis » (Thermofisher) selon les recommandations du fournisseur.

La reverse transcription se déroule en trois étapes : tout d'abord l'hybridation des amorces est effectuée pendant 10 minutes à une température de 25°C, puis la phase de transcription inverse permettant à l'enzyme, de synthétiser le brin d'ADNc à partir de l'ARNm pendant 60 minutes à 42°C, et enfin la désactivation de l'enzyme par un chauffage de 85°C pendant 5 minutes. Les ADNc peuvent être utilisés immédiatement ou conservés à -80°C.

La q-PCR est réalisée avec un mélange comprenant 10 µL de « iTaq Universal Probes Supermix » (Biorad), 1µL de sonde du gène d'intérêt, 2 µL d'ADNc et 7µL d'eau désionisée. La liste des références des amorces utilisées est présentée dans le tableau 7.

La réaction se fait en plaque 96 puits dans le thermocycleur Applied Biosystems 7300 selon le déroulé suivant : un cycle d'activation de l'enzyme à 95°C pendant 10 minutes, 40 cycles d'amplification des séquences comprenant la dénaturation des brins (15 secondes 95°C) puis l'hybridation des amorces ainsi que l'élongation des amorces (1 minute à 60°C). Les résultats obtenus sont analysés grâce au logiciel GENORM et normalisés par rapport à deux gènes de références (*RPLPO* et *GAPDH*). L'expression relative des transcrits est exprimée par rapport à l'expression du gène dans un échantillon défini comme contrôle.

Assay ID	Symbole du Gène	Nom du gène
Hs99999902_m1	RPLPO	Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0
Hs99999905_m1	GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Déshydrogénase
Hs00976831_s1	CLDN4	Claudine 4
Hs00600772-m1	CLDN7	Claudine 7
Hs01049883_m1	OCLN	Occludine
Hs00193376_m1	GJB5	GJB5
Hs00951428_m1	DSC2	Desmocolline 2
Hs00950591_m1	DSP	Desmoplakine

Tableau 7 - Liste des références des amorces et sondes utilisées en RT-qPCR

Fournisseur : Thermofischer.

2.3 Migration cellulaire

Les cellules HLME.E, HMLE.M, HMLE.E_CD24⁻ et HMLE.E_CD24^c ont étéensemencées à une faible densité dans une plaque 24 puits à fond de verre (MatTek, Corp., Ashland, MA), dans du DMEM/F12 sans antibiotiques, et incubées une nuit afin de permettre aux cellules d'adhérer correctement. La plaque a été transférée dans la chambre humide (37°C, 18% O₂, 5% CO₂) d'un microscope confocal Nikon A1 (Nikon, Corp., Tokyo, Japan) puis les images ont été capturées en contraste de phase à l'aide de l'objectif Plan Apo VC 20X DIC (NA/ 0.75). Chacune des 150 cellules analysées sur trois puits distincts ont été individuellement suivies grâce au plugin MTrackJ (Meijering et al., 2012) du logiciel ImageJ pendant 10 heures à l'aide d'une image prise toutes les 15 minutes. Les images de la figure 25 représentent un exemple de suivi du trajet des cellules par le plugin MTrackJ après 6 heures de traçage.

L'analyse de la vitesse, du ratio directionnel, du graphique des trajectoires de chaque cellule émanant du point d'origine et du déplacement quadratique moyen a été réalisé à l'aide du programme en libre accès DiPer (Gorelik and Gautreau, 2014).

3. Résultats

3.1 Exploration des mécanismes moléculaires et cellulaires associés à la modulation de CD24

Notre étude a consisté à analyser les variations du transcriptome induites par la perte d'expression de CD24 dans les cellules HMLE.E. Pour cela, nous avons extrait les ARN des cellules HMLE.E et HMLE.E_CD24⁻, mais également des cellules HMLE.M, ceci afin d'avoir une vision globale des gènes spécifiquement impliqués dans la TEM. Du fait de leur construction postérieure à l'envoi des échantillons, les cellules HMLE.E_CD24⁻ ne font pas partie de cette étude. Pour compléter cette approche, nous avons réalisé des qPCR afin de vérifier et confirmer les résultats obtenus sur toutes nos constructions.

3.1.1 Analyse descriptive des résultats obtenus par l'étude du transcriptome

Dans un premier temps, nous avons réalisé une analyse préliminaire des résultats obtenus à l'aide du logiciel TAC4.0 (Applied Biosystems, Thermofischer).

La représentation graphique de l'analyse en composantes principales (ou ACP) permet de visualiser le placement de chacun des échantillons les uns par rapport aux autres sur des axes distincts en fonction de la valeur d'expression de l'ensemble des gènes. Dans ce contexte, l'ACP sert à déterminer rapidement la variabilité intra- et intergroupe d'échantillons afin de valider le regroupement des points par type cellulaire. L'ACP relative à notre étude révèle que les triplicats par construction sont bien regroupés et que chaque type cellulaire représente un ensemble distinct des deux autres démontrant une bonne variabilité intergroupe (Figure 21). Dans cette étude, le nombre d'échantillons par condition est faible mais la variabilité intra-échantillon l'étant également, cette analyse ainsi que d'autres

paramètres évalués lors du contrôle de qualité par la plateforme nous permettent de valider la bonne qualité de notre étude.

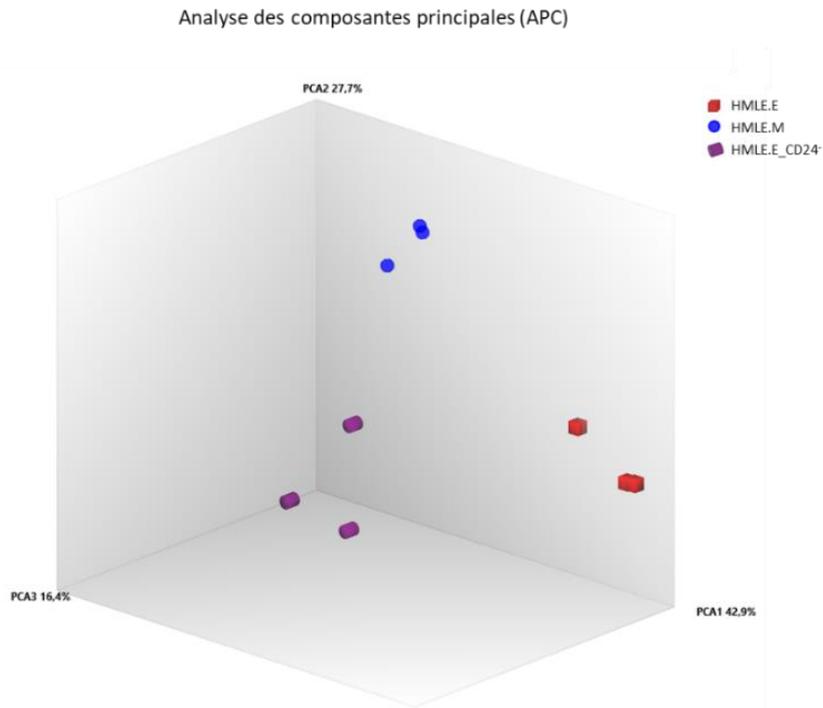


Figure 21 - Contrôle de la qualité des échantillons en utilisant l'analyse en composantes principales

L'ACP a été appliquée au jeu de données transcriptomiques de notre étude et permet de visualiser en trois dimensions la variabilité totale existante entre les groupes.

Par la suite, une première comparaison des différences d'expression entre les cellules HMLE.E, HMLE.E_CD24⁺ et HMLE.M a été réalisée (Figure 22). Pour une p-value nominale inférieure à 5% et en comparant les types cellulaires deux à deux, nous observons un grand nombre de gènes aussi bien sur- que sous-exprimés. Ainsi, ces données nous permettent d'avoir une idée de l'étendue des dérégulations d'expression entre les cellules mais aussi de valider la qualité de l'étude.

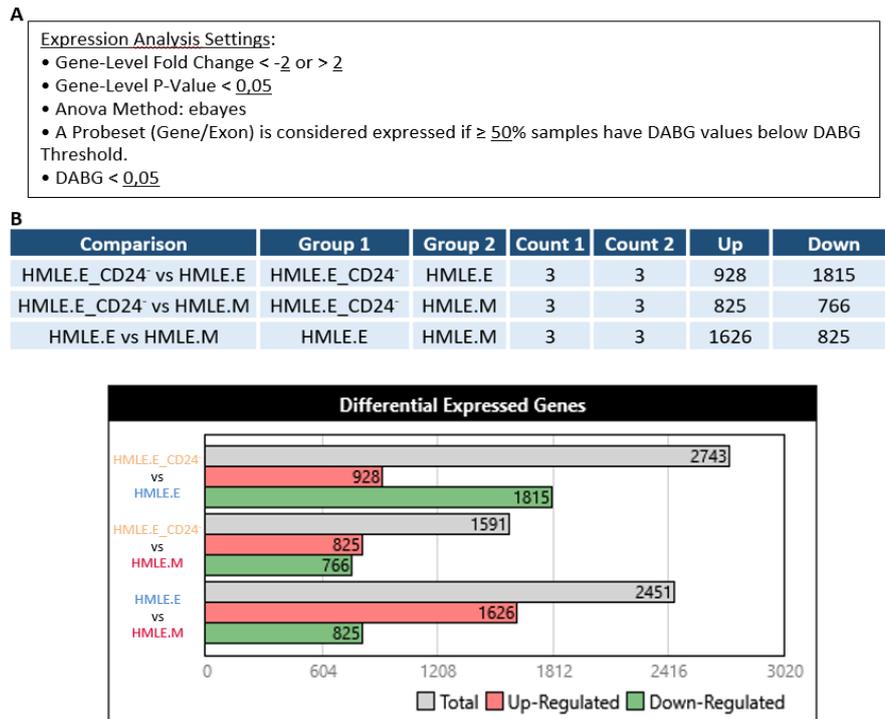


Figure 22 - Analyse descriptive des différences d'expression génique obtenus à l'aide du logiciel TAC4.0

(A) Réglage des paramètres utilisés pour cette analyse. (B) Répartition des différentiels d'expression génique des cellules comparées deux à deux.

Après avoir validé la qualité de nos échantillons, nous avons déterminé la liste des gènes présentant un différentiel d'expression entre les trois types de cellules. Pour ce faire, nous avons décidé d'être plus strict concernant les paramètres d'inclusion, notamment en ce qui concerne la significativité des différences d'expression. Ainsi, nous avons sélectionné un seuil de 10^{-3} pour la p-value corrigée par un test FDR. La correction FDR (pour False Discovery Rate ou « taux de fausses découvertes ») est une méthode permettant de contrôler le taux de faux positifs parmi les gènes considérés comme différentiellement exprimés.

Lors de la comparaison de l'expression des gènes des trois ensembles cellulaires, une liste de 230 gènes possédant un niveau d'expression différent dans au moins deux des trois groupes a été obtenue (Tableau 8 et Annexe 3). De façon rassurante, dans la liste des 10 premiers gènes les plus différentiels nous retrouvons *CD24*, validant ainsi notre modèle cellulaire. Parmi cette même liste, de nombreux gènes sont impliqués dans la TEM, au niveau de la régulation génétique tel que *ESRP1* mais également au niveau structural avec *CDH1*, *EPCAM*, *DSG3* et la *KRT15*. De plus, les gènes *MAL2* et *FABP4* ont récemment été impliqués dans l'initiation, la prolifération et la progression tumorale dans les cancers du sein (Bhandari et al., 2018; Guaita-Esteruelas et al., 2017; Zeng et al., 2020).

Gene Symbol	HMLE.E Avg (log2)	HMLE.E_CD24 ⁺ Avg (log2)	HMLE.M Avg (log2)	line FDR F-Test	Description
MAL2	16,05	14,31	5,04	1,63E-07	Mal, T-cell differentiation protein 2 (gene/pseudogene)
ESRP1	14,37	11,4	4,65	1,63E-07	Epithelial splicing regulatory protein 1
CD24	14,36	10,28	8,08	4,27E-07	CD24 molecule
CDH1	11,43	10,81	4,22	4,27E-07	Cadherin 1, type 1
FABP4	10,37	4,35	4,39	4,27E-07	Fatty acid binding protein 4, adipocyte
LAMA3	11,64	15,7	7,98	5,90E-07	Laminin, alpha 3
EPCAM	15,33	13,98	5,36	7,93E-07	Epithelial cell adhesion molecule
AKR1B15	9,93	4,89	5,13	9,41E-07	Aldo-keto reductase family 1, member B15
DSG3	11,63	8,59	5,28	1,24E-06	Desmoglein 3
KRT15	14,36	6,75	4,83	1,30E-06	Keratin 15, type I; microRNA 6510

Tableau 8 - Liste des dix gènes présentant la plus grande différence d'expression entre au moins un des trois types cellulaires.

Le calcul de la significativité par le test « FDR F-test » a été réalisé entre la valeur d'expression génique la plus faible et la valeur la plus forte.

Nous pouvons distinguer des groupes de gènes en fonction du profil d'expression des cellules HMLE.E_CD24⁺ par rapport aux deux autres populations cellulaires. Ainsi, nous pouvons regrouper :

- les gènes *MAL2*, *CDH1* et *EPCAM* dont le profil d'expression pour les cellules HMLE.E_CD24⁺ est similaire à celui observé pour les cellules HMLE.E mais différent de celui des cellules HMLE.M.
- le groupe de gènes *CD24*, *ESRP1* et *DSG3* dont l'expression est intermédiaire entre les cellules E et M pour HMLE.E_CD24⁺.
- l'ensemble de gènes *FABP4*, *AKR1B15* et *KRT15* dans lequel les cellules HMLE.E_CD24⁺ et HMLE.M sont semblables mais différents de HMLE.E.

Une approche en PCR quantitative a été réalisée à partir de l'ARNm de ces mêmes échantillons dont une partie a été présentée dans l'article (Figure 2 de l'article). Dans tous les cas, le différentiel d'expression a été retrouvé avec cependant quelques différences d'amplitude. De plus, ces qPCR nous ont permis de mesurer le niveau d'expression de ces gènes pour les cellules complémentées par CD24. Nous avons pu confirmer nos observations et les compléter en ajoutant les variations d'expression du type cellulaire HMLE.E_CD24⁺c qui n'était pas inclus dans l'analyse transcriptomique.

Suite à ces premières constatations, nous nous sommes concentrés sur l'analyse des différences d'expression entre les cellules HMLE.E et HMLE.E_CD24⁺. En conservant les mêmes paramètres d'analyse ($p < 0.001$), la recherche a révélé une liste de 144 gènes différemment exprimés entre ces

deux types cellulaires (Annexe 4). Le troisième gène le plus significativement dérégulé entre les deux types cellulaires est *CD24* ce qui permet ainsi de valider nos observations. Parmi les 30 premiers gènes de cette liste (Tableau 9), trois groupes semblent pouvoir être rassemblés au vu de leurs fonctions :

- régulation hormonale (notamment la voie du TGFβ et erbb2).
- protéines d'adhésion et de membrane.
- métabolisme (notamment relatif aux acides gras).

Gene Symbol	HMLE.E Avg (log2)	E_CD24 Avg (log2)	Fold Change	FDR P-val	Description	Fonctions
FABP4	10,37	4,35	-65,02	2,10E-06	fatty acid binding protein 4, adipocyte	Transport des acides gras dans cellules
AKR1B15	9,93	4,89	-32,76	3,71E-06	aldo-keto reductase family 1, member B15	Réduction des composés aldéhydes issus de la peroxydation des lipides
CD24	14,36	10,28	-16,97	9,48E-06	CD24 molecule	
ANKRD1	5,02	10,54	45,86	9,48E-06	ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)	
CLDN7	13,37	8,09	-38,9	9,48E-06	claudin 7	Adhésion
KRT15; MIR6510	14,36	6,75	-194,83	9,48E-06	keratin 15, type I; microRNA 6510	Filaments intermédiaires, adhésion
INHBA	6,78	10,81	16,29	2,04E-05	inhibin beta A	Régulateur de la voie du TGFβ
KLK6	11,94	5,96	-62,72	2,04E-05	kallikrein related peptidase 6	Régulateur de la MEC
SULT1E1	10,13	5,09	-32,89	2,55E-05	sulfotransferase family 1E member 1	Catalyseur des estrogènes
AREG	10,49	14,14	12,55	2,55E-05	amphiregulin	Facteur de croissance se liant à erbb2
FAT2	10,07	6,84	-9,39	2,55E-05	FAT atypical cadherin 2	Protocadhérine, adhésion
LY6D	10,72	6,21	-22,83	2,55E-05	lymphocyte antigen 6 complex, locus D	Marqueur membranaire
SCEL	9,4	5,55	-14,43	2,56E-05	sciellin	Marqueur membranaire, cellules cornifiées
FN1	9,03	14,84	56,06	3,10E-05	fibronectin 1	Filaments intermédiaires, adhésion
LAMA3	11,64	15,7	16,72	3,30E-05	laminin, alpha 3	Filaments intermédiaires, adhésion
GLUL	14,57	10,45	-17,33	4,38E-05	glutamate-ammonia ligase	Métabolisme glutamine
UCHL1	5,07	13,18	276,14	4,38E-05	ubiquitin C-terminal hydrolase L1	
SERPINE1	10,4	13,93	11,51	5,72E-05	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	Adhésion
GJB2	11,04	7,16	-14,73	5,72E-05	gap junction protein beta 2	Adhésion
NRG1	8,71	12,53	14,14	6,67E-05	neuregulin 1	Régulateur de la voie erbb2
TFCP2L1	8,81	6,23	-5,95	8,24E-05	transcription factor CP2-like 1	Régulateur de l'oxydation des acides gras
CLDN4	14,57	7,99	-96	8,88E-05	claudin 4	Adhésion
IGFBP2	9,56	6,45	-8,62	0,0001	insulin like growth factor binding protein 2	Signalisation de la voie de l'IGF
AKR1B10	9,44	5,47	-15,66	0,0001	aldo-keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase)	Réduction des composés aldéhydes issus de la peroxydation des lipides
PDCD4; MIR4680	12,38	7,88	-22,62	0,0001	programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor); microRNA 4680	Régulateur de l'apoptose induit par les ROS
IL6	5,63	10,61	31,66	0,0001	interleukin 6	
DSG3	11,63	8,59	-8,21	0,0001	desmoglein 3	Adhésion
PDHB	10,82	8,38	-5,44	0,0002	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	Métabolisme
KLK7	13,19	7,47	-52,53	0,0002	kallikrein related peptidase 7	Régulateur de la MEC
SLC7A8	9,63	5,41	-18,7	0,0002	solute carrier family 7 (amino acid transporter light chain, L system), member 8	

Métabolisme
 Adhésion et membrane
 Régulation hormonale

Tableau 9 - Liste des 30 gènes les plus significativement différentiels entre les groupes de cellules

HMLE.E et HMLE.E CD24

MEC = matrice extracellulaire.

Le tableau ci-dessus présente les gènes les plus différentiellement exprimés en fonction de la significativité de la différence et non du Fold Change. Cependant, un classement par Fold Change modifie uniquement l'ordre des gènes dans la liste et non la nature des gènes. Dans le fichier global, les plus exprimés chez les HMLE.E sont des kératines et kallikréines ainsi que des protéines de surface

alors que pour les HMLE.E_CD24⁻ on retrouve la vimentine, des intégrines et facteurs de croissance (Annexe 4).

De cette première analyse descriptive, nous pouvons déduire que la transfection réalisée afin de diminuer l'expression de *CD24* est de bonne qualité. De plus, la perte de cette protéine semble modifier le métabolisme cellulaire, l'organisation de la membrane et des protéines d'adhésion ainsi que la régulation hormonale liée aux facteurs de croissance.

En revanche, le regroupement de ces gènes en trois grands groupes fonctionnels est arbitraire c'est pourquoi il nous faut prendre du recul en interrogeant les bases de données sans *a priori*.

3.1.2 Analyse exploratoire des données

Ces analyses dites de « Data mining » permettent d'explorer et de mettre en évidence les voies biologiques impliquées dans les modèles étudiés, sans *a priori* sur la fonction des gènes contrairement à une analyse manuelle des listes de gènes. De plus, ce type d'approche permet de prendre en compte l'ensemble des résultats ou un panel de gènes différentiels et pas seulement de sélectionner les plus significatifs ou ceux disposant d'un très grand différentiel d'expression. Il existe donc deux objectifs relatifs à la diminution des biais d'analyse : l'exploration de données sans idées préconçues de fonctions des gènes et de valeur de différentiel entre les différents échantillons.

Parmi ces analyses, nous avons choisi de mener deux approches, l'une avec IPA (Ingenuity Pathway Analysis, Qiagen) et la seconde avec GSEA (Gene-Set Enrichment Analysis, <https://www.gsea-msigdb.org/gsea>, Broad Institute).

▪ **L'approche IPA**

L'approche IPA permet l'intégration des données d'analyse d'expression des gènes avec des informations sur les systèmes biologiques, les réseaux de gènes, et les voies de signalisation. Le service IPA dispose de bases de données actualisées et validées contenant les informations bibliographiques et expérimentales des interactions entre gènes et des composants des grandes voies cellulaires. L'interrogation des bases de données peut aboutir à l'identification (avec valeurs de significativité) des voies de signalisation, des voies métaboliques et des fonctions biologiques les plus enrichies dans notre jeu de données. IPA identifie également des régulateurs causaux dont le nombre de cibles est significativement élevé dans notre analyse par rapport à un panel de gènes choisis aléatoirement.

Pour cette analyse, ont été prises en compte les relations directes et indirectes entre les gènes différentiellement exprimés entre les cellules HMLE.E et HMLE.E_CD24⁻, obtenues à partir de données expérimentales uniquement. Nous avons restreint les paramètres d'exploration aux tissus mammaires, tumeurs de seins et lignées cellulaires de cancer du sein.

L'analyse des voies canoniques révèle l'implication de plusieurs voies (Tableau 10) dont les trois plus importantes sont : la signalisation p53 ($p=5,5 \times 10^{-5}$), la signalisation ILK (via les intégrines) ($p=1,15 \times 10^{-4}$) et la ferroptose ($p=1,80 \times 10^{-4}$).

Inguenuity Canonical Pathways	p-value	Molecules	Overlap
p53 Signaling	5,50E-05	AKT2, AKT3, BCL2L1, CCND1, CCND2, CCNG1, CDK4, CSNK1D, HDAC1, HIF1A, HIPK2, JMY, JUN, KAT2B, MAPK14, PERP, PIAS1, PIK3R1, PRKDC, SERPINB5, THBS1, TP53INP1, TP63, TRIM29	27,0% (24/89)
ILK Signaling	1,15E-04	ACTG2, AKT2, AKT3, BMP2, CCND1, CDC42, CREB5, DSP, FLNA, FN1, FOS, HIF1A, ITGB1, ITGB8, JUN, KRT18, MYC, MYH10, MYL6, MYL9, PARVA, PGF, PIK3R1, PPP1R14B, PPP2CA, PPP2R1A, PPP2R1B, PTK2, PXN, RHOA, RHOD, TGFB1I1, TMSB10/TMSB4X, VEGFC, VIM	22,2% (35/158)
Ferroptosis Signaling Pathway	1,80E-04	ACACA, CBS/CBSL, CTSB, EMP1, FDFT1, GCLC, GLS2, GPX4, H2BC10, H2BC5, HMGCR, HSPB1, LPCAT3, NCOA4, PEBP1, PRKAB1, RAF1, RBL2, SLC39A14, SLC39A8, SLC3A2, SP1, SREBF2, TFAP2C, VDACC2, YAP1	24,3% (26/107)
Acetyl-CoA Biosynthesis I (Pyruvate Dehydrogenase Complex)	1,82E-04	DLAT, DLD, PDHA1, PDHB	100% (4/4)

Tableau 10 - Voies canoniques les plus significatives comprenant les gènes différentiels entre HMLE.E et HMLE.E_CD24⁻

Le service IPA fournit des représentations graphiques de ces connexions établies dans ces voies en montrant les différents niveaux d'expression des gènes de notre étude (Annexe 5,6 et 8).

Pour la signalisation p53, les gènes dérégulés concernent les voies des dommages à l'ADN, et un certain nombre de régulateurs de la protéine p53. Ces gènes sont globalement impliqués dans le développement tumoral et correspondent à de nombreux gènes « uniques », par exemple MAPK qui représentent toutes les protéines de la famille MAPK.

Pour la signalisation ILK, les voies de signalisations pointent vers les propriétés de motilité cellulaire, d'adhésion et de migration. Au niveau nucléaire, on observe une régulation des gènes cibles de SLUG et des facteurs de transcription tels que CREB, C-JUN, et C-FOS notamment.

Enfin, la ferroptose est un type de mort cellulaire décrit récemment, notamment dans les cancers du sein, qui dépend des taux intracellulaires de fer et de ROS. Quelques gènes impliqués dans le stress oxydant se retrouvent dérégulés dans cette voie.

Enfin, le service IPA permet de fournir une **liste des fonctions cellulaires et moléculaires** les plus différentielles entre les cellules HMLE.E et HMLE.E_CD24⁺. De manière intéressante, les fonctions relatives à la motilité et à la migration cellulaire en lien avec l'organisation et les mouvements cellulaires sont les plus significatives (Tableau 11). De plus, la survie et la mort cellulaire semblent prendre une place importante dans cette liste ce qui peut être relié à l'article présenté dans la première partie des résultats de ce manuscrit.

Molecular and cellular functions	p-value range	# Molecules
Cellular Movement	3,10E-02 - 6,59E-11	116
Cellular Assembly and Organization	3,74E-02 - 2,22E-05	26
Cellular Function and Maintenance	3,74E-02 - 2,22E-05	24
Cell Death and Survival	4,96E-02 - 7,27E-05	107
Cell Cycle	4,19E-02 - 1,24E-04	46

Tableau 11 - Liste des principales fonctions moléculaires et cellulaires discordantes entre les cellules HMLE.E et HMLE.E_CD24⁺

- **L'approche GSEA**

L'approche GSEA, complémentaire de IPA, effectue quant à elle une analyse d'enrichissement par rapport à des listes de gènes prédéfinies dans un terme (voie canonique, fonction moléculaire...) et issues de banques comme Hallmarks, Gene Ontology ou KEGG. Ainsi, l'outil compare les gènes de la liste qu'on lui soumet aux listes des gènes présents dans chacune des voies ou des fonctions explorées. Quand une de ces fonctions est particulièrement bien représentée (en % de nombre de gènes) dans la liste soumise, elle est considérée comme enrichie.

