



HAL
open science

Rôle des inhibiteurs de PARP dans le mimétisme vasculaire des cellules tumorales mammaires

Justine Chivot

► **To cite this version:**

Justine Chivot. Rôle des inhibiteurs de PARP dans le mimétisme vasculaire des cellules tumorales mammaires. Biochimie, Biologie Moléculaire. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT : 2022SORUS560 . tel-04115880

HAL Id: tel-04115880

<https://theses.hal.science/tel-04115880>

Submitted on 2 Jun 2023

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.

Sorbonne Université

Ecole doctorale 934 : Physiologie, physiopathologie et thérapeutique

UMRS938 : Centre de Recherche Saint-Antoine, Equipe biologie et thérapeutique du cancer

Rôle des inhibiteurs de PARP dans le mimétisme vasculaire des cellules tumorales mammaires

Par **Justine Chivot**

Thèse de doctorat de Biologie

Dirigée par Michèle Sabbah

Présentée et soutenue publiquement le 15/09/2022

Devant un jury composé de :

Pr. Houard Xavier,

Dr. Lallemand François

Pr. Vasse Marc

Dr. Boissan Mathieu

Dr. De La Motte Rouge Thibault

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur



Remerciements

Merci au programme doctoral de l'ED394 « Physiologie, physiopathologie et thérapeutique » d'avoir financé mes 3 années de thèse ainsi qu'une année supplémentaire nécessaire à la finalisation de mon travail.

Dans un premier temps je souhaite remercier chaleureusement **les membres du jury** d'avoir accepté de juger mon travail de thèse. L'évaluation d'une thèse est un travail long et consciencieux et je vous remercie d'avoir pris le temps de le faire. Merci aux rapporteurs, le **Professeur Marc Vasse** et le **Professeur François Lallemand** d'avoir pris le temps d'étudier mon manuscrit. Merci au **Docteur Mathieu Boissan** et au **Docteur Thibault De La Motte Rouge** d'avoir accepté d'être examinateurs. Et merci au **Professeur Xavier Houard** d'avoir accepté la présidence de mon jury de thèse.

Je souhaite à remercier tout particulièrement ma directrice de thèse, **Docteur Michèle Sabbah**, pour m'avoir fait confiance et m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Merci de m'avoir guidé tout en me laissant l'autonomie nécessaire à la réalisation de mon projet. Tu m'as toujours laissé ta porte ouverte et je t'en remercie. Mon expérience au sein de ton laboratoire m'a permis d'acquérir de nombreuses compétences qui me seront utiles par la suite. En tant que directrice de l'équipe, merci de m'avoir acceptée et intégrée au sein de l'équipe « Biologie et Thérapeutique du cancer ». Tu m'as permis d'effectuer ma thèse dans de meilleures conditions qu'elle n'avait commencées dans une autre équipe, et de m'offrir de très belles rencontres au sein de cette équipe.

Un grand merci à **Annie Munier** pour m'avoir enseigné la cytométrie et pour ta constante bonne humeur. Tu m'as été d'une grande aide. Merci à **Romain Morichon**, pour m'avoir initiée à l'Olympus et pour sa patience, mais aussi pour sa grande sympathie. Merci pour ton temps, et de m'avoir permis d'obtenir ces milliers de photos.

Je tiens également à remercier l'équipe du 1^{er} et du 8^{ème} étage dans sa globalité.

Merci au **Docteur Nathalie Ferrand** pour tes conseils scientifiques et ton expertise. Pour ces repas, ces discussions, ta grande disponibilité et ton aide indéniable tout au long de cette thèse.

Merci à **Aude**, pour ta gentillesse et ta sympathie. C'était un plaisir que de travailler avec toi, je te souhaite le meilleur pour la suite. Merci à **Eric**, toujours prêt à partager ses connaissances au besoin, et dont les travaux ont toujours été très intéressants à découvrir.

Merci à tous les doctorants passés et présents du laboratoire.

L'ancienne « *Estudiante* » de chez Santos, je nomme **Elodie Pramil**. Une grande chercheuse dans l'âme. Toujours pertinente dans ses conseils et toujours la bonne idée pour faire avancer. Tu as fait une excellente thèse, et tu as été l'exemple à atteindre pendant mes années de thèse. Quelle force de caractère ! ;) Tu m'as été d'un grand soutien et c'était un plaisir de te rencontrer chez Santos, de te suivre à Saint-Antoine, et puisque l'on se suit toujours, je t'attends donc l'année prochaine sur Bordeaux ! Je te souhaite une belle et grande carrière, si la recherche était faite d'ElodieS PramilS, tout irait beaucoup plus vite.

Lila, je suis très heureuse d'avoir pu travailler à tes côtés. Je tiens à te remercier pour toute ton aide et tes conseils. Tu es une personne qui est toujours prête à aider les autres, tu es un des piliers du laboratoire. Celle qui connaît tout, qui sait où est tout, celle qu'on va voir quand on en a marre de travailler et qu'on veut papoter, celle qu'on va voir quand on a cassé quelque chose et qu'on ne sait pas quoi faire, et c'est toujours un plaisir de pouvoir rigoler avec toi. Je te souhaite plein de belles choses et une belle carrière de chercheuse !

Mehdi, merci pour toutes tes imitations, ta bonne humeur mais également tes râleries qui étaient toujours à mourir de rire. Pour toutes tes bêtises, tes danses, ton talent théâtral, mais également pour m'avoir formée lors de mon arrivée et pour avoir pris le temps de m'aider continuellement. En bref, tu as animé le laboratoire et je t'en remercie !

À mes copines de bureau : **Katyana** et **Clémentine**. Lorsque l'on dit qu'une thèse ne se fait pas toute seule, c'est bien à vous que je pense. **Clem**, ma copine de sport, mon inspiration musculaire, ma conseillère vestimentaire, la source de nombreuses marrades et de nombreux ragotages. La source de bleus quand tu m'as visée avec un nerf. Nous avons trouvé un chemin pour nous entendre et je suis contente de te compter parmi mes amies. Professionnellement, tu m'as impressionnée par ta grande capacité de travail, qui te sert actuellement dans ta carrière et tu peux en être fière. Tu es une très belle rencontre et je te souhaite le meilleur ! Comme disait ta dernière attaque de post-it « tu es le cheveu lisse de mon cheveu bouclé ».

Kat-Kat, j'ai appris à te connaître et je n'ai pas été déçue du voyage ! Je connais grâce à toi toute la Martinique et il me tarde d'y aller. Je suis infiniment contente d'avoir pu te rencontrer

et d'avoir tissé une belle amitié avec toi. Tu m'as toujours donné de d'excellents conseils, et tu as été un réel mentor et un exemple à suivre. J'ai aimé toutes nos discussions d'actualités, nos repas, nos papotages, ton humour premier degré qui m'a valu nombreux fous rires. Je te remercie pour ton soutien et ta bonne humeur sans faille. Ma thèse n'aurait pas été la même sans toi. J'ai tant appris à tes côtés que je sais d'avance à quel point tu seras une brillante enseignante chercheuse et je te souhaite le meilleur.

À mes nouvelles copines de bureau **Lara** et **Aurélia**, le gang des filles du fond. La relève est là ! En peu de temps vous avez pris une place importante dans ma thèse et je suis contente d'avoir pu passer cette dernière année avec vous. Je n'aurais pas rêvé mieux. Nos discussions vont me manquer, nos pauses cafés journalières, nos gossipages journaliers... **Aurélia**, je ne pensais pas rencontrer une personne avec une telle bienveillance et intelligence émotionnelle, toujours à essayer de comprendre l'autre, avec un tel esprit sportif ! **Lara**, à l'inverse, (non je rigole hahaha). Lara, tu m'as fait réaliser que je n'étais pas si pipelette que ça. ;) Plus sérieusement, j'ai découvert une super personne avec qui j'adore passer mes journées et papoter pendant des heures. Vous êtes deux belles rencontres de cette thèse. Vous avez toutes les deux les capacités pour aller très loin, et je vous souhaite tout le meilleur pour vos projets respectifs. J'ai hâte d'assister à vos soutenances !

Je n'oublie pas non plus **Sandrinette**, qui m'a fait beaucoup rire et qui m'a également bien aidée ! Ainsi que ceux qui sont passés plus rapidement, **Marjo**, **Adrien**, **Romain**, mais également plus récemment **Salah**, **Madara**, **Dorine**, tant de stagiaires qui ont rendu l'ambiance encore plus folle et agréable :D Merci aux copains de thèse au sens large, ceux que j'ai rencontré lors des comités organisateurs, ou ceux que j'ai rencontrés à mon café autour d'une bière lors des « CRSAPEROO ». Une pensée particulière à **Henri**, dont les balades l'amènent souvent au premier étage et qui a toujours des discussions intéressantes à proposer pour se distraire.

Je souhaiterais aussi saluer **Ludovic Jondreville**. C'était un plaisir de te rencontrer et de pouvoir écouter tes mille et une anecdotes hospitalières toujours plus loufoques les unes que les autres. Nos discussions m'ont toujours beaucoup plu et peut-être nous reverrons-nous en tant que collègues un jour !

Je remercie aussi mes petites cellules, qui m'ont fait parfois des misères en se suicidant, ou à l'inverse en décidant de résister à toutes les épreuves. Qui parfois ont sympathisé avec des bactéries ou des champignons, mais qui se sont laissées apprivoiser au fil des années.

Enfin, je tiens à remercier mes proches. Merci à mes **parents**, qui m'ont permis de faire ces longues études et qui me soutiennent depuis toujours. Qui m'ont toujours poussée à aller plus loin, qui m'ont donné les clefs pour y arriver et être la personne que je suis aujourd'hui et je vous remercie infiniment pour cela. Merci pour votre soutien. Sans vous je n'en serais pas là merci !

Je pense également à mes **sœurs**, qui sont des sœurs exceptionnelles (et je ne dis pas cela parce que l'on se ressemble) ! Vous êtes de beaux exemples de réussites, et je vous remercie de votre soutien, de votre temps et de votre aide constante.

A mes **amis**, la bande de Saintes, qui m'ont toujours permis de m'évader quand j'en avais besoin. Un merci particulier à **Audrey** et **Alice**, des amies fidèles, qui m'ont beaucoup soutenu dans cette thèse et qui malgré la distance restent là. Il me tarde de continuer les aventures que nous réserve la vie à vos côtés.

Aux « **filles** », **Mel**, **Celia**, et **Béa**. Une belle bande de biologistes, dont les liens ne se délient pas et dont un œil nous unies maintenant !

Et pour finir un énorme merci à **Baptiste**. Tu as été dans ce projet mon Robin, mon Luigi, ma Debra, mon R2-D2, mon Watson, bref, mon partenaire. Merci de m'avoir soutenu lors de mon changement de laboratoire ainsi que dans les moments difficiles. Tu as toujours eu la capacité intellectuelle de comprendre les problèmes et d'y apporter des solutions, de scientifiquement voir ce qui était correct ou pas. Tu as toujours eu la capacité émotionnelle de m'écouter quand j'en avais besoin, même quand je parlais pendant des heures. Merci de m'avoir aidé, de m'avoir poussé à ne pas lâcher, de tout le temps que tu as consacré à mon travail. Tu me pousses vers le haut, et il me tarde de continuer l'aventure à Bordeaux avec toi. Merci pour tout.

Et comme dirait Snoop Dogh « Last but not least, I wanna thank me, for believing in me, for doing all this hard work, for never quitting ».

Résumé

Le cancer du sein, malgré les avancées thérapeutiques, reste la première cause de mortalité par cancer chez la femme en raison principalement de sa faculté à développer des métastases dans des tissus vitaux. Il est largement admis que les tumeurs ont besoin d'un apport sanguin pour survivre, croître et métastaser. Ce concept est inextricable à l'angiogenèse, processus qui correspond à la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins au sein d'une tumeur. Cependant, il est maintenant établi que la vasculogénèse tumorale n'est pas nécessairement attribuée aux seules cellules endothéliales. Dans certaines tumeurs les cellules tumorales elles-mêmes peuvent former des réseaux, un phénomène que l'on appelle mimétisme vasculaire (VM) et qui est souvent associé à des phénotypes hautement invasifs et métastatiques.

Les inhibiteurs de poly-(ADP-ribose)-polymérase (PARPi) représentent une nouvelle arme thérapeutique dans les cancers du sein agressifs présentant une mutation des gènes suppresseurs de tumeurs BRCA1 et BRCA2. Ils exercent des activités anti-tumorales et des études récentes ont mis en évidence leurs effets anti-angiogéniques. En revanche leurs effets sur le mimétisme vasculaire restent peu étudiés dans le cadre du cancer du sein. Les objectifs de cette thèse ont été de déterminer les effets des PARPi sur la capacité des cellules tumorales mammaires à former des réseaux de mimétisme vasculaire, et à comprendre les mécanismes impliqués.

In vitro à travers des expériences de formation de tubes nous avons pu montrer que 3 PARPi (Olaparib, Talazoparib et Veliparib) sont capables d'inhiber la formation de réseaux de plusieurs lignées classifiées triples négatives du cancer du sein. Cette inhibition est indépendante du statut BRCA des tumeurs. En explorant les mécanismes impliqués dans cette inhibition, nous avons pu mettre en évidence dans le sécrétome des cellules traitées par l'Olaparib une diminution de certaines protéines régulées par NF- κ B et impliquées dans l'angiogenèse comme PTX3, Serpine-E1, uPA, VEGF et IL-8. De plus, lorsque le facteur NF- κ B est inhibé par un inhibiteur spécifique, nous retrouvons les mêmes effets sur le VM que ceux observés par les traitements PARPi, confirmant l'implication de cette voie de signalisation. Nous avons également démontré que l'expression de la protéine PTX3 était suffisante pour contrecarrer les effets des PARPi sur la formation du VM.

Les travaux présentés dans cette thèse ont permis de montrer que les inhibiteurs de PARP peuvent inhiber le VM dans les cellules agressives tumorales mammaires, et cela peut être expliqué par l'inhibition de la voie de signalisation NF- κ B et des protéines régulées par cette voie et impliquées dans l'angiogenèse. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de PARP pourrait avoir de nouvelles implications thérapeutiques pour les cancers du sein les plus agressifs.