L'analyse de l'enrichissement des ensembles de gènes (GSEA) se fait non pas sur l'ensemble des résultats mais sur une liste de gènes pondérés sur leur expression et leur p-value de différentiel. Dans notre étude, la version GSEA 4.0.3 a été utilisée.

Dans un premier temps, nous avons interrogé l'enrichissement par rapport à la base de données « Hallmarks ». Les ensembles de gènes des « Hallmarks » résumet et représentent des états ou des processus biologiques spécifiques bien définis.

Pour les cellules HMLE.E, cette étude nous révèle un enrichissement de gènes relatifs à la réponse aux œstrogènes, aux acides gras et à leur métabolisme (fatty_acid_metabolism, peroxisome, adipogenesis,

cholesterol_homeostasis) et également au métabolisme énergétique (oxidative_stress, glycolysis, mTORC1_signaling) (Tableau 12). Concernant les cellules n'exprimant plus CD24, nous retrouvons les processus et états cellulaire suivant : la TEM, la signalisation canonique en lien avec les CSC (Wnt_beta_catenin_signaling, notch_signaling, IL6_jak_stat3_signaling) et la réponse immunitaire (complement, allograft_rejection, inflammatory_reponse).

	Bases de données	Nom	Score d'enrichissement (NES)	p-value nominale
Surexpression dans HMLE.E	Hallmarks	PEROXISOME	1.56	<10E-03
		ESTROGEN_RESPONSE_LATE	1.50	<10E-03
		ESTROGEN_RESPONSE_EARLY	1.42	<10E-03
		FATTY_ACID_METABOLISM	1.34	<10E-03
		MTORC1_SIGNALING	1.26	<10E-03
		ADIPOGENESIS	1.26	<10E-03
		XENOBIOTIC_METABOLISM	1.26	<10E-03
		GLYCOLYSIS	1.26	<10E-03
		CHOLESTEROL_HOMEOSTASIS	1.26	<10E-03
		OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION	1.50	<10E-03
Surexpression dans HMLE.E_CD24 ⁻	Hallmarks	WNT_BETA_CATENIN_SIGNALING	-1.42	<10E-03
		EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION	-1.39	<10E-03
		COMPLEMENT	-1.32	<10E-03
		ALLOGRAFT_REJECTION	-1.30	<10E-03
		NOTCH_SIGNALING	-1.24	0.302
		IL6_JAK_STAT3_SIGNALING	-1.22	<10E-03
		INFLAMMATORY_RESPONSE	-1.22	<10E-03
		COAGULATION	-1.15	0.198
		KRAS_SIGNALING_UP	-1.13	0.091
		ANGIOGENESIS	-1.13	0.277

Tableau 12 – Liste des états et processus biologiques spécifiques des cellules HMLE.E et HMLE.E_CD24⁻ identifiés à partir de la base de données « Hallmarks »

Par la suite, nous avons décidé d'approfondir cette recherche en questionnant un ensemble de base de données KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) relatives aux génomes et voies métaboliques entre autres. De cette analyse, nous pouvons observer un enrichissement dans les voies et états quasiment similaires aux « Hallmarks ». En effet, pour les cellules HMLE.E nous retrouvons un enrichissement au niveau du métabolisme énergétique et lipidique (Tableau 13). Pour les cellules HMLE.E_CD24⁻, nous observons une sur-représentation des signatures immunologiques et de la structure cellulaire et membranaire (focal_adhesion, regulation_of_actin_cytoskeleton).

	Bases de données	Nom	Score d'enrichissement (NES)	p-value nominale
Surexpression dans HMLE.E	KEGG	BUTANOATE_METABOLISM	1.56	<10E-03
		PROPANOATE_METABOLISM	1.49	<10E-03
		PYRUVATE_METABOLISM	1.46	<10E-03
		GLUTATHIONE_METABOLISM	1.45	<10E-03
		CYSTEINE_AND_METHIONINE_METABOLISM	1.44	<10E-03
		PEROXISOME	1.42	<10E-03
		GLYCOLYSIS_GLUONEOGENESIS	1.42	<10E-03
		TERPENOID_BACKBONE_BIOSYNTHESIS	1.40	<10E-03
		CITRATE_CYCLE_TCA_CYCLE	1.39	<10E-03
		GALACTOSE_METABOLISM	1.39	<10E-03
		SELENOAMINO_ACID_METABOLISM	1.38	<10E-03
FATTY_ACID_METABOLISM	1.38	<10E-03		
Surexpression dans HMLE.E_CD24 ⁻	KEGG	NOD_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	-1.40	<10E-03
		GRAFT_VERSUS_HOST_DISEASE	-1.35	<10E-03
		INTESTINAL_IMMUNE_NETWORK_FOR_IGA_PRODUCTION	-1.32	0.109
		FOCAL_ADHESION	-1.27	<10E-03
		JAK_STAT_SIGNALING_PATHWAY	-1.26	<10E-03
		ECM_RECEPTOR_INTERACTION	-1.23	<10E-03
		HYPERTROPHIC_CARDIOMYOPATHY_HCM	-1.22	0.169
		SMALL_CELL_LUNG_CANCER	-1.21	0.210
		REGULATION_OF_ACTIN_CYTOSKELETON	-1.21	<10E-03
		CYTOKINE_CYTOKINE_RECEPTOR_INTERACTION	-1.21	<10E-03

Tableau 13 - Liste des états et processus biologiques spécifiques des cellules HMLE.E et HMLE.E_CD24⁻ identifiés à partir de la base de données « KEGG »

Les différentes approches que nous avons utilisées mettent en exergue une liste des fonctions cellulaires et moléculaires ainsi qu'un ensemble de voies dérégulées entre les cellules HMLE.E et HMLE.E_CD24⁻. Une étude plus approfondie de ces différentes voies est en cours d'analyse. Mais, en première intention, nous avons décidé de nous focaliser sur les dérégulations liées à l'adhésion et la migration cellulaire.

3.1.3 Analyse de l'expression des protéines de jonctions cellules-cellules

Les différentes analyses suggèrent que la perte de CD24 modifie l'organisation de la membrane (analyse descriptive), les propriétés de motilité cellulaire, d'adhésion et de migration (approche IPA) ainsi que l'adhésion focale et la régulation du cytosquelette d'actine (approche GSEA). L'ensemble de

ces modifications vont dans le sens des dérégulations observées au cours des premières étapes de la TEM. Comme nous l'avons vu dans la présentation bibliographique, au cours de la TEM, les cellules épithéliales vont subir plusieurs changements phénotypiques permettant l'acquisition de propriétés migratoires et invasives : notamment par la perte des jonctions intercellulaires (Wu et al., 2021) et la désorganisation du cytosquelette (Le Bras et al., 2012).

Dans les cellules épithéliales, il existe plusieurs types de jonctions cellules-cellules composés de protéines inter-membranaires ainsi que de protéines cytoplasmiques, ces différentes jonctions sont présentées sur la figure 23.

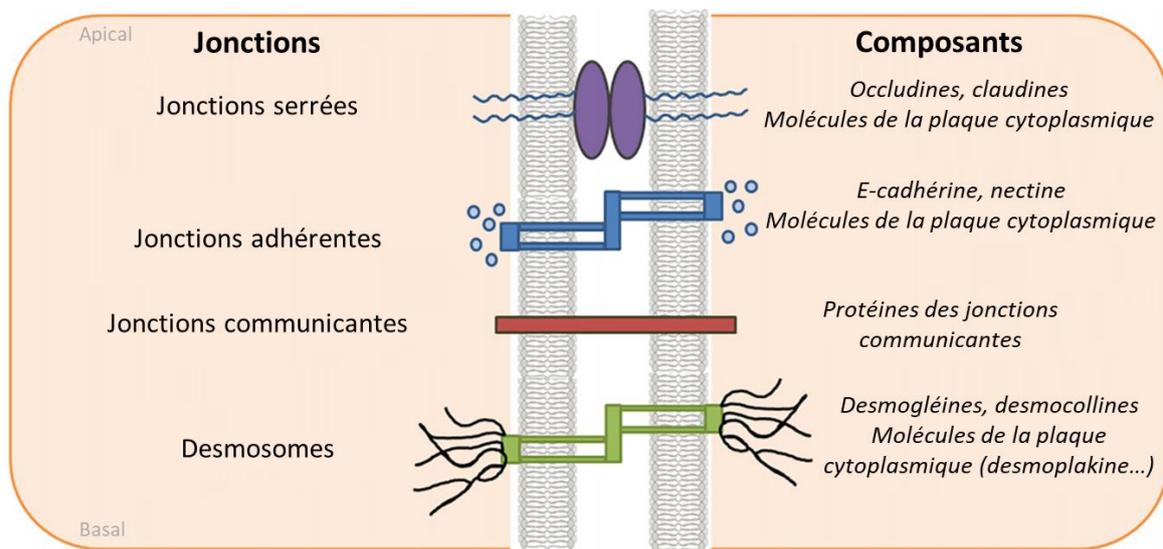


Figure 23 - Schéma des différentes jonctions intercellulaires des cellules épithéliales

Les jonctions serrées et adhérentes sont situées au pôle apical tandis que les jonctions communicantes ou desmosomes se trouvent au pôle basal avec une possibilité d'un inversement dans l'ordre de ces jonctions. Inspiré de "Bhat et al., 2019".

Dans le tableau 14, nous pouvons comparer les différences d'expression des gènes relatifs aux jonctions dans les cellules HMLE.E_CD24⁻, HMLE.E et HMLE.M. Les cellules mésenchymateuses nous permettent d'avoir un contrôle de la régulation négative de l'expression d'un certain nombre de ces protéines. De manière intéressante, un certain nombre de protéines qui sont sous-exprimées dans les cellules mésenchymateuses le sont également dans les cellules HMLE.E_CD24⁻ comparé aux cellules épithéliales HMLE.E. Dans certains cas, cette diminution d'expression est similaire aux HMLE.M, et dans d'autres, les cellules HMLE.E_CD24⁻ présentent un profil d'expression intermédiaire entre HMLE.E et HMLE.M.

	HMLE.E Avg (log2)	HMLE.E_CD24 Avg (log2)	HMLE.M Avg (log2)	line FDR F-Test	Gene Symbol	Description	Chromosome	
Jonctions serrées	Protéines transmembranaires	4,13	4,14	4,6	5,75E-01	CRB1	crumbs family member 1	chr1
		5,01	5,46	5,18	0,4147	CRB2	crumbs family member 2	chr9
		9,28	8,67	9,33	0,321	CRB3	crumbs family member 3	chr19
		9,65	8,94	5,89	7,44E-05	MARVELD2	MARVEL domain containing 2	chr5
		7,79	7,73	8,29	2,99E-01	MARVELD1	MARVEL domain containing 1	chr10
		8,8	9,5	9,24	0,5143	MARVELD3	MARVEL domain containing 3	chr16
		11,41	8,48	6,35	0,0001	OCLN	occludin	chr5
		6,45	7,07	4,78	0,0023	CLDN1	claudin 1	chr3
		13,37	8,09	8,83	0,000004	CLDN7	claudin 7	chr17
		14,57	7,99	6,24	0,0000124	CLDN4	claudin 4	chr7
		9,27	7,97	7,44	0,0848	CLDN12	claudin 12	chr7
		7,19	7,62	7,88	0,1822	BVES	blood vessel epicardial substance	chr6
		4,22	4,47	4,74	0,6212	JAM2	junctional adhesion molecule 2	chr21
		7,63	6,46	7,34	0,3279	JAM3	junctional adhesion molecule 3	chr11
	8,76	5,9	5,18	4,10E-03	CXADR=CAR	coxsackie virus and adenovirus receptor	chr21	
	Protéines cytoplasmiques	9,65	8,52	5,28	0,0003	LSR	lipolysis stimulated lipoprotein receptor	chr19
		9,01	8,22	7,7	0,0526	PARD6B	par-6 family cell polarity regulator beta	chr20
		7,74	5,05	3,94	0,0134	PARD6G	par-6 family cell polarity regulator gamma	chr18
		8,77	7,12	4,96	0,0079	INADL=PATJ	InaD-like (Drosophila)	chr1
		15,14	12,83	14,43	0,0065	RHOA	ras homolog family member A	chr3
		12,07	10,45	10,66	0,0017	CDC42SE2	CDC42 small effector 2	chr5
		8,62	11,4	11,7	0,0035	CDC42EP3	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3	chr2
		10,23	9,53	7,07	0,0047	GRHL2	grainyhead-like transcription factor 2	chr8
		6,74	5,48	4,69	0,0133	GRHL1	grainyhead-like transcription factor 1	chr2
		7,87	6,54	6,08	0,0275	GRHL3	grainyhead-like transcription factor 3	chr1
		11,89	9,7	6,99	0,00000744	TP63	tumor protein p63	chr3
		13,31	11,68	11,56	0,0014	HSPA4	heat shock 70kDa protein 4	chr5
		6,32	5,1	4,25	0,016	ARHGEF3	Rho guanine nucleotide exchange factor 3	chr3
12,74		11,03	10,91	0,0023	YES1	YES proto-oncogene 1, Src family tyrosine kinase	chr18	
8,56	6,96	7,42	0,0882	RAF1	Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase	chr3		
14,23	11,55	9,74	0,0054	MYC	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog	chr8		
11,12	8,94	7,08	0,0011	JUN	jun proto-oncogene	chr1		
Jonctions adhérentes	11,9	7,91	5,93	0,000072	PVRL1=nectin	poliovirus receptor-related 1	chr11	
	11,43	10,81	4,22	0,000000427	CDH1	cadherin 1, type 1	chr16	
	12,07	11,22	11,88	0,0312	CTNNB1	catenin (cadherin-associated protein), beta 1	chr3	
	13,41	11,9	11,86	0,0354	CTNNA1	catenin (cadherin-associated protein), alpha 1	chr5	
	4,83	5,66	5,23	0,1878	CTNNA2	catenin (cadherin-associated protein), alpha 2	chr2	
	11,59	10,45	9,86	0,0027	CTNND1	catenin (cadherin-associated protein), delta 1	chr11	
	10,3	8,58	9,06	0,0046	PTK2=FAK	protein tyrosine kinase 2	chr8	
Jonctions communicantes	11,04	7,16	5,53	0,0000045	GJB2	gap junction protein beta 2	chr13	
	9,94	9,52	4,97	0,0015	GJB3	gap junction protein beta 3	chr1	
	9,25	7,44	6,9	0,0558	GJB5	gap junction protein beta 5	chr1	
	6,8	6,91	8,08	0,0153	GJC2	gap junction protein gamma 2	chr1	
	4,82	3,86	3,9	0,0247	GJB4	gap junction protein beta 4	chr1	
Desmosomes	Protéines transmembranaires	11,24	9,34	7,44	0,000014	DSC3	desmocollin 3	chr18
		11,23	8,85	6,4	0,0002	DSC2	desmocollin 2	chr18
		4,22	4,15	4,15	0,6632	DSC1	desmocollin 1	chr18
		11,63	8,59	5,28	0,00000124	DSG3	desmoglein 3	chr18
		10,91	9,91	8,47	0,0069	DSG2	desmoglein 2	chr18
		5,71	5,8	5,26	0,2379	DSG1	desmoglein 1	chr18
	Protéines cytoplasmiques	9,91	7,91	7,39	0,0019	PKP1	plakophilin 1	chr1
		13,13	11,18	11,16	0,0075	PKP2	plakophilin 2	chr12
		9,06	9,78	9,54	0,4495	PKP4	plakophilin 4	chr2
		5,21	5,02	5,02	0,7457	PKP3	plakophilin 3	chr11
		10,7	8,88	6,22	0,0002	JUP	junction plakoglobin	chr17
		12	10,29	6,89	0,0000441	DSP	desmoplakin	chr6
		15,67	13,99	10,49	0,0002	PERP	PERP, TP53 apoptosis effector	chr6

Tableau 14 - Liste des gènes relatifs aux jonctions intercellulaires

Le calcul de la significativité par le test « FDR F-test » a été réalisé entre la valeur d'expression génique la plus faible et la valeur la plus forte. Les gènes grisés correspondent aux plus différenciellement exprimés entre les HMLE.E et HMLE.E_CD24.

En effet, les protéines des jonctions serrées telles que l'occludine, les claudines 7,4 et 12 mais aussi la protéine CAR sont sous-régulées dans les cellules n'exprimant pas CD24. Nous retrouvons également une baisse de l'expression de quelques protéines des jonctions adhérentes (PVRL1 et FAK), communicantes (GJB2 et GJB5) et des desmosomes (DSC3, dSC2, DGS3, PKP1, PKP2, DSP et PERP).

Nous avons dans un premier temps voulu confirmer par qRT-PCR les modifications d'expression des gènes des jonctions les plus différentiellement exprimés entre les cellules HMLE.E et HMLE.E_CD24⁻. De manière intéressante et similaire à l'étude transcriptomique, nous observons une diminution de l'expression relative de l'ARNm pour chacun des gènes étudiés dans les cellules HMLE.E_CD24⁻ comparé aux HMLE.E. Néanmoins, la complémentation de la protéine CD24 ne rétablit pas l'expression de certaines protéines de jonctions notamment les claudines 4, 7 et l'occludine. Concernant la protéine présente au niveau des jonctions communicantes GJB5, son expression est augmentée dans les cellules HMLE.E_CD24^c. Enfin, pour la desmocolline 2 et la desmoplakine correspondant à des protéines présentes au niveau des desmosomes, l'expression relative de leur ARNm est rétablie partiellement avec la complémentation de CD24.

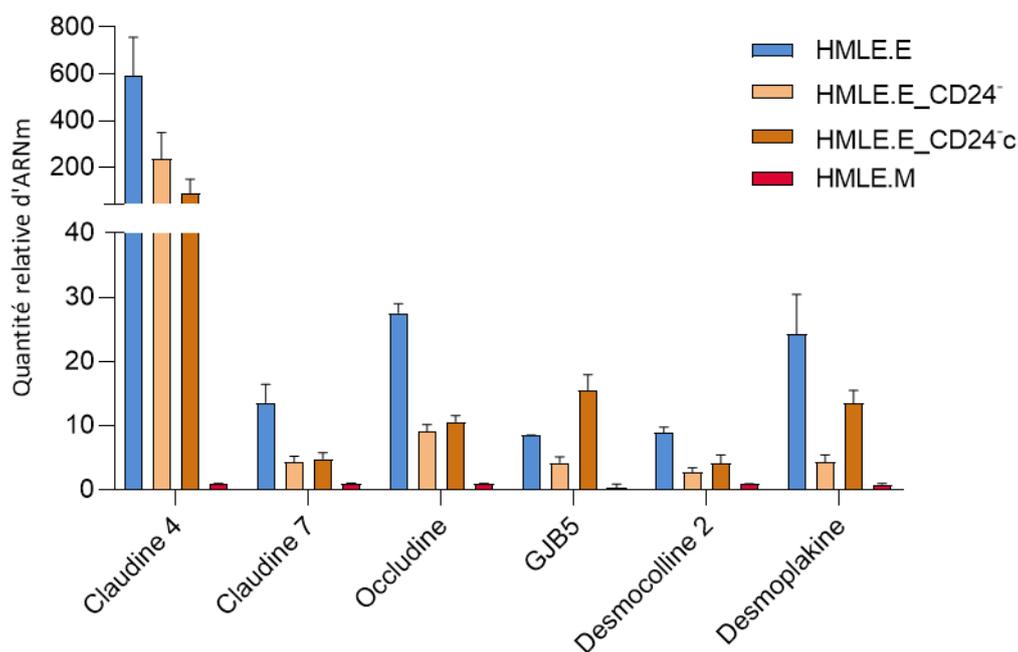


Figure 24 – Evaluation de l'expression relative des ARNm des protéines de jonctions cellulaires dans les cellules HMLE.E, HMLE.E_CD24⁻, HMLE.E_CD24^c et HMLE.M

De cette première analyse, nous pouvons déduire que la réexpression de toutes les protéines de jonctions dérégulées par la perte d'expression de CD24 n'est pas rétablie par sa complémentation. Ces résultats étant préliminaires, il est nécessaire de les confirmer et d'éventuellement se concentrer sur les protéines des jonctions communicantes et les desmosomes.

3.2 Étude de la migration cellulaire

Comme nous l'avons vu précédemment, l'étude transcriptomique de notre modèle suggère fortement que la perte de CD24 pourrait se traduire par une augmentation des capacités migratoires des cellules. Nous avons également mis en évidence dans la première partie des résultats un lien entre la perte de la protéine CD24 et l'acquisition de marqueurs relatifs aux CSCs ainsi qu'aux cellules à un stade précoce de la TEM, autrement appelées cellules hybrides E/M précoces, qui présentent des capacités migratoires augmentées. Au regard de ces résultats, nous avons voulu vérifier la corrélation entre ces observations théoriques et l'acquisition de capacités migratoires *in vitro* par nos cellules HMLE.E_CD24⁻ par rapport aux cellules HMLE.E et HMLE.E_CD24^c. Pour cela, nous avons réalisé une étude fonctionnelle de la migration cellulaire.

La migration cellulaire est un mécanisme utilisé par la cellule tumorale pour se déplacer et se propager efficacement dans son territoire ou dans l'organisme. Le déplacement actif des cellules dans son milieu est possible grâce au processus de motilité cellulaire correspondant à la capacité d'une cellule à effectuer des mouvements spontanés ou stimulés. L'efficacité de la migration cellulaire dépend de plusieurs paramètres qui peuvent être mesurés notamment grâce à une méthode développée par les chercheurs Roman Gorelik et Alexis Gautreau (Gorelik and Gautreau, 2014) que nous avons décidé d'utiliser afin de réaliser une expérience fonctionnelle de l'analyse quantitative de cette migration. Pour cela, les cellules sont suivies et marquées toutes les 15 minutes afin de tracer un trajet de leur mouvement grâce au plugin MtrackJ de ImageJ (Figure 25).

Par la suite, les coordonnées des points de chaque cellule à chaque temps sont analysées.

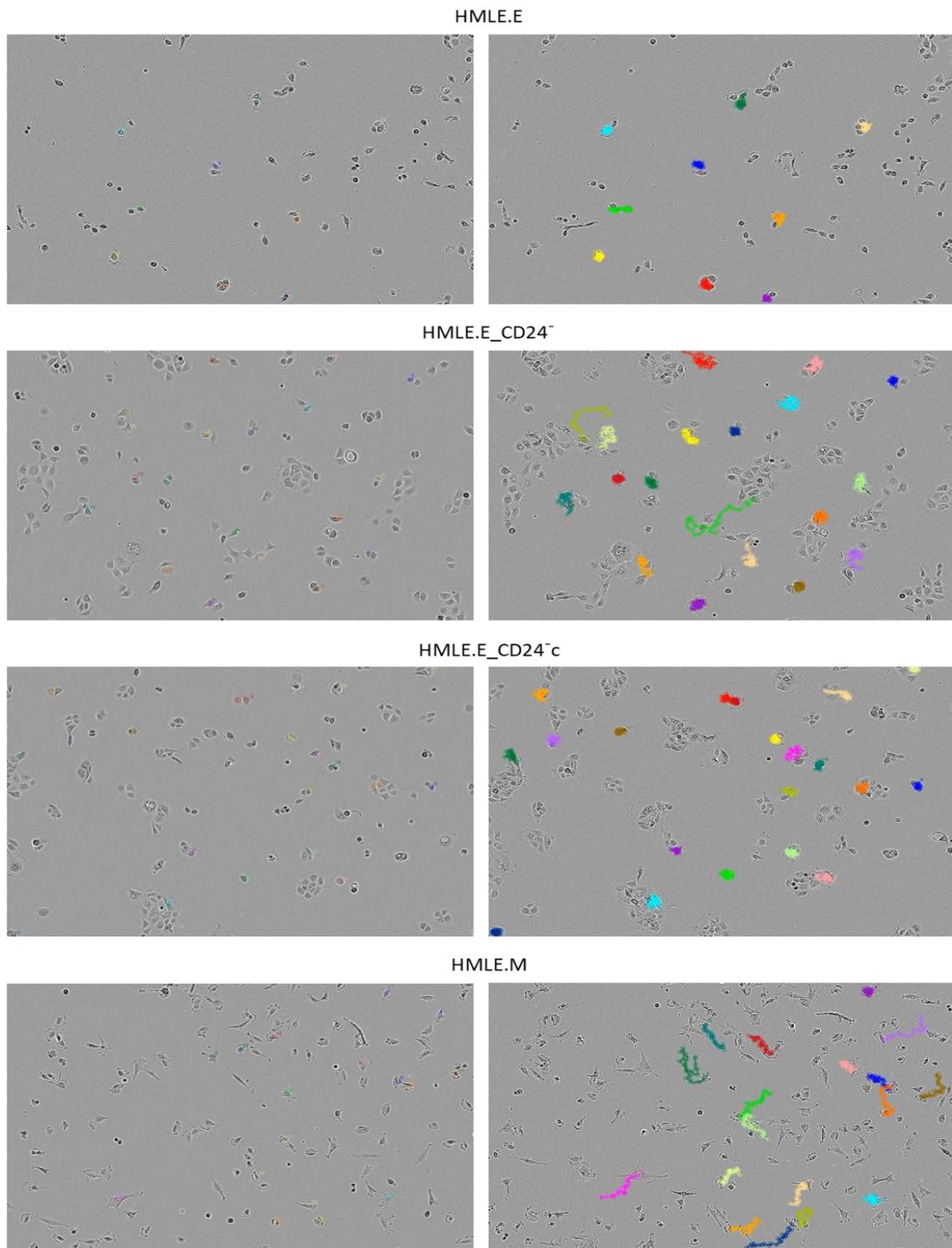


Figure 25 - Images en contraste de phase des cellules à 0h et 6h après traçage avec le plugin MTrackJ du logiciel ImageJ réalisé à l'aide du microscope de l'IncuCyte[®] (Sartorius)

Le programme DiPer permet d'obtenir une représentation graphique de la trajectoire à l'origine de chaque cellule au sein d'un même diagramme pour toutes les constructions. Dans ce diagramme, toutes les coordonnées (x,y) des points de départ de chaque cellule sont fixées à (0,0) en utilisant une transformation de coordonnées (Figure 26). Grâce à ce réglage, ce schéma donne une vue générale de

la direction de la migration cellulaire ainsi que de la distance parcourue par les cellules et permet une première interprétation des données.

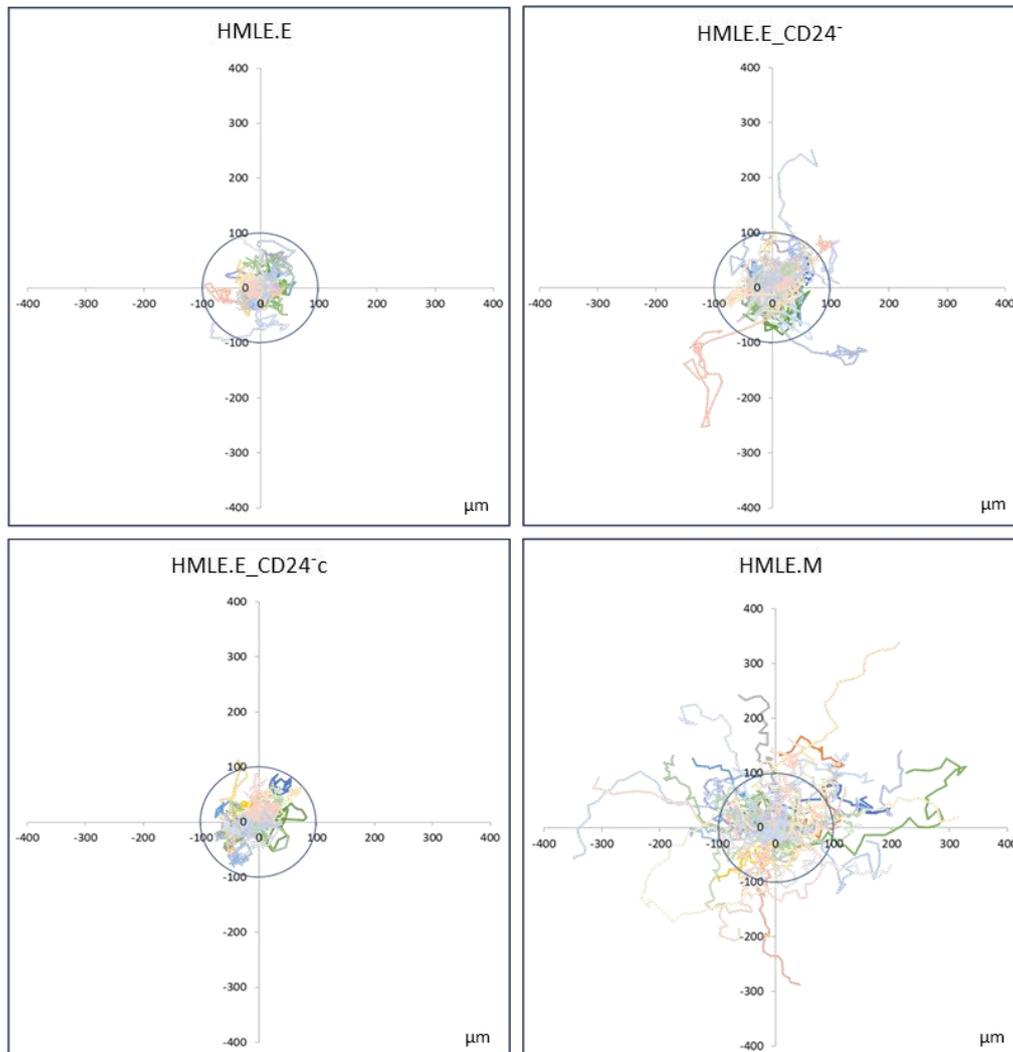


Figure 26 - Diagramme des trajectoires émanant de l'origine illustrant le trajet total des cellules

Chaque ligne colorée représente le chemin total parcouru par une cellule sur une durée de 10 heures. Sur ce schéma, les trajectoires de 50 cellules par constructions sont présentes.

Le tracé représentatif de la rose des vents des cellules HMLE.M montre de longues trajectoires qui s'éloignent de leur point d'origine. Les cellules HMLE.E et les cellules HMLE.E_CD24^c ont des profils de migration similaires avec une trajectoire beaucoup plus resserrée autour de leur point de départ. Les cellules HMLE.E_CD24⁻ semblent quant à elles parcourir plus de distance que les autres cellules épithéliales avec quelques cellules qui s'éloignent fortement de leur origine. Comme attendu du fait de leurs propriétés migratoires accrues caractéristiques du phénotype mésenchymateux, les cellules

HMLE.M présentent la motilité la plus forte comparé aux autres types cellulaires. De manière intéressante, les cellules épithéliales n'exprimant plus CD24 semblent avoir une motilité plus importante que les autres cellules épithéliales. Cette représentation donne une idée visuelle de la capacité d'exploration et de migration des cellules sans analyse statistique.

Le programme DiPer peut également mesurer et calculer la vitesse moyenne de déplacement ainsi que le déplacement quadratique moyen (mean square displacement ou MSD). Le MSD représente les déplacements carrés moyens sur des intervalles de temps croissants entre les positions d'une trajectoire de migration. Dans le contexte de migration cellulaire, le MSD est une bonne mesure de la surface d'aire explorée par les cellules au cours du temps, ce qui est rattaché à l'efficacité de la migration.

Après avoir visualisé la représentation graphique en rose des vents des cellules HMLE.M, nous avons pu en déduire que ces cellules sont hautement plus motiles que les trois autres types cellulaires. Puisque nous nous intéressons principalement au rôle de la perte de CD24 dans les cellules épithéliales sur la migration cellulaire, nous avons décidé de ne pas présenter les résultats relatifs aux cellules HMLE.M.

Après avoir suivi le déplacement de nos cellules pendant 10 heures, nous pouvons voir que la courbe du MSD des cellules HMLE.E_CD24⁻ s'élève au-dessus des courbes des cellules HMLE.E et HMLE.E_CD24^c (Figure 27). De cette expérience, nous pouvons déduire que les cellules qui ont perdu l'expression de la protéine CD24 ont une plus grande capacité exploratoire que les cellules HMLE.E. De plus, la complémentation du gène *CD24* rétabli la courbe du MSD pratiquement au même niveau que les cellules épithéliales non modifiées HMLE.E. Ainsi, la perte d'expression de la protéine CD24 semble augmenter la migration cellulaire.

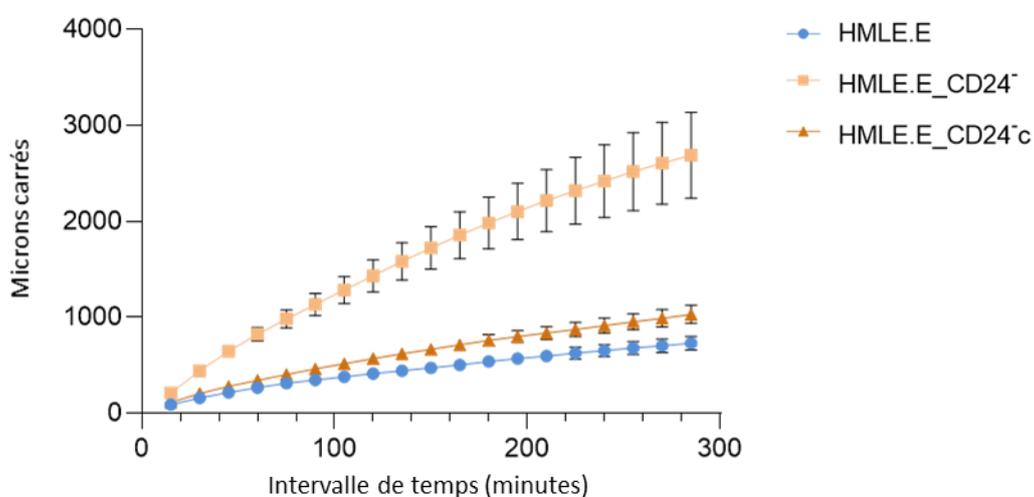


Figure 27 - Déplacement moyen quadratique des cellules HMLE.E, HMLE.E CD24⁻, HMLE.E CD24^c

Le MSD a été calculé pour ces cellules pendant la moitié de la durée de la trajectoire entière à savoir 5 heures car la courbe devient moins fiable aux temps long. Au moins 150 cellules par construction ont été quantifiées ; les données représentent la moyenne des MSD \pm l'erreur standard de la moyenne (SEM).

Le MSD est toujours la résultante de la persistance de direction et de la vitesse de déplacement des cellules. La persistance correspond à la capacité des cellules à maintenir une direction lors de ses déplacements. Dans un contexte dénué de stimulations comme dans notre étude, la persistance dépend du maintien de l'état polarisé des cellules.

Le programme DiPer permet d'évaluer la persistance des cellules à travers deux paramètres : l'autocorrélation de la distance et le ratio directionnel. Ce dernier paramètre se réfère à la longueur en ligne droite entre le point de départ et d'arrivée de la trajectoire de migration divisée par la longueur de la trajectoire. Ce ratio est égal à 1 pour une trajectoire droite et 0 pour une trajectoire très courbée. L'autocorrélation quantifie l'angle de migration que les vecteurs de déplacement forment entre les différents intervalles de temps. Elle mesure ainsi la façon dont les angles qui décrivent une trajectoire sont alignés les uns par rapport aux autres.

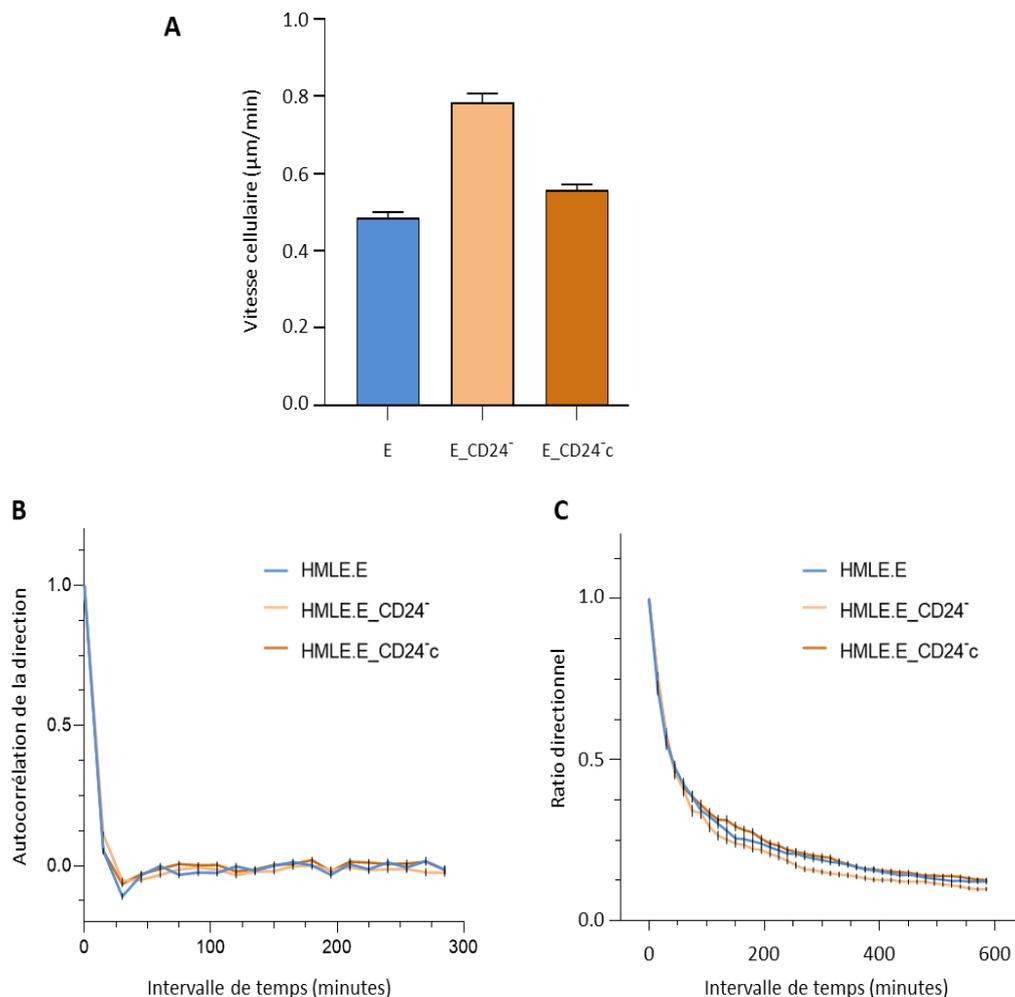


Figure 28 - Etude de la vitesse et de la persistance de déplacement des cellules HMLE.E, HMLE.E CD24⁻, HMLE.E CD24^{-c}

Ces paramètres ont été calculé sur 150 cellules. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard de la moyenne.

Dans les cellules HMLE.E_CD24⁻, la vitesse de déplacement est d'environ 0,8µm/min contre 0,5µm/min pour les cellules HMLE.E (Figure 28.A). Les cellules ayant perdu l'expression de CD24 se déplacent plus rapidement que les cellules épithéliales non modifiées. De plus, la réexpression de CD24 entraîne une diminution de la vitesse de migration à une valeur approximative de 0,55µm/min, proche de la vitesse des cellules épithéliales. Ainsi, la perte d'expression de CD24 semble augmenter la vitesse de déplacement des cellules. Concernant la persistance de direction, nous n'observons pas de différence entre les différentes constructions cellulaires sur les courbes représentant l'autocorrélation de direction (Figure 28.B) et le ratio directionnel (Figure 28.C). Le fait que les courbes de l'autocorrélation descendent au-dessous de zéro lors de son premier pas de temps nous indique que les cellules vont dans un sens et reviennent en arrière. De ces données, nous pouvons déduire que la perte de la protéine CD24 ne semble pas influencer sur la direction de déplacement des cellules.

Nous pouvons déduire de ce test fonctionnel que la perte d'expression seule de CD24 entraîne une augmentation de la surface d'aire explorée par les cellules. Ce phénomène est lié à l'augmentation de la vitesse de déplacement et non de la direction des mouvements effectués par la cellule.

4. Discussion

Face au manque d'informations pouvant expliquer d'un point de vue mécanistique l'implication spécifique de la protéine CD24 dans la résistance thérapeutique, j'ai initié, au cours de la deuxième partie de ma thèse, une étude transcriptomique sur les 3 constructions cellulaires HMLE.E, HMLE.E_CD24⁻ et HMLE.M. Il est important de noter que ce travail est en cours d'analyse.

Une première analyse descriptive de l'étude transcriptomique met en évidence, en plus de la dérégulation attendue de CD24, une modification d'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans la TEM. En effet, des gènes emblématiques des phénotypes E et M (*KRT15*, *CDH1*, *EPCAM*) ainsi que des facteurs de transcription de la TEM (*ESRP1*) se retrouvent dérégulés entre les cellules HMLE.E et HMLE.M. De manière intéressante, le profil d'expression de ces mêmes gènes dans les cellules HMLE.E_CD24⁻ est, la plupart du temps, à l'intermédiaire des deux premières constructions. D'autre part, les plus importantes dérégulations qui font suite à la perte d'expression de CD24 dans les cellules épithéliales peuvent être regroupées en 3 voies principales : le métabolisme cellulaire,

l'organisation de la membrane et des protéines d'adhésion ainsi que la régulation hormonale liée aux facteurs de croissance.

Afin d'intensifier nos recherches menées sur la fonction de CD24, nous avons entamé une deuxième analyse de type exploratoire appelée *data mining*, suivant deux approches différentes : IPA et GSEA. Ces approches, présentées partiellement ici, permettent d'interroger des bases de données en ligne et de révéler, sans *a priori*, plusieurs pistes dignes d'intérêt. Les grandes voies qui semblent être dérégulées par la modulation de CD24 dans les cellules épithéliales sont relatives à la plasticité cellulaire, la migration et l'adhésion cellulaire, le métabolisme énergétique, l'immunité ainsi que le métabolisme lipidique et la ferroptose.

La plasticité cellulaire correspond à la capacité des cellules cancéreuses à adapter leurs phénotypes à des stimuli intrinsèques et extrinsèques de manière réversible afin de favoriser la survie cellulaire et la progression tumorale (Celià-Terrassa and Kang, 2016). Cette plasticité s'exerce sur plusieurs phénomènes interconnectés regroupant les transitions épithélio-mésenchymateuses et mésenchymo-épithéliales (TEM/TME), la plasticité métabolique et la plasticité relative aux CSCs (Jia et al., 2019). Ces dernières années, le modèle classique de la TEM en tant que processus binaire d'interconversion de cellules E pures en cellules M a été remis en question. En effet, des études *in vivo* sur des modèles murins de cancers du sein et du pancréas ont montré que le développement de métastases se produit sans activation obligatoire d'une TEM complète induite par l'activation d'une majorité de ses facteurs de transcription emblématiques (Fischer et al., 2015; Zheng et al., 2015). Ces travaux suggèrent que les cellules de phénotype épithélial peuvent métastaser et se disséminer vers d'autres organes. C'est ainsi, en plus d'un nombre croissant d'autres preuves expérimentales, que la TEM est reconsidérée en tant que processus graduel au cours duquel les cellules E se transforment en cellules M en passant au travers d'un spectre d'états de transition intermédiaires permettant aux cellules d'exprimer à la fois les phénotypes E et M (Jolly, 2015). Dans les cancers du sein, la co-expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux dans une même cellule a été mise en évidence dans quelques lignées cellulaires (Pastushenko et al., 2018) et tumeurs primaires (Pastushenko and Blanpain, 2019). Ces cellules, qui peuvent se trouver dans un état stable intermédiaire ou progresser le long de l'axe E-M, sont appelées cellules hybrides E/M (Bornes et al., 2021). Par définition, les cellules hybrides E/M possèdent à la fois des marqueurs et caractéristiques de cellules E et M ce que nous retrouvons dans les cellules HMLE.E_CD24⁻ au travers de l'étude transcriptomique (Tableau 8 et Annexe 3) et des résultats de l'article présenté dans la partie 1 (Figure 2 de l'article). De plus, le transcriptome de ces mêmes cellules présente un enrichissement de gènes impliqués dans la TEM (Tableau 12) ce qui renforce l'idée d'un changement phénotypique en faveur d'un gain de caractéristiques mésenchymateuses.

L'identification des cellules hybrides se fait au travers de marqueurs protéiques et de facteurs impliqués dans la régulation de la TEM. Cependant, il est difficile d'avoir une idée précise des marqueurs utilisés pour l'étude de ces cellules car elles existent sous plusieurs états en fonction de leur place sur l'axe épithélio-mésenchymateux. Ainsi, on parle de cellules hybrides précoces, dont les marqueurs associés sont plus épithéliaux que mésenchymateux, et les hybrides tardives présentant des marqueurs plus mésenchymateux. La morphologie cellulaire permet également de situer les différentes cellules hybrides sur l'axe E-M (Pastushenko and Blanpain, 2019).

La régulation de l'expression de ces cellules E/M est principalement gouvernée par des facteurs stabilisateurs, des facteurs de transcription, des protéines de jonctions et des modifications post-traductionnelles (Sinha et al., 2020). Les principaux facteurs de transcription qui ont été rapporté comme stabilisateurs de cet état E/M sont le gène *OVOL2* (ovo-like zinc finger), *GRHL2* (grainyhead-like transcription factor 2) et $\Delta Np63$, isoforme codée par le gène *TP63* (Norgard and Stanger, 2021; Sinha et al., 2020). Bien que diminuée dans les cellules HMLE.E_CD24⁻ par rapport aux HMLE.E, l'expression de ces gènes reste supérieure comparée aux cellules HMLE.M, ce qui renforce l'idée de l'apparition d'un phénotype hybride E/M lorsque CD24 est inhibée (Figure 2E de l'article et Tableau 15).

Gene Symbol	HMLE.E Avg (log2)	HMLE.E_CD24 ⁻ Avg (log2)	HMLE.M Avg (log2)	line FDR F-Test	Description
TP63	11,89	9,7	6,99	7,44E-06	Tumor protein p63
OVOL 2	6,98	6,03	5,37	0,0111	Ovo-like zinc finger 2
GRHL2	10,23	9,53	7,07	0,0047	Grainyhead-like transcription factor 2

Tableau 15 - Expression des facteurs régulateurs du maintien des phénotypes E/M dans les cellules HMLE.E, HMLE.M et HMLE.E CD24⁻

Liste obtenue à partir de l'étude transcriptomique.

Certaines des propriétés associées aux cellules hybrides sont assimilées aux cellules E, telles que l'adhésion cellulaire et la prolifération, mais également aux cellules M comme la migration et l'invasion. Ainsi, les cellules E/M peuvent migrer collectivement en cluster, ce qui les protège de l'apoptose et de l'anoïkis une fois dans la circulation sanguine, assurant une colonisation plus efficace qu'avec des cellules M seules plus vulnérables aux contraintes du système sanguin (Jolly, 2015; Saitoh, 2018; Yu et al., 2013). Ces cellules ont donc un fort pouvoir tumorigène, métastatique et initiateur de tumeurs révélant de ce fait une augmentation de leurs caractéristiques souches (Kröger et al., 2019; Pastushenko and Blanpain, 2019). Enfin, les cellules E/M sont fortement résistantes aux traitements notamment de radio- et chimiothérapie (Jolly et al., 2019). De ce fait, l'enrichissement des gènes des voies de signalisation Wnt/ β -caténine et Jak/Stat impliquées dans la régulation des CSCs (Tableaux 12

et 13) (Matsui, 2016), l'augmentation de l'activité aldéhyde déshydrogénase (Figure 2F de l'article) et l'accentuation de la résistance thérapeutique (Figure 3 de l'article) observés dans les cellules HMLE.E_CD24⁻ démontrent un gain des caractéristiques souches, qui est une propriété imputable au phénotype hybride E/M.

Comme énoncé précédemment, il existe de fortes et multiples connexions entre la plasticité liée aux TEM/TME et le principe des CSC. En effet, une étude démontre qu'une forte probabilité d'acquisition de caractéristiques souches chez les cellules hybride E/M est le résultat d'interactions entre ces deux phénomènes (Pasani et al., 2020). Des observations cliniques d'expériences *in vivo* montrent que les cellules « complètement E » et « complètement M » ont un potentiel d'initiation tumoral minime comparé aux cellules E/M. Ces résultats soulignent l'importance de la co-expression de marqueurs épithéliaux et mésenchymateux sur les cellules individuelles dans l'acquisition du caractère souche. L'association entre un enrichissement du ou des phénotypes hybrides E/M dans les populations de type souche est non exclusive ou exhaustive. On ne s'attend pas à ce que toutes les cellules subissant une TEM ou TME, même partielle, soient de type souche ; on ne s'attend pas non plus à ce que toutes les CSC manifestent le(s) phénotype(s) hybride(s) E/M. Des CSCs de phénotype E/M variable ont été observées dans le cancer du sein (Liu et al., 2014) avec différentes localisations spatiales possibles dans une tumeur (Bocci et al., 2019). Ainsi, Liu *et al.* propose que les cellules souches cancéreuses mammaires existent dans des états distincts « epithelial-like » exprimant l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) et localisé au centre de la tumeur, et « mesenchymal-like » caractérisé par le marquage CD44⁺/CD24⁻ et situé sur les bords de la tumeur (Liu et al., 2014). Une autre population de cellules exprimant à la fois le marquage CD44⁺/CD24⁻ et l'ALDH a été également identifiée et nommée CSC hybride E/M (Sulaiman et al., 2018). Un modèle de prédictions explique l'existence d'une « fenêtre de cellules souches » qui est dynamique et qui démontre la présence de phénotypes plus épithéliaux ou plus mésenchymateux au sein d'une population de cellules souches. La plasticité cellulaire, essentielle à la formation des métastases, permet de transiter entre ces différents états (Pasani et al., 2020).

Au regard de ces informations et constatations en faveur de l'apparition d'un phénotype hybride E/M, nous avons décidé de nous focaliser en première intention sur les voies de l'adhésion et la migration cellulaire identifiées par l'étude du transcriptome. Pour cela, nous nous sommes intéressés à l'expression des jonctions intracellulaires essentielles à la communication entre les cellules épithéliales et comprenant les jonctions adhérentes, les jonctions serrées, les desmosomes et les jonctions communicantes (Figure 23). Les jonctions d'adhérence sont reliées aux faisceaux d'actine corticale, tandis que les desmosomes sont liés aux filaments intermédiaires de cytokératine (Yang et al., 2020). La perte d'expression des protéines de jonctions intracellulaires est une transformation subie par les

cellules épithéliales au cours de la TEM (Liao and Yang, 2020). De ce fait, et en plus de leur rôle essentiel dans la régulation du type, de l'efficacité et du destin des mouvements cellulaires collectifs, l'étude de la régulation de ces jonctions est importante dans notre modèle (Friedl and Mayor, 2017; Wu et al., 2021). Le transcriptome des cellules HMLE.E_CD24⁻ présente une diminution de l'expression d'un nombre important de gènes impliqués dans les jonctions intracellulaires (Tableau 14). En attendant d'avoir une meilleure vision de l'ensemble des dérégulations génétiques de l'expression des différents acteurs intervenant dans l'adhésion et la migration cellulaire, les premières confirmations par PCR ont été réalisées. Ainsi, certaines protéines impliquées dans les jonctions communicantes (GJB5) ou dans les desmosomes (Desmocolline 2 et Desmoplakine), qui sont réexprimées dans les cellules épithéliales complémentées pour CD24, pourraient jouer un rôle clef dans l'acquisition de propriétés migratoires liée à un début des pertes de capacités d'adhésion.

Suite à ces premiers résultats prometteurs, nous avons quantifié la migration cellulaire *in vitro* des cellules HMLE.E, HMLE.E_CD24⁻, HMLE.E_CD24^{-c} et HMLE.M. Nos résultats montrent clairement que les cellules épithéliales n'exprimant plus CD24 présentent une augmentation des capacités migratoires cellulaire en lien avec une accélération de la vitesse de déplacement des cellules en comparaison aux HMLE.E. De plus, cette augmentation globale de la motilité liée à la perte d'expression de CD24 disparaît quand cette dernière est réexprimée dans les cellules.