Sommaire

REMERCIEMENTS	1
RESUME	5
ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES	9
LISTE DES FIGURES	12
LISTE DES TABLEAUX	14
INTRODUCTION	15
CHAPITRE 1 : LE CANCER DU SEIN	16
I. Le cancer du sein	16
I.1. Anatomie du sein	16
I.2. Epidémiologie	18
I.3. Classification des cancers du sein	18
I.3.A. Classification histologique	19
I.3.B. Classification moléculaire	19
I.3.C. Classification TNM	22
I.4. Facteurs de risques	25
I.4.A. Les risques intrinsèques	25
I.4.B. Les risques extrinsèques	29
II. Développement du cancer du sein	32
II.1. La tumorigenèse	32
II.2. Transition épithélio-mésenchymateuse : invasion et métastase	36
II.2.A. La transition épithélio-mésenchymateuse	36
II.2.B. TEM et cellules souches cancéreuses	38
II.3. La dissémination métastatique	39
II.4. Le microenvironnement tumoral	41

CHAPITRE 2 : LA VASCULOGENESE TUMORALE	47
I. Le système vasculaire	47
I.1. L'endothélium	47
I.2. La vasculogénèse	49
I.3. L'angiogénèse	50
I.3.A. Les processus	50
I.3.B. Les facteurs pro-angiogéniques	52
II. Les mécanismes de la vascularisation tumorale	56
II.1. L'angiogénèse tumorale	57
II.2. Le mimétisme vasculaire	58
II.2.A. Découverte et propriétés	58
II.2.B. Mécanismes de régulation	60
II.3. Autres processus existants	63
III. Thérapies anti-angiogéniques	63
III.1. Les thérapies anti-angiogéniques basées sur VEGF	63
III.2. Mécanismes de résistance aux thérapies anti-angiogéniques VEGF/VEGFR dans le cancer du sein	66
III.3. Autres thérapies	69
CHAPITRE 3 : LES THERAPIES DANS LE CANCER DU SEIN : PLACE DES INHIBITEURS DE PARP	72
I. La superfamille des Poly(ADP) ribose polymérase (PARP)	73
I.1. PARP1 et la réparation de l'ADN	74
I.2. Autres rôles	78
I.3. PARP1 et cancer	81
II. Les inhibiteurs de PARP-1 (PARPi)	85
II.1. Le mécanisme	85
II.2. L'utilisation en clinique dans le cancer du sein	89
II.3. La résistance aux inhibiteurs de PARP	91
OBJECTIFS	96
RESULTATS	98

ARTICLE	99
I. Résumé de l'article	99
II. Manuscrit de l'article	100
III. Supplementary data :	118
RESULTATS COMPLEMENTAIRES	120
I. Objectifs	120
II. Résultats	121
II.1. Analyse de l'expression de PD-L1 sur un large panel de lignées cellulaires tumorales mammaires	121
II.2. Corrélation entre l'expression de PD-L1 et le VM	122
II.3. Effets des inhibiteurs de PARP et de NF-κB sur l'expression de PD-L1	123
II.4. Impact de PD-L1 sur le mimétisme vasculaire	125
III. Conclusion	127
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	128
REFERENCES	136

Abréviations et acronymes

A

α -SMA+ : *α Smooth Muscle Actin*
ABCB1 : *ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1*
ADN : Acide désoxyribonucléique
AIF : *Apoptosis Inducing Factor*
ALC1 : *Amplified in Liver Cancer 1*
ALDH : Aldéhyde déshydrogénase
AMD : Domaine d'auto-modification
ANG : Angiopoïétines
ARH : ADP-ribosylhydrolase
ATM : *Ataxia Telangiectasia Mutated*
ATP : Adenosine triphosphate

B

BCL-2 : *B-Cell Lymphoma 2*
BER : Réparation par excision de bases
BI-RADS : *Breast Imaging Reporting and Data System*
BL1/2 : Basal-like 1/2
BRCA1/2 : *Breast cancer gene 1*

C

CAF : *Cancer associated fibroblast*
CAA : *Cancer associated adipocytes*
CCL2 : *Chemokine (CC-motif) ligand 2*
CD : Cluster de différenciation
CDK12 : *Cyclin-dependent kinase 1*
cGAS : GMP-AMP synthase cyclique

cGMP : Guanosine cyclique monophosphate

CL : *Claudin-low*

CO : Contraception orale

CSB : Cassure simple brin

CSC : Cellules souches cancéreuses

CXCL : *CXC-chemokine ligand*

CXCR : *CXC-chemokine receptor*

D

DAMP : *Damage Associated Molecular Pattern*

DDB1/2 : *DNA damage-binding protein 1/2*

DIU : Dispositif intra-utérin

DNA-PKcs : *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*

DR : *Direct repair*

DSB : *Double-strand break*

E

E-CAD : E-cadhérine

EGF : *Epidermal growth factor*

EET : *Epithelial to endothelial transition*

EMA : *European Medicines Agency*

eNOS : *Endothelial nitric oxide synthase*

EPHA2 : *Ephrin type-A receptor 2*

ER : Récepteur aux œstrogènes

ESA : *Epithelium-specific antigen*

ET-1 : Endothéline 1

F

FAK : *Focal Adhesion Kinase*

FAO : *β -oxydation des acides gras*

FDA : *Federal Drug Association*

FGF : Facteur de croissance des fibroblastes

G

GLUT : *Glucose transporter 1*

GSK3 β : *Glycogen synthase kinase 3-b β*

H

H1 : Histone H1

HIF1 : *Hypoxia-inducible factor 1*

HER2 : *Human epithelial growth factor receptor 2*

HMGB1 : *High mobility group box 1*

HOXB7 : *Homeobox B7*

HR : Réparation par recombinaison homologue

HRD : Déficience de recombinaison homologue

HUVEC : *Human umbilical vein endothelial cells*

I

IFN- γ : Interféron gamma

IGF : *Insulin-like Growth Factor*

IKK : I κ B kinase

IL : *Interleukin*

IMC : Indice de masse corporelle

INCa : Institut national du cancer

K

KLF4 : *Krüppel-like factor 4*

L

LAR : *Luminal androgen receptor*

LIG3 : Ligase 3

LOX : Lipoxigenase

M

M : Mésoenchymateux

M1 : TAM anti-tumoral

M2 : TAM pro-tumoral

MAPK : *Mitogen-activated protein kinase*

MAR : mono(ADP-ribose)

MCP-1 : *monocyte chemotactic protein-1*

MEC : Matrice extracellulaire

MET : Microenvironnement tumoral

MFI : Moyenne d'intensité fluorescente

MGMT : *Methylguanine-DNA methyltransferase*

miARN : micro ARN

MMPs : *Matrix metalloproteinases*

MMR : *Mismatch repair*

MSL : *Mesenchymal stem-like*

mTOR : *Mammalian target of rapamycin*

N

NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide

NEMO : *NF- κ B essential modulator*

NER : *Nucleotide excision repair*

NF- κ B : *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer*

NHEJ : *Non-homologous end joining*

NK : *Natural killer*

O

OMS : *Organisation mondiale de la santé*

P

PAR : *poly(ADP-ribose)*

PARG : *poly(ADP-ribose) glycohydrolase*

PARP : *Poly(ADP-ribose) polymérase*

PARPi : *PARP inhibitor*

PAS : *Periodic Acid Schiff*

PDGF : *Platelet-derived growth factor*

PD-L1 : *Programmed death ligand 1*

PECAM : *Platelet endothelial cell adhesion molecule*

PKC : *Protein kinase C*

PIGF : *Placental growth factor*

PR : *Récepteur de la progestérone*

PTX3 : *Pentraxin-related protein 3*

R

RAGE : *Receptor for Advanced Glycation Endproducts*

RNA-seq : *RNA sequencing*

ROS : *Reactive oxygen species*

S

SDF-1 : *Stromal cell-derived factor 1*

SERMs : *Selective estrogen receptor modulators*

sGC : *Guanylate cyclase soluble*

siARN : *Small interfering ARN*

SUMO : *Small ubiquitin-like modifier*

T

TAM : *Tumor associated macrophages*

TAN : *Tumor associated neutrophils*

TEC : *Tumor endothelial cells*

TEM : *Transition épithélio-mésenchymateuse*

TGF- β : *Transforming growth factor bêta*

TIMP : *Tissue inhibitor of metalloproteinase*

TLR4 : *Toll-Like Receptor 4*

TME : *Transition mésenchymato-épithéliale*

TNBC : *Triple-negatives breast cancer*

TNF- α : *Facteur de nécrose tumorale alpha*

TOP1 : *Topoisomérase 1*

Treg : *Lymphocytes T régulateurs*

U

UPA : *Urokinase-type plasminogen activator*

V

VEGF : *Vascular endothelial growth factor*

VEGFR : *Vascular endothelial growth factor receptor*

VM : *Mimétisme Vasculaire*

X

XRCC1/4 : *X-ray repair cross-complementing protein 1/4*

Z

ZEB : *Zinc finger E-box homeobox*

Liste des figures

Figure 1: Structure et anatomie de la glande mammaire.....	16
Figure 2: Structure des lobes mammaires	17
Figure 3: Schéma de la localisation anatomique des ganglions lymphatiques du sein.....	23
Figure 4: Les quatre stades de densité mammaire.....	28
Figure 5: Représentation des stades de la carcinogenèse	34
Figure 6: Hallmarks of cancer, d'après Hanahan et Weinberg, 2000.....	35
Figure 7: Hallmarks of cancer, d'après Hanahan et Weinberg, 2022	36
Figure 8: Représentation de la transition épithélio-mésenchymateuse	37
Figure 9: La cascade métastatique.....	40
Figure 10: Résumé de l'organotropisme des métastases des cancers du sein.....	41
Figure 11: La genèse du système vasculaire	49
Figure 12: Le bourgeonnement	51
Figure 13: l'intussusception.....	52
Figure 14: Principaux mécanismes pro-angiogénique	56
Figure 15: Le switch angiogénique	57
Figure 16: Constitution des différents types de réseaux vasculaire	59
Figure 17: Principales cibles moléculaires des thérapies anti-angiogéniques approuvées	64
Figure 18: Structures des domaines des protéines PARP.....	73
Figure 19: Structure de PARP-1.....	74
Figure 20: Rôle de PARP dans la réparation des cassures simple brin.....	76
Figure 21: Rôle de PARP1 dans la réparation des cassures double brins.	77
Figure 22: Modèle simplifié de l'activation de NF- κ B lié à PARP-1.....	80
Figure 23: Principe d'action des inhibiteurs de PARP : la létalité synthétique	86
Figure 24: Mécanismes moléculaires des inhibiteurs de PARP.....	88
Figure 25: Mécanismes de résistance : restauration de l'activité de HR	92
Figure 26: Mécanismes de résistance : drogue efflux	93
Figure 27: Mécanismes de résistance : Stabilisation de la fourche de réplication	93
Figure 28: Mécanisme de résistance : Diminution de PARG	94
Figure 29: Expression de PD-L1 dans un panel de lignées tumorales mammaires et dans la lignée endothéliale HMEC-1.....	121

Figure 30: Corrélation entre PD-L1 et le VM.	122
Figure 31: Effets des inhibiteurs de PARP1 sur PD-L1.	123
Figure 32: Effets de BAY11-7082 sur PD-L1.	124
Figure 33: Inhibition de PD-L1 par transfection avec un siARN.	125
Figure 34: Effets de l'invalidation de PD-L1 sur le VM.	126

Liste des tableaux

Tableau 1: Grades histologiques des cancers du sein	19
Tableau 2: Résumé de la classification moléculaire	20
Tableau 3: Classification N clinique (cN) et pathologique (pN)	24

INTRODUCTION

Chapitre 1 : le cancer du sein

I. Le cancer du sein

I.1. Anatomie du sein

Le sein est un organe sexuel secondaire constitué de tissus graisseux enrobant la glande mammaire exocrine. Elle est qualifiée d'exocrine puisqu'elle sécrète des substances destinées à être expulsées de l'organisme dans le milieu extérieur. Elle est de densité variable et est organisée en une vingtaine de lobes, eux-mêmes divisés en lobules et subdivisés en alvéoles sécrétoires ou *acini* [1]. Chaque lobe débouche au niveau du mamelon, sur lequel on retrouve les orifices d'abouchement (les pores) des canaux galactophores qui sont disposés de façon circonférentielle. Le mamelon est joint à l'aréole, et cela forme ainsi la plaque aréolo-mamelonnaire. L'enveloppe du sein est la peau qui est séparée de la glande par le muscle mamillaire (**Figure 1 et 2**).

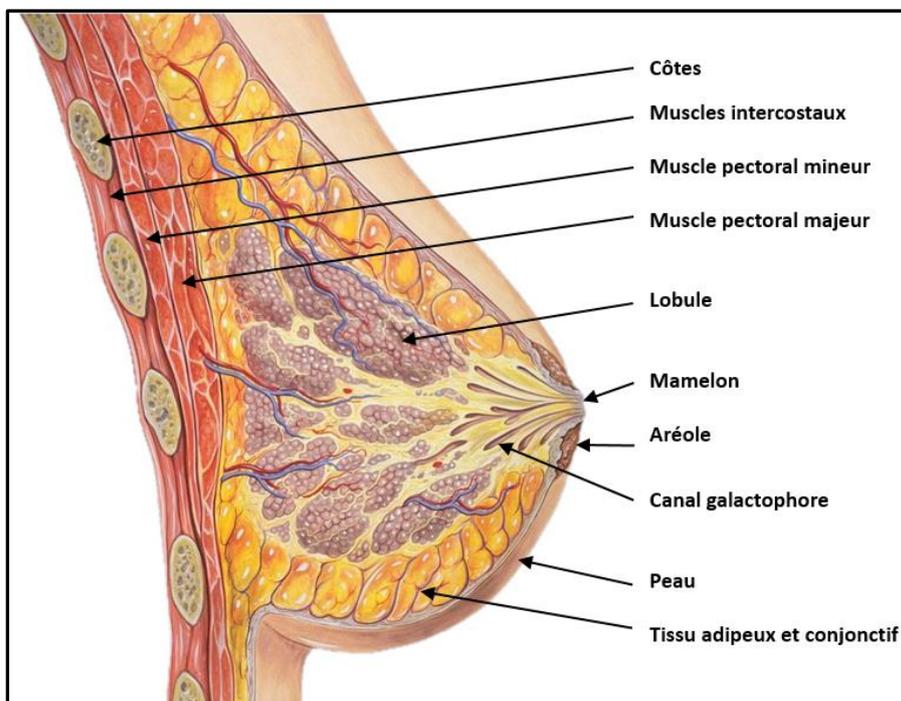


Figure 1: Structure et anatomie de la glande mammaire (adapté d'un artwork de Patrick Lynch, Medical illustrations)

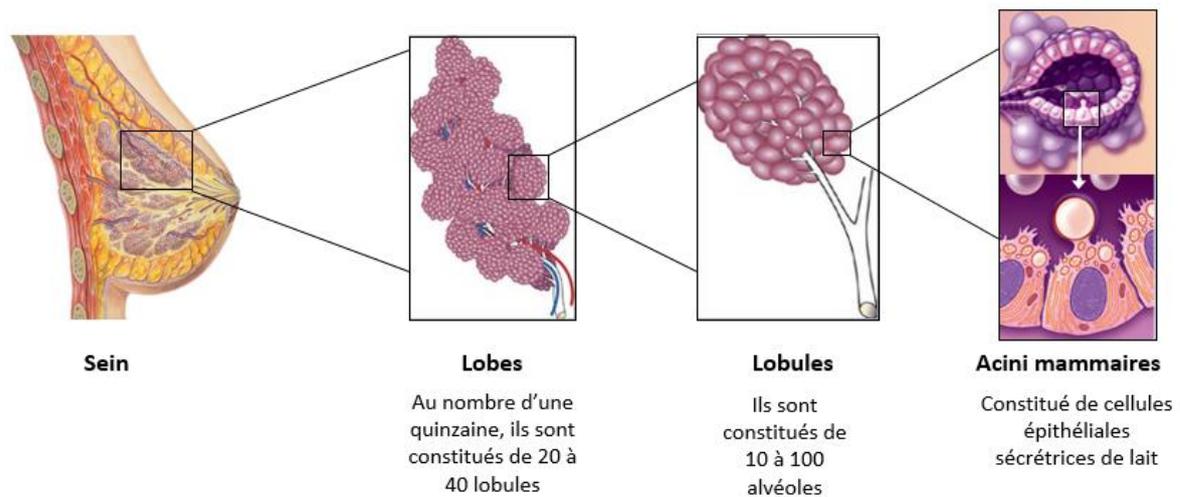


Figure 2: Structure des lobes mammaires (adaptée de www.santéallaitementmaternel.com)

Le sein est également parcouru par une vascularisation artérielle, un réseau veineux qui assure un drainage. Aussi retrouve-t-on un réseau de vaisseaux lymphatiques qui recueillent et transportent la lymphe loin du sein jusqu'aux ganglions lymphatiques [2]. Parmi eux on retrouve les ganglions sus- et sous-claviculaires, les ganglions mammaires internes et les axillaires qui eux se trouvent à l'aisselle et sont répartis en trois niveaux selon leur proximité au grand pectoral. Le sein est également innervé par deux groupes de nerfs, les nerfs superficiels cutanés, brachiaux et intercostaux, et les nerfs profonds qui suivent le trajet des vaisseaux dans la glande.

Les hormones sexuelles (œstrogènes et progestérones) modulent tout au long de la vie le développement et le fonctionnement de ces glandes mammaires. En effet, elles se développent au moment de la puberté, augmentent en taille de manière cyclique en période prémenstruelle et en période de grossesse. A l'inverse, leur taille diminuent en phase post-lactation et lors de la ménopause les glandes deviennent fibreuses [3]. Chez l'homme et l'enfant, la glande mammaire est réduite à un petit amas glandulaire conservant néanmoins la même organisation qu'une glande adulte.