L'ensemble des résultats sur la motilité cellulaire suggère que la perte d'expression de CD24 dans les cellules épithéliales entraîne une augmentation de leurs capacités migratoires, très probablement en lien avec une perte des jonctions intracellulaires. Cette nouvelle propriété étant associée au phénotype E/M, ces résultats présentent une preuve supplémentaire du changement phénotypique induit par l'inhibition de CD24.

L'ensemble de ces données renforce l'idée que la perte de CD24 conduit les cellules HMLE.E dans un stade hybride E/M. Ce stade hybride est associé à l'acquisition de propriétés souches qui, en plus de se traduire par une radio- et une chimiorésistance accrue, notamment liée à une augmentation de l'activité ALDH (Kamble et al., 2021; Tanei et al., 2009), pourrait également se traduire par une augmentation des capacités à métastaser. Il est important de noter que Kröger et *al.* (Kröger et al., 2019), ainsi que d'autres auteurs, ont mis en évidence que l'acquisition d'un statut hybride E/M était essentiel à l'induction des tumeurs dans les cellules de cancer du sein. Ce statut hybride, associé à un mauvais pronostic pour les patientes atteintes d'un cancer du sein (Grosse-Wilde et al., 2015), favorise également fortement la formation de métastases (Jolly et al., 2019).

Parallèlement et comme énoncé précédemment, l'étude transcriptomique que nous avons entreprise a révélé d'autres fonctions moléculaires et cellulaires modulées par l'expression de CD24 dans les cellules épithéliales. En effet, la modulation de CD24 semble affecter le métabolisme énergétique, la réponse immunitaire ainsi que le métabolisme lipidique et la ferroptose. Bien que l'analyse de ces voies n'ait pu être approfondie pour l'heure, ces résultats semblent prometteurs et en adéquation avec la littérature et nos découvertes.

En ce qui concerne le métabolisme énergétique, nous avons vu que les cellules cancéreuses présentent une altération de leur métabolisme en faveur d'une augmentation de la glycolyse au détriment de la phosphorylation oxydative (OXPHOS) en condition aérobie comparé aux cellules saines (Warburg et al., 1930). Ces dernières années, de nombreuses études montrent que la plasticité cellulaire à l'origine de l'hétérogénéité intratumorale génère des cellules métaboliquement différentes, ce qui est susceptible de contribuer à l'échappement thérapeutique (Daniel et al., 2021). En effet, l'induction de la TEM est accompagnée d'une augmentation de la glycolyse aérobie dans les cancers du sein (Kondaveeti et al., 2015). De plus, une diminution de la phosphorylation oxydative est observée dans les métastases comparées au cancer primaire chez les patients (Gaude and Frezza, 2016). Or, dans les cellules HMLE.E, l'étude transcriptomique a mis en évidence une accentuation de l'expression des gènes de la glycolyse et, d'autant plus, des gènes de l'OXPHOS (Figure 12). L'OXPHOS générant une plus grande quantité d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) que la glycolyse, ces observations concernant la modification du métabolisme énergétique pourraient nous permettre de mieux appréhender les mécanismes impliqués dans la régulation du ROS intracellulaire par CD24.

Comme indiqué dans l'introduction bibliographique de ce manuscrit, la protéine CD24 a été identifiée en tant que récepteur d'un certain nombre de molécules impliquées dans la réponse immunitaire. En effet, des études montrent que le ligand Siglec-10 se trouvant à la surface des cellules immunitaires interagit avec CD24 à la surface des cellules tumorales ce qui inhibe leur phagocytose (Yin and Gao, 2020). L'étude transcriptomique réalisée durant cette thèse a permis de mettre en évidence un groupe de gènes dérégulés en fonction du statut CD24 en lien à la réponse immunitaire, inflammatoire ou non. Parmi les gènes les plus différentiels on retrouve notamment *MAL2* et *IL6*. Le gène *MAL2* (Mal, T Cell Differentiation Protein 2), absent chez les HMLE.M et réprimé chez les HMLE.E_CD24⁻ par rapport aux HMLE.E, fait l'objet de recherches dans les cancers du sein depuis peu. Par exemple, une étude récente lie l'expression de *MAL2* à une inhibition de la présentation d'antigènes tumoraux dans les cellules de cancer du sein (Fang et al., 2021). La protéine IL-6 est une interleukine associée à de multiples phénomènes immunitaires, notamment inflammatoires, et présente une surexpression forte

dans les cellules HMLE.E_CD24⁻ par rapport aux cellules HMLE.E. Dans plusieurs cancers, elle a été associée à une augmentation de la résistance aux radiations (Yuan et al., 2021) et aux drogues (Wang et al., 2018). Enfin, l'analyse de *data mining* du transcriptome a mis en exergue l'augmentation des *hallmarks* tels que « *Complement* » et « *Allograft rejection* » dans les cellules épithéliales sans CD24. Les gènes retrouvés dans notre étude qui composent ces *hallmarks* correspondent surtout à des gènes de l'inflammation et des cytokines, ou à leurs régulateurs. Bien qu'ils n'apparaissent pas systématiquement dans les listes de gènes les plus différentiels ni avec les différences les plus significatives, leur enrichissement permet de mettre en évidence cette voie comme régulée par la modification d'expression de CD24.

Enfin, l'étude transcriptomique a révélé une implication probable de CD24 dans la régulation positive du métabolisme lipidique des cellules HMLE. En effet, parmi les gènes les plus différentiels, on retrouve : *FABP4*, un transporteur intracellulaire d'acides gras (Zeng et al., 2020), *AKR1B15* (Aldo-Keto Reductase Family 1 Member B15) et *AKR1B10* (Aldo-Keto Reductase Family 1 Member B10) qui sont des enzymes réduisant les aldéhydes produits par la peroxydation des acides gras (Fujii et al., 2021) et *TFCP2L1*, un facteur de transcription régulant l'oxydation des acides gras (Yan et al., 2021). Ainsi, Les approches de *data mining* mettent toutes en évidence un enrichissement des voies de la synthèse et du transport des acides gras, des fonctions péroxysomales et de la beta-oxydation des acides gras dans les cellules épithéliales qui expriment CD24.

Le péroxysome est le lieu de synthèse des phospholipides contenant des acides gras polyinsaturés, substrats de la peroxydation lipidique (Chen et al., 2021). Cette peroxydation des lipides est une voie de régulation du taux de ROS intracellulaires (Tang et al., 2021), qui mène à la ferroptose, aussi identifiée dans nos analyses à plusieurs reprises. Ainsi, l'enrichissement de cet organite dans les cellules HMLE.E pourrait également expliquer les modifications du niveau de ROS intracellulaire en lien avec l'augmentation de la mort induite par les traitements comparés aux cellules HMLE.E_CD24⁻ (Bensimon et al., 2016a, article partie 1). D'autre part, une analyse lipidique globale des cellules HMLE.E et HMLE.M a révélé d'importantes modifications dans la proportion des espèces lipidiques dans ce modèle (Eiriksson et al., 2018). L'induction d'une TEM entraîne donc une modification des composants lipidiques cellulaires. De plus, des études ont décrit la présence de CD24 comme marqueur des progéniteurs d'adipocytes (Berry and Rodeheffer, 2013) et l'absence de CD24 du tissu adipeux comme étant à l'origine de dysfonctionnements métaboliques dans l'homéostasie du glucose et le niveau d'acide gras libres *in vivo* (Fairbridge et al., 2015). On peut donc imaginer que ce lien potentiel entre CD24 et les acides gras puisse être transposable à d'autres types cellulaires ou dans d'autres contextes physiopathologiques.

Ainsi, la petite protéine CD24, bien que dépourvue de domaine transmembranaire, semble jouer un rôle pléiotrope dans la régulation des fonctions et phénotypes des cellules épithéliales cancéreuses mammaires.

Conclusions et perspectives

Dans les cancers, l'hétérogénéité intratumorale se caractérise par une diversité morphologique et moléculaire des cellules au sein d'une même tumeur, ce qui est à l'origine d'une réponse différentielle aux traitements notamment par chimio- et radiothérapie. Dans les carcinomes mammaires, la résistance aux traitements anticancéreux a été associée à la fois aux cellules souches cancéreuses ainsi qu'aux cellules de phénotype mésenchymateux qui sont fréquemment identifiées par le même phénotype membranaire CD24⁻/CD44⁺. L'objectif de notre étude est d'évaluer le rôle de CD24 dans la résistance à la chimio- et radiothérapie tout en examinant son implication dans la plasticité cellulaire.

En cherchant à évaluer *in vitro* l'influence de CD24 dans la réponse aux traitements principalement sur notre modèle tumoral mammaire HMLE, nous avons mis en évidence que la baisse d'expression de cette protéine induit l'augmentation de la résistance à la chimio- et radiothérapie. Grâce à ce travail, nous montrons que l'un des mécanismes utilisés par la cellule CD24⁻ pour se défendre contre la mort induite par les traitements passe par la gestion du niveau de ROS dans la cellule. Ce phénomène semble être lié, au moins en partie, à une baisse de l'activité mitochondriale en lien avec une diminution de la masse mitochondriale pour les cellules HMLE.E_CD24⁻ (Figure 29) et HMLE.M, ainsi qu'à une augmentation de l'expression des protéines antioxydantes uniquement dans les cellules M. Ces découvertes démontrent l'implication de cette protéine CD24 dans la gestion du stress oxydatif via une diminution des fonctions mitochondriales. Ces observations pouvant être expliquées par une modification des sources générant l'énergie dans les cellules, il serait intéressant pour la suite de l'étude de mesurer le métabolisme énergétique de nos cellules notamment grâce à l'analyseur de flux extracellulaire (XF) de Seahorse. La technologie Agilent Seahorse permet d'évaluer le taux de consommation d'oxygène (OCR), indicateur de la respiration mitochondriale et le taux d'acidification extracellulaire (ECAR) reflétant en grande partie la glycolyse. L'enrichissement du métabolisme lipidique dans les cellules HMLE.E rapporté par l'étude transcriptomique devrait également être investigué plus en détails afin de vérifier son éventuelle implication dans la sensibilité thérapeutique reliée, ou non, à la gestion des ROS. Toujours dans le but de décortiquer l'influence de la perte de CD24 sur les fonctions mitochondriales cellulaires, l'analyse des régulateurs de la biogenèse mitochondriale, ainsi que du processus de mitophagie responsable de la dégradation des mitochondries pourrait nous aider à approfondir le rôle de CD24 sur le contrôle de la masse mitochondriale.

L'implication de CD24 dans le métabolisme cellulaire en lien avec les ROS est un élément pouvant expliquer la résistance à la radiothérapie et chimiothérapie observée lors de la perte de cette protéine.

Il est important de noter que cette explication n'est pas la seule envisageable et envisagée, d'autres mécanismes, associés ou non à la gestion des ROS, peuvent entraîner la résistance thérapeutique présente dans les cellules HMLE.E_CD24⁻.

Les premières données obtenues par l'analyse transcriptomique pourront être complétées par un panel de traitements appliqués aux mêmes types cellulaires.

Tout au long de ce projet, un nombre croissant d'indices nous ont amené à penser que la perte d'expression de la protéine CD24 dans les cellules épithéliales pouvait avoir des conséquences sur la plasticité cellulaire. Dans un premier temps, nous avons remarqué une diminution de certains marqueurs épithéliaux au profit d'un gain de marqueurs mésenchymateux, sous fond d'activation du facteur de transcription emblématique de la TEM *Snail1* dans les cellules HMLE.E_CD24⁻. Il a été montré que l'expression spécifique de ce facteur de transcription conduit à l'apparition d'un phénotype hybride E/M (Kröger et al., 2019) qui est caractérisé par la co-expression de marqueurs E et M au sein d'une même cellule, reflet d'une TEM partielle. Afin de confirmer ces premières observations, nous allons étudier l'expression d'autres marqueurs spécifiques des phénotypes E et M. De plus, les fonctionnalités que nous avons retrouvé associées à la modulation de l'expression de CD24 dans les cellules épithéliales coïncident avec les propriétés des cellules hybrides E/M (Figure 29). En effet, nous avons démontré une hausse des capacités migratoires dans les cellules HMLE.E_CD24⁻ vraisemblablement en lien avec diminution des jonctions intracellulaires. Or, la TEM partielle joue un rôle essentiel dans la promotion de la migration cellulaire et l'invasion notamment. Il serait donc intéressant d'étudier l'invasion cellulaire dans notre modèle. Ce travail a également mis en exergue un enrichissement des caractéristiques souches des cellules HMLE.E_CD24⁻ via l'augmentation de l'activité aldéhyde déshydrogénase et de la résistance thérapeutique. En outre, l'étude transcriptomique de ces cellules suggère l'activation de certaines voies de signalisation régulatrices des CSCs. Or, l'acquisition du caractère souche a été démontré comme augmentée au début de la TEM puis pour s'atténuer fortement dans les cellules « complètement M » (Pasani et al., 2020). Les propriétés souches des cellules étant aussi définies par leurs capacités spécifiques à initier et propager une tumeur, il serait intéressant d'étudier *in vivo* leur potentiel à former des cancers dans un modèle murin. Pour l'heure, au laboratoire, ainsi que dans d'autres équipes, il n'a pas été possible d'induire des tumeurs après injection en sous-cutanée de cellules HMLE.E ou HMLE.M, chez les souris immunodéficientes (souris nude au laboratoire). Il serait donc pertinent de concevoir une expérience sur des souris plus immuno-déficientes de type NOD/SCID par exemple, afin de comparer la tumorigénicité des cellules HMLE.E, HMLE.M, et HMLE.E_CD24⁻ et HMLE.E_CD24⁻c, qui n'ont jamais

été testé dans ce cadre. Parallèlement, il faudrait comparer l'aptitude des différentes cellules à former des mammosphères.

Cependant, des zones d'ombres restent encore à éclaircir afin de comprendre le rôle de CD24 dans la résistance thérapeutique et la progression tumorale. Comme décrit dans l'introduction bibliographique, plusieurs voies de signalisation ont été associées à CD24 mais aucune mécanistique n'a été clairement définie. Une hypothèse qui nous semble envisageable et sérieuse repose sur la localisation de CD24 au sein d'une structure particulière de la membrane plasmique appelée radeau lipidique. En effet, il a été montré que l'interaction protéine-protéine spécifiquement présente dans ces radeaux lipidiques entraîne l'activation d'une cascade de signalisation (Simons and Toomre, 2000).

Globalement, ces résultats suggèrent que la perte d'expression de la protéine CD24 entraîne l'apparition d'un phénotype hybride E/M. Des indices nous font penser que ces cellules se trouvent au début de l'axe E-M notamment au regard du maintien de leur forme cuboïde et de l'expression de la E-cadhérine. L'émergence de phénotypes hybrides et la capacité des cellules cancéreuses à passer d'un phénotype à l'autre doivent être prises en compte dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, en ciblant notamment la plasticité des cellules cancéreuses. L'élimination des phénotypes hybrides notoirement agressifs pourrait constituer une étape cruciale de la lutte contre le cancer (Jia et al., 2019).

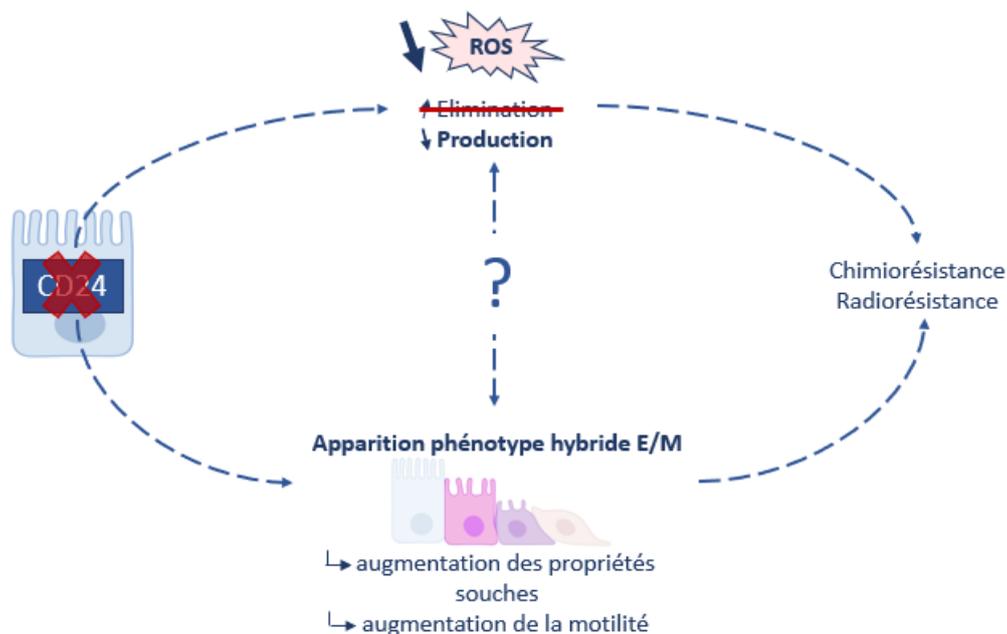
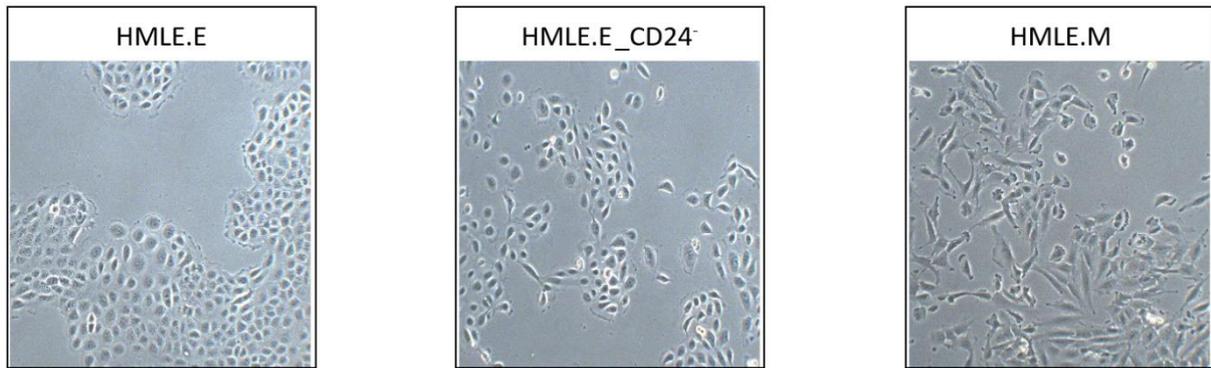


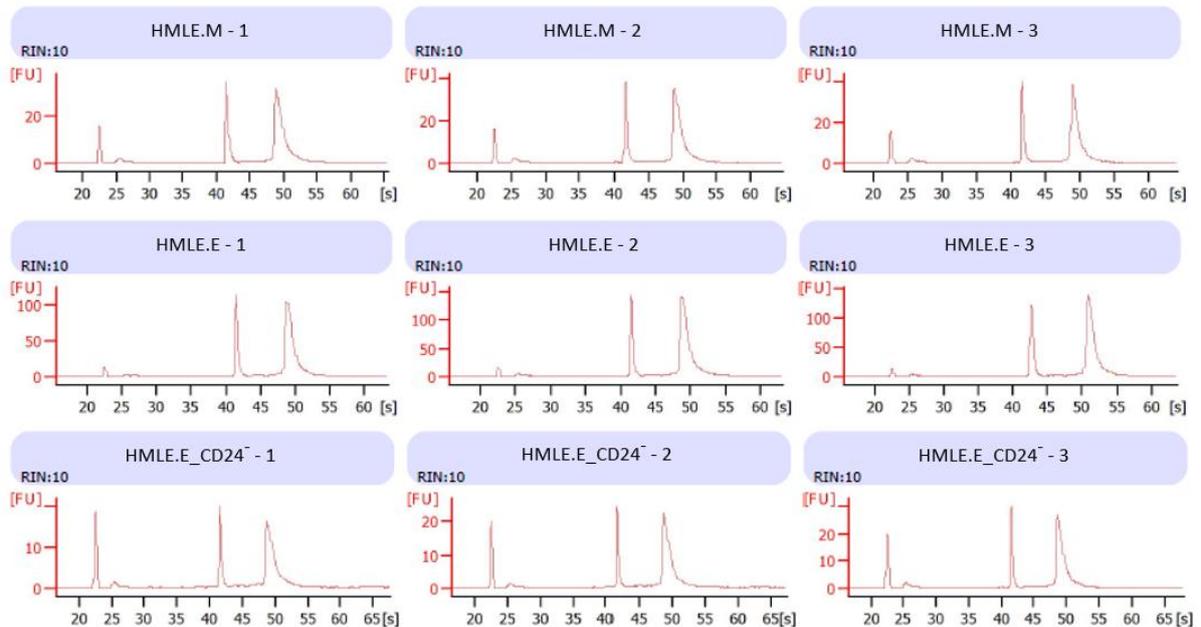
Figure 29 - Schéma bilan des principaux résultats obtenus au cours de ma thèse

Annexes

Annexe 1 - Photos de la densité des cellules HMLE.E, HMLE.E_CD24⁻ et HMLE.M au moment de la récolte des culots cellulaires



Annexe 2 - Vérification de la qualité des ARNm obtenus après extraction par la quantification des RIN



Annexe 3 - Tableau complet des 230 gènes dérégulés entre au moins deux des trois types cellulaires HMLE.E, HMLE.E CD24⁻ et HMLE.M

Gene Symbol	HMLE.E Avg (log2)	HMLE.E_CD24 ⁻ Avg (log2)	HMLE.M Avg (log2)	Line FDR F-Test	Description
MAL2	16,05	14,31	5,04	1,63E-07	mal, T-cell differentiation protein 2 (gene/pseudogene)
ESRP1	14,37	11,4	4,65	1,63E-07	epithelial splicing regulatory protein 1
CD24	14,36	10,28	8,08	4,27E-07	CD24 molecule
CDH1	11,43	10,81	4,22	4,27E-07	cadherin 1, type 1
FABP4	10,37	4,35	4,39	4,27E-07	fatty acid binding protein 4, adipocyte
LAMA3	11,64	15,7	7,98	5,90E-07	laminin, alpha 3
EPCAM	15,33	13,98	5,36	7,93E-07	epithelial cell adhesion molecule
AKR1B15	9,93	4,89	5,13	9,41E-07	aldo-keto reductase family 1, member B15
DSG3	11,63	8,59	5,28	1,24E-06	desmoglein 3
KRT15; MIR6510	14,36	6,75	4,83	1,30E-06	keratin 15, type I; microRNA 6510
DMKN	13,51	14,23	7,77	1,94E-06	dermokine
ANKRD1	5,02	10,54	11,21	1,94E-06	ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)
PPP1R14C	10,58	7,9	4,7	1,94E-06	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14C
PRRG4	10,56	8,92	4,53	2,64E-06	proline rich Gla (G-carboxyglutamic acid) 4 (transmembrane)
FAT2	10,07	6,84	5,5	2,64E-06	FAT atypical cadherin 2
HES1	12,74	10,38	6,09	3,52E-06	hes family bHLH transcription factor 1
KRT17	15,69	12,33	7,86	3,52E-06	keratin 17, type I
CLDN7	13,37	8,09	8,83	4,00E-06	claudin 7
AREG	10,49	14,14	9,79	4,00E-06	amphiregulin
KLK6	11,94	5,96	5,31	4,05E-06	kallikrein related peptidase 6
GJB2	11,04	7,16	5,53	4,50E-06	gap junction protein beta 2
SCEL	9,4	5,55	4,73	4,78E-06	sciellin
KRT6A	13,63	13,23	7,9	6,01E-06	keratin 6A, type II
TP63	11,89	9,7	6,99	7,44E-06	tumor protein p63
TRIM29	12,52	8,68	5,57	7,44E-06	tripartite motif containing 29
CA2	12,4	8,68	5,87	7,44E-06	carbonic anhydrase II
LAMC2	11,11	13,46	7,68	9,30E-06	laminin, gamma 2
LY6D	10,72	6,21	6,34	1,06E-05	lymphocyte antigen 6 complex, locus D
SERPINE1	10,4	13,93	14,67	1,06E-05	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1
GPR87	11	9,84	5,72	1,14E-05	G protein-coupled receptor 87
CLDN4	14,57	7,99	6,24	1,24E-05	claudin 4
SULT1E1	10,13	5,09	5,44	1,26E-05	sulfotransferase family 1E member 1
TFCP2L1	8,81	6,23	5,43	1,26E-05	transcription factor CP2-like 1
DSC3	11,24	9,34	7,44	1,40E-05	desmocollin 3
INHBA	6,78	10,81	7,95	1,40E-05	inhibin beta A
KRT13	14,19	8,28	5,37	1,44E-05	keratin 13, type I
TACSTD2	14,6	12,16	8,65	1,46E-05	tumor-associated calcium signal transducer 2
ITGB6	6,82	9,44	4,25	1,48E-05	integrin beta 6
FN1	9,03	14,84	14,27	1,61E-05	fibronectin 1
UCHL1	5,07	13,18	4,96	1,78E-05	ubiquitin C-terminal hydrolase L1
PTX3	4,03	6,8	9,46	1,78E-05	pentraxin 3, long
TNFAIP3	8,58	12,32	6,69	2,20E-05	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3

GPRC5A; MIR614	11,79	12,32	8,08	2,70E-05	G protein-coupled receptor, class C, group 5, member A; microRNA 614
S100A14	12,31	10,28	6,91	3,05E-05	S100 calcium binding protein A14
ST14	11,1	8,42	4,65	3,13E-05	suppression of tumorigenicity 14 (colon carcinoma)
IGFBP2	9,56	6,45	6,13	3,13E-05	insulin like growth factor binding protein 2
AKR1B10	9,44	5,47	5,12	3,19E-05	aldo-keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase)
KLK5	14,23	8,08	5,31	3,42E-05	kallikrein related peptidase 5
IL6	5,63	10,61	5,05	3,43E-05	interleukin 6
FAM83B	9,26	7,9	4,01	4,04E-05	family with sequence similarity 83, member B
KRT19	13,62	8,78	5,98	4,32E-05	keratin 19, type I
KLK7	13,19	7,47	6,55	4,38E-05	kallikrein related peptidase 7
LAMB3; MIR4260	9,56	12,01	7,23	4,38E-05	laminin, beta 3; microRNA 4260
GLUL	14,57	10,45	11,64	4,41E-05	glutamate-ammonia ligase
DSP	12	10,29	6,89	4,41E-05	desmoplakin
CKMT1A	13,49	8,15	6,06	4,97E-05	creatine kinase, mitochondrial 1A
SLC7A8	9,63	5,41	5,1	6,32E-05	solute carrier family 7 (amino acid transporter light chain, L system), member 8
NEDD4L	10,77	12,1	8,58	7,03E-05	neural precursor cell expressed, developmentally down- regulated 4-like, E3 ubiquitin protein ligase
DUSP4	6,68	10,63	6,29	7,20E-05	dual specificity phosphatase 4
PVRL1	11,9	7,91	5,93	7,20E-05	poliovirus receptor-related 1 (herpesvirus entry mediator C)
MYB	7,77	5,57	4,53	7,20E-05	v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog
NRG1	8,71	12,53	11,06	7,20E-05	neuregulin 1
EPPK1	10,69	8,32	6,18	7,20E-05	epiplakin 1
ALPPL2	12,97	11,14	8,54	7,26E-05	alkaline phosphatase, placental like 2
KRT6C	12,59	12,3	8,16	7,29E-05	keratin 6C, type II
MYO5B	8,39	11,11	6,69	7,29E-05	myosin VB
SCNN1G	8,04	4,42	4,23	7,29E-05	sodium channel, non voltage gated 1 gamma subunit
ABLIM1	12,12	10,87	6,28	7,29E-05	actin binding LIM protein 1
IL1A	7,41	9,98	4,82	7,44E-05	interleukin 1 alpha
MARVELD2	9,65	8,94	5,89	7,44E-05	MARVEL domain containing 2
COL17A1; MIR936	12,16	11,97	5,37	7,53E-05	collagen, type XVII, alpha 1; microRNA 936
NEGR1	6,62	9,37	10,43	7,53E-05	neuronal growth regulator 1
TIMP3	12,11	9,67	7,13	7,75E-05	TIMP metalloproteinase inhibitor 3
VIM	6,03	13,13	14,54	9,23E-05	vimentin
SERPINB13	9,75	6,29	5,36	9,95E-05	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 13
GALNT3	11,2	11,45	6,93	9,95E-05	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3
SERPINB5	14,19	12,64	9,81	9,95E-05	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 5
TBX3	7,57	11,03	10,89	9,95E-05	T-box 3
EPB41L4B	10,94	8,84	7,16	0,0001	erythrocyte membrane protein band 4.1 like 4B
OCLN	11,41	8,48	6,35	0,0001	occludin
PALLD	8,09	10,31	10,97	0,0001	palladin, cytoskeletal associated protein
KCNMA1	4,98	5,76	7,87	0,0001	potassium channel, calcium activated large conductance subfamily M alpha, member 1
SPINT2	10,38	8,8	5,14	0,0001	serine peptidase inhibitor, Kunitz type, 2
ITGA6	11,24	12,49	9,37	0,0001	integrin alpha 6
TFAP2C	9,1	7,14	4,43	0,0001	transcription factor AP-2 gamma (activating enhancer binding protein 2 gamma)
GULP1	5,7	7,76	9,09	0,0001	GULP, engulfment adaptor PTB domain containing 1
CASP4	10,99	13,59	10,47	0,0001	caspase 4

PDCD4; MIR4680	12,38	7,88	10,08	0,0001	programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor); microRNA 4680
CSTA	11,06	10,97	6,51	0,0001	cystatin A (stefin A)
IL20RB	12,28	8,86	9,06	0,0001	interleukin 20 receptor beta
HIST2H4A; HIST2H4B	10,92	13,34	13,26	0,0001	histone cluster 2, H4a; histone cluster 2, H4b
CDH2	6,19	9,21	9	0,0001	cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)
ABCA12	8,56	5,64	4,87	0,0001	ATP binding cassette subfamily A member 12
TMEM133	3,94	6,37	3,85	0,0001	transmembrane protein 133
CTSC	14,21	15,93	12,43	0,0002	cathepsin C
FAM84B	10,61	8,56	6,59	0,0002	family with sequence similarity 84, member B
TPD52L1	12,98	10,59	7,61	0,0002	tumor protein D52-like 1
PERP	15,67	13,99	10,49	0,0002	PERP, TP53 apoptosis effector
ATF3	9,61	8,84	6,32	0,0002	activating transcription factor 3
SH3KBP1	9,8	12,37	11,72	0,0002	SH3-domain kinase binding protein 1
PDHB	10,82	8,38	9,81	0,0002	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta
DSC2	11,23	8,85	6,4	0,0002	desmocollin 2
HIST2H4B; HIST2H4A	10,79	13,18	13,18	0,0002	histone cluster 2, H4b; histone cluster 2, H4a
NOG	5,52	7,05	8,35	0,0002	noggin
NT5DC3	7,46	8,65	10,32	0,0002	5-nucleotidase domain containing 3
CAMK2D	6,31	7,98	8,64	0,0002	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta
PARVA	9,53	11,87	11,99	0,0002	parvin, alpha
FABP5	14,4	12,63	11,97	0,0002	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)
KRT10	7,21	4,88	4,23	0,0002	keratin 10, type I
KLF5	12,42	10,57	7,95	0,0002	Kruppel-like factor 5 (intestinal)
HCAR1	9,82	6,48	6,87	0,0002	hydroxycarboxylic acid receptor 1
FAM213A	10,61	5,51	6,51	0,0002	family with sequence similarity 213, member A
JUP	10,7	8,88	6,22	0,0002	junction plakoglobin
PMEPA1	7,02	10,95	6,92	0,0002	prostate transmembrane protein, androgen induced 1
IL1B	10,47	10,48	5,29	0,0002	interleukin 1 beta
MYL9	6,21	10,69	10,85	0,0002	myosin light chain 9
PHLDA1	8,91	11,87	9,12	0,0002	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1
KRT5	15,84	11,05	7,44	0,0002	keratin 5, type II
ADGRL2	7,76	4,46	5	0,0002	adhesion G protein-coupled receptor L2
FERMT1	11,86	11	7,82	0,0002	fermitin family member 1
NCOA7	12,32	8,76	7,92	0,0002	nuclear receptor coactivator 7
SYT12	7,46	5,2	5,35	0,0002	synaptotagmin XII
CCDC152	7,38	9,88	9,68	0,0002	coiled-coil domain containing 152
HRSF12	10,94	8,38	9,5	0,0002	heat-responsive protein 12
SFRP1	4,54	7,68	4,43	0,0002	secreted frizzled-related protein 1
ANXA3	9,98	11,53	6,75	0,0002	annexin A3
FAM135A	8,85	6,71	6,17	0,0002	family with sequence similarity 135, member A
EPHB6	6,12	7,95	9,72	0,0002	EPH receptor B6
HOOK1	9,73	7,99	6,95	0,0002	hook microtubule-tethering protein 1
RAB25	11,07	8,66	5,13	0,0002	RAB25, member RAS oncogene family
SERPINB7	8,51	9,37	6,12	0,0003	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 7
FRK	8,11	6,39	5,08	0,0003	fyn-related Src family tyrosine kinase
AKAP2	8,79	11,77	9,31	0,0003	A kinase (PRKA) anchor protein 2
F11R	12,42	10,49	8,11	0,0003	F11 receptor
AP1M2	10,71	8,11	5,51	0,0003	adaptor-related protein complex 1, mu 2 subunit
CDH3	12,54	10,25	7,54	0,0003	cadherin 3, type 1, P-cadherin (placental)
CD9	16,37	13,34	12,92	0,0003	CD9 molecule
LSR	9,65	8,52	5,28	0,0003	lipolysis stimulated lipoprotein receptor
GCNT1	6,09	7,46	8,55	0,0003	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 1, core 2

PCDH7	4,45	7,58	5,02	0,0003	protocadherin 7
PLEKHF2	11	8,06	8,75	0,0003	pleckstrin homology domain containing, family F (with FYVE domain) member 2
PDCD1LG2	5,66	7,73	6,24	0,0003	programmed cell death 1 ligand 2
KLK10	11,32	5,13	4,85	0,0003	kallikrein related peptidase 10
CRABP2	9,12	6,05	6,64	0,0003	cellular retinoic acid binding protein 2
ASXL1	10,66	12,66	12,85	0,0003	additional sex combs like transcriptional regulator 1
CCND1	9,26	13,61	8,01	0,0003	cyclin D1
NREP	6,33	7,37	10,51	0,0003	neuronal regeneration related protein
CCDC90B	10,62	13,45	12,38	0,0003	coiled-coil domain containing 90B
PTMS	9,59	11,83	12,89	0,0003	parathyrosin
ADAMTS1	4,38	7,28	7,99	0,0003	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 1
BHLHE40	11,45	8,94	6,74	0,0004	basic helix-loop-helix family, member e40
EGR3	7,73	4,9	4,34	0,0004	early growth response 3
ADD2	5,31	7,71	5,22	0,0004	adducin 2 (beta)
TPD52	13,37	12,1	9,61	0,0004	tumor protein D52
PKIA	5,22	5,03	8,03	0,0004	protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor alpha
HIGD1A	13,5	10,77	12,4	0,0004	HIG1 hypoxia inducible domain family, member 1A
CKMT1B; CKMT1A	13,96	7,55	5,63	0,0004	creatine kinase, mitochondrial 1B; creatine kinase, mitochondrial 1A
ITGB1	12,77	15,24	14,57	0,0004	integrin beta 1
ANKRD46	9,58	6,98	7,99	0,0004	ankyrin repeat domain 46
GABARAPL1	11,26	9,7	8,01	0,0004	GABA(A) receptor-associated protein like 1
RNF128	8,93	4,68	4,77	0,0004	ring finger protein 128, E3 ubiquitin protein ligase
MICAL2	7,13	9,94	9,83	0,0004	microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 2
ARAP2	7,57	6,75	4,72	0,0004	ArfGAP with RhoGAP domain, ankyrin repeat and PH domain 2
FLNA	7,2	10,82	9,28	0,0004	Jeck2013 ANTISENSE, CDS, coding, INTERNAL, OVCODE, OVEXON best transcript NM_001110556
CSF1	7,76	10,9	11,86	0,0005	colony stimulating factor 1 (macrophage)
AIG1	12,74	9,61	11,16	0,0005	androgen-induced 1
COL8A1	5,69	7,16	7,81	0,0005	collagen, type VIII, alpha 1
S100A2	12,52	13,9	10,12	0,0005	S100 calcium binding protein A2
FAM107B	5,08	7,01	4,53	0,0005	family with sequence similarity 107, member B
RAPGEF5	7,67	5,63	4,32	0,0005	Rap guanine nucleotide exchange factor 5
ENPP1	4,41	4,97	8,45	0,0005	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1
AKAP12	8,78	12,04	10,12	0,0005	A kinase (PRKA) anchor protein 12
ZNF280B	4,97	7,05	5,38	0,0005	zinc finger protein 280B
MAP7	8,61	8,41	6,3	0,0005	microtubule-associated protein 7
OTUD1	10,18	7,56	7,1	0,0005	OTU deubiquitinase 1
GLIPR1	8,24	12,06	11,28	0,0005	GLI pathogenesis-related 1
ZNF385B	5,2	5,43	8,48	0,0005	zinc finger protein 385B
ITGB8	10,6	7,95	7,53	0,0005	integrin beta 8
FLRT3	8,46	6,98	6,01	0,0005	fibronectin leucine rich transmembrane protein 3
ETS1	9,04	11,17	10,63	0,0005	v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1
FAM50A	8,94	12,18	11,36	0,0005	family with sequence similarity 50, member A
IDH1	12,02	10,15	10,41	0,0005	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+)
CDKN2C	7,56	8,43	10,54	0,0005	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)
CACNG4	7,12	4,74	4,61	0,0005	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 4
EMP1	14,37	11,61	11,47	0,0005	epithelial membrane protein 1
ERBB3	7,91	6,49	5,6	0,0005	erb-b2 receptor tyrosine kinase 3
COL12A1	6,74	9,48	9,29	0,0006	collagen, type XII, alpha 1

MACC1	7,58	6,07	4,26	0,0006	metastasis associated in colon cancer 1
MIR205HG; MIR205	12,19	12,9	7,99	0,0006	MIR205 host gene; microRNA 205
EFEMP1	8,94	10,98	10,7	0,0006	EGF containing fibulin-like extracellular matrix protein 1
POLE4	11,44	13,8	12,4	0,0006	polymerase (DNA-directed), epsilon 4, accessory subunit
FOS	10,86	6,03	6,67	0,0006	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
SPIDR	9,81	6,84	8,02	0,0006	scaffolding protein involved in DNA repair
PTPN13	9,68	7,76	6,57	0,0006	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13 (APO-1/CD95 (Fas)-associated phosphatase)
FABP5	13,56	12,31	11,38	0,0006	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)
AQP3	10,03	6,87	6,96	0,0007	aquaporin 3 (Gill blood group)
LYNX1	10	7,1	7,82	0,0007	Ly6/neurotoxin 1
NT5E	12,07	14,3	13,38	0,0007	5-nucleotidase, ecto (CD73)
ORAOV1	8,67	12,82	9,16	0,0007	oral cancer overexpressed 1
BIRC3	8,6	10,94	9,09	0,0007	baculoviral IAP repeat containing 3
CADPS2	4,33	4,6	6,61	0,0007	Ca ⁺⁺ -dependent secretion activator 2
FOSB	10,28	8,19	7,97	0,0007	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B
ETV5	4,84	7,72	7,06	0,0007	ets variant 5
RAB7B	9,22	5,63	6,24	0,0008	RAB7B, member RAS oncogene family
VGLL1	10,36	9,75	4,82	0,0008	vestigial-like family member 1
KRT14	11,37	8,07	5,81	0,0008	keratin 14, type I
ELF3	9,17	6,2	5,01	0,0008	E74-like factor 3 (ets domain transcription factor, epithelial-specific)
LAPTM4B	12,92	9,33	10,44	0,0008	lysosomal protein transmembrane 4 beta
TFPI	7,87	6,6	8,63	0,0008	tissue factor pathway inhibitor (lipoprotein-associated coagulation inhibitor)
HDAC1	13,31	11,14	12,03	0,0008	histone deacetylase 1
NMU	8,83	10,48	7,6	0,0008	neuromedin U
ATP1A1	13,91	12,13	11,62	0,0008	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 1 polypeptide
NPR3	4,79	5,26	7,71	0,0008	natriuretic peptide receptor 3
RUNX2	6,96	8,85	11,29	0,0008	runt-related transcription factor 2
NPNT	8,34	4,19	5,06	0,0008	nephronectin
MYO1D	9,09	7,85	4,67	0,0008	myosin ID
SFN	15,37	14,2	11,5	0,0009	stratifin
PTPRK	11,33	10,49	9,04	0,0009	protein tyrosine phosphatase, receptor type, K
PCMTD1	11,9	8,5	10,15	0,0009	protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase domain containing 1
TSTD1	8,35	6,88	5,93	0,0009	thiosulfate sulfurtransferase (rhodanese)-like domain containing 1
NNMT	4,3	5,68	7,38	0,0009	nicotinamide N-methyltransferase
ZFAND1	13,19	10,53	11,65	0,0009	zinc finger, AN1-type domain 1
NRCAM	5,73	7,71	6,24	0,0009	neuronal cell adhesion molecule
RHOBTB3	9,73	6,6	7,72	0,0009	Rho-related BTB domain containing 3
ROR1	7,56	10,4	10,27	0,0009	receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1
CPA4	7,28	8,42	9,47	0,0009	carboxypeptidase A4
IL18	11,55	9,6	8,26	0,0009	interleukin 18
CKLF- CMTM1	5,45	5,88	7,51	0,0009	CKLF-CMTM1 readthrough
SEL1L3	6,76	8,71	5,33	0,0009	sel-1 suppressor of lin-12-like 3 (C. elegans)
GATA6	5,85	7,58	5,57	0,0009	GATA binding protein 6

Annexe 4 - Tableau complet des 144 gènes dérégulés entre les cellules HMLE.E, HMLE.E CD24⁻

Gene Symbol	HMLE.E Avg (log2)	HMLE.E_CD24 ⁻ Avg (log2)	Fold Change	FDR P-val	Gene Symbol	Description
FABP4	10,37	4,35	-65,02	2,10E-06	FABP4	fatty acid binding protein 4, adipocyte
AKR1B15	9,93	4,89	-32,76	3,71E-06	AKR1B15	aldo-keto reductase family 1, member B15
CD24	14,36	10,28	-16,97	9,48E-06	CD24	CD24 molecule
ANKRD1	5,02	10,54	45,86	9,48E-06	ANKRD1	ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)
CLDN7	13,37	8,09	-38,9	9,48E-06	CLDN7	claudin 7
KRT15; MIR6510	14,36	6,75	-194,83	9,48E-06	KRT15; MIR6510	keratin 15, type I; microRNA 6510
INHBA	6,78	10,81	16,29	2,04E-05	INHBA	inhibin beta A
KLK6	11,94	5,96	-62,72	2,04E-05	KLK6	kallikrein related peptidase 6
SULT1E1	10,13	5,09	-32,89	2,55E-05	SULT1E1	sulfotransferase family 1E member 1
AREG	10,49	14,14	12,55	2,55E-05	AREG	amphiregulin
FAT2	10,07	6,84	-9,39	2,55E-05	FAT2	FAT atypical cadherin 2
LY6D	10,72	6,21	-22,83	2,55E-05	LY6D	lymphocyte antigen 6 complex, locus D
SCEL	9,4	5,55	-14,43	2,56E-05	SCEL	sciellin
FN1	9,03	14,84	56,06	3,10E-05	FN1	fibronectin 1
LAMA3	11,64	15,7	16,72	3,30E-05	LAMA3	laminin, alpha 3
GLUL	14,57	10,45	-17,33	4,38E-05	GLUL	glutamate-ammonia ligase
UCHL1	5,07	13,18	276,14	4,38E-05	UCHL1	ubiquitin C-terminal hydrolase L1
SERPINE1	10,4	13,93	11,51	5,72E-05	SERPINE1	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1
GJB2	11,04	7,16	-14,73	5,72E-05	GJB2	gap junction protein beta 2
NRG1	8,71	12,53	14,14	6,67E-05	NRG1	neuregulin 1
TFCP2L1	8,81	6,23	-5,95	8,24E-05	TFCP2L1	transcription factor CP2-like 1
CLDN4	14,57	7,99	-96	8,88E-05	CLDN4	claudin 4
IGFBP2	9,56	6,45	-8,62	0,0001	IGFBP2	insulin like growth factor binding protein 2
AKR1B10	9,44	5,47	-15,66	0,0001	AKR1B10	aldo-keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase)
PDCD4; MIR4680	12,38	7,88	-22,62	0,0001	PDCD4; MIR4680	programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor); microRNA 4680
IL6	5,63	10,61	31,66	0,0001	IL6	interleukin 6
DSG3	11,63	8,59	-8,21	0,0001	DSG3	desmoglein 3
PDHB	10,82	8,38	-5,44	0,0002	PDHB	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta
KLK7	13,19	7,47	-52,53	0,0002	KLK7	kallikrein related peptidase 7
SLC7A8	9,63	5,41	-18,7	0,0002	SLC7A8	solute carrier family 7 (amino acid transporter light chain, L system), member 8
SH3KBP1	9,8	12,37	5,96	0,0002	SH3KBP1	SH3-domain kinase binding protein 1
DUSP4	6,68	10,63	15,41	0,0002	DUSP4	dual specificity phosphatase 4
HRSP12	10,94	8,38	-5,9	0,0002	HRSP12	heat-responsive protein 12
SCNN1G	8,04	4,42	-12,28	0,0002	SCNN1G	sodium channel, non voltage gated 1 gamma subunit

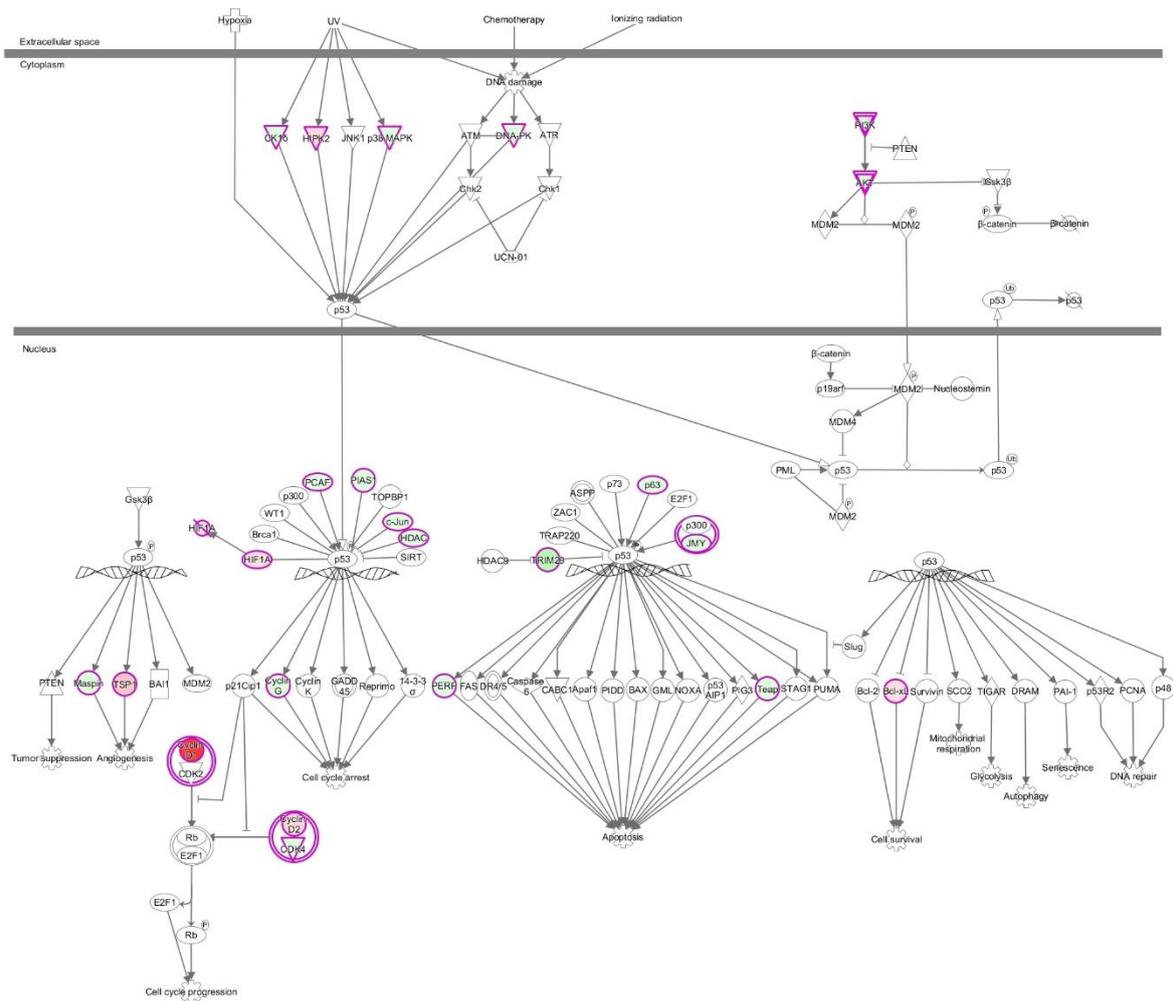
TBX3	7,57	11,03	10,95	0,0003	TBX3	T-box 3
ADGRL2	7,76	4,46	-9,87	0,0003	ADGRL2	adhesion G protein-coupled receptor L2
IL20RB	12,28	8,86	-10,66	0,0003	IL20RB	interleukin 20 receptor beta
CA2	12,4	8,68	-13,14	0,0003	CA2	carbonic anhydrase II
ESRP1	14,37	11,4	-7,79	0,0003	ESRP1	epithelial splicing regulatory protein 1
HCAR1	9,82	6,48	-10,16	0,0003	HCAR1	hydroxycarboxylic acid receptor 1
HIST2H4A; HIST2H4B	10,92	13,34	5,36	0,0003	HIST2H4A; HIST2H4B	histone cluster 2, H4a; histone cluster 2, H4b
TNFAIP3	8,58	12,32	13,29	0,0003	TNFAIP3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3
PDCD1LG2	5,66	7,73	4,21	0,0003	PDCD1LG2	programmed cell death 1 ligand 2
AKAP2	8,79	11,77	7,9	0,0003	AKAP2	A kinase (PRKA) anchor protein 2
CCDC90B	10,62	13,45	7,12	0,0003	CCDC90B	coiled-coil domain containing 90B
CRABP2	9,12	6,05	-8,38	0,0003	CRABP2	cellular retinoic acid binding protein 2
HIGD1A	13,5	10,77	-6,62	0,0003	HIGD1A	HIG1 hypoxia inducible domain family, member 1A
PLEKHF2	11	8,06	-7,67	0,0003	PLEKHF2	pleckstrin homology domain containing, family F (with FYVE domain) member 2
ANKRD46	9,58	6,98	-6,07	0,0003	ANKRD46	ankyrin repeat domain 46
FAM213A	10,61	5,51	-34,37	0,0003	FAM213A	family with sequence similarity 213, member A
TMEM133	3,94	6,37	5,38	0,0003	TMEM133	transmembrane protein 133
CDH2	6,19	9,21	8,11	0,0003	CDH2	cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)
KLK5	14,23	8,08	-71,01	0,0003	KLK5	kallikrein related peptidase 5
HIST2H4B; HIST2H4A	10,79	13,18	5,26	0,0003	HIST2H4B; HIST2H4A	histone cluster 2, H4b; histone cluster 2, H4a
PCDH7	4,45	7,58	8,75	0,0003	PCDH7	protocadherin 7
CCDC152	7,38	9,88	5,63	0,0003	CCDC152	coiled-coil domain containing 152
PPP1R14C	10,58	7,9	-6,4	0,0003	PPP1R14C	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14C
SYT12	7,46	5,2	-4,76	0,0003	SYT12	synaptotagmin XII
CASP4	10,99	13,59	6,06	0,0003	CASP4	caspase 4
PHLDA1	8,91	11,87	7,76	0,0003	PHLDA1	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1
FLNA	7,2	10,82	12,23	0,0003	FLNA	Jeck2013 ANTISENSE, CDS, coding, INTERNAL, OVCODE, OVEXON best transcript NM_001110556
AIG1	12,74	9,61	-8,76	0,0003	AIG1	androgen-induced 1
AKAP12	8,78	12,04	9,57	0,0003	AKAP12	A kinase (PRKA) anchor protein 12
ITGB1	12,77	15,24	5,56	0,0003	ITGB1	integrin beta 1
KRT13	14,19	8,28	-60,04	0,0003	KRT13	keratin 13, type I
TRIM29	12,52	8,68	-14,34	0,0004	TRIM29	tripartite motif containing 29
PMEPA1	7,02	10,95	15,29	0,0004	PMEPA1	prostate transmembrane protein, androgen induced 1
POLE4	11,44	13,8	5,13	0,0005	POLE4	polymerase (DNA-directed), epsilon 4, accessory subunit
SPIDR	9,81	6,84	-7,83	0,0005	SPIDR	scaffolding protein involved in DNA repair
NT5E	12,07	14,3	4,71	0,0005	NT5E	5-nucleotidase, ecto (CD73)