1.2. Epidémiologie

Le cancer du sein est le cancer le plus courant dans le monde et est la cause première de mortalité par cancer chez la femme. Il s'agit d'une pathologie survenant majoritairement (à 75%) chez les femmes âgées de plus de 50 ans [4]. En 2020, 58 000 nouveaux cas ont été diagnostiqués en France et malgré les progrès thérapeutiques qui ont eu lieu au cours des dernières décennies, la mortalité associée est de 12 000 décès par an en France [5]. Ce nombre diminue cependant d'année en année, en raison de l'amélioration des traitements et des stratégies de dépistages de plus en plus adaptées permettant un diagnostic à des stades précoces. Bien que l'on estime à 3 cancers du sein sur 4 la proportion de guérison, le pronostic a une forte variabilité selon les catégories de ce cancer. De plus, il existe une disparité quant au taux de survie à 5 ans suivant les pays avec un taux de 80 % dans les pays développés et de moins de 40 % dans ceux en voie de développement [6]. Cette disparité se retrouve également au sein d'un même pays en fonction des régions et est corrélée aux inégalités sociales. Pour tenter d'y remédier, plusieurs « plan cancer » ont été mis en place en France ce qui a notamment permis la mise en place en 2004 de dépistage généralisé pour les femmes de plus de 50 ans permettant des dépistages plus précoces [7]. Dans la mesure où une femme sur huit y sera confrontée au cours de sa vie, le cancer du sein reste un enjeu majeur de santé publique.

1.3. Classification des cancers du sein

Le cancer du sein est considéré comme une maladie hétérogène selon plusieurs critères. Il existe une variabilité histopathologique, biologique, avec différents pronostics et différentes réponses aux traitements. Cette hétérogénéité rend nécessaire l'établissement d'une classification afin de regrouper les différents sous-types de cancer. Cela permet de faciliter les décisions thérapeutiques et d'affiner la prédiction des comportements tumoraux.

1.3.A. Classification histologique

La classification histologique est basée sur la diversité morphologique des tumeurs [8]. Elle est utilisée mondialement et est relativement reproductible. Elle permet de définir si la tumeur est limitée à l'épithélium du sein ou si elle a envahi le stroma avoisinant, mais aussi si elle est originaire des lobes ou du canal mammaire. Elle est évaluée par examen histopathologique selon la classification de Nottingham [9], qui est une modification de la plus ancienne classification de Scarff-Bloom-Richardson.

Les principaux types histologiques d'adénocarcinomes sont les suivants : les carcinomes canaux (majoritaires) ou lobulaires infiltrant et les carcinomes canaux *in situ*. Il existe également d'autres types comme les carcinomes tubuleux, mucineux, micropapillaires [10]. Le système de classification histologique est employé principalement pour les cancers du sein infiltrant en se basant sur trois caractéristiques : la formation de tubules, le pléomorphisme nucléaire indiquant la différence existant entre les noyaux de cellules cancéreuses vis-à-vis des cellules saines, et la fréquence des mitoses caractérisant la division cellulaire [11]. Ces trois critères sont associés à un score allant de 1 à 3 (**Tableau 1**), et leur somme permet d'établir le grade.

Grade	Score total	Description
1 (bas)	3 à 5	Tumeurs aux structures bien formées, cellules différenciées. Petits noyaux uniformes avec une division cellulaire lente
2 (moyen)	6 ou 7	Cellules modérément différenciées, classées entre grade 1 et 3
3 (haut)	8 ou 9	Tumeurs aux structures peu ou pas formées, cellules cancéreuses peu différenciées ou indifférenciées. Noyaux gros et variables de taille. Division importante

Tableau 1: Grades histologiques des cancers du sein

1.3.B. Classification moléculaire

En 2000, Perou *et al.* ont classé les tumeurs du sein selon leurs profils d'expression génique en définissant une classification moléculaire en plusieurs sous-types [12] : les tumeurs lumineuses (gènes associés à la voie des récepteurs d'œstrogènes), HER2+ (surexpression et

amplification du gène *HER2*), *basal-like* de phénotype triple négatif et *normal-beast like*. A cette première classification se sont ajoutées d'autres propositions, divisant les sous-types déjà admis ou en ajoutant de nouveaux. Ces sous-groupes sont associés à des pronostics différents (**Tableau 2**).

Molecular Subtypes	Luminal A	Luminal B		HER2+	TN
		(HER2-)	(HER2+)		
Biomarkers	ER+ PR+ HER2- Ki67low	ER+ PR- HER2- Ki67high	ER+ PR-/+ HER2+ Ki67low/high	ER- PR- HER2+ Ki67high	ER- PR- HER2- Ki67high
Frequency of Cases (%)	40–50	20–30		15–20	10–20
Histological Grade	Well Differentiated (Grade I)	Moderately Differentiated (Grade II)		Little Differentiated (Grade III)	Little Differentiated (Grade III)
Prognosis	Good	Intermediate		Poor	Poor
Response to Therapies	Endocrine	Endocrine Chemotherapy	Endocrine Chemotherapy Target Therapy	Target Therapy Chemotherapy	Chemotherapy PARP Inhibitors

Tableau 2: Résumé de la classification moléculaire (selon Otoni et al., 2020)

Sous-types luminaux

Il s'agit de tumeurs dérivant de cellules luminales de l'épithélium mammaire et exprimant le récepteur aux œstrogènes (ER). Le groupe luminal est divisé en deux : luminal A et luminal B en fonction du score d'expression de la protéine Ki-67, lié à la prolifération. Cet indicateur utilisé en clinique permet de classer la tumeur selon le sous-type A (Ki-67 < 15 %), ou sous-type B (Ki-67 > 15 %). D'autres critères permettent de classer les tumeurs en luminales A ou B. L'expression du récepteur à la progestérone (PR) permet d'établir un score qui doit être supérieur à 20% pour les luminales A et inférieur pour les luminales B. le gène HER2 (Human epithelial growth factor receptor-2) doit être inférieur à 10 % dans le sous-type A, et peut être inférieur ou supérieur dans le sous-type B.

Le sous-type A, avec une fréquence de 40-50 %, a le pronostique le plus favorable et montre généralement moins de propagation aux glandes lymphatiques. Ces tumeurs, qui sont positives à PR et ER, permettent aux patientes de bénéficier des thérapies endocrines, ciblant les récepteurs aux œstrogènes. En revanche, le sous-type B d'une fréquence de 20 à 30%, a un pronostic plus intermédiaire et montre que peu de bénéfiques aux hormonothérapies. Les patientes nécessitent alors des traitements additionnels au vu de l'agressivité de ce sous-type.

L'évolution des techniques de génomique a permis d'affiner cette classification. En 2016, suite au constat de la grande hétérogénéité du groupe luminal, un groupe de recherche a permis via l'analyse génétique de 2000 gènes par RNA-seq de subdiviser les lumbales en deux groupes : LumA-R1 et LumA-R2 [13]. Les lumA-R1 sont un mixte de tumeurs A et B de type canalaire, et les lumA-R2 montrent une surexpression de 1068 gènes liés au système immunitaire. Cette nouvelle classification permettrait d'établir une meilleure corrélation à la survie et aux récurrences. Plus récemment, en 2019, une étude a permis de diviser le groupe des lumbales A en cinq sous-types (*stem-like*, entérocyte, *goblet-like*, inflammatoire, amplification de transit (TA)) qui ont permis d'expliquer une hétérogénéité transcriptomique supplémentaire que les LumA-R1 et lumA-R2 n'avaient pas pu montrer [14]. Cette nouvelle classification se base sur les mutations et le nombre d'altérations du nombre de copies somatiques (CNAs), sur des caractéristiques moléculaires et en association avec la résistance au traitement par hormonothérapie avec une molécule anti-œstrogénique qui est le Tamoxifen.

Sous-type HER2+

Environ 15 à 20% des tumeurs nouvellement diagnostiquées sont de sous-type HER2+, caractérisé par une expression haute de HER2 (> 10%). Ces tumeurs n'expriment pas de récepteurs aux œstrogènes ou progestérone, et ont une expression élevée de Ki-67 (> 20%). Elles présentent des propriétés de forte prolifération, sont souvent de haut grade histologique, et ont un potentiel métastatique rendant le pronostic moins bon comparé aux tumeurs lumbales avec un taux de survie sans-récurrence court. Cependant, grâce aux avancées thérapeutiques et au développement de thérapies ciblées anti-HER2, le pronostic tend à s'améliorer.

Sous-type triple-négatif/*basal-like*

Représentant 10 à 20% des cas, ces tumeurs n'expriment ni les récepteurs aux œstrogènes, ni à la progestérone, ni HER2 et ont un fort taux de prolifération avec une expression de Ki-67 haute (> 30%). Elles sont plus fréquentes chez des patientes jeunes avec des mutations du gène BRCA1 (*Breast cancer 1*), et présentent un grade histologique élevé. Aussi présentent-elles une activation des gènes exprimés par les cellules myoépithéliales (basales). Il existe une forte hétérogénéité génétique de ce groupe et des études plus récentes ont permis de le subdiviser en 7 sous-groupes [15], [16].

- Les sous-types basal-like BL1 et BL2, qui expriment les gènes des cellules basales avec cependant des différences en termes de réponses immunitaires.

- Le sous-type LAR *pour luminal androgen receptor* qui a une signature génique liée au métabolisme des androgènes.
- Le sous-type immunomodulateur (IM) caractérisé par l'expression génique de gènes impliqués dans les voies de signalisation immunologiques.
- Les tumeurs Claudin-low (CL) possèdent un faible taux de protéines de jonctions cellulaires (les claudins 3, 4, 7). Elles montrent un enrichissement pour les marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse et de la réponse immune, ainsi qu'une forte corrélation avec les signatures de type « cellules souches ».
- Deux types mésenchymateux : M pour mésenchymateux et MSL pour *mesenchymal stem-like*. Ils présentent une régulation positive des gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuses mais différent par l'expression de gènes liés aux cellules souches et à l'angiogenèse.

L'enjeu est de taille pour la prise en charge clinique de ce sous-type, car le pronostic est mauvais dû au manque de thérapies efficaces ciblant les tumeurs triples négatives. Les thérapies autres que chirurgicales se limitent aux chimiothérapies et aux inhibiteurs de PARP pour les patientes mutées BRCA1 et 2. Il est à noter que les tumeurs basal-like et triples négatives sont similaires, mais les basal-like présentent des profils protéiques parfois différents des triples négatives, et par conséquent toutes les tumeurs triples-négatives ne sont pas basal-like.

I.3.C. Classification TNM

Le système de classification TNM (Tumeur, Nodes, Métastases) est couramment utilisé en clinique pour définir les stades de la maladie [17]. Ce système est utilisé dans un but pronostic et de planification thérapeutique. Il se base sur trois aspects : l'extension Tumorale (T0-T4), l'atteinte ganglionnaire (*Nodes*) (N0-N3), et l'existence de Métastases (M0-M1) (TNM). De manière simplifiée, voici une description de la classification :

T : Tumeur

Cet indice décrit la taille de la tumeur.

Tx : Tumeur primaire qui ne peut pas être évaluée

T0 : Pas de tumeur primaire

T1 : Tumeur de taille ≤ 2 cm

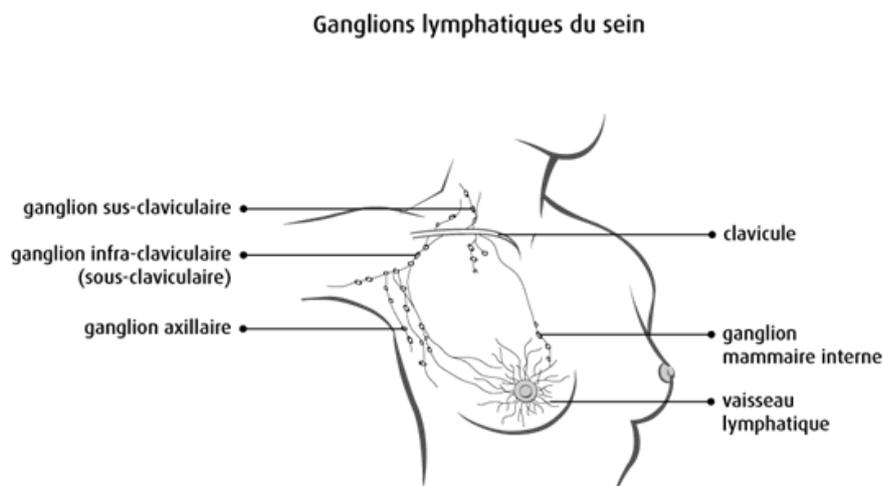
T2 : Tumeur de taille comprise entre 2 et 5 cm

T3 : Tumeur supérieure à 5 cm

T4 : Tumeur avec une extension soit à la paroi thoracique soit à la peau, quelle que soit la taille

N : **Nodes** : ganglions lymphatiques régionaux

Ce score caractérise la dissémination aux ganglions. Cette classification peut se faire soit de manière pathologique via l'analyse de tissu récolté par chirurgie (pTNM) soit de manière clinique après examen des tests biologiques et radiologiques (cTNM) [18] (**Figure 3** et **Tableau 3**).



***Figure 3:** Schéma de la localisation anatomique des ganglions lymphatiques du sein (selon la société canadienne du cancer)*

Clinique cN	Pathologique pN
cNx : Evaluation ganglionnaire non réalisable	pNx : Evaluation ganglionnaire non réalisable
cN0 : Absence d’envahissement ganglionnaire	pN0 : Absence d’envahissement ganglionnaire
cN1mi : Micrométastases comprises entre 0.2 mm et 2 mm	pN1mi : Micrométastases comprises entre 0.2 mm et 2 mm
cN1 : Métastases mobiles dans les ganglions	pN1 : pN1a. Métastases dans 1 à 3 ganglions axillaires, pN1b. métastases supérieures à 0.2 mm dans les ganglions sentinelles mammaires interne et pN1c. association de pN1a et pN1b
cN2 : cN2a. Métastases fixées dans les ganglions homolatéraux ou cN2b. métastases dans les ganglions mammaires internes mais sans envahissement axillaire	pN2 : pN2a. Envahissement dans 4 à 9 ganglions axillaires dont au moins une supérieur à 2 mm et pN2b. métastases mammaires internes cliniques en l’absence d’envahissement ganglionnaires axillaire
cN3 : cN3a. Métastases dans les ganglions sous-claviculaires homolatéraux, cN3b. métastases dans les ganglions mammaires internes avec envahissement axillaire et cN3c dans les ganglions sus-claviculaires homolatéraux	pN3 : pN3a. Envahissements métastatiques dans ≥ 10 ganglions axillaires dont au moins une supérieure à 2 mm ou métastases sus-claviculaires, pN3b. qui présente des métastases mammaires internes cliniques avec envahissement axillaire à l’examen microscopique et pN3c. atteinte ganglionnaire sus-claviculaire homolatérale

Tableau 3: Classification N clinique (cN) et pathologique (pN)

M : Métastases

L’état métastatique est évalué suivant les critères suivants :

Mx : non déterminé

M0 : pas de signe de métastases

cM0(i+) : Pas de signe de métastases (radiologique, examen physique) mais présence de cellules cancéreuses dans le sang, la moelle osseuse ou les ganglions lymphatiques retrouvées par des tests en laboratoire

cM1 : Dissémination dans une autre partie du corps, à distance, diagnostiqué par radiologie ou palpation

pM1 : le cancer mesure plus de 0.2 mm a métastasé à distance, et confirmation par biopsie/chirurgie/radiologie

1.4. Facteurs de risques

Le cancer du sein est une maladie dont le développement est multifactoriel pour laquelle le lien de cause à effet est difficile à établir. Malgré tout, des études épidémiologiques et expérimentales menées à travers le monde ont permis d'identifier plusieurs facteurs de risques. Parmi eux on retrouve des facteurs de risques internes, propres à l'individu (l'âge, les facteurs familiaux et génétiques, des facteurs reproductifs et hormonaux, l'obésité et la densité mammaire, etc.) ainsi que des facteurs de risques externes propres au mode de vie (tabac, alcool, alimentation, environnement, pollution, pesticides, etc.) [19].

1.4.A. Les risques intrinsèques

Le sexe et l'âge

Tout d'abord le sexe de la personne est, de manière évidente, le premier facteur étant donné que ce cancer touche pour 99 % des cas des femmes. L'âge est également important puisqu'environ 80 % des cancers du sein se développent après 50 ans [20]. C'est pour cette raison qu'en France un dépistage gratuit est proposé aux femmes de 50 à 74 ans depuis 2004 par mammographie et examen clinique des seins, tous les deux ans. La fréquence de ces dépistages est plus élevée en fonction de la situation individuelle. L'âge est aussi corrélé au type de cancer du sein que l'on détecte. Il a été montré que la fréquence des tumeurs positives aux récepteurs des œstrogènes augmente avec l'âge alors que la fréquence des tumeurs triples négatives est plus fréquente avant 50 ans [21].

Facteurs hormonaux et reproductifs.

Les œstrogènes sont les hormones les plus liées au cancer du sein, et l'imprégnation œstrogénique est un des principaux facteurs de risque. Ces hormones stéroïdiennes regroupent trois hormones : l'œstradiol, l'œstrone et l'œstriol. Elles sont produites par une chaîne de réactions à partir du cholestérol. Cette imprégnation œstrogénique dépend de plusieurs paramètres. L'âge de la ménarche (des premières règles) et de la ménopause influent sur la durée d'exposition aux œstrogènes et plusieurs études ont ainsi montré que la survenue du cancer du sein serait augmentée par une puberté précoce (avant 12 ans) ou par une ménopause tardive (après 50 ans) [22].

L'effet des œstrogènes est appuyé par des études cliniques utilisant par exemple des traitements d'hormonothérapies, tels que les inhibiteurs de l'aromatase (Ais) ou des modulateurs sélectifs du récepteur aux œstrogènes (SERMs), montrant ainsi une réduction du risque de rechute chez les patientes atteintes de tumeurs exprimant les récepteurs aux œstrogènes [23].

Les grossesses ont aussi un impact sur le risque de développer un cancer du sein, avec une dualité quant à ses effets. En effet, dans la période immédiate post grossesse le risque de cancer est élevé. On estime que 0.7 à 3.8 % des cancers du sein sont associés à une grossesse [24]. Cette fréquence est d'ailleurs en augmentation en raison de l'âge plus tardif de survenue d'une grossesse dans les pays industrialisés. Ce risque diminue graduellement par la suite. Comparé aux femmes nullipares, une grossesse conduite à terme réduit les risques du cancer du sein et cet effet augmente avec le nombre de grossesses [25]. L'allaitement a également un effet protecteur qui est corrélé à la durée de l'allaitement. D'autres facteurs entrent en compte comme par exemple l'âge de la première grossesse, qui, tardive, serait associée à une augmentation des risques [26].

Antécédents, facteurs familiaux et génétiques

Près de 20 à 30 % des cancers du sein surviennent chez des femmes qui ont des antécédents familiaux de cancers dont des cancers du sein selon l'INCa [27]. Plusieurs raisons peuvent expliquer ce phénomène, telles que les facteurs génétiques, mais aussi environnementaux et comportementaux. Les études montrent que le risque augmente selon le degré de proximité, mais aussi suivant le nombre de parents touchés, la précocité, le nombre d'occurrences chez le parent touché, avec la survenue de cancers controlatéraux (dans le sein

opposé) ou ipsilatéraux (dans le même sein) multiples. Par exemple, lorsqu'il s'agit d'une parente au premier degré (mère, sœur, fille) ayant eu un cancer en particulier avant la ménopause, le risque d'être atteinte de ce type de cancer est d'environ deux fois plus élevé. Ce risque est diminué lorsqu'il s'agit de parentes au second degré [28].

Les antécédents propres à chacun sont aussi à prendre en considération dans l'évaluation des risques. Une femme ayant déjà eu un cancer de sein, a un risque plus élevé d'en développer un deuxième au cours de sa vie, soit dans le même sein soit dans le sein opposé, ou à distance ; 30 % des patientes ayant eu un cancer du sein dont la maladie a été totalement éliminée par les traitements, récidiveront [29], [30]. Le temps entre la guérison et la rechute varie selon plusieurs facteurs de risques tel que l'âge de la patiente, la taille de la tumeur, l'agressivité du cancer initial et les stratégies thérapeutiques utilisées

On estime que 5 à 10% des cancers ont une origine génétique. C'est en partie lié aux gènes BReast Cancer 1 et 2 (BRCA1/2) qui sont décrits comme étant impliqués dans 80 % des cancers du sein d'origine génétique [31]–[33]. Ce sont des gènes suppresseurs de tumeurs localisés dans les chromosomes 17q et 13q. Ils codent pour des facteurs inhibiteurs de prolifération cellulaire mais aussi de contrôle du cycle cellulaire, de la réparation de l'ADN et d'autres processus cellulaires importants [34]. Des mutations dans ces gènes augmentent le risque de tumeurs du sein. Le gène BRCA1 est lié à des tumeurs de haut grade souvent triples négatives [35].

Structure mammaire

Les lésions mammaires antérieures multiplient par 3 ou 4 le risque de développer un cancer du sein [36]. De plus, la densité mammaire est un facteur de risque. La densité est estimée par un radiologue à l'issue d'une mammographie où il estime la quantité de parenchyme mammaire radio-opaque en relation avec les tissus adipeux translucides [37]. En effet, le tissu glandulaire est radiologiquement dense, bloquant les rayons X et apparaît blanc alors que le tissu adipeux laisse passer les rayons X. Dans le cadre de la détection des tumeurs mammaires par mammographie, il a été montré que la densité mammaire induit une sous-détection des tumeurs car les tissus denses peuvent obstruer la détection des tumeurs [38]. En 1953 la densité fut identifiée comme un facteur de risque potentiel de cancer du sein [39]. Aujourd'hui, les différentes densités sont le plus souvent classées selon le lexique BI-RADS (Breast Imaging Reporting and Data System). Il a permis de déterminer le pourcentage de

chaque densité dans la population générale. Ainsi, 10 % des femmes ont des seins presque entièrement constitués de tissus adipeux, 40 % ont des zones dispersées de densité fibroglandulaire, 40 % ont des seins avec une densité hétérogène et pour finir 10 % ont des seins extrêmement denses (**Figure 4**).

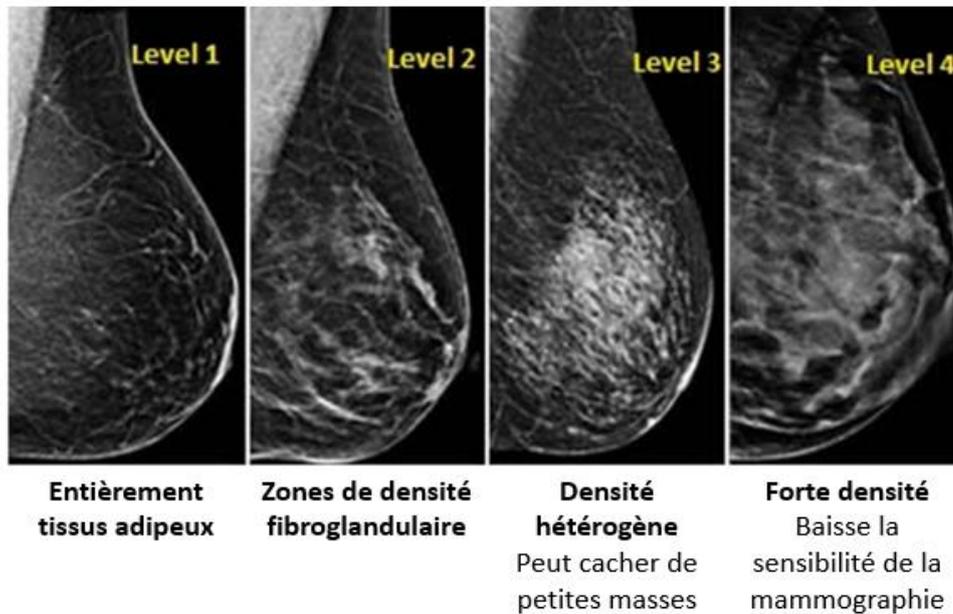


Figure 4: Les quatre stades de densité mammaire (adaptée de mayoclinique.org)

Le risque relatif est moins important que d'autres risques majeurs dans le cancer du sein comme les antécédents familiaux. Cependant, étant donné qu'environ 50 % des femmes ont des seins denses, des auteurs ont proposé que le facteur de la densité seul peut-être considéré comme un facteur de risque majeur comparé à d'autres facteurs plus forts mais moins répandus [40].

Les mécanismes biologiques sous-jacents expliquant cette augmentation de risque par une forte densité mammaire restent largement inconnus. Quelques hypothèses émergent afin d'expliquer ce mécanisme, comme par exemple la relation entre la densité et le microenvironnement mammaire [41].

Il est intéressant de noter qu'il existe à première vue un paradoxe. En effet, le risque de cancer du sein est plus faible lorsqu'il y a de faibles densités mammaires et donc la présence de tissus adipeux en plus grande proportion. Or, et nous le verrons par la suite via les risques liés à l'obésité, une forte adiposité est généralement associée à un risque accru de cancer du

sein chez la femme post-ménopausée. Le rôle du tissu adipeux mammaire aurait potentiellement un rôle différent par rapport à d'autres dépôts anatomiques.

1.4.B. Les risques extrinsèques

Les hormones exogènes

La pilule contraceptive était, en 2016 en France, la méthode la plus utilisée dans le cadre de la contraception [42]. Il ne s'agit pas de la seule méthode de contraception de type hormonal. En effet, le DIU, l'implant, le patch ont eux aussi un fonctionnement basé sur la libération d'hormones. De nombreuses études ont été publiées sur le rôle qu'a la prise de contraception orale (CO) sur l'incidence et le développement du cancer du sein. Jusqu'à maintenant, les résultats sont toujours controversés [43]. Il a été montré à plusieurs reprises que la contraception hormonale augmente légèrement le risque de cancer du sein, mais que ce risque est très bas jusqu'à l'âge de 40 ans. En outre, ce risque est lié à la durée de prise du contraceptif [44]. Mais les différentes études sur ce sujet montrent des résultats inconstants, allant d'aucune augmentation à une augmentation de 30 % des risques [45]. Ils dépendent également du type de CO, avec un accroissement du risque chez les femmes prenant des CO oestroprogestatives comparé à celles prenant des CO d'œstrogène seul [46]. Des études ont également montré qu'il n'y avait pas de risque associé à la prise de CO à la récurrence d'un cancer du sein après son diagnostic et sa rémission [47].

Il existe également l'exposition aux hormones chez la femme ménopausée qui a pour but l'atténuation des symptômes lié à la ménopause, qu'on appelle les traitements hormonaux de la ménopause (THM). Pendant longtemps les THM étaient utilisés de façon quasi systématique et sur de longues durées. Environ 1 femme sur 2 prenait un traitement hormonal en France en 2000. Leur utilisations a diminué drastiquement à partir des années 2000 [48]. Ce changement de fréquence d'utilisation faisait suite principalement à une étude parue en 2002 par la Women's Health Initiative aux Etats-Unis qui rapportait un risque accru de cancers du sein et de maladies cardiovasculaires [49]. Après la parution de cette étude, d'autres études faites cette fois-ci sur des thérapies utilisées en France ont permis de mettre en avant les risques de ces traitements mais également le fait qu'ils sont dépendants de la nature des THM. Il est substantiellement plus élevé pour les œstroprogestatifs, combinant œstrogènes et progestérone

[50]. Depuis, les recommandations ont changé et il est recommandé d'utiliser les THM uniquement si les patientes se plaignent de symptômes altérant leur qualité de vie et qu'elles expriment le souhait de se traiter, en prenant en compte le profil de chaque patiente vis-à-vis de ses risques cardiovasculaires ou de cancer du sein et de l'utérus. Aujourd'hui, moins de 10 % des femmes ménopausées prennent un traitement hormonal.

Mode de vie

- **Obésité et alimentation**

L'obésité est une maladie résultant de l'adaptation aux récentes évolutions des modes de vie. Selon l'OMS, 39 % des adultes dans le monde sont en surpoids et 13 % sont obèses [51]. Les recommandations actuelles classent le degré d'obésité en se basant principalement sur l'indice de masse corporelle (IMC) qui est le rapport de la masse corporelle (en kg) divisé par la taille au carré (en mètres) [52]. Les complications associées sont nombreuses, on peut en particulier citer le diabète de type 2 ou encore les maladies cardiaques et les cancers. Concernant le cancer du sein, il semblerait y avoir un risque augmenté de 73 % de développer un cancer du sein luminal B chez les femmes avant la ménopause et 67 % d'augmentation des cancers triple négatifs [53]–[55]. De plus, les femmes diabétiques sont elles aussi à plus fort risque de développer un cancer triple négatif [56].

De nombreux facteurs liés à l'obésité peuvent être responsable de l'augmentation du risque de développement du cancer du sein chez la femme obèse. Parmi eux, on peut citer l'augmentation du niveau d'œstrogènes via l'activité aromatique des tissus adipeux, mais aussi l'hyper-activation des facteurs de croissance insulino-semblables (IGFs : Insulin-like Growth Factor) [53], la surexpression de cytokines pro-inflammatoires, la présence d'adipokines dérivées des adipocytes, l'hypercholestérolémie ou encore un stress oxydatif [57].

De récentes études s'intéressent également à l'impact du microbiome intestinal sur la survenue de cancer. L'exemple le plus connu étant le cas de l'infection à *Helicobacter pylori* qui est liée au cancer gastrique [58]. Il est important de noter que la composition du microbiome est différente chez la personne obèse par rapport à la personne avec un IMC « normal » [59] et que, dans certains cas, la composition peut être différente chez les personnes avec un cancer [60]. Plus récemment un lien entre le microbiome et le cancer du sein a été exploré. On peut citer en exemple l'étude des estrobolomes, des agrégats de bactéries capables de métaboliser les œstrogènes, qui en grande quantité peuvent promouvoir la réabsorption d'œstrogènes

déconjuguées dans la circulation [60]. L'impact que cela pourrait avoir sur la progression et le pronostic reste à élucider. Il peut également y avoir un effet œstrogène-indépendant. Une étude a mis en évidence qu'un métabolite bactérien, l'acide lithocholique, peut limiter la prolifération des cellules cancéreuses mammaires *in vitro* et *in vivo*. Ces interactions restent complexes, et leurs compréhensions restent à approfondir. En effet, comme le souligne le papier de B. A. Helmink dans Nature Medicine [61], le microbiome peut conférer des susceptibilités à certains cancers et influencer la réponse aux thérapies et c'est notamment ce qui est observé avec la réponse aux immunothérapies.

Pour finir, la nutrition influence aussi le risque de développer un cancer du sein. Premièrement, le régime alimentaire est lié à l'obésité, au diabète, au microbiome intestinal, à l'adiposité et comme on vient de le voir cela constitue un facteur de risque supplémentaire. Le type de régime joue un rôle complexe. La consommation de viande rouge par exemple est un facteur de risque dû à la présence d'hèmes contenant du fer et à l'administration d'œstrogènes aux bétails, ainsi qu'aux mutagènes produits par la cuisson [62]. Il en va de même pour la viande transformée dont la consommation est associée à un plus fort taux de cancer du sein post-ménopause [51]. Suite aux recherches faites sur le sujet, l'OMS a classé la viande rouge comme probablement cancérogène et la viande transformée comme cancérogène pour l'homme.

Par ailleurs, la consommation de produits laitiers est controversée [63]. Les études montrent tant des effets protecteurs que des effets délétères [64]. Cela peut être dû à la variété des produits laitiers consommés dans les différentes études et plus généralement aux différentes méthodologies. En revanche les graisses provenant de produits laitiers ont été montrées comme étant associées avec le cancer du sein [65]. De même que la consommation de soja qui est une source d'isoflavones, ayant une activité œstrogénique faible [63], [66]. Mais l'association de cette consommation avec le cancer du sein reste controversée et cela pourrait dépendre de la situation géographique (pays asiatiques vs pays occidentaux).

- **Consommation alcoolo-tabagique**

Des études ont permis de montrer que la consommation de plus de trois verres d'alcool par jour augmenterait le risque de cancer du sein de 40 à 50 % et que 5 % des cancers en Europe étaient imputables à l'alcool [67]. Il est admis que la consommation d'alcool est corrélée à un risque du cancer du sein, mais les méta-analyses réalisées montrent qu'en fonction de la zone géographique, du type de boisson, et de la fréquence de consommation il existe des différences

significatives [68]. Le tabagisme actif ou passif est lui associé à un risque modestement plus élevé de cancer du sein [69], [70].