PARVA	9,53	11,87	5,06	0,0005	PARVA	parvin, alpha
ETS1	9,04	11,17	4,37	0,0005	ETS1	v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1
ZNF280B	4,97	7,05	4,22	0,0005	ZNF280B	zinc finger protein 280B
MYB	7,77	5,57	-4,57	0,0005	MYB	v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog
SERPINB13	9,75	6,29	-11	0,0006	SERPINB13	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 13
SFRP1	4,54	7,68	8,8	0,0006	SFRP1	secreted frizzled-related protein 1
ITGB6	6,82	9,44	6,17	0,0006	ITGB6	integrin beta 6
HDAC1	13,31	11,14	-4,48	0,0006	HDAC1	histone deacetylase 1
PCMTD1	11,9	8,5	-10,55	0,0006	PCMTD1	protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase domain containing 1
LYNX1	10	7,1	-7,44	0,0006	LYNX1	Ly6/neurotoxin 1
BIRC3	8,6	10,94	5,07	0,0006	BIRC3	baculoviral IAP repeat containing 3
GLIPR1	8,24	12,06	14,12	0,0006	GLIPR1	GLI pathogenesis-related 1
FAM50A	8,94	12,18	9,44	0,0006	FAM50A	family with sequence similarity 50, member A
LAPTM4B	12,92	9,33	-12,05	0,0006	LAPTM4B	lysosomal protein transmembrane 4 beta
ZFAND1	13,19	10,53	-6,33	0,0006	ZFAND1	zinc finger, AN1-type domain 1
VIM	6,03	13,13	137,25	0,0006	VIM	vimentin
CD9	16,37	13,34	-8,18	0,0006	CD9	CD9 molecule
KLK10	11,32	5,13	-72,7	0,0006	KLK10	kallikrein related peptidase 10
CKMT1A	13,49	8,15	-40,53	0,0006	CKMT1A	creatine kinase, mitochondrial 1A
RHOBTB3	9,73	6,6	-8,8	0,0006	RHOBTB3	Rho-related BTB domain containing 3
ADD2	5,31	7,71	5,3	0,0007	ADD2	adducin 2 (beta)
PALLD	8,09	10,31	4,69	0,0007	PALLD	palladin, cytoskeletal associated protein
YIPF4	10,79	7,93	-7,29	0,0007	YIPF4	Yip1 domain family member 4
IDH1	12,02	10,15	-3,66	0,0007	IDH1	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+)
ORAOV1	8,67	12,82	17,8	0,0007	ORAOV1	oral cancer overexpressed 1
SPATA5	10,33	7,41	-7,54	0,0007	SPATA5	spermatogenesis associated 5
FOS	10,86	6,03	-28,51	0,0007	FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
ASS1	14,19	9,99	-18,4	0,0007	ASS1	argininosuccinate synthase 1
MICAL2	7,13	9,94	7,02	0,0007	MICAL2	microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 2
PVRL1	11,9	7,91	-15,84	0,0007	PVRL1	poliovirus receptor-related 1 (herpesvirus entry mediator C)
ETV5	4,84	7,72	7,34	0,0007	ETV5	ets variant 5
CA8	7,83	5,18	-6,25	0,0007	CA8	carbonic anhydrase VIII
KRT10	7,21	4,88	-5,03	0,0007	KRT10	keratin 10, type I
MYL9	6,21	10,69	22,3	0,0007	MYL9	myosin light chain 9
ABCA12	8,56	5,64	-7,57	0,0007	ABCA12	ATP binding cassette subfamily A member 12
CASP1	6,35	8,17	3,53	0,0007	CASP1	caspase 1
OTUD1	10,18	7,56	-6,18	0,0008	OTUD1	OTU deubiquitinase 1
RNF128	8,93	4,68	-18,98	0,0008	RNF128	ring finger protein 128, E3 ubiquitin protein ligase

GCA	7,58	4,94	-6,23	0,0008	GCA	grancalcin, EF-hand calcium binding protein
PTX3	4,03	6,8	6,78	0,0008	PTX3	pentraxin 3, long
ITGB8	10,6	7,95	-6,3	0,0008	ITGB8	integrin beta 8
NRCAM	5,73	7,71	3,93	0,0008	NRCAM	neuronal cell adhesion molecule
CRNDE	13,14	6,74	-84,51	0,0008	CRNDE	colorectal neoplasia differentially expressed (non-protein coding)
KRT19	13,62	8,78	-28,53	0,0008	KRT19	keratin 19, type I
CCND1	9,26	13,61	20,46	0,0008	CCND1	cyclin D1
KIAA1109	8,66	6,24	-5,36	0,0008	KIAA1109	KIAA1109
NEGR1	6,62	9,37	6,75	0,0008	NEGR1	neuronal growth regulator 1
EFEMP1	8,94	10,98	4,09	0,0008	EFEMP1	EGF containing fibulin-like extracellular matrix protein 1
TP63	11,89	9,7	-4,56	0,0008	TP63	tumor protein p63
NPNT	8,34	4,19	-17,84	0,0008	NPNT	nephronectin
FAM135A	8,85	6,71	-4,42	0,0008	FAM135A	family with sequence similarity 135, member A
COL12A1	6,74	9,48	6,7	0,0008	COL12A1	collagen, type XII, alpha 1
NCOA7	12,32	8,76	-11,76	0,0008	NCOA7	nuclear receptor coactivator 7
KIAA0196	12,32	9,65	-6,34	0,0008	KIAA0196	KIAA0196
AQP3	10,03	6,87	-8,97	0,0008	AQP3	aquaporin 3 (Gill blood group)
EMP1	14,37	11,61	-6,76	0,0008	EMP1	epithelial membrane protein 1
NID2	4,5	7,69	9,16	0,0008	NID2	nidogen 2 (osteonidogen)
KRT17	15,69	12,33	-10,25	0,0008	KRT17	keratin 17, type I
CACNG4	7,12	4,74	-5,2	0,0008	CACNG4	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 4
ECH1	13,69	10,27	-10,68	0,0008	ECH1	enoyl-CoA hydratase 1, peroxisomal
ASXL1	10,66	12,66	4	0,0008	ASXL1	additional sex combs like transcriptional regulator 1
RAB7B	9,22	5,63	-12,11	0,0008	RAB7B	RAB7B, member RAS oncogene family
MYO5B	8,39	11,11	6,62	0,0009	MYO5B	myosin VB
GBP1	6,81	9,93	8,7	0,0009	GBP1	guanylate binding protein 1, interferon-inducible
FABP5	14,4	12,63	-3,41	0,0009	FABP5	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)
LETM2	5,52	7,41	3,71	0,0009	LETM2	leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 2
IMPA1	9,98	7,99	-3,97	0,0009	IMPA1	inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 1
TGFB2; TGFB2-OT1	7,71	11,21	11,25	0,0009	TGFB2; TGFB2-OT1	transforming growth factor beta 2; TGFB2 overlapping transcript 1
PLD5	5,89	7,77	3,67	0,0009	PLD5	phospholipase D family, member 5
TMEM68	11,96	8,67	-9,79	0,001	TMEM68	transmembrane protein 68
EGR3	7,73	4,9	-7,13	0,001	EGR3	early growth response 3
ZFAND3	9,7	11,79	4,27	0,001	ZFAND3	zinc finger, AN1-type domain 3
BIRC3	5,8	10,73	30,5	0,001	BIRC3	Memczak2013 ANTISENSE, CDS, coding, INTERNAL best transcript NM_182962
NEXN	6,49	9,03	5,81	0,001	NEXN	nexilin (F actin binding protein)

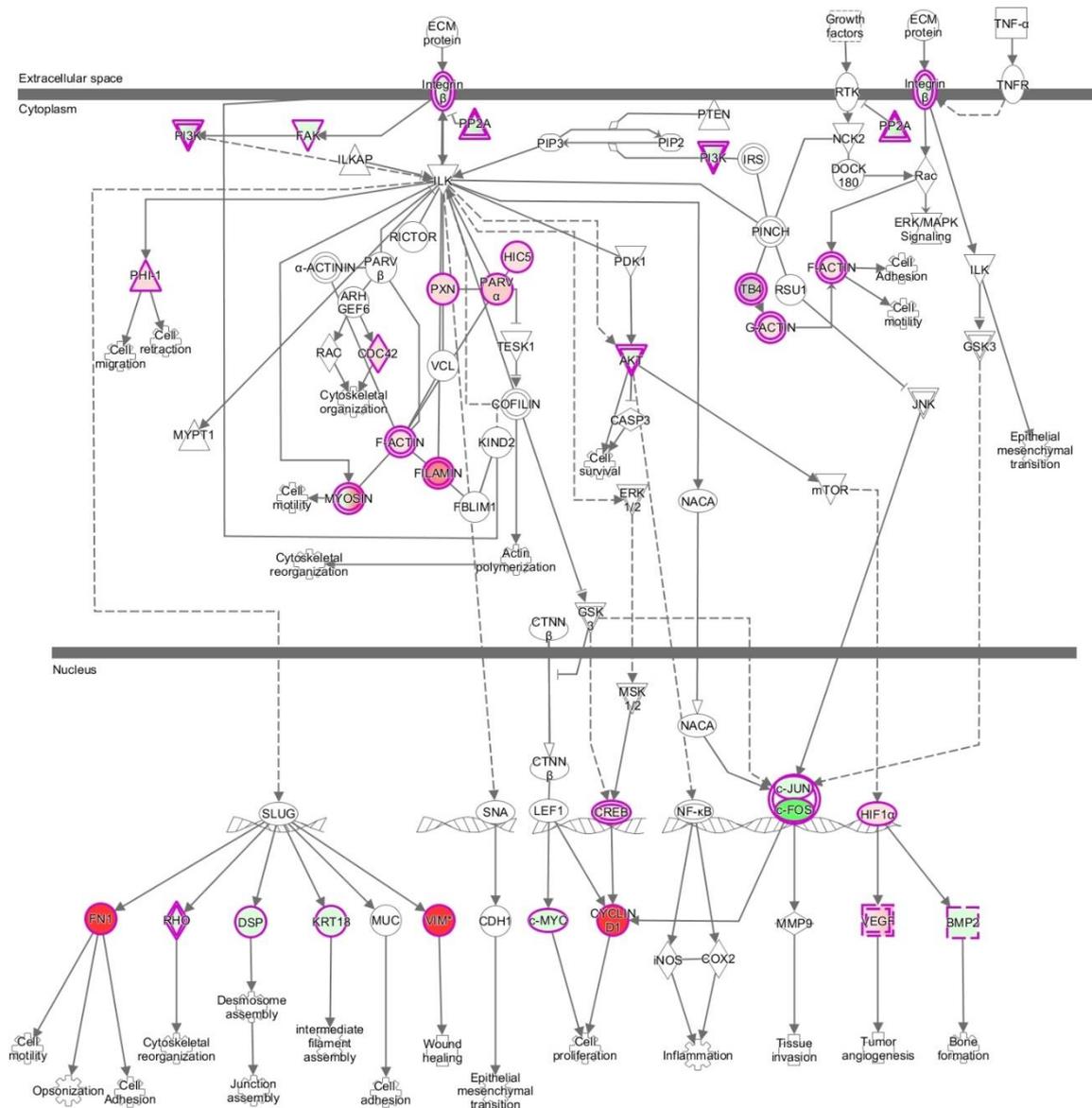
Annexe 5 - Schéma du réseau de la signalisation p53 fourni par l'approche IPA

Les gènes suréxprimés sont en rouge pour les cellules HMLE.E_CD24⁻ et en vert pour les cellules HMLE.E.



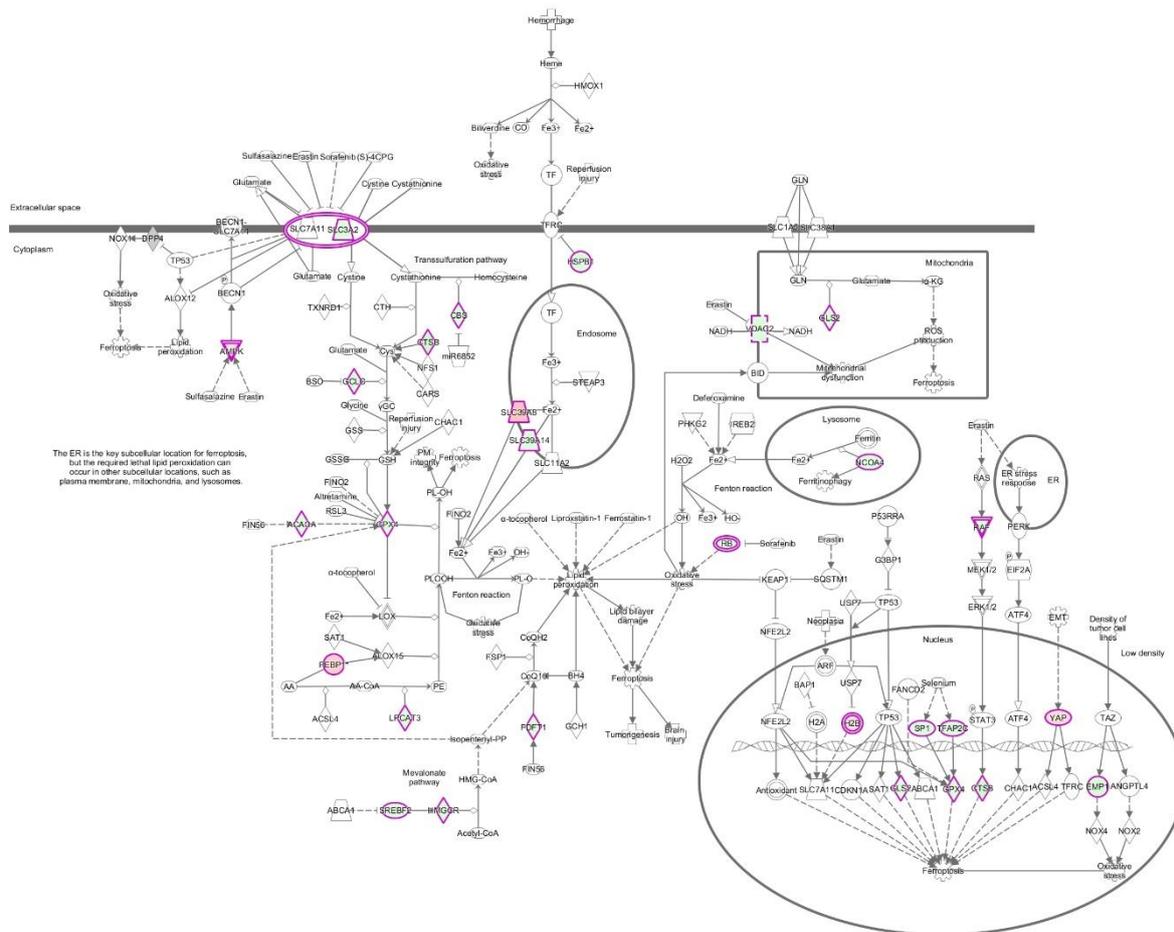
Annexe 6 - Schéma du réseau de la signalisation ILK (kinase lié à l'intégrine) fourni par l'approche IPA

Les gènes suréxprimés sont en rouge pour les cellules HMLE.E_CD24⁻ et en vert pour les cellules HMLE.E.



Annexe 7 - Schéma du réseau de la signalisation de la ferroptose fourni par l'approche IPA

Les gènes suréxprimés sont en rouge pour les cellules HMLE.E_CD24⁻ et en vert pour les cellules HMLE.E.



Références bibliographiques

Aggarwal, V., Tuli, H.S., Varol, A., Thakral, F., Yerer, M.B., Sak, K., Varol, M., Jain, A., Khan, Md.A., and Sethi, G. (2019). Role of Reactive Oxygen Species in Cancer Progression: Molecular Mechanisms and Recent Advancements. *Biomolecules* *9*, 735.

Aiello, N.M., and Kang, Y. (2019). Context-dependent EMT programs in cancer metastasis. *Journal of Experimental Medicine* *216*, 1016–1026.

Aigner, S., Sthoeger, Z.M., Fogel, M., Weber, E., Zarn, J., Ruppert, M., Zeller, Y., Vestweber, D., Stahel, R., Sammar, M., et al. (1997). CD24, a mucin-type glycoprotein, is a ligand for P-selectin on human tumor cells. *Blood* *89*, 3385–3395.

Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 3983–3988.

Al-Othman, N., Alhendi, A., Ihbaisha, M., Barahmeh, M., Alqaraleh, M., and Al-Momany, B.Z. (2020). Role of CD44 in breast cancer. *BD* *39*, 1–13.

Altevogt, P., Sammar, M., Hüser, L., and Kristiansen, G. (2021a). Novel insights into the function of CD24: A driving force in cancer. *International Journal of Cancer* *148*, 546–559.

Altevogt, P., Sammar, M., Hüser, L., and Kristiansen, G. (2021b). Novel insights into the function of CD24: A driving force in cancer. *International Journal of Cancer* *148*, 546–559.

Amani, N., Shaki, F., and Shokrzadeh, M. (2019). Contribution of Autophagy in Acquired Drug Resistance of Human Breast Cancer Cells MCF7 to Doxorubicin. *Applied In Vitro Toxicology* *5*, 173–179.

Angadi, P., and Kale, A. (2015). Epithelial-mesenchymal transition - A fundamental mechanism in cancer progression: An overview. *Indian j Health Sci* *8*, 77.

Ansieau, S., Bastid, J., Doreau, A., Morel, A.-P., Bouchet, B.P., Thomas, C., Fauvet, F., Puisieux, I., Doglioni, C., Piccinin, S., et al. (2008). Induction of EMT by Twist Proteins as a Collateral Effect of Tumor-Promoting Inactivation of Premature Senescence. *Cancer Cell* *14*, 79–89.

Bacelli, I., Schneeweiss, A., Riethdorf, S., Stenzinger, A., Schillert, A., Vogel, V., Klein, C., Saini, M., Bäumler, T., Wallwiener, M., et al. (2013). Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat Biotechnol* *31*, 539–544.

Barkal, A.A., Brewer, R.E., Markovic, M., Kowarsky, M., Barkal, S.A., Zaro, B.W., Krishnan, V., Hatakeyama, J., Dorigo, O., Barkal, L.J., et al. (2019). CD24 signalling through macrophage Siglec-10 is a target for cancer immunotherapy. *Nature* *572*, 392–396.

Baumann, P., W, T., N, C., S, M., J, K., M, D., O, K., G, M., H, A., M, F., et al. (2011). CD24 interacts with and promotes the activity of c-src within lipid rafts in breast cancer cells, thereby increasing integrin-dependent adhesion. *Cell Mol Life Sci* *69*, 435–448.

- Bensimon, J., Altmeyer-Morel, S., Benjelloun, H., Chevillard, S., and Lebeau, J. (2013). CD24(-/low) stem-like breast cancer marker defines the radiation-resistant cells involved in memorization and transmission of radiation-induced genomic instability. *Oncogene* 32, 251–258.
- Bensimon, J., Biard, D., Paget, V., Goislard, M., Morel-Altmeier, S., Konge, J., Chevillard, S., and Lebeau, J. (2016). Forced extinction of CD24 stem-like breast cancer marker alone promotes radiation resistance through the control of oxidative stress. *Mol Carcinog* 55, 245–254.
- Bernard-Marty, C., Cardoso, F., and Piccart, M.J. (2004). Facts and Controversies in Systemic Treatment of Metastatic Breast Cancer. *The Oncologist* 9, 617–632.
- Berry, R., and Rodeheffer, M.S. (2013). Characterization of the adipocyte cellular lineage in vivo. *Nat Cell Biol* 15, 302–308.
- Bhandari, A., Shen, Y., Sindan, N., Xia, E., Gautam, B., Lv, S., and Zhang, X. (2018). MAL2 promotes proliferation, migration, and invasion through regulating epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 504, 434–439.
- Bhola, N.E., Balko, J.M., Dugger, T.C., Kuba, M.G., Sánchez, V., Sanders, M., Stanford, J., Cook, R.S., and Arteaga, C.L. (2013). TGF- β inhibition enhances chemotherapy action against triple-negative breast cancer. *J Clin Invest* 123, 1348–1358.
- Bierie, B., Pierce, S.E., Kroeger, C., Stover, D.G., Pattabiraman, D.R., Thiru, P., Liu Donaher, J., Reinhardt, F., Chaffer, C.L., Keckesova, Z., et al. (2017). Integrin- β 4 identifies cancer stem cell-enriched populations of partially mesenchymal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E2337–E2346.
- Bocci, F., Gearhart-Serna, L., Boareto, M., Ribeiro, M., Ben-Jacob, E., Devi, G.R., Levine, H., Onuchic, J.N., and Jolly, M.K. (2019). Toward understanding cancer stem cell heterogeneity in the tumor microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 148–157.
- Bolstad, B.M., Irizarry, R.A., Astrand, M., and Speed, T.P. (2003). A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 19, 185–193.
- Bornes, L., Belthier, G., and van Rheenen, J. (2021). Epithelial-to-Mesenchymal Transition in the Light of Plasticity and Hybrid E/M States. *JCM* 10, 2403.
- Boute, D.V. (2004). Les différents types de cancers du sein. 21.
- Bredholt, G., Mannelqvist, M., Stefansson, I.M., Birkeland, E., Bø, T.H., Øyan, A.M., Trovik, J., Kalland, K.-H., Jonassen, I., Salvesen, H.B., et al. (2015). Tumor necrosis is an important hallmark of aggressive endometrial cancer and associates with hypoxia, angiogenesis and inflammation responses. *Oncotarget* 6, 39676–39691.
- Brunori, M., and Gilson, E. (2005). Télomère et cancer : quoi de plus à la fin ? *Med Sci (Paris)* 21, 37–42.
- Byerly, J.H., Port, E.R., and Irie, H.Y. (2020). PRKCQ inhibition enhances chemosensitivity of triple-negative breast cancer by regulating Bim. *Breast Cancer Research* 22, 72.

- Cao, X., Geradts, J., Dewhirst, M.W., and Lo, H.-W. (2012). Upregulation of VEGF-A and CD24 gene expression by the tGIL1 transcription factor contributes to the aggressive behavior of breast cancer cells. *Oncogene* *31*, 104–115.
- Celià-Terrassa, T., and Kang, Y. (2016). Distinctive properties of metastasis-initiating cells. *Genes Dev* *30*, 892–908.
- Chaffer, C.L., and Weinberg, R.A. (2011). A Perspective on Cancer Cell Metastasis. *Science* *331*, 1559–1564.
- Chaffer, C.L., San Juan, B.P., Lim, E., and Weinberg, R.A. (2016). EMT, cell plasticity and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* *35*, 645–654.
- Chan, S.-H., Tsai, K.-W., Chiu, S.-Y., Kuo, W.-H., Chen, H.-Y., Jiang, S.S., Chang, K.-J., Hung, W.-C., and Wang, L.-H. (2019). Identification of the Novel Role of CD24 as an Oncogenesis Regulator and Therapeutic Target for Triple-Negative Breast Cancer. *Mol Cancer Ther* *18*, 147–161.
- Chen, C., Zhao, S., Karnad, A., and Freeman, J.W. (2018a). The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. *J Hematol Oncol* *11*.
- Chen, G.-Y., Tang, J., Zheng, P., and Liu, Y. (2009). CD24 and Siglec-10 Selectively Repress Tissue Damage-Induced Immune Responses. *Science* *323*, 1722–1725.
- Chen, S., Wang, H., Li, Z., You, J., Wu, Q.-W., Zhao, C., Tzeng, C.-M., and Zhang, Z.-M. (2018b). Interaction of WBP2 with ER α increases doxorubicin resistance of breast cancer cells by modulating MDR1 transcription. *Br J Cancer* *119*, 182–192.
- Chen, W., Hoffmann, A.D., Liu, H., and Liu, X. (2018c). Organotropism: new insights into molecular mechanisms of breast cancer metastasis. *Npj Precision Onc* *2*, 4.
- Chen, X., Kang, R., Kroemer, G., and Tang, D. (2021). Broadening horizons: the role of ferroptosis in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* *18*, 280–296.
- Chiasson-MacKenzie, C., Morris, Z.S., Baca, Q., Morris, B., Coker, J.K., Mirchev, R., Jensen, A.E., Carey, T., Stott, S.L., Golan, D.E., et al. (2015). NF2/Merlin mediates contact-dependent inhibition of EGFR mobility and internalization via cortical actomyosin. *Journal of Cell Biology* *211*, 391–405.
- Clere, N. (2016). Les traitements du cancer du sein. *Actualités Pharmaceutiques* *55*, 20–25.
- Corradini, S., Krug, D., Meattini, I., Matuschek, C., Bölke, E., Francolini, G., Baumann, R., Figlia, V., Pazos, M., Tonetto, F., et al. (2019). Preoperative radiotherapy: A paradigm shift in the treatment of breast cancer? A review of literature. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* *141*, 102–111.
- Cottu, P. ATTITUDES DIAGNOSTIQUES ET THERAPEUTIQUES, PROTOCOLES DE TRAITEMENT 2019-2020. 131.
- Crocker, P.R., Paulson, J.C., and Varki, A. (2007). Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol* *7*, 255–266.
- Curran and Wiseman (2001). Fulvestrant. *61*.