- **Situation géographique et statut socio-économique**

Il existe sans surprise des disparités en terme de survie en fonction de la situation socio-économique des femmes [71]. Les études visant à analyser les disparités doivent prendre en compte plusieurs points : le dépistage, l'incidence, le stade du diagnostic, la qualité de vie, l'intervalle de diagnostic, le profil hormonal, le traitement chirurgical, la survie et la mortalité. Une confusion résulte de cette grande hétérogénéité de mesures et d'approches que l'on retrouve en comparant les études existantes. Il est cependant possible de mettre en avant le fait que le lieu de vie ait un réel impact. Les femmes vivant dans des zones désavantagées d'un point de vue soit économique, soit géographique, ou vis-à-vis d'accès aux services, ont une survie réduite liée au cancer du sein. Une étude de 2018 a aussi mis en évidence la différence en terme de traitement reçu entre les femmes ayant un statut socioéconomique bas versus haut [72]. Ces différences existent lorsque l'on compare les statuts aux extrêmes mais également les statuts plus bas entre eux.

II. Développement du cancer du sein

II.1. La tumorigenèse

La carcinogenèse mammaire est un processus multi-étapes évolutif qui résulte, selon l'approche réductionniste, d'une accumulation de mutations génétiques au sein d'une cellule. Ces altérations provoquent l'émergence d'un clone tumoral (cellule initialement altérée et ses descendants), formant la tumeur, qui avec l'accumulation de mutations au cours du temps feront émerger des sous clones. Il existe de ce fait une grande hétérogénéité au sein de la tumeur primitive, mais aussi entre la tumeur et les métastases, et entre les métastases elles-mêmes [73]. Une approche alternative dite holistique étudie l'ensemble des systèmes comme un tout ; en fonction du type cellulaire, des mutations et de la fonction des gènes mutés, de l'environnement tumoral et des thérapeutiques.

L'évolution des connaissances a permis d'identifier les étapes clés de la transformation d'une cellule saine en cellule cancéreuse (**Figure 5**) [74]:

- **L'initiation** : il s'agit de l'évènement initial, l'altération du génome spontané ou survenant suite à l'exposition d'agents génotoxiques. Certains agents sont endogènes (comme par exemple les œstrogènes [75]), d'autres sont exogènes ; c'est le cas des carcinogènes chimiques (certains produits industriels comme les agents alkylants), des virus (le virus du papillomavirus causant le cancer du col de l'utérus [76]), ou encore les radiations (exposition au soleil et aux ultraviolets). Les altérations peuvent également résulter de modifications épigénétiques qui n'entraînent pas de modifications structurales de l'ADN mais des modifications de l'expression de gènes. Il en résulte des pertes ou gains de fonctions cellulaires rendant les cellules autonomes face aux systèmes de maintien de l'homéostasie cellulaire. Cette étape est irréversible, mais plusieurs issues sont possibles ; soit le matériel génétique est réparé grâce aux mécanismes de réparations de l'ADN, soit les mécanismes de mort programmée interviennent, soit la cellule se divise et la lésion est transmise.

Ces altérations peuvent activer des proto-oncogènes (gènes favorisant la tumorigenèse). Plus d'une centaine de proto-oncogènes sont connus, on y retrouve les gènes codant pour la famille Ras, retrouvées dans 20 à 30% des tumeurs [77]. Elles peuvent aussi inhiber des gènes suppresseurs de tumeurs, dont P53 est un exemple notoire puisqu'il contrôle le cycle cellulaire, l'apoptose, et les mécanismes de réparation et sa mutation est retrouvée dans de nombreux cancers [55], [78].

- **La promotion** : elle est caractérisée par la prolifération anarchique des cellules mutées ou initiées formant un ensemble de clones et duquel résulte un carcinome *in situ*. Lors de cette phase, les cellules vont de surcroît accumuler de nouvelles anomalies génétiques aboutissant à une instabilité génétique. Cette étape est réversible et est influencée par des agents promoteurs qui souvent sont non génotoxiques mais qui dérèglent l'homéostasie. La cigarette a par exemple un effet promoteur démontré : des études ont montré que l'exposition répétée à la fumée de cigarette promeut le développement tumoral chez les souris après initiation par des agents génotoxiques [79].
- **La progression** : il s'agit d'une phase clinique où le néoplasme est cliniquement détectable. Lors de cette étape, irréversible, la dissémination est possible. Plusieurs conditions sont nécessaires comme d'autres mutations résultant de l'instabilité génétique durant la promotion, le recrutement des cellules immunitaires et inflammatoires sur le site tumoral,

la capacité des tumeurs à acquérir des capacités de réparation (via la sécrétion de chimio-attractants attirant les cellules inflammatoires, de facteurs angiogéniques, de protéases, etc.). Il existe des agents de la progression comme par exemple l'inflammation, le benzène, le stress oxydatif... Les cellules envahissent alors le tissu conjonctif et peuvent former des métastases par voie sanguine ou voie lymphatique.

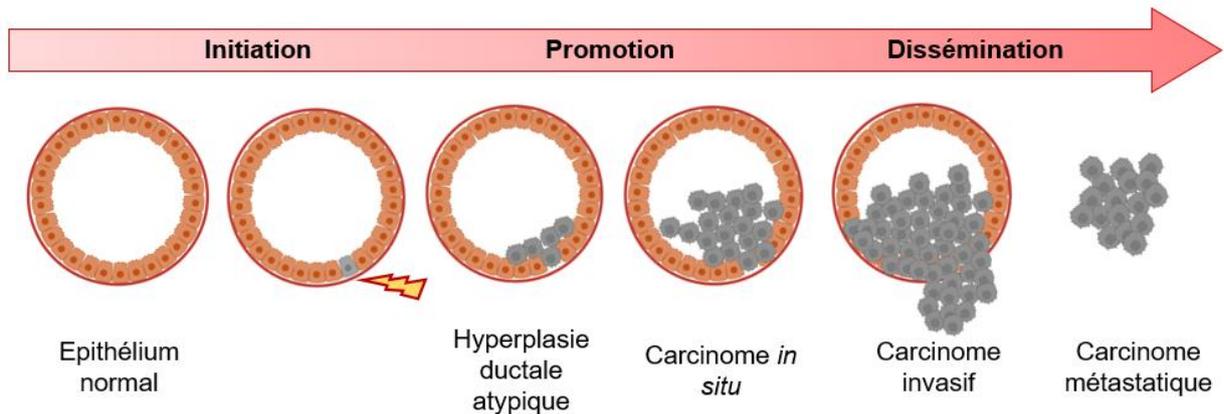
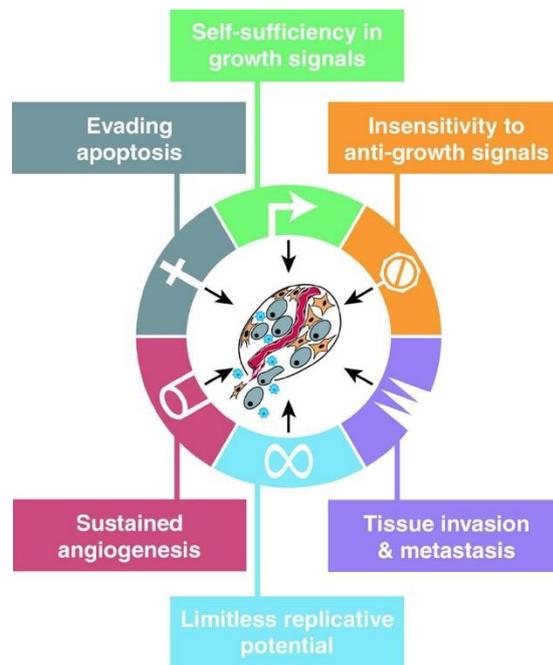


Figure 5: Représentation des stades de la carcinogénèse (inspiré de Lui et al., 2015)

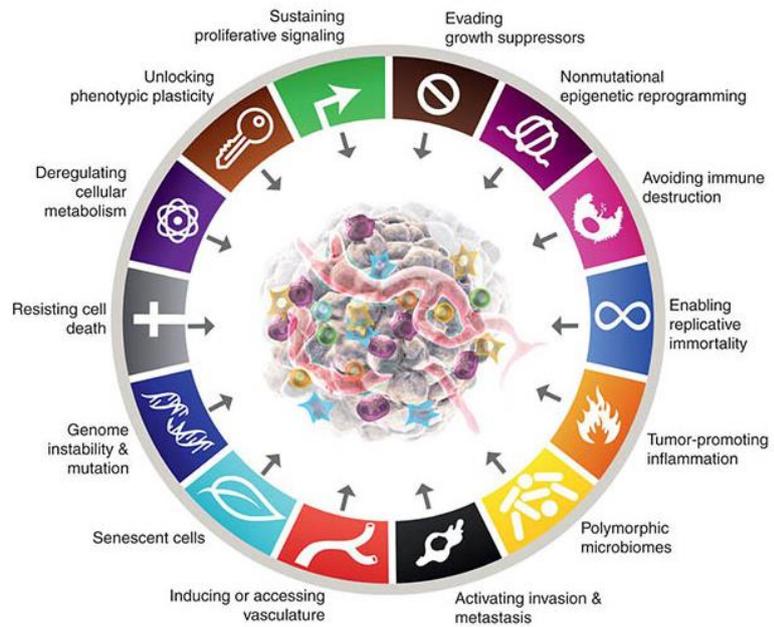
Tout au long de ce développement les cellules vont acquérir des capacités biologiques nécessaires au développement de la tumeur et interagir avec leur environnement qui évolue conjointement à la cellule en transformation. Ces comportements cellulaires ont été décrits au début des années 2000, par Hanahan et Weinberg, qui avaient pour but de fournir une liste d'altérations et de caractéristiques essentielles à la malignité, nommées « *hallmarks of cancer* » [80] (**Figure 6**). Initialement elles étaient au nombre de 6 : l'autosuffisance en facteurs de croissance, l'insensibilité aux signaux suppresseurs de croissances avec perte de l'inhibition de contact, la capacité d'invasion et de métastases, l'immortalité répllicative et l'induction de l'angiogénèse.

Figure 6: Hallmarks of cancer, d'après Hanahan et Weinberg, 2000



En 2011, un complément à cette première liste a été ajouté dans lequel on trouve la capacité des cellules à échapper au système immunitaire, un état inflammatoire propice au développement de la tumeur, l'instabilité du génome et la présence de mutations avec une reprogrammation du métabolisme cellulaire [81]. Plus récemment en 2022, de nouvelles dimensions à ces caractéristiques ont été apportées (**Figure 7**) [82]. Se sont alors ajoutées la plasticité phénotypique et la différenciation altérée des cellules tumorales. En effet les cellules tumorales, à l'inverse des cellules saines dont la différenciation est associée à un arrêt de prolifération, peuvent échapper à la différenciation et avoir un état de plasticité phénotypique pour continuer de proliférer. A noter qu'il ne s'agit pas d'une nouvelle caractéristique mais d'un processus préexistant dans les cellules normales, qu'elles utilisent pour régénérer des tissus, qui est ici utilisé par les cellules tumorales [82]. Une autre nouvelle caractéristique est la reprogrammation épigénétique, qui est reconnue comme commune à de nombreux cancers. L'impact du microbiome a été reconnu comme un *hallmark*. Champ grandissant de la recherche et en pleine expansion, des chercheurs ont montré que des microorganismes peuvent exercer des effets protecteurs ou délétères sur le développement du cancer et la réponse aux thérapies [61], [83]. Pour finir, l'importance des cellules sénescents est reconnue comme un composant du microenvironnement tumoral. Dans certains contextes les cellules sénescents environnantes peuvent stimuler le développement et la progression tumorale et sont un élément clé du microenvironnement.

Figure 7: Hallmarks of cancer, d'après Hanahan et Weinberg, 2022



II.2. Transition épithélio-mésenchymateuse : invasion et métastase

II.2.A. La transition épithélio-mésenchymateuse

Au cours du développement tumoral les cellules vont acquérir des capacités via des modifications génétiques et épigénétiques, qui vont leur permettre de se dissocier, de traverser la lame basale et d'envahir les tissus environnants. Dans certains cas, les cellules tumorales traversent l'épithélium vasculaire ou lymphatique pour rejoindre la circulation et se disséminer à distance de la tumeur primaire. Le carcinome infiltrant ou invasif donne alors naissance à des métastases. Deux phénomènes intrinsèquement associés au développement tumoral permettent cette dissémination : la diversité génétique et la plasticité tumorale. Dans ce contexte, le mécanisme au cours duquel une cellule épithéliale devient une cellule invasive mésenchymateuse, appelé transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), a un rôle clé (**Figure 8**).

La TEM est un processus fondamental requis pour l'embryogénèse ainsi que pour les processus de cicatrisation. Lors de ce processus, les cellules épithéliales acquièrent les caractéristiques des cellules mésenchymateuses. Ainsi, elles perdent leur cohésion, leurs jonctions cellules-cellules, leur polarisation et réorganisent la structure de leur cytosquelette

afin de s'individualiser et de devenir mobiles. Ce mécanisme est également retrouvé dans la carcinogenèse de tumeurs solides, l'invasion et les métastases [84], [85]. La TEM est dépendante de facteurs de transcriptions, dont ZEB, SLUG, SNAIL1 et TWIST1 [86] et peut être activée par des conditions comme l'hypoxie, à travers divers stimuli (TNF- α , TGF- β , etc.), ou encore par des composants de la matrice extracellulaire tels que le collagène et l'acide hyaluronique [87]. En résumé les voies de signalisations régulant la TEM sont nombreuses et complexes.

La perte de marqueurs épithéliaux que l'on retrouve au cours de cette transition concerne principalement la perte de E-cadherin, α -catenin, et de γ -catenin. A l'inverse il y a un gain de marqueurs mésenchymateux tels que la fibronectine, la vimentine, la N-cadherin et des métalloprotéases impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire (MMPs) [87].

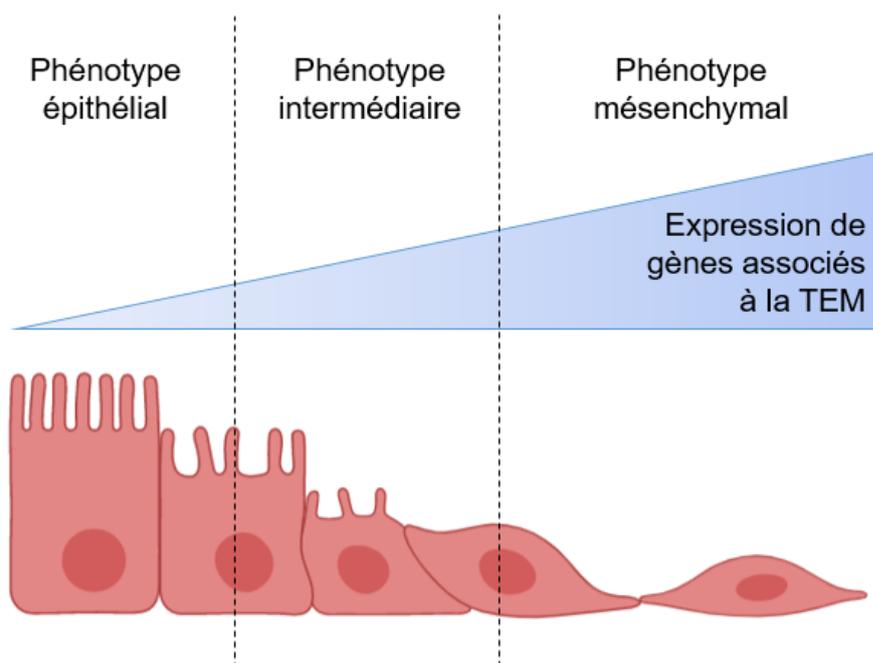


Figure 8: Représentation de la transition épithélio-mésenchymateuse (inspiré de Cristofanilli et al., 2010)

Cette transition en cellule mésenchymateuse est associée à un mauvais pronostic chez les patientes atteintes de tumeurs triples-négatives du sein [89]. Au début des années 1990, le rôle de la TEM dans la résistance aux traitements a été proposé dans une étude réalisée sur deux

lignées tumorales mammaires (MCF7 et ZR-75-B). Sommers *et al.* montrent que les cellules résistantes aux chimiothérapies présentent une expression de la vimentine et ont perdu des protéines de l'adhésion cellulaire ainsi que des jonctions serrées [90]. Depuis, le rôle antagoniste de la TEM est reconnu dans les thérapies anti-tumorales [91] et notamment dans la résistance à la chimiothérapie dans le cancer du sein [92]. Il existe de nombreuses explications à cela ; l'une d'entre elles s'appuie sur le lien existant entre la TEM et certaines voies de signalisations, comme la voie NF- κ B qui est régulatrice de la TEM par l'induction de SNAIL. NF- κ B joue un rôle dans la résistance aux stimuli d'induction de mort cellulaire mais également aux chimiothérapies. Il a par ailleurs été montré que l'inhibition de NF- κ B permet de sensibiliser les cellules tumorales mammaires à la doxorubicine [87].

Il est à noter qu'au sein d'une tumeur, la TEM n'est pas homogène. En effet, une tumeur est constituée de cellules aux phénotypes hétérogènes épithéliaux et mésenchymateux.

II.2.B. TEM et cellules souches cancéreuses

Les cellules souches sont caractérisées par leurs capacités d'autorenouveaulement et de différenciation en divers types cellulaires spécialisés [93]. Les cellules souches cancéreuses (CSCs) représentent une petite population au sein des tumeurs, on dénombre entre 0.1 et 1 % de cellules tumorales souches dans les tumeurs [94]. Elles peuvent provenir de la masse tumorale qui suite à une succession de mutations se sont dédifférenciées, ou de cellules souches pré-existantes dans l'épithélium mammaires qui ont dérivé en CSCs sous l'influence de l'environnement tumoral [95]. C'est un élément clé de l'invasion, de la progression tumorale et de la résistance aux thérapies conventionnelles [96].

Ces cellules expriment les marqueurs moléculaires des cellules souches de l'épithélium mammaires : CD44(+)/CD24(-) [97]. La glycoprotéine de surface CD44 se lie à l'acide hyaluronique, composant de la matrice extracellulaire (MEC) et médie les interactions cellules-cellules et cellules-protéines de la matrice telles que les MMPs ou l'ostéopontine. CD24 est une protéine de surface glycosylée qui a une fonction dans la prolifération et le processus métastatique. Du fait de la grande hétérogénéité inter et intratumorale, l'indicateur CD44(+)/CD24(-) n'est pas suffisant pour déterminer s'il s'agit d'une cellule souche tumorale ; d'autres caractéristiques comme l'expression et l'activité de l'aldéhyde déshydrogénase 1

(ALDH1) ou encore de l'antigène ESA (*epithelium-specific antigen*) sont alors nécessaires [98].

Leurs implications dans les mécanismes de résistance aux thérapies sont en majorité liées au fait que les CSCs expriment fortement les transporteurs de cassettes liant l'ATP (transporteurs ABC) et des protéines anti-apoptotiques, elles ont aussi la capacité de résister au stress oxydatif et ont une réponse rapide face aux lésions à l'ADN [99]. De plus, du fait de leur cycle ralenti et leur quiescence, elles échappent plus facilement aux thérapies cytotoxiques.

Une étude réalisée en 2008 a permis de souligner le rôle de la transition épithélio-mésenchymateuse dans la génération de cellules souches tumorales mammaires [100]. Dans la lignée humaine mammaire épithéliale HMECs de phénotype CD44-/CD24+, le traitement par le TGF- β et l'activation de Ras ont permis l'apparition de marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse et, *in fine*, l'émergence de cellules CD44+/CD24-. Le lien entre ces deux mécanismes a également été confirmé dans d'autres études, mais les explications moléculaires restent nombreuses et complexes [101].

II.3. La dissémination métastatique

La formation de métastases est la conséquence d'une série d'étapes biologiques qu'une cellule cancéreuse doit accomplir afin de quitter le site primaire et se disséminer à distance. L'apparition de métastases macroscopiques aboutit quand la cellule a traversé la membrane basale, pour entrer dans le système circulatoire sanguin ou lymphatique et par la suite a réussi à extravaser et à se développer dans un organe distant [102]. Le plus souvent ces cellules sont détruites dans la circulation et ne parviennent pas à former des métastases. Mais lorsqu'elles arrivent à extravaser, il est nécessaire que ces cellules réacquièrent un phénotype épithélial afin de s'implanter dans le nouveau site. On parle de transition mésenchymato-épithéliale (TME) (**Figure 9**).

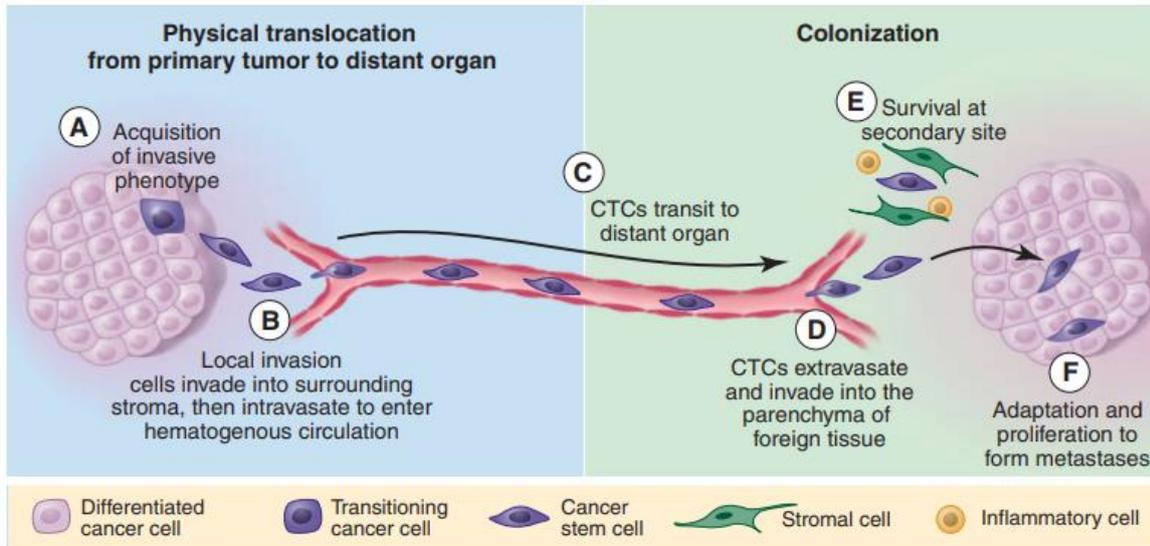


Figure 9: La cascade métastatique (selon Weinberg et al., 2012)

L'adaptation dans le nouvel environnement après la colonisation est importante pour la survie cellulaire. Il existe de plus en plus de preuves montrant que la tumeur primitive peut promouvoir la formation de métastases à distance par la sécrétion de facteurs ou via des vésicules extracellulaires permettant de modifier le microenvironnement local de l'organe cible. Cela permet d'augmenter les chances de survie des cellules migrantes dans leur nouvel environnement [103]. Ces microenvironnements prédéterminés sont appelés les niches pré-métastatiques. Ils sont initiés par des changements locaux comme le remodelage du stroma et de la matrice extracellulaire, la perméabilité vasculaire, et la dérégulation du système immunitaire [104]. Une fois les cellules tumorales dans leurs niches, elles peuvent rester dormantes, quiescentes, durant des mois ou des années. Pour se faire, elles peuvent sortir du cycle cellulaire et rester dans un état d'arrêt de prolifération. Les cellules tumorales dormantes existent aussi dans le site primaire, et sont réfractaires aux thérapies anti-tumorales ciblant principalement les cellules en prolifération. Certains constituants cellulaires et moléculaires permettent de maintenir cet état de dormance. Dans une étude réalisée en 2013, l'effet de la thrombospondine-1 sécrétée par les cellules endothéliales de la niche tumorale permettait de maintenir les cellules tumorales mammaires dans un état de quiescence [105]. A l'inverse, le TGF- β 1 et la periostine dérivés des cellules endothéliales lors de la formation de néovaisseaux aboutissent à la réactivation de la prolifération.

Pris dans leur ensemble, les lieux préférentiels de métastases dans le cancer du sein sont les os (chez 70% des patientes), le foie (30%), le cerveau (10%), les poumons et les ganglions

[106]. Notons ici que l'organotropisme des métastases dans le cancer du sein est dépendant des sous-types tumoraux (**Figure 10**).

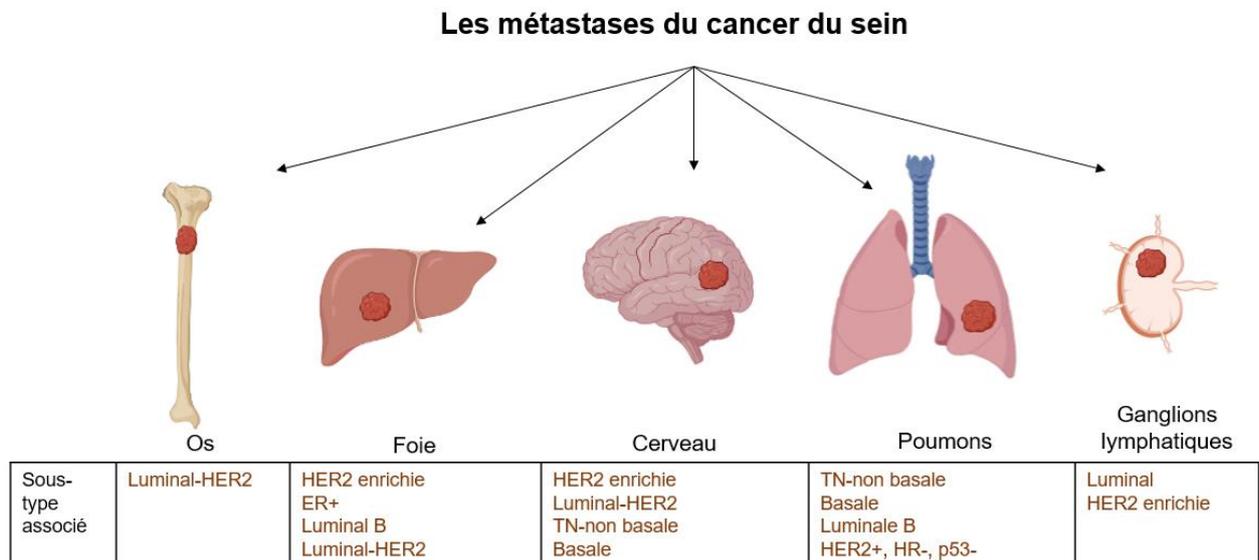


Figure 10: Résumé de l'organotropisme des métastases des cancers du sein (adapté de Liu et al., 2018).

II.4. Le microenvironnement tumoral

Tel que nous venons de le voir dans les processus menant au développement tumoral, le microenvironnement est un composant essentiel, il s'agit d'un partenaire à part entière dans l'évolution de la maladie. Il est composé d'une multitude d'éléments qui interagissent entre eux ; des éléments cellulaires (comme les fibroblastes, les cellules endothéliales...), des éléments solubles (les cytokines, les hormones...), des composants tels que la matrice extracellulaire et pour finir des composants physiques (le pH, le taux d'oxygène...). La nature de ces éléments dépend de leur localisation : locale, régionale ou métastatique. Dans la dernière décennie, le microenvironnement tumoral (MET) a été considéré comme une source de cibles pour le développement de nouveaux agents anti-cancéreux [107].

Les cellules immunitaires

Le système immunitaire est un élément pivot du développement tumoral. Il s'agit de l'un des composants cellulaires que l'on retrouve dans le microenvironnement tumoral (MET). Les **macrophages** sont très abondants dans le MET mammaire, on les nomme les macrophages associés à la tumeur (TAM). Il s'agit de cellules myéloïdes différenciées, agissant dans le système immunitaire inné, qui, en fonction de leur rôle sont classées selon deux sous-types phénotypiques : le sous-type anti-tumoral M1 ou le sous-type pro-tumoral M2 [108, p. 2]. On les distingue de manière moléculaire principalement par les glycoprotéines du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, ainsi que par l'expression de divers marqueurs comme CD80, CD86, iNOS pour les M1, CD206, CD163 pour les M2. De plus en plus d'études tendent à montrer qu'il s'agit d'un groupe hétérogène formant un continuum plutôt que deux groupes opaques [109]. Les M1 ont pour fonction de capturer, phagocyter et lyser les cellules tumorales. S'ajoutent à cela leur capacité à produire des cytokines pro-inflammatoires et à améliorer la présentation d'antigènes à travers la sécrétion de cytokines stimulatrices. Il a été montré que les M2 peuvent promouvoir l'angiogenèse et la néo-vascularisation, avoir un rôle immunosuppresseur ainsi que médier le remodelage de la matrice extracellulaire [110]. Les mécanismes de différenciations en M1/M2 ne sont pas encore complètement établis mais le microenvironnement dans lequel ils se situent permet d'expliquer leur hétérogénéité.

Les **lymphocytes T** sont également d'importants médiateurs de la réponse adaptative anti-tumorale. Les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques ainsi que les CD4⁺ *helper* (Th1) sont impliqués directement dans les mécanismes d'élimination de la tumeur et leur présence est associée à un bon pronostic [111]. A l'inverse, certains T CD4⁺ peuvent être associés à une action pro-tumorale. L'action cytotoxique des CD8⁺ est régulée par les Treg (lymphocytes T régulateurs), qui expriment le CD25 et FOXP3, deux molécules jouant sur la tolérance périphérique. Les Tregs sont ainsi connus comme étant impliqués dans le développement et la progression tumorale en inhibant la réponse anti-tumorale. Leur infiltration au sein d'une tumeur se fait par chimioattraction à travers un gradient de chémokines (comme CCR4-CCL17/22) présent dans le microenvironnement tumoral, et leur présence est associée à une moins bonne survie dans de nombreux cancers [112].

Des récentes études ont mis en avant le rôle que pourraient avoir les **lymphocytes B** dans la réponse immunitaire anti-tumorale. L'infiltration de la tumeur par les lymphocytes B semble être associée, suivant les cas, à des effets pro- ou anti-tumoraux [113]. Les tumeurs

peuvent également être infiltrées par des cellules cytotoxiques de l'immunité innée : les cellules **natural killer (NK)** [114]. Ces cellules peuvent reconnaître et tuer les cellules tumorales via la dégranulation de granules cytolytiques. Elles permettent aussi l'activation du système adaptatif en produisant des chimiokines et cytokines. Les **cellules dendritiques**, aussi impliquées dans l'immunité innée, peuvent infiltrer les tumeurs et présenter un antigène dérivé de la tumeur aux cellules T naïves [115]. Les **neutrophiles** représentent la première ligne de défense contre l'infection. Dans le MET, plusieurs mécanismes moléculaires peuvent promouvoir la polarisation des neutrophiles en deux populations opposées de neutrophiles associés aux tumeurs (TANs) anti-tumoraux (N1) et tumoraux (N2). Un intérêt grandissant est porté aux neutrophiles ; ces derniers ne sont plus simplement considérés comme cellules de l'immunité innée, mais leur diversité et leur plasticité commencent à être reconnues. Il a été montré qu'ils avaient un rôle dans l'initiation, la progression, les métastases et les rechutes dans de nombreux cancers [116].

Les fibroblastes associés au cancer (CAFs)

Les CAFs représentent un des grands groupes cellulaires présents dans le MET. Il s'agit d'un groupe de fibroblastes activés qui possèdent une grande hétérogénéité et plasticité dans le microenvironnement tumoral. Dans des conditions physiologiques, les fibroblastes sont les principaux producteurs du tissu connectif de la matrice extracellulaire. Généralement quiescents, ils peuvent être activés en cas de dommages aux tissus et jouer un rôle dans leur réparation. Ils peuvent également promouvoir l'angiogenèse à travers la production de VEGFA (*vascular endothelial growth factor A*) et coordonner le système immunitaire à travers la production de chimiokines et cytokines. En somme, ils jouent un rôle clé dans la communication avec de nombreux autres types cellulaires dans l'homéostasie des tissus normaux et dans le cadre de la réparation [117]. Les fibroblastes associés au cancer sont définis sur un principe d'exclusion : les marqueurs de cellules épithéliales, endothéliales, et des leucocytes doivent être négatifs. De plus, ils doivent être positifs aux marqueurs mésenchymateux avec principalement la vimentine. A la différence des fibroblastes normaux, les CAFs présentent une prolifération augmentée, avec de plus grandes propriétés migratoires. Les CAFs deviennent directement activés par les cellules tumorales de plusieurs manières. Nous pouvons citer des dommages à l'ADN, l'activation par le TGF- β , le MCP-1 (*monocyte chemotactic protein*), par des protéases sécrétées, par du stress physiologique (ROS) ou encore par des signaux inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF). Ils peuvent également être activés par d'autres cellules du microenvironnement tumoral, comme par exemple la production de granuline par les macrophages qui peut

promouvoir l'activation d'un environnement fibreux dans les métastases du foie [118]. Les études montrent que les CAFs sont composés de sous-populations aux fonctions bien différentes, qui peuvent promouvoir ou freiner la progression tumorale [119]. Par exemple, certains CAFs sécrètent le ligand CXCL12 (*CXC-chemiokin ligand 12*) pour promouvoir la prolifération des cellules souches cancéreuses. Plus généralement, la sécrétion par les CAFs de MMP2, CXCL12, TGF- β et IL-6 peuvent promouvoir la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses dans de nombreux cancers [120]. Plus récemment un rôle anti-tumoral a été montré dans certains CAFs. La délétion d'un certain type de myofibroblastes (α -SMA+) dans le cancer pancréatique aboutit à la suppression de l'immuno-surveillance, en augmentant les lymphocytes T régulateurs CD4+Foxp3+ dans les tumeurs [121].

La matrice extracellulaire (MEC)

En plus des contributions cellulaires, la matrice extracellulaire peut influencer sur la tumorigenèse. La MEC est un maillage non-cellulaire de macromolécules incluant le collagène, les protéoglycanes et des glycoprotéines, formant une structure dynamique. Cela a une influence physique et chimique sur la progression tumorale et la capacité à métastaser. Des signaux biochimiques et biomécaniques sont présents dans la MEC, des facteurs de croissance y sont séquestrés, et elle possède une organisation ultra-structurale avec des mécanismes de biomécaniques. Les cellules peuvent convertir ces signaux en diverses réponses cellulaires. La modulation des composants de la MEC est un changement commun à de nombreux cancers. Le remodelage de la MEC a notamment été observé dans des tissus pré-malins et l'augmentation de la rigidité de la matrice contribue à la transformation maligne dans le sein [122]. La rigidité de la matrice se définit par la capacité à résister à la déformation appliquée par une force, et dépend de la composition et de l'organisation de la matrice. La MEC tumorale est montrée comme étant 1.5 fois plus rigide que dans les tissus normaux. Une étude réalisée sur 337 patientes ayant un cancer du sein a permis de mettre en évidence que cette rigidité est associée aux sous-types les plus agressifs [123]. Les enzymes produits par les CAFs contribuent à augmenter la rigidité des tissus. Quand la signalisation YAP est activée dans les CAFs, cela promeut la rigidité de la matrice et l'invasion tumorale, montrant ici encore le rôle clé des CAFs dans la progression tumorale [124]. Plusieurs enzymes de remodelage de la MEC sont induites dans le cancer du sein. Sont impliquées les MMPs, les héparanases, l'urokinase plasminogen activator, et les enzymes de la famille LOX, qui sont fréquemment augmentées dans le cancer du sein [125]. La MEC a également un rôle dans la résistance aux traitements. Des études ont montré l'importance des composants matriciels dans la résistance à certaines chimiothérapies

dans divers cancers [126]–[128]. Elle a également un rôle dans la résistance aux radiothérapies dans le cancer du sein : la fibronectine et la laminine augmente la résistance aux radiations ionisantes dans les cellules tumorales [129]. Du fait du rôle clé de la MEC dans la tumorigenèse, des études expérimentales s'intéressent aujourd'hui à son ciblage thérapeutique qui se basent sur l'inhibition de composants de la MEC et en particulier sur le ciblage des enzymes de remodelage. Certaines études tentent par ailleurs de mimer la MEC tumorale afin de prévenir la formation de métastases [130].

Le tissu adipeux

Les adipocytes sont les principaux composants cellulaires du microenvironnement des tumeurs mammaires et de plus en plus de preuves existent montrant leur rôle dans la progression tumorale. Il a été observé que les adipocytes en contact avec les cellules tumorales peuvent être modifiés. On les appelle les adipocytes associés au cancer (CAA) et ils ont un phénotype différent, avec un profil de sécrétion et expression génique qui les différencie des autres adipocytes. Ils sécrètent des facteurs inflammatoires qui peuvent promouvoir l'invasion et la formation de métastases (comme par exemple TNF- α , VEGF ou l'IL-6) [131]. Il a été montré que le microenvironnement adipeux, composé essentiellement d'adipocytes, de cellules souches adipocytaires, de fibroblastes, de cellules endothéliales et immunitaires est capable de promouvoir l'angiogenèse [132].

Les adipocytes sont également une source de stockage énergétique. Ils peuvent libérer des lipides sous la forme d'acides gras non-saturés, or les cellules tumorales mammaires requièrent des acides gras pour beaucoup de processus biologiques. Les lipides contribuent au métabolisme des cellules tumorales mammaires. La co-culture des cellules tumorales avec des adipocytes 3T3-L1 induit la prolifération des cellules tumorales et réduit la présence dans le milieu de triglycérol [133]. L'hypothèse suivante a donc été émise : les tumeurs peuvent induire la reprogrammation métabolique des adipocytes, et peuvent s'adapter à leur processus métabolique intracellulaire requis pour la prolifération à travers des interactions dynamiques avec les CAAs [134]. Dans le cancer du sein, les CAAs induisent l'absorption des acides gras à travers le récepteur CD36 des cellules tumorales mammaires, aboutissant à une augmentation de la prolifération, de la migration et de l'invasion [135].

De plus, les adipocytes peuvent interagir et communiquer avec d'autres cellules à travers des vésicules extracellulaires. Il s'agit d'une interaction émergente dans l'influence des adipocytes sur la physiologie de la tumeur [136]. Les exosomes d'adipocytes induisent la

progression tumorale dans le mélanome, en stimulant la migration et l'invasion in vitro. De plus, une analyse de spectrométrie de masse a montré que la plupart des protéines retrouvées dans ces exosomes sont impliquées dans l'oxydations des acides gras. L'obésité peut également avoir une influence dans ce mécanisme puisque plusieurs études ont montré dans des cellules CF7 que les exosomes issus de femmes en obésité induisaient une plus forte prolifération cellulaire, migration et invasion en comparaison avec des exosomes de femmes non-obèses [137].

Chapitre 2 : la vasculogénèse tumorale

La première trace de l'utilisation du terme « angiogénèse » remonte à 1787 par un chirurgien nommé John Hunter. Cependant durant des dizaines d'années très peu d'études se sont portées sur ce sujet, et ce jusqu'au début des années 1960, où Judah Folkman eu l'idée de perfuser des solutions d'hémoglobine dans l'artère carotide d'un lapin et dans des glandes thyroïdes [138]. Lorsqu'il implanta des mélanomes murins dans ces glandes, de petites tumeurs se développèrent, atteignant toutes une taille plateau. Lorsqu'il réimplanta ces tumeurs dans des souris, elles se développèrent jusqu'à atteindre 1000 fois leur volume. Ces tumeurs de tailles plus conséquentes présentaient une vascularisation importante en regard des petites tumeurs. Les solutions utilisées de perfusions d'hémoglobine ne contenaient pas de plaquettes, globules rouges et leucocytes. En s'appuyant sur ces expériences, et en constatant les données cliniques dans le rétinoblastome où la tumeur primaire, très grosse, est très vascularisée alors que les métastases, petits, sont avasculaires, il émit l'hypothèse que la vascularisation est un élément essentiel du développement tumoral. Il fut également novateur en imaginant le développement de thérapies basées sur l'inhibition de l'angiogénèse.

Il est aujourd'hui admis que l'angiogénèse est une condition *sine qua non* du développement et de la progression tumorale. Au-delà de quelques millimètres cubes, les nutriments et l'oxygène apportés par diffusion passive des vaisseaux environnants ne suffisent plus. Les cellules tumorales initient alors différents processus grâce à la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques afin de pallier à ce manque.

I. Le système vasculaire

I.1. L'endothélium

L'endothélium est une membrane fine couvrant l'intérieur des vaisseaux sanguins et du cœur. Il forme l'interface entre le sang ou la lymphe dans le lumen et le reste du vaisseau. Il est constitué de cellules endothéliales, de formes allongées et de tailles variables allant de 0,10 à 0,20 μm de large et 100 à 200 μm de long. Les cellules endothéliales en contact avec le réseau

sanguin sont appelées cellules endothéliales vasculaires [139]. L'endothélium a un rôle pivot dans la protection contre les lésions vasculaires et dans le maintien de la fluidité du sang en réponse aux hormones, neurotransmetteurs et facteurs vasoactifs modulant la vasomotricité, la thrombose, l'agrégation plaquettaire et l'inflammation. La production de ces facteurs permet le bon fonctionnement de l'endothélium, par conséquent un mauvais équilibre aboutit au dysfonctionnement endothélial responsable par exemple de l'athérosclérose. Il est important de souligner qu'en fonction de la localisation des cellules endothéliales elles n'exprimeront pas les mêmes antigènes de surface et les cellules ne répondent pas de la même façon aux stimuli.

Leurs fonctions sont multiples et sont divisibles en trois types : un rôle trophique, un rôle sur le tonus et un rôle sur le trafic moléculaire.

1. Les cellules endothéliales ont un rôle modulateur de l'homéostasie métabolique ; elles ont un rôle clé dans le transport d'éléments nutritifs et des déchets produits par le fonctionnement des tissus. Plusieurs mécanismes existent à cet effet : elles peuvent transporter des molécules telles que le glucose (via les transporteurs de la superfamille de gènes GLUT) ou les aminoacides. L'utilisation de cavéoles, qui sont des invaginations de la membrane cellulaire, permettent de transporter de manière transcellulaire l'albumine principalement dans les cellules endothéliales. Les jonctions serrées permettent le transport paracellulaire d'ions, d'eau et de nombreuses macromolécules.
2. En plus de ce rôle de transport, l'endothélium module le tonus vasculaire à travers la sécrétion de molécules vasodilatatrices ou vasoconstrictrices. Par exemple, l'endothéline (et particulièrement ET-1) produite par les cellules endothéliales a des effets vasoconstricteurs. Le facteur vasodilatateur le plus décrit est le monoxyde d'azote (NO) synthétisé par les cellules endothéliales à partir de la L-arginine par l'enzyme NO-synthase (eNOS) qui est localisée dans les cavéoles membranaires. Il agit en activant la guanylate cyclase soluble (sGC) dans le muscle lisse vasculaire, qui à son tour augmente la guanosine cyclique monophosphate (cGMP), qui produit une réponse vasodilatatoire. [140].
3. Le sang est impliqué dans le transport de médiateurs moléculaires et cellulaires. L'endothélium a un rôle dans la diffusion de composants de l'immunité et de l'inflammation via la sécrétion de chémokines, la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires et des facteurs de croissances. De plus, les cellules endothéliales peuvent

modifier les protéines membranaires et permettre ainsi l'adhérence des leucocytes sur l'endothélium et leur sortie du réseau vasculaire.

Les cellules endothéliales sont donc à l'interface entre le sang circulant et les tissus, avec un rôle important dans le contrôle des échanges nutritifs et d'oxygène ainsi que sur le trafic cellulaire.

1.2. La vasculogénèse

La vasculogénèse est l'étape préalable consistant à former des vaisseaux sanguins primitifs grâce à la migration, la différenciation et l'association de cellules progénitrices endothéliales (angioblastes). Le système cardiovasculaire est le premier système fonctionnel qui se développe dans les embryons (**Figure 11**). La vasculogénèse se déroule en plusieurs étapes :

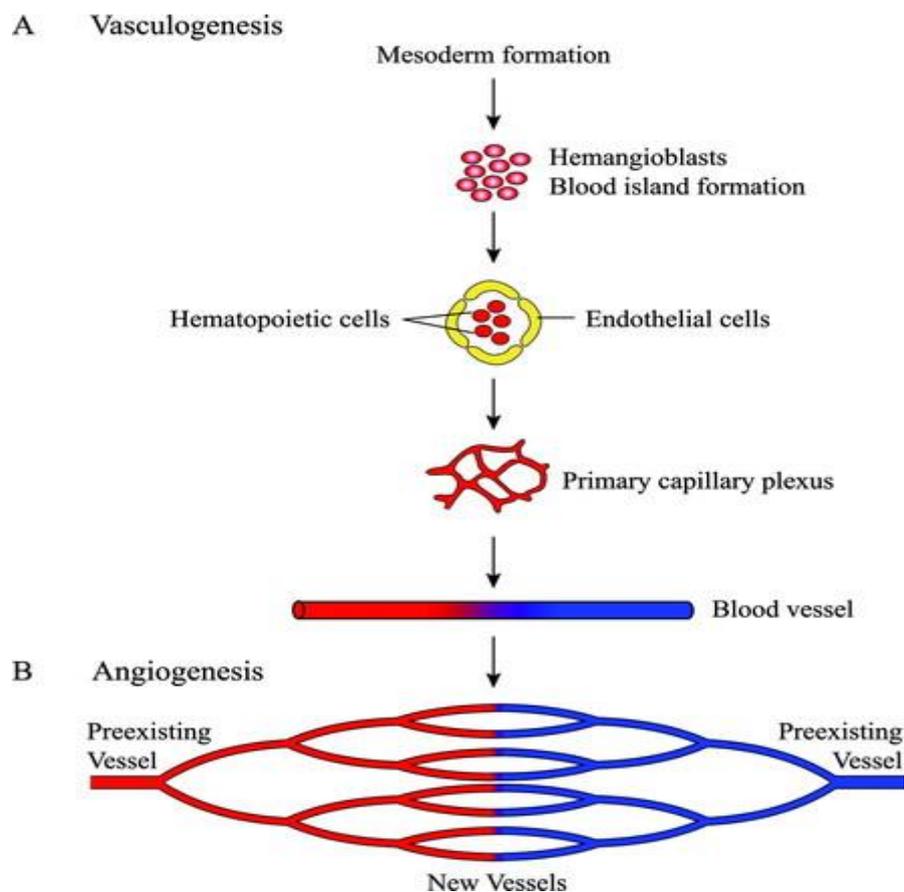


Figure 11: La genèse du système vasculaire (selon Huot et al, 2007)

- La première étape est la différenciation des cellules précurseurs endothéliales. Cette étape s'appelle l'**induction mésodermique**. Dès la formation précoce du mésoderme, à partir de l'épiblaste dans le processus de gastrulation, un groupe de cellules primitives du mésoderme deviennent des précurseurs des cellules sanguines et des cellules endothéliales : il s'agit des **hémangioblastes** [141]. Ces cellules apparaissent en premier lieu dans le sac vitellin extra-embryonnaire et fusionnent en amas pour former des **îlots sanguins**.
- Les cellules de cet îlot se différencient soit en cellules souches hématopoïétiques soit en progéniteurs de cellules endothéliales : les **angioblastes** [142]. En migrant, se regroupant et via la différenciation des angioblastes en cellules endothéliales, ces îlots forment des vaisseaux avec à terme la formation d'une lumière interne. Il s'agit de la formation de ce qu'on appelle le **plexus vasculaire primitif**. Au cours de cette étape la voie de signalisation du VEGF (*vascular endothelial growth factor*) est cruciale ; des études de gains et pertes de fonction du VEGF ont permis de mettre en évidence son rôle clé dans la constitution de réseaux sanguins dans l'embryogenèse [143]. L'interconnexion des réseaux endothéliaux vitellins et intraembryonnaires aboutit à la différenciation de l'endocarde et à la formation des deux aortes dorsales qui a lieu seulement au bout de trois semaines chez l'homme [144].

Le système cardiovasculaire, mais aussi la vascularisation de certains organes comme par exemple les poumons, sont issus de la vasculogenèse, alors que d'autres organes comme le système nerveux central sont vascularisés par le processus d'angiogenèse. La néovascularisation adulte est principalement effectuée par l'angiogenèse, mais des études ont démontré la présence d'angioblastes dans le sang qui peuvent contribuer à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans la vie adulte par vasculogenèse [145].

1.3. L'angiogenèse

1.3.A. Les processus

La formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants est appelée angiogenèse. Elle a lieu suite à la vasculogenèse *in utero* et plus rarement au cours de la vie adulte. De manière physiologique l'angiogenèse est observée par exemple au cours du cycle ovarien et la grossesse ou encore lors des processus de cicatrisation. Elle intervient également de manière pathologique lors de la croissance tumorale, dans le diabète ou encore

dans les maladies inflammatoires. Ce processus permet le remodelage du réseau capillaire primitif via deux mécanismes distincts : l'intussusception et le bourgeonnement [146].