Daguenet, E., Jmour, O., Vallard, A., Guy, J.-B., Jacquin, J.-P., Méry, B., and Magné, N. (2019). Analogues de la LH-RH dans le traitement hormonal adjuvant dans les cancers du sein localisés de la femme pré-ménopausée : la fin d'une controverse pour de nouvelles recommandations ? *Bulletin du Cancer* *106*, 342–353.

Dai, X., Li, T., Bai, Z., Yang, Y., Liu, X., Zhan, J., and Shi, B. (2015). Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical. *15*.

Dalenc, F., Kanoun, D., and Ung, M. Les thérapies ciblées en oncologie mammaire. *7*.

Daniel, Y., Lelou, E., Aninat, C., Corlu, A., and Cabillic, F. (2021). Interplay between Metabolism Reprogramming and Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer Stem Cells. *Cancers* *13*, 1973.

DeBerardinis, R.J., Lum, J.J., Hatzivassiliou, G., and Thompson, C.B. (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* *7*, 11–20.

Delbue, D., Mendonça, B.S., Robaina, M.C., Lemos, L.G.T., Lucena, P.I., Viola, J.P.B., Magalhães, L.M., Crocama, S., Oliveira, C.A.B., Teixeira, F.R., et al. (2020). Expression of nuclear XIAP associates with cell growth and drug resistance and confers poor prognosis in breast cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* *1867*, 118761.

Dong, C., Yuan, T., Wu, Y., Wang, Y., Fan, T.W.M., Miriyala, S., Lin, Y., Yao, J., Shi, J., Kang, T., et al. (2013). Loss of FBP1 by Snail-mediated repression provides metabolic advantages in basal-like breast cancer. *Cancer Cell* *23*, 316–331.

Dvorak, H.F. (1986). Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* *315*, 1650–1659.

Eiriksson, F.F., Rolfsson, O., Ogmundsdottir, H.M., Haraldsson, G.G., Thorsteinsdottir, M., and Halldorsson, S. (2018). Altered plasmalogen content and fatty acid saturation following epithelial to mesenchymal transition in breast epithelial cell lines. *Int J Biochem Cell Biol* *103*, 99–104.

Elenbaas, B., Spirio, L., Koerner, F., Fleming, M.D., Zimonjic, D.B., Donaher, J.L., Popescu, N.C., Hahn, W.C., and Weinberg, R.A. (2001). Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev* *15*, 50–65.

Elston, C.W., and Ellis, I.O. (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* *19*, 403–410.

Eyvazi, S., Kazemi, B., Dastmalchi, S., and Bandehpour, M. (2018). Involvement of CD24 in Multiple Cancer Related Pathways Makes It an Interesting New Target for Cancer Therapy. *CCDT* *18*, 328–336.

Fairbridge, N.A., Southall, T.M., Ayre, D.C., Komatsu, Y., Raquet, P.I., Brown, R.J., Randell, E., Kovacs, C.S., and Christian, S.L. (2015). Loss of CD24 in Mice Leads to Metabolic Dysfunctions and a Reduction in White Adipocyte Tissue. *PLoS One* *10*, e0141966.

Fallet, E. (2014). Les dommages à l'ADN et leur réparation.

- Fang, X., Zheng, P., Tang, J., and Liu, Y. (2010a). CD24: from A to Z. *Cell Mol Immunol* 7, 100–103.
- Fang, Y., Wang, L., Wan, C., Sun, Y., Van der Jeught, K., Zhou, Z., Dong, T., So, K.M., Yu, T., Li, Y., et al. (2021). MAL2 drives immune evasion in breast cancer by suppressing tumor antigen presentation. *J Clin Invest* 131, 140837.
- Fares, J., Fares, M.Y., Khachfe, H.H., Salhab, H.A., and Fares, Y. (2020). Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Sig Transduct Target Ther* 5, 28.
- Farmer, P., Bonnefoi, H., Becette, V., Tubiana-Hulin, M., Fumoleau, P., Larsimont, D., MacGrogan, G., Bergh, J., Cameron, D., Goldstein, D., et al. (2005). Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene* 24, 4660–4671.
- Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B., Luo, W., et al. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & Diseases* 5, 77–106.
- Fischer, K.R., Durrans, A., Lee, S., Sheng, J., Li, F., Wong, S.T.C., Choi, H., El Rayes, T., Ryu, S., Troeger, J., et al. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature* 527, 472–476.
- Fischer, N., Saeed, M.E.M., Lippe, E., Roth, W., and Efferth, T. (2021). High TCTP expression as prognostic factor in different cancer types. *World Academy of Sciences Journal* 3, 1–1.
- Fougner, C., Bergholtz, H., Norum, J.H., and Sørli, T. (2020). Re-definition of claudin-low as a breast cancer phenotype. *Nat Commun* 11, 1787.
- Franchet, C., and Lacroix-Triki, M. (2016). Hétérogénéité tumorale dans les cancers du sein : un écosystème aux mille facettes. 6.
- Friederichs, J., Zeller, Y., Hafezi-Moghadam, A., Grone, H.-J., Ley, K., and Altevogt, P. The CD24/P-selectin Binding Pathway Initiates Lung Arrest of Human A125 Adenocarcinoma Cells. 10.
- Friedl, P., and Mayor, R. (2017). Tuning Collective Cell Migration by Cell–Cell Junction Regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9.
- Fujii, J., Homma, T., Miyata, S., and Takahashi, M. (2021). Pleiotropic Actions of Aldehyde Reductase (AKR1A). *Metabolites* 11, 343.
- G**andhi, N., and Das, G.M. (2019). Metabolic Reprogramming in Breast Cancer and Its Therapeutic Implications. *Cells* 8, 89.
- Gaude, E., and Frezza, C. (2016). Tissue-specific and convergent metabolic transformation of cancer correlates with metastatic potential and patient survival. *Nat Commun* 7, 13041.
- Gautier Defosse et, Le Guyader-Peyrou, S., Uhry, Z., Grosclaude, P., Colonna, M., Dantony, E., Delafosse, P., Molinié, F., Woronoff, A.-S., Bouvier, A.-M., et al. (2019). Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018.
- Ghebeh, H., Al-Khaldi, S., Olabi, S., Al-Dhfyhan, A., Al-Mohanna, F., Barnawi, R., Tulbah, A., Al-Tweigeri, T., Ajarim, D., and Al-Alwan, M. (2014). Fascin is involved in the chemotherapeutic resistance of breast cancer cells predominantly via the PI3K/Akt pathway. *Br J Cancer* 111, 1552–1561.

Gilliam, D.T., Menon, V., Bretz, N.P., and Pruszk, J. (2017). The CD24 surface antigen in neural development and disease. *Neurobiology of Disease* *99*, 133–144.

Ginestier, C. (2017). Les cellules souches cancéreuse : définition et techniques d'isolement. *Bulletin Du Cancer* *104*, 1060–1063.

Ginestier, C., Hur, M.H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Jacquemier, J., Viens, P., Kleer, C., Liu, S., et al. (2007). ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* *1*, 555–567.

Golan, H., Shukrun, R., Caspi, R., Vax, E., Pode-Shakked, N., Goldberg, S., Pleniceanu, O., Bar-Lev, D.D., Mark-Danieli, M., Pri-Chen, S., et al. (2018). In Vivo Expansion of Cancer Stemness Affords Novel Cancer Stem Cell Targets: Malignant Rhabdoid Tumor as an Example. *Stem Cell Reports* *11*, 795–810.

Gómez-Miragaya, J., Morán, S., Calleja-Cervantes, M.E., Collado-Sole, A., Paré, L., Gómez, A., Serra, V., Dobrolecki, L.E., Lewis, M.T., Diaz-Lagares, A., et al. (2019). The Altered Transcriptome and DNA Methylation Profiles of Docetaxel Resistance in Breast Cancer PDX Models. *Mol Cancer Res* *17*, 2063–2076.

Gorelik, R., and Gautreau, A. (2014). Quantitative and unbiased analysis of directional persistence in cell migration. *Nat Protoc* *9*, 1931–1943.

Gottesman, M.M. (2002). Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med* *53*, 615–627.

Greaves, M., and Maley, C.C. (2012). CLONAL EVOLUTION IN CANCER. *Nature* *481*, 306–313.

Grosse-Wilde, A., Fouquier d'Hérouël, A., McIntosh, E., Ertaylan, G., Skupin, A., Kuestner, R.E., del Sol, A., Walters, K.-A., and Huang, S. (2015). Stemness of the hybrid Epithelial/Mesenchymal State in Breast Cancer and Its Association with Poor Survival. *PLoS ONE* *10*, e0126522.

Guaita-Esteruelas, S., Bosquet, A., Saavedra, P., Gumà, J., Girona, J., Lam, E.W.-F., Amillano, K., Borràs, J., and Masana, L. (2017). Exogenous FABP4 increases breast cancer cell proliferation and activates the expression of fatty acid transport proteins. *Mol Carcinog* *56*, 208–217.

Guedj, M., Marisa, L., de Reynies, A., Orsetti, B., Schiappa, R., Bibeau, F., MacGrogan, G., Lerebours, F., Finetti, P., Longy, M., et al. (2012). A refined molecular taxonomy of breast cancer. *Oncogene* *31*, 1196–1206.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* *144*, 646–674.

Handy, D.E., and Loscalzo, J. (2012). Redox regulation of mitochondrial function. *Antioxid Redox Signal* *16*, 1323–1367.

He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T., and Ma, X. (2017). Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *CPB* *44*, 532–553.

Hecht, F., Pessoa, C.F., Gentile, L.B., Rosenthal, D., Carvalho, D.P., and Fortunato, R.S. (2016). The role of oxidative stress on breast cancer development and therapy. *Tumor Biol.* *37*, 4281–4291.

Hehlgans, S., and Cordes, N. (2011). Caveolin-1: an essential modulator of cancer cell radio-and chemoresistance. *Am J Cancer Res* *1*, 521–530.

Hennequin, C., Barillot, I., Azria, D., Belkacémi, Y., Bollet, M., Chauvet, B., Cowen, D., Cutuli, B., Fourquet, A., Hannoun-Lévi, J.M., et al. (2016). Radiothérapie du cancer du sein. *Cancer/Radiothérapie* 20, S139–S146.

Hennessy, B.T., Gonzalez-Angulo, A.-M., Stemke-Hale, K., Gilcrease, M.Z., Krishnamurthy, S., Lee, J.-S., Fridlyand, J., Sahin, A., Agarwal, R., Joy, C., et al. (2009). Characterization of a Naturally Occurring Breast Cancer Subset Enriched in Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Stem Cell Characteristics. *Cancer Res* 69, 4116–4124.

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

Horton, J.K., Siamakpour-Reihani, S., Lee, C.-T., Zhou, Y., Chen, W., Geradts, J., Fels, D.R., Hoang, P., Ashcraft, K.A., Groth, J., et al. (2015). FAS Death Receptor: A Breast Cancer Subtype-Specific Radiation Response Biomarker and Potential Therapeutic Target. *Radiation Research* 184, 456–469.

Hosonaga, M., Arima, Y., Sugihara, E., Kohno, N., and Saya, H. (2014). Expression of CD24 is associated with HER2 expression and supports HER2-Akt signaling in HER2-positive breast cancer cells. *Cancer Sci* 105, 779–787.

Hwang-Verslues, W.W., Kuo, W.-H., Chang, P.-H., Pan, C.-C., Wang, H.-H., Tsai, S.-T., Jeng, Y.-M., Shew, J.-Y., Kung, J.T., Chen, C.-H., et al. (2009). Multiple lineages of human breast cancer stem/progenitor cells identified by profiling with stem cell markers. *PLoS One* 4, e8377.

Ianza, A., Sirico, M., Bernocchi, O., and Generali, D. (2021). Role of the IGF-1 Axis in Overcoming Resistance in Breast Cancer. *Front. Cell Dev. Biol.* 9.

INCa (2018). Les cancers en France. 254.

Ishay-Ronen, D., Diepenbruck, M., Kalathur, R.K.R., Sugiyama, N., Tiede, S., Ivanek, R., Bantug, G., Morini, M.F., Wang, J., Hess, C., et al. (2019). Gain Fat—Lose Metastasis: Converting Invasive Breast Cancer Cells into Adipocytes Inhibits Cancer Metastasis. *Cancer Cell* 35, 17-32.e6.

Jaggupilli, A., and Elkord, E. (2012). Significance of CD44 and CD24 as Cancer Stem Cell Markers: An Enduring Ambiguity. *Clinical and Developmental Immunology* 2012, e708036.

Ji, X., Lu, Y., Tian, H., Meng, X., Wei, M., and Cho, W.C. (2019). Chemoresistance mechanisms of breast cancer and their countermeasures. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 114, 108800.

Jia, D., Li, X., Bocci, F., Tripathi, S., Deng, Y., Jolly, M.K., Onuchic, J.N., and Levine, H. (2019). Quantifying Cancer Epithelial-Mesenchymal Plasticity and its Association with Stemness and Immune Response. *J Clin Med* 8, 725.

Jing, X., Cui, X., Liang, H., Hao, C., Yang, Z., Li, X., Yang, X., and Han, C. (2018). CD24 is a Potential Biomarker for Prognosis in Human Breast Carcinoma. *CPB* 48, 111–119.

Jolly, M.K. (2015). Implications of the Hybrid Epithelial/Mesenchymal Phenotype in Metastasis. *Front. Oncol.* 5.

Jolly, M.K., Somarelli, J.A., Sheth, M., Biddle, A., Tripathi, S.C., Armstrong, A.J., Hanash, S.M., Bapat, S.A., Rangarajan, A., and Levine, H. (2019). Hybrid epithelial/mesenchymal phenotypes promote metastasis and therapy resistance across carcinomas. *Pharmacology & Therapeutics* 194, 161–184.

Jordan, V.C. Selective Estrogen Receptor Modulation: A Personal Perspective. 6.

Joyon, N., Penault-Llorca, F., and Lacroix-Triki, M. (2017). Classification et signatures moléculaires des cancers du sein en 2017. *Oncologie* 19, 64–70.

Kaiparettu, B.A., Malik, S., Konduri, S.D., Liu, W., Rokavec, M., van der Kuip, H., Hoppe, R., Hammerich-Hille, S., Fritz, P., Schroth, W., et al. (2008). Estrogen-mediated down-regulation of CD24 in breast cancer cells. *Int J Cancer* 123, 66–72.

Kamble, D., Mahajan, M., Dhat, R., and Sitasawad, S. (2021). Keap1-Nrf2 Pathway Regulates ALDH and Contributes to Radioresistance in Breast Cancer Stem Cells. *Cells* 10, 83.

Kaufmann, S.H., and Earnshaw, W.C. (2000). Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 256, 42–49.

Kay, R., Takei, F., and Humphries, R.K. (1990). Expression cloning of a cDNA encoding M1/69-J11d heat-stable antigens. *J Immunol* 145, 1952–1959.

Kim, Lee, Seo, Kim, Kim, Kim, Kang, Seong, Youn, and Youn (2019). Cellular Stress Responses in Radiotherapy. *Cells* 8, 1105.

Kim, N., Piatyszek, M., Prowse, K., Harley, C., West, M., Ho, P., Coviello, G., Wright, W., Weinrich, S., and Shay, J. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 2011–2015.

Kim, R., Emi, M., and Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 121, 1–14.

King, M.-C., Marks, J.H., and Mandell, J.B. (2003). Breast and Ovarian Cancer Risks Due to Inherited Mutations in BRCA1 and BRCA2. 302, 5.

Kondaveeti, Y., Guttilla Reed, I.K., and White, B.A. (2015). Epithelial-mesenchymal transition induces similar metabolic alterations in two independent breast cancer cell lines. *Cancer Lett* 364, 44–58.

Konge, J., Leteurtre, F., Goislard, M., Biard, D., Morel-Altmeier, S., Vaurijoux, A., Gruel, G., Chevillard, S., and Lebeau, J. (2018). Breast cancer stem cell-like cells generated during TGFβ-induced EMT are radioresistant. *Oncotarget* 9, 23519–23531.

Kreso, A., and Dick, J.E. (2014). Evolution of the Cancer Stem Cell Model. *Cell Stem Cell* 14, 275–291.

Kristiansen, G., Winzer, K.-J., Mayordomo, E., Bellach, J., Schlüns, K., Denkert, C., Dahl, E., Pilarsky, C., Altevogt, P., Guski, H., et al. (2003). CD24 Expression Is a New Prognostic Marker in Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 9, 4906–4913.

Kristiansen, G., Machado, E., Bretz, N., Rupp, C., Winzer, K.-J., König, A.-K., Moldenhauer, G., Marmé, F., Costa, J., and Altevogt, P. (2010a). Molecular and clinical dissection of CD24 antibody specificity by a comprehensive comparative analysis. *Lab Invest* 90, 1102–1116.

Kristiansen, G., Machado, E., Bretz, N., Rupp, C., Winzer, K.-J., König, A.-K., Moldenhauer, G., Marmé, F., Costa, J., and Altevogt, P. (2010b). Molecular and clinical dissection of CD24 antibody specificity by a comprehensive comparative analysis. *Lab Invest* *90*, 1102–1116.

Kröger, C., Afeyan, A., Mraz, J., Eaton, E.N., Reinhardt, F., Khodor, Y.L., Thiru, P., Bierie, B., Ye, X., Burge, C.B., et al. (2019). Acquisition of a hybrid E/M state is essential for tumorigenicity of basal breast cancer cells. *PNAS* *116*, 7353–7362.

Krumova, K., and Cosa, G. (2016). Chapter 1 Overview of Reactive Oxygen Species. 1–21.

Kwon, M.J., Han, J., Seo, J.H., Song, K., Jeong, H.M., Choi, J.-S., Kim, Y.J., Lee, S.-H., Choi, Y.-L., and Shin, Y.K. (2015). CD24 Overexpression Is Associated with Poor Prognosis in Luminal A and Triple-Negative Breast Cancer. *PLOS ONE* *10*, e0139112.

Lagadec, C., Vlashi, E., Della Donna, L., Dekmezian, C., and Pajonk, F. (2012). Radiation-induced reprogramming of breast cancer cells. *Stem Cells* *30*, 833–844.

Lainetti, P. de F., Leis-Filho, A.F., Laufer-Amorim, R., Battazza, A., and Fonseca-Alves, C.E. (2020). Mechanisms of Resistance to Chemotherapy in Breast Cancer and Possible Targets in Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics* *12*, 1193.

Le Bras, G.F., Taubenslag, K.J., and Andl, C.D. (2012). The regulation of cell-cell adhesion during epithelial-mesenchymal transition, motility and tumor progression. *Cell Adh Migr* *6*, 365–373.

Leach, J., Morton, J.P., and Sansom, O.J. (2019). Neutrophils: Homing in on the myeloid mechanisms of metastasis. *Mol Immunol* *110*, 69–76.

Lee, K., Ju, J., Jang, K., Yang, W., Yi, J.Y., Noh, D.Y., and Shin, I. (2012). CD24 regulates cell proliferation and transforming growth factor β -induced epithelial to mesenchymal transition through modulation of integrin $\beta 1$ stability. *Cell Signal* *24*, 2132–2142.

Lee, K.J., Mann, E., Wright, G., Pieltz, C.G., Nagel, Z.D., and Gassman, N.R. (2020). Exploiting DNA repair defects in triple negative breast cancer to improve cell killing. *Ther Adv Med Oncol* *12*, 1758835920958354.

Lee, S.Y., Jeong, E.K., Ju, M.K., Jeon, H.M., Kim, M.Y., Kim, C.H., Park, H.G., Han, S.I., and Kang, H.S. (2017). Induction of metastasis, cancer stem cell phenotype, and oncogenic metabolism in cancer cells by ionizing radiation. *Mol Cancer* *16*.

Li, F., Zheng, X., Liu, Y., Li, P., Liu, X., Ye, F., Zhao, T., Wu, Q., Jin, X., and Li, Q. (2016). Different Roles of CHOP and JNK in Mediating Radiation-Induced Autophagy and Apoptosis in Breast Cancer Cells. *Radiat Res* *185*, 539–548.

Li, J.-Y., Li, Y.-Y., Jin, W., Yang, Q., Shao, Z.-M., and Tian, X.-S. (2012). ABT-737 reverses the acquired radioresistance of breast cancer cells by targeting Bcl-2 and Bcl-xL. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* *31*, 102.

Liang, D.H., El-Zein, R., and Dave, B. (2015). Autophagy Inhibition to Increase Radiosensitization in Breast Cancer. *J Nucl Med Radiat Ther* *6*, 254.

Liao, T.-T., and Yang, M.-H. (2020). Hybrid Epithelial/Mesenchymal State in Cancer Metastasis: Clinical Significance and Regulatory Mechanisms. *Cells* *9*, 623.

Lim, J., Lee, K., Shim, J., and Shin, I. (2014). CD24 regulates stemness and the epithelial to mesenchymal transition through modulation of Notch1 mRNA stability by p38MAPK. *Arch Biochem Biophys* 558, 120–126.

Liu, M. (2019). MicroRNA-5195-3p enhances the chemosensitivity of triple-negative breast cancer to paclitaxel by downregulating EIF4A2. 11.

Liu, S., Cong, Y., Wang, D., Sun, Y., Deng, L., Liu, Y., Martin-Trevino, R., Shang, L., McDermott, S.P., Landis, M.D., et al. (2014). Breast Cancer Stem Cells Transition between Epithelial and Mesenchymal States Reflective of their Normal Counterparts. *Stem Cell Reports* 2, 78–91.

Liu, X., Zhou, M., Mei, L., Ruan, J., Hu, Q., Peng, J., Su, H., Liao, H., Liu, S., Liu, W., et al. (2016). Key roles of necroptotic factors in promoting tumor growth. *Oncotarget* 7, 22219–22233.

Liu, Y., Chen, G.-Y., and Zheng, P. (2009). CD24-Siglec G/10 discriminates danger- from pathogen-associated molecular patterns. *Trends Immunol* 30, 557–561.

Longley, D.B., Harkin, D.P., and Johnston, P.G. (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 3, 330–338.

Lu, L., Dong, J., Wang, L., Xia, Q., Zhang, D., Kim, H., Yin, T., Fan, S., and Shen, Q. (2018). Activation of STAT3 and Bcl-2 and reduction of reactive oxygen species (ROS) promote radioresistance in breast cancer and overcome of radioresistance with niclosamide. *Oncogene* 37, 5292–5304.

Magné, N., Chargari, C., Conforti, R., Toillon, R.-A., Bauduceau, O., Védrine, L., Khayat, D., and Spano, J.-P. (2010). Mécanismes de résistance aux thérapeutiques moléculaires ciblées dans le cancer du sein : constats et perspectives. *Bulletin du Cancer* 97, 385–395.

Makki, J. (2015). Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clin Med Insights Pathol* 8, 23–31.

Malhotra, G.K., Zhao, X., Band, H., and Band, V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biology & Therapy* 10, 955–960.

Malmgren, J.A., Mayer, M., Atwood, M.K., and Kaplan, H.G. (2018). Differential presentation and survival of de novo and recurrent metastatic breast cancer over time: 1990–2010. *Breast Cancer Res Treat* 167, 579–590.

Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E.Ng., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., et al. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133, 704–715.

Mansoori, B., Mohammadi, A., Davudian, S., Shirjang, S., and Baradaran, B. (2017). The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Adv Pharm Bull* 7, 339–348.

Marullo, R., Werner, E., Degtyareva, N., Moore, B., Altavilla, G., Ramalingam, S.S., and Doetsch, P.W. (2013). Cisplatin Induces a Mitochondrial-ROS Response That Contributes to Cytotoxicity Depending on Mitochondrial Redox Status and Bioenergetic Functions. *PLOS ONE* 8, e81162.

Marusyk, A., Almendro, V., and Polyak, K. (2012). Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat Rev Cancer* 12, 323–334.

- Mathieu, M.C. Facteurs histopronostiques dans les carcinomes infiltrants. 2.
- Matsui, W.H. (2016). Cancer stem cell signaling pathways. *Medicine (Baltimore)* 95, S8–S19.
- Medema, J.P. (2013). Cancer stem cells: the challenges ahead. *Nat Cell Biol* 15, 338–344.
- Meffert, M.K., and Baltimore, D. (2005). Physiological functions for brain NF-kappaB. *Trends Neurosci* 28, 37–43.
- Meijering, E., Dzyubachyk, O., and Smal, I. (2012). Methods for Cell and Particle Tracking. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), pp. 183–200.
- Migdal, C., and Serres, M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Med Sci (Paris)* 27, 405–412.
- Mongroo, P.S., and Rustgi, A.K. (2010). The role of the miR-200 family in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Biol Ther* 10, 219–222.
- Morel, A.-P., Lièvre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S., and Puisieux, A. (2008). Generation of Breast Cancer Stem Cells through Epithelial-Mesenchymal Transition. *PLoS ONE* 3, e2888.
- Moulder, S. (2010a). Intrinsic resistance to chemotherapy in breast cancer. *Womens Health (Lond)* 6, 821–830.
- Moulder, S. (2010b). Intrinsic Resistance to Chemotherapy in Breast Cancer. *Womens Health (Lond Engl)* 6, 821–830.
- Moussa, Z., Judeh, Z.M.A., and Ahmed, S.A. (2019). Nonenzymatic Exogenous and Endogenous Antioxidants (IntechOpen).
- Moustakas, A., and Heldin, P. (2014). TGFβ and matrix-regulated epithelial to mesenchymal transition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1840, 2621–2634.
- Moyret-Lalle, C., Pommier, R., Bouard, C., Nouri, E., Richard, G., and Puisieux, A. (2016). Plasticité des cellules cancéreuses et dissémination métastatique. *Med Sci (Paris)* 32, 725–731.
- Mr, H., Pm, R., Tl, S., R, K., and Rk, H. (1994). Mapping of CD24 and homologous sequences to multiple chromosomal loci. *Genomics* 22, 154–161.
- Myers, D.J., and Walls, A.L. (2020). Atypical Breast Hyperplasia. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.
- Myung, J.H., Gajjar, K.A., Pearson, R.M., Launiere, C.A., Eddington, D.T., and Hong, S. (2011). Direct Measurements on CD24-Mediated Rolling of Human Breast Cancer MCF-7 Cells on E-selectin. *Anal Chem* 83, 1078–1083.
- N**ajafi, M., Farhood, B., and Mortezaee, K. (2018). Cancer stem cells (CSCs) in cancer progression and therapy. *Journal of Cellular Physiology* 234, 8381–8395.
- Nakaya, Y., and Sheng, G. (2008). Epithelial to mesenchymal transition during gastrulation: an embryological view. *Dev Growth Differ* 50, 755–766.