Le bourgeonnement

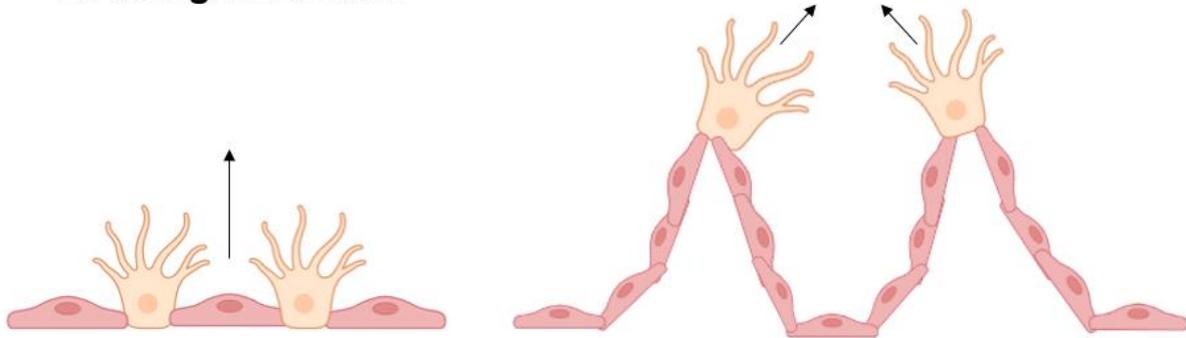


Figure 12: Le bourgeonnement (adaptée Banfi et al., 2011)

- Le bourgeonnement (**Figure 12**) : Les cellules endothéliales prolifèrent et migrent en fonction de signaux extracellulaires qu'elles reçoivent. Lors du bourgeonnement, les cellules sont activées par un stimulus extracellulaire angiogénique, qui va rompre leur état de quiescence. Cette étape a souvent lieu dans des tissus pauvres en oxygène et peu perfusés, où l'hypoxie va induire la demande de nouveaux vaisseaux. La plupart des cellules parenchymateuses (hépatocytes, neurones, astrocytes, etc.) répondent à l'hypoxie par la sécrétion de signaux pro-angiogéniques et notamment le VEGF-A [147]. Ainsi ces cellules endothéliales activées vont proliférer et migrer vers le signal. Cette étape se fait grâce à ce que l'on appelle une *tip cell*. Il s'agit d'une cellule endothéliale non proliférative qui possède des extensions de filopodes pour diriger la migration. Elle guide ainsi la formation du capillaire à travers la matrice extracellulaire (MEC). Ses filopodes sécrètent des enzymes protéolytiques qui permettent de traverser la MEC. Dans un même temps certaines cellules endothéliales prolifératives suivent la *tip cell* et forment les prémices d'un nouveau tronçon vasculaire. Lorsque la *tip cell* rencontre un ou plusieurs autres vaisseaux, elle fusionne et crée un lumen continu permettant la circulation sanguine. La maturation et la stabilisation de ce nouveau vaisseau se fait grâce aux cellules murales ou péricytes, des cellules attachées aux capillaires et permet leur maintien en état de quiescence.

L'intussusception

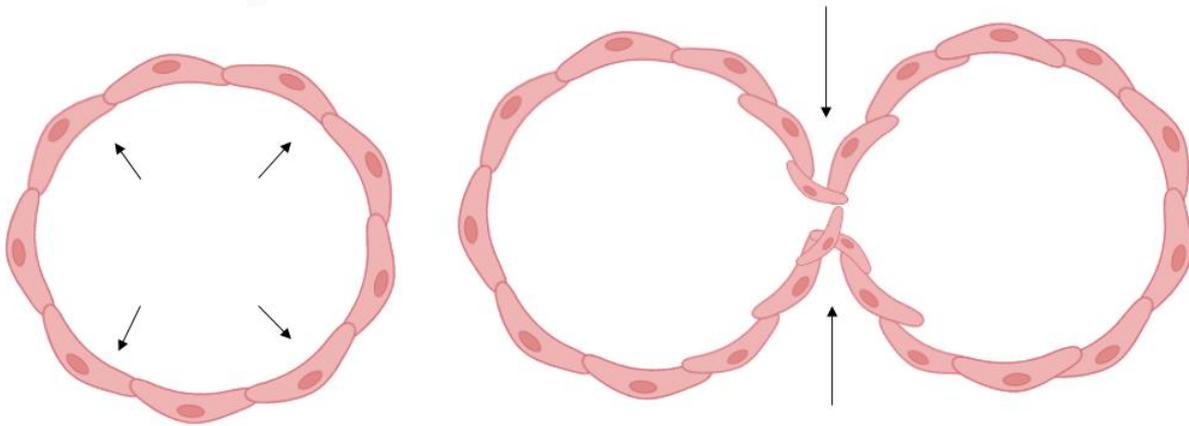


Figure 13: *l'intussusception (adaptée de Banfi et al., 2011)*

- L'intussusception (**Figure 13**) à l'inverse est un mécanisme dans lequel les cellules endothéliales opposées dans le vaisseau s'invaginent et entrent en contact formant deux vaisseaux au lieu d'un. Contrairement au bourgeonnement c'est un processus qui requiert peu de prolifération des cellules endothéliales, il est dit plus rapide et efficace car il requiert seulement un remaniement des cellules préexistantes. Sa découverte étant plus récente, ses mécanismes sont moins connus [148].

1.3.B. Les facteurs pro-angiogéniques

Les cellules endothéliales sont soumises à de nombreux facteurs qui vont influencer leur comportement. Ces facteurs sont des cytokines, protéines solubles synthétisées par les cellules d'un tissu pour modifier le fonctionnement d'une autre. Elles peuvent agir de manière endocrine avec un passage dans la circulation pour atteindre des cibles distantes, de manière paracrine entre des cellules proches, ou juxtacrine entre cellules en contact. De plus, la cellule émettrice peut être la cellule cible ; on parle alors d'un mode d'action autocrine. Nous allons détailler ci-après les principaux facteurs pro-angiogéniques.

Le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

La famille des VEGF se compose de 5 glycoprotéines structurellement très proches : VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et le facteur de croissance placentaire PIGF [149]. Leurs effets sont médiés par trois récepteurs tyrosine kinase nommés VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3. Les membres de la famille VEGF peuvent également interagir avec d'autres protéines comme les neuropilines, les intégrines et les cadhérines. VEGFR-1/2 sont prédominants dans les cellules endothéliales vasculaires. Les récepteurs VEGFR sont composés d'un domaine extracellulaire responsable de la liaison du ligand, d'un domaine transmembranaire, et d'un domaine cytoplasmique responsable de l'activité tyrosine kinase. La liaison de VEGF à la partie extracellulaire de son récepteur promeut l'activation de la tyrosine kinase, qui phosphoryle le résidu tyrosine, activant à son tour plusieurs voies de signalisation.

VEGFA est la protéine la plus connue et le principal protagoniste des processus de vasculogenèse et d'angiogenèse. Suite à l'épissage alternatif du gène *VEGFA* six isoformes sont générés (VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆ et VEGF₁₄₅ et VEGF₁₈₃). Ces protéines se lient à VEGFR-1 avec une haute affinité, et plus faiblement à VEGFR-2. Par ailleurs, l'activation de VEGFR-2 génère le majeur signal pro-angiogénique et constitue la principale voie d'activation de la prolifération et de la régulation de la perméabilité endothéliale. La voie de signalisation PLC γ -PKC-MAPK est activement liée à l'activation de VEGFR-2 et est cruciale pour l'activation de la prolifération endothéliale. La cascade d'activation de VEGFR-1 reste quant à elle moins comprise, et il semblerait y avoir une activité de la kinase plus faible. Les activités pro-angiogéniques liées à VEGFR-1 sont souvent soit faibles soit indétectables [150] (**Figure 14**).

Le système VEGF est sous la dépendance du facteur induit par l'hypoxie HIF1 (*hypoxia-inducible factor*), mais est également dépendant de certaines voies de signalisation comme la voie EGF (*epidermal growth factor*) [151] ou PDGF, ainsi que certains oncogènes comme Ras [152].

L'angiopoïétine/TIE

La deuxième voie de signalisation des récepteurs à activité tyrosine kinase, spécifique des cellules endothéliales, est la voie des récepteurs TIE. Les angiopoïétines (ANG-1, ANG-2, ANG-3 et ANG-4) sont des ligands qui se lient aux récepteurs TIE-1 et TIE-2. Ensemble, ils contrôlent l'état de quiescence des vaisseaux chez l'adulte et régulent différentes étapes de la

cascade de l'angiogenèse. La plupart des études réalisées se sont focalisées sur ANG-1 et ANG-2. TIE-1 et TIE-2 sont exprimés dans les endothéliums sanguins et lymphatiques, ainsi que dans certaines cellules hématopoïétiques. Ce système de régulation n'est pas requis pour la différenciation des cellules endothéliales, ni pour la vasculogenèse et pour la formation du système vasculaire lymphatique dans l'embryon [153]. Il est en revanche nécessaire pour le remodelage et la maturation de la vascularisation dans les phases plus avancées de l'embryogenèse ainsi que dans le développement post-natal. Il a été montré que ANG-1, le ligand de TIE-2, stabilise l'endothélium vasculaire sanguin, en limitant les réponses angiogéniques dans des conditions pathologiques. Il est sécrété dans les vaisseaux matures et quiescents. ANG-2 a longtemps été considéré comme un antagoniste de TIE-2, dans la mesure où il promeut la plasticité endothéliale. Cependant son action semble être dépendante du contexte et il peut agir en tant qu'agoniste sous certaines conditions. Dans les deux cas l'activation de TIE-2 par ANG-1 ou ANG-2 induit l'internalisation du récepteur et la libération du ligand [154]. Le rôle de TIE-1 est plus controversé, et n'est pas complètement compris à ce jour. Il est capable de s'hétérodimériser avec TIE-2 et de modifier l'activité de ce dernier (**Figure 14**).

Le facteur de croissance des fibroblastes (FGF)

Le facteur de croissance des fibroblastes (FGF) participe à la prolifération, la migration et la réparation tissulaire chez l'adulte en stimulant de nombreux types cellulaires dont les cellules endothéliales [155] (**Figure 14**). Cette famille comporte 22 membres dont deux sont particulièrement étudiés dans le cadre de l'angiogenèse : FGF-1 et FGF-2. Ils agissent en se liant à leurs récepteurs FGFRs à activité tyrosine kinase exprimés à la surface des cellules cibles. Les cellules endothéliales expriment FGFR1, ainsi que, sous certaines conditions, FGFR2. Le FGF favorise la migration des cellules endothéliales et augmente la synthèse du VEGF. Il joue sur la prolifération des cellules endothéliales en activant plusieurs voies de signalisation comme la voie MAPK ou PKC. De plus, FGF-1 et 2 régulent la production d'UPA (*urokinase-type plasminogen activator*) et de certaines MMPs (métalloprotéases matricielles) dans les cellules endothéliales ce qui va entraîner la dégradation de la matrice extracellulaire permettant la formation des vaisseaux vasculaires. De plus, le FGF est capable d'induire la synthèse de collagène, fibronectine, de protéoglycanes, soulignant son implication dans le remodelage de la matrice extracellulaire.

TGF- β et TNF- α

Le facteur de croissance transformant bêta (**TGF- β**) joue un rôle de premier plan [156]. Il s'agit d'une famille de cytokines multifonctionnelles qui ont un effet à travers des récepteurs sérines/thréonines kinases et les facteurs de transcription SMAD. Il a été montré que TGF- β a un rôle dans la régulation de l'activation des cellules endothéliales de deux manières principalement : ALK1 induit la phosphorylation de SMAD1/5 et donc la prolifération et migration des cellules endothéliales, ALK5 induit la phosphorylation de SMAD2/3 et la différenciation des cellules endothéliales ainsi que la maturation des vaisseaux sanguins [157]. En condition physiologique il contribue également à la stabilisation des néovaisseaux en stimulant la sécrétion de fibronectine et de protéoglycane par les cellules endothéliales et les cellules du muscle lisse [158].

Le facteur de nécrose tumorale alpha (**TNF- α**), qui est un médiateur de l'inflammation, induit des changements dans l'expression génique des cellules endothéliales comme par exemple l'induction de molécules d'adhésion, d'intégrines et de MMPs [159]. Il est décrit comme ayant des effets pro- et anti-angiogénique en fonction du contexte et de l'étape de l'angiogenèse. Par exemple, TNF- α a une régulation négative sur l'expression des récepteurs VEGF dans les cellules endothéliales et a un impact sur sa voie de signalisation. On peut en partie expliquer l'effet anti-angiogénique de TNF- α par la modulation de la voie VEGF [160].

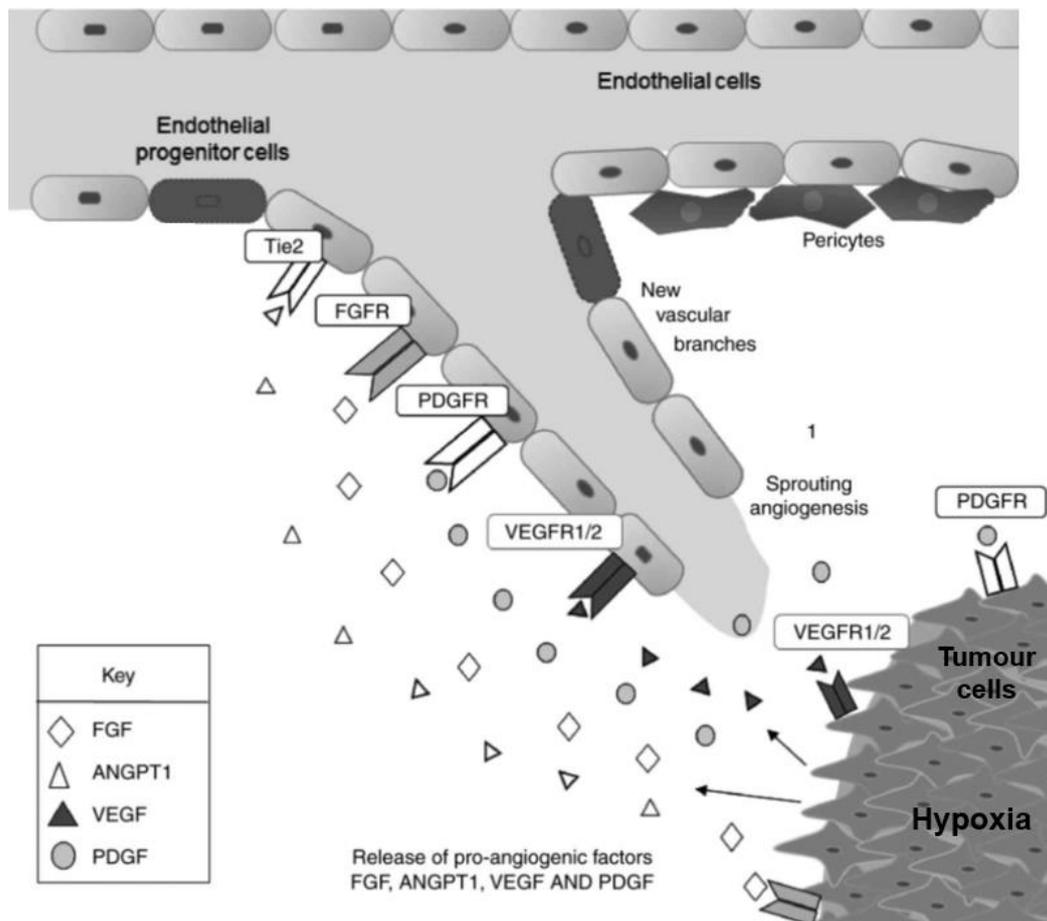


Figure 14: Principaux mécanismes pro-angiogénique (selon Camarillo et al. 2018)

II. Les mécanismes de la vascularisation tumorale

Au-delà de quelques millimètres cubes, les nutriments ainsi que l'oxygène apportés par les vaisseaux environnants d'une tumeur ne sont plus suffisants pour alimenter la tumeur. Plusieurs modes de formation des vaisseaux tumoraux existent pour pallier à ce besoin. Les vaisseaux tumoraux ont une structure et des caractéristiques différentes des vaisseaux