Nedeljković, M., and Damjanović, A. (2019). Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer—How We Can Rise to the Challenge. *Cells* 8, 957.

Nelson, R.A., Guye, M.L., Luu, T., and Lai, L.L. Survival Outcomes of Metaplastic Breast Cancer Patients: Results from a US Population-based Analysis. 8.

Niekerk, G. van, Davids, L.M., Hattingh, S.M., and Engelbrecht, A.-M. (2017). Cancer stem cells: A product of clonal evolution? *International Journal of Cancer* 140, 993–999.

Norgard, R.J., and Stanger, B.Z. (2021). Isolation and Identification of EMT Subtypes. In *The Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Methods and Protocols*, K. Campbell, and E. Theveneau, eds. (New York, NY: Springer US), pp. 315–326.

Nowell, P. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23–28.

Ohl, C., Albach, C., Altevogt, P., and Schmitz, B. (2003). N-glycosylation patterns of HSA/CD24 from different cell lines and brain homogenates: a comparison. *Biochimie* 85, 565–573.

Okuyama, H., Nogami, W., Sato, Y., Yoshida, H., Tona, Y., and Tanaka, Y. (2020). Characterization of CD44-positive Cancer Stem-like Cells in COLO 201 Cells. *Anticancer Res* 40, 169–176.

Ortiz-Montero, P., Liu-Bordes, W.-Y., Londoño-Vallejo, A., and Vernet, J.-P. (2018). CD24 expression and stem-associated features define tumor cell heterogeneity and tumorigenic capacities in a model of carcinogenesis. *CMAR* 10, 5767–5784.

Paget, S. (1989). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* 8, 98–101.

Pan, S.-T., Li, Z.-L., He, Z.-X., Qiu, J.-X., and Zhou, S.-F. (2016). Molecular mechanisms for tumour resistance to chemotherapy. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 43, 723–737.

Panda, M., and Biswal, B.K. (2019). Cell signaling and cancer: a mechanistic insight into drug resistance. *Mol Biol Rep* 46, 5645–5659.

Park, H.S., Jang, M.H., Kim, E.J., Kim, H.J., Lee, H.J., Kim, Y.J., Kim, J.H., Kang, E., Kim, S.-W., Kim, I.A., et al. (2014). High EGFR gene copy number predicts poor outcome in triple-negative breast cancer. *Mod Pathol* 27, 1212–1222.

Pasani, S., Sahoo, S., and Jolly, M.K. (2020). Hybrid E/M Phenotype(s) and Stemness: A Mechanistic Connection Embedded in Network Topology. *J Clin Med* 10, 60.

Pascussi, J.-M., Giraud, J., Samalin, E., Grillet, F., and Pannequin, J. (2016). Bases fondamentales du processus métastatique. *Bulletin du Cancer* 103, S39–S47.

Pastushenko, I., and Blanpain, C. (2019). EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends in Cell Biology* 29, 212–226.

Pastushenko, I., Brisebarre, A., Sifrim, A., Fioramonti, M., Revenco, T., Boumahdi, S., Van Keymeulen, A., Brown, D., Moers, V., Lemaire, S., et al. (2018). Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature* 556, 463–468.

Peinado, H., Zhang, H., Matei, I.R., Costa-Silva, B., Hoshino, A., Rodrigues, G., Psaila, B., Kaplan, R.N., Bromberg, J.F., Kang, Y., et al. (2017). Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases. *Nature Reviews Cancer* 17, 302–317.

Pelicano, H., Zhang, W., Liu, J., Hammoudi, N., Dai, J., Xu, R.-H., Pusztai, L., and Huang, P. (2014). Mitochondrial dysfunction in some triple-negative breast cancer cell lines: role of mTOR pathway and therapeutic potential. *Breast Cancer Research* 16, 434.

Penault-Llorca, F. (2014). Les signatures moléculaires dans le -cancer du sein : le point de vue du pathologiste. Mis e au point 4.

Peppercorn, J., Perou, C.M., and Carey, L.A. (2008). Molecular Subtypes in Breast Cancer Evaluation and Management: Divide and Conquer. *Cancer Investigation* 26, 1–10.

Perillo, B., Di Donato, M., Pezone, A., Di Zazzo, E., Giovannelli, P., Galasso, G., Castoria, G., and Migliaccio, A. (2020). ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. *Exp Mol Med* 52, 192–203.

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., Akslén, L.A., et al. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747–752.

Pinamonti, M., and Zanconati, F. (2018). Normal Breast. *Breast Cytopathology* 24, 20–24.

Piperno-Neumann, S. (2013). Sarcomes du sein.

Polyak, K. (2007). Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest* 117, 3155–3163.

Polyak, K., and Weinberg, R.A. (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 9, 265–273.

Pons, D.G., Nadal-Serrano, M., Torrens-Mas, M., Valle, A., Oliver, J., and Roca, P. (2015). UCP2 inhibition sensitizes breast cancer cells to therapeutic agents by increasing oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 86, 67–77.

Prat, A., Parker, J.S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J.I., He, X., and Perou, C.M. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* 12, R68.

Qu, C., Liang, Z., Huang, J., Zhao, R., Su, C., Wang, S., Wang, X., Zhang, R., Lee, M.-H., and Yang, H. (2012). MiR-205 determines the radioresistance of human nasopharyngeal carcinoma by directly targeting PTEN. *Cell Cycle* 11, 785–796.

Ranganathan, P., Weaver, K.L., and Capobianco, A.J. (2011). Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time. *Nat Rev Cancer* 11, 338–351.

Redza-Dutordoir, M., and Averill-Bates, D.A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1863, 2977–2992.

Rivlin, N., Brosh, R., Oren, M., and Rotter, V. (2011). Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene. *Genes Cancer* 2, 466–474.

Roca, H., Hernandez, J., Weidner, S., McEachin, R.C., Fuller, D., Sud, S., Schumann, T., Wilkinson, J.E., Zaslavsky, A., Li, H., et al. (2013). Transcription Factors OVOL1 and OVOL2 Induce the Mesenchymal to Epithelial Transition in Human Cancer. *PLoS ONE* 8, e76773.

Rougon, G., Alterman, L.A., Dennis, K., Guo, X.J., and Kinnon, C. (1991). The murine heat-stable antigen: a differentiation antigen expressed in both the hematolymphoid and neural cell lineages. *Eur J Immunol* 21, 1397–1402.

Rowe, L.A., Degtyareva, N., and Doetsch, P.W. (2008). DNA damage-induced reactive oxygen species (ROS) stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radical Biology and Medicine* 45, 1167–1177.

Runz, S., Mierke, C.T., Joumaa, S., Behrens, J., Fabry, B., and Altevogt, P. (2008). CD24 induces localization of beta1 integrin to lipid raft domains. *Biochem Biophys Res Commun* 365, 35–41.

Sabatier, R., Finetti, P., Guille, A., Adelaide, J., Chaffanet, M., Viens, P., Birnbaum, D., and Bertucci, F. (2014). Claudin-low breast cancers: clinical, pathological, molecular and prognostic characterization. *Mol Cancer* 13, 228.

Saitoh, M. (2018). Involvement of partial EMT in cancer progression. *The Journal of Biochemistry* 164, 257–264.

Saman, H., Raza, S.S., Uddin, S., and Rasul, K. (2020). Inducing Angiogenesis, a Key Step in Cancer Vascularization, and Treatment Approaches. *Cancers* 12, 1172.

Samarasinghe, B. Hallmarks of Cancer 3: Evading Apoptosis.

Santamaría, P.G., Moreno-Bueno, G., and Cano, A. (2019). Contribution of Epithelial Plasticity to Therapy Resistance. *J Clin Med* 8, 676.

Sarniak, A., Lipińska, J., Tytman, K., and Lipińska, S. (2016). Endogenous mechanisms of reactive oxygen species (ROS) generation. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 70, 1150–1165.

Schabath, H. (2006). CD24 affects CXCR4 function in pre-B lymphocytes and breast carcinoma cells. *Journal of Cell Science* 119, 314–325.

Scheel, C., and Weinberg, R.A. (2012). Cancer stem cells and epithelial–mesenchymal transition: Concepts and molecular links. *Semin Cancer Biol* 22, 396–403.

Schindelman, S., Windisch, J., Grundmann, R., Kreienberg, R., Zeillinger, R., and Deissler, H. (2002). Expression Profiling of Mammary Carcinoma Cell Lines: Correlation of in vitro Invasiveness with Expression of CD24. *TBI* 23, 139–145.

Schlesinger, M. (2018). Role of platelets and platelet receptors in cancer metastasis. *Journal of Hematology & Oncology* 11, 125.

Screaton, G.R., Bell, M.V., Jackson, D.G., Cornelis, F.B., Gerth, U., and Bell, J.I. (1992). Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *PNAS* 89, 12160–12164.

- Ségal-Bendirdjian, E., and Geli, V. (2019). Non-canonical Roles of Telomerase: Unraveling the Imbroglia. *Front. Cell Dev. Biol.* 7.
- Shackleton, M., Quintana, E., Fearon, E.R., and Morrison, S.J. (2009). Heterogeneity in Cancer: Cancer Stem Cells versus Clonal Evolution. *Cell* 138, 822–829.
- Sharda, A., Rashid, M., Shah, S.G., Sharma, A.K., Singh, S.R., Gera, P., Chilkapati, M.K., and Gupta, S. (2020). Elevated HDAC activity and altered histone phospho-acetylation confer acquired radio-resistant phenotype to breast cancer cells. *Clinical Epigenetics* 12, 4.
- Sher, G., Salman, N.A., Khan, A.Q., Prabhu, K.S., Raza, A., Kulinski, M., Dermime, S., Haris, M., Junejo, K., and Uddin, S. (2020). Epigenetic and breast cancer therapy: Promising diagnostic and therapeutic applications. *Seminars in Cancer Biology*.
- Sheridan, C., Kishimoto, H., Fuchs, R.K., Mehrotra, S., Bhat-Nakshatri, P., Turner, C.H., Goulet, R., Badve, S., and Nakshatri, H. (2006). CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res* 8, R59.
- Shibue, T., and Weinberg, R.A. (2017). EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol* 14, 611–629.
- Shulewitz, M., Soloviev, I., Wu, T., Koeppen, H., Polakis, P., and Sakanaka, C. (2006). Repressor roles for TCF-4 and Sfrp1 in Wnt signaling in breast cancer. *Oncogene* 25, 4361–4369.
- Sia, J., Szmyd, R., Hau, E., and Gee, H.E. (2020). Molecular Mechanisms of Radiation-Induced Cancer Cell Death: A Primer. *Front. Cell Dev. Biol.* 8.
- Simons, K., and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 31–39.
- Singh, A., and Settleman, J. (2010). EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 29, 4741–4751.
- Singh, S.S., Vats, S., Chia, A.Y.-Q., Tan, T.Z., Deng, S., Ong, M.S., Arfuso, F., Yap, C.T., Goh, B.C., Sethi, G., et al. (2018). Dual role of autophagy in hallmarks of cancer. *Oncogene* 37, 1142–1158.
- Sinha, D., Saha, P., Samanta, A., and Bishayee, A. (2020). Emerging Concepts of Hybrid Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer Progression. *Biomolecules* 10, 1561.
- Song, H., Li, D., Wu, T., Xie, D., Hua, K., Hu, J., Deng, X., Ji, C., Deng, Y., and Fang, and L. (2018). MicroRNA-301b promotes cell proliferation and apoptosis resistance in triple-negative breast cancer by targeting CYLD. *BMB Reports* 51, 602–607.
- Springer, T., Galfrè, G., Secher, D.S., and Milstein, C. (1978). Monoclonal xenogeneic antibodies to murine cell surface antigens: identification of novel leukocyte differentiation antigens. *Eur J Immunol* 8, 539–551.
- Sulaiman, A., Yao, Z., and Wang, L. (2018). Re-evaluating the role of epithelial-mesenchymal-transition in cancer progression. *J Biomed Res* 32, 81–90.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 71, 209–249.

Suyama, K., Onishi, H., Imaizumi, A., Shinkai, K., Umebayashi, M., Kubo, M., Mizuuchi, Y., Oda, Y., Tanaka, M., Nakamura, M., et al. (2016). CD24 suppresses malignant phenotype by downregulation of SHH transcription through STAT1 inhibition in breast cancer cells. *Cancer Lett* 374, 44–53.

Tanei, T., Morimoto, K., Shimazu, K., Kim, S.J., Tanji, Y., Taguchi, T., Tamaki, Y., and Noguchi, S. (2009). Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. *Clin Cancer Res* 15, 4234–4241.

Tang, D., Chen, X., Kang, R., and Kroemer, G. (2021). Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications. *Cell Res* 31, 107–125.

Tao, Z., Shi, A., Lu, C., Song, T., Zhang, Z., and Zhao, J. (2015). Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell Biochem Biophys* 72, 333–338.

Terry, S., Savagner, P., Ortiz-Cuaran, S., Mahjoubi, L., Saintigny, P., Thiery, J., and Chouaib, S. (2017). New insights into the role of EMT in tumor immune escape. *Mol Oncol* 11, 824–846.

Thakur, B., Kumar, Y., and Bhatia, A. (2019). Programmed necrosis and its role in management of breast cancer. *Pathology - Research and Practice* 215, 152652.

Tsang, J.Y.S., and Tse, G.M. (2019). Molecular Classification of Breast Cancer. *Adv Anat Pathol* 27, 9.

Turashvili, G., and Brogi, E. (2017). Tumor Heterogeneity in Breast Cancer. *Front. Med.* 4, 227.

Turnbull, C., and Rahman, N. (2008). Genetic Predisposition to Breast Cancer: Past, Present, and Future. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* 9, 321–345.

Valastyan, S., and Weinberg, R.A. (2011). Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell* 147, 275–292.

Vesuna, F., Lisok, A., Kimble, B., and Raman, V. (2009). Twist Modulates Breast Cancer Stem Cells by Transcriptional Regulation of CD24 Expression. *Neoplasia* 11, 1318–1328.

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

Vu, T., and Datta, P.K. (2017). Regulation of EMT in Colorectal Cancer: A Culprit in Metastasis. *Cancers* 9, 171.

Vučetić, M., Cormerais, Y., Parks, S.K., and Pouyssegur, J. (2017). The Central Role of Amino Acids in Cancer Redox Homeostasis: Vulnerability Points of the Cancer Redox Code. *Front. Oncol.* 7, 319.

W, L., Hp, L., Wc, Y., Hd, L., Q, S., Ml, Z., W, S., Jb, Z., L, Z., and Ch, H. (2013). Elevated cerebral cortical CD24 levels in patients and mice with traumatic brain injury: a potential negative role in nuclear factor kb/inflammatory factor pathway. *Mol Neurobiol* 49, 187–198.

Wang, D.-Y. Molecular stratification within triple-negative breast cancer subtypes. 10.

Wang, K., Zhu, X., Zhang, K., Yin, Y., Chen, Y., and Zhang, T. (2018). Interleukin-6 contributes to chemoresistance in MDA-MB-231 cells via targeting HIF-1 α . *J Biochem Mol Toxicol* 32, e22039.

Warburg, O.H., Dickens, F., and Kaiser-Wilhelm-Institut für Biologie (1930). *The metabolism of tumours; investigations from the Kaiser Wilhelm institute for biology, Berlin-Dahlem*, (London: Constable & Co. Ltd.).

Weigelt, B. Clinical insights: Metaplastic breast carcinoma: more than a special type. 2.

Weigelt, B., Horlings, H., Kreike, B., Hayes, M., Hauptmann, M., Wessels, L., de Jong, D., Van de Vijver, M., Veer, L.V., and Peterse, J. (2008). Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J. Pathol.* 216, 141–150.

Wicha, M.S., Liu, S., and Dontu, G. (2006). Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res* 66, 1883–1890; discussion 1895-1896.

Wirapati, P., Sotiriou, C., Kunkel, S., Farmer, P., Pradervand, S., Haibe-Kains, B., Desmedt, C., Ignatiadis, M., Sengstag, T., Schütz, F., et al. (2008). Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. *Breast Cancer Res* 10, R65.

Wu, J., Jiang, J., Chen, B., Wang, K., Tang, Y., and Liang, X. (2021). Plasticity of cancer cell invasion: Patterns and mechanisms. *Translational Oncology* 14, 100899.

Wu, T.-S., Lin, B.-R., and Chang, H.-H. (2015). Radio Resistance Mechanisms of Cancers: An Overview and Future Perspectives. *Biol Med (Aligarh)* s2.

Wu, Y., Alvarez, M., Slamon, D.J., Koeffler, P., and Vadgama, J.V. (2010). Caspase 8 and maspin are downregulated in breast cancer cells due to CpG site promoter methylation. *BMC Cancer* 10, 32.

Xu, H., Tian, Y., Yuan, X., Wu, H., Liu, Q., Pestell, R.G., and Wu, K. (2015). The role of CD44 in epithelial–mesenchymal transition and cancer development. *Onco Targets Ther* 8, 3783–3792.

Xu, X., Zhang, M., Xu, F., and Jiang, S. (2020). Wnt signaling in breast cancer: biological mechanisms, challenges and opportunities. *Molecular Cancer* 19, 165.

Yan, H., Malik, N., Kim, Y.-I., He, Y., Li, M., Dubois, W., Liu, H., Peat, T.J., Nguyen, J.T., Tseng, Y.-C., et al. (2021). Fatty acid oxidation is required for embryonic stem cell survival during metabolic stress. *EMBO Rep* 22, e52122.

Yang, C., Cao, M., Liu, Y., He, Y., Du, Y., Zhang, G., and Gao, F. (2019). Inducible formation of leader cells driven by CD44 switching gives rise to collective invasion and metastases in luminal breast carcinomas. *Oncogene* 38, 7113–7132.

Yang, H., Villani, R.M., Wang, H., Simpson, M.J., Roberts, M.S., Tang, M., and Liang, X. (2018). The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 37, 266.

Yang, J., Antin, P., Berx, G., Blanpain, C., Brabletz, T., Bronner, M., Campbell, K., Cano, A., Casanova, J., Christofori, G., et al. (2020). Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 341–352.

Yann, C. (2019). Haute Autorité de santé. 64.

Yeldag, G., Rice, A., and Del Río Hernández, A. (2018). Chemoresistance and the Self-Maintaining Tumor Microenvironment. *Cancers* 10, 471.

Yin, S.-S., and Gao, F.-H. (2020). Molecular Mechanism of Tumor Cell Immune Escape Mediated by CD24/Siglec-10. *Front Immunol* 11, 1324.

Yoshida, T., Goto, S., Kawakatsu, M., Urata, Y., and Li, T.-S. (2012). Mitochondrial dysfunction, a probable cause of persistent oxidative stress after exposure to ionizing radiation. *Free Radic Res* 46, 147–153.

Yu, M., Bardia, A., Wittner, B.S., Stott, S.L., Smas, M.E., Ting, D.T., Isakoff, S.J., Ciciliano, J.C., Wells, M.N., Shah, A.M., et al. (2013). Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science* 339, 580–584.

Yuan, X., Zhang, L., Huang, Y., Liu, D., Peng, P., Liu, S., Long, G., Hu, G., and Sun, W. (2021). Induction of interleukin-6 by irradiation and its role in epithelial mesenchymal transition and radioresistance of nasopharyngeal carcinoma cells. *Head Neck* 43, 757–767.

Zardavas, D., Irrthum, A., Swanton, C., and Piccart, M. (2015). Clinical management of breast cancer heterogeneity. *Nat Rev Clin Oncol* 12, 381–394.

Zeng, J., Sauter, E.R., and Li, B. (2020). FABP4: A New Player in Obesity-Associated Breast Cancer. *Trends Mol Med* 26, 437–440.

Zhang, X., and Bai, W. (2016). Repression of phosphoglycerate dehydrogenase sensitizes triple-negative breast cancer to doxorubicin. *Cancer Chemother Pharmacol* 78, 655–659.

Zhang, D., Tang, D.G., and Rycaj, K. (2018). Cancer stem cells: regulation programs, immunological properties and immunotherapy. *Semin Cancer Biol* 52, 94–106.

Zhang, P., Wang, L., Rodriguez-Aguayo, C., Yuan, Y., Debeb, B.G., Chen, D., Sun, Y., You, M.J., Liu, Y., Dean, D.C., et al. (2014). miR-205 acts as a tumour radiosensitizer by targeting ZEB1 and Ubc13. *Nat Commun* 5, 5671.

Zhang, P., Zheng, P., and Liu, Y. (2019). Amplification of the CD24 Gene Is an Independent Predictor for Poor Prognosis of Breast Cancer. *Front Genet* 10.

Zhang, Q., Zhu, B., and Li, Y. (2017). Resolution of Cancer-Promoting Inflammation: A New Approach for Anticancer Therapy. *Front. Immunol.* 8.

Zheng, H.-C. (2017). The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. *Oncotarget* 8, 59950–59964.

Zheng, X., Carstens, J.L., Kim, J., Scheible, M., Kaye, J., Sugimoto, H., Wu, C.-C., LeBleu, V.S., and Kalluri, R. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature* 527, 525–530.

Zhu, X., Chen, H.-H., Gao, C.-Y., Zhang, X.-X., Jiang, J.-X., Zhang, Y., Fang, J., Zhao, F., and Chen, Z.-G. (2020). Energy metabolism in cancer stem cells. *World J Stem Cells* 12, 448–461.

Titre : CD24 : un nouvel acteur de la résistance aux traitements et de la plasticité cellulaire dans les cancers du sein

Mots clés : cancer du sein, résistance, hétérogénéité tumorale, phénotype hybride E/M, CD24

Résumé : La caractérisation de cellules résistantes aux traitements à l'origine des récidives et rechutes est un enjeu majeur de la recherche contre les cancers du sein. La plasticité tumorale, caractérisée par l'existence des cellules souches cancéreuses (CSC) et des processus de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), est à l'origine de l'hétérogénéité intratumorale et participe à la formation de cellules cancéreuses aux propriétés de tumorigénicité et de résistance à la mort cellulaire singulières.

Dans les cancers du sein, l'absence d'expression de la protéine membranaire CD24 caractérise les CSCs et les cellules générées par la TEM. Malgré le fait que CD24 soit un marqueur important des cancers du sein, ses fonctions précises au cours de la cancérogenèse ainsi que son éventuel rôle dans la résistance aux traitements, restent très mal définis.

Ce travail de thèse s'intéresse particulièrement au rôle de la protéine CD24 dans les cancers du sein en tant qu'acteur de la résistance thérapeutique.

Dans la première partie de mon travail, nous avons montré que la perte artificielle de l'expression de CD24 dans les cellules cancéreuses épithéliales mammaires entraîne à elle seule une augmentation de la résistance à aux radiations et à différentes drogues anticancéreuses. Cette résistance apparait associée à la modulation du niveau d'espèces

réactives de l'oxygène (ROS). En effet, la perte d'expression de CD24 entraîne une diminution de la masse et des fonctions mitochondriales à l'origine d'une baisse du niveau de ROS intracellulaire ce qui participe à la radio- et chimiorésistance des cellules. De plus, nos résultats montrent que les cellules CD24⁻ expriment majoritairement des marqueurs épithéliaux (E) tout en présentant une augmentation de l'expression des marqueurs mésenchymateux (M) ainsi que de l'activité aldéhyde déshydrogénase (ALDH). Dans la littérature, ces caractéristiques définissent des cellules de phénotype hybride E/M qui sont considérées comme les cellules les plus plastiques et tumorigènes car fortement enrichies en propriétés souches.

Dans la deuxième partie de mon travail, nous avons initié une étude transcriptomique afin de mieux comprendre le rôle de CD24 dans la progression tumorale et la résistance aux traitements. Les premiers résultats obtenus indiquent que la perte de CD24 semble liée à l'acquisition de propriétés migratoires.

L'ensemble de ces résultats sont d'autant plus importants que le développement d'un modèle de cellules hybrides E/M permet d'étudier de nouvelles cibles pour lutter contre l'échec thérapeutique.

Title : CD24 : a new player in treatment resistance and cell plasticity in breast cancer

Keywords : Breast cancer, Resistance, Tumor heterogeneity, hybrid phenotype E/M, CD24

Abstract: Characterizing cells resistant to treatments is a major issue in research on breast cancer (BC). Tumor plasticity characterized by cancer stem cells (CSCs) existence and processes of epithelial-mesenchymal transition (EMT), leads to tumor heterogeneity and takes part in the genesis of cancer cells harboring specific tumorigenic and cell death resistance properties.

In BC, the lack of expression of the membrane protein CD24 is a feature of CSCs and EMT-generated cells. Although being a crucial marker in BC, CD24 precise functions along oncogenesis and its role in treatment resistance remain largely unknown.

This thesis work focuses mainly on CD24 role as a player in treatment resistance of BC. In the first part of my work, we have shown that forced extinction of CD24 in mammary epithelial cancer cells is sufficient to increase resistance to radiations and diverse drugs. This resistance is linked to the ROS level modulation. Indeed, the loss of CD24 expression drives a decrease in mitochondrial mass and functions,

leading to a diminished intracellular ROS level, which participates in radio- and chemoresistance of BC cells. Moreover, our results show that CD24⁻ cells express mainly epithelial markers, but also show an increase of mesenchymal markers and aldehyde dehydrogenase activity. In the literature, these features define cells with a hybrid E/M phenotype, and considered, since they exhibit strong stem characteristics, as the most plastic and tumorigenic cells.

In the second part of my work, we initiated a transcriptome study to better understand CD24 role in tumor progression and treatment resistance. The first results indicate that the loss of CD24 could be linked to a higher motility of cells.

Those results are of utmost importance since the development of such a model of hybrid E/M cells can facilitate the discovery of new targets to fight against treatment failure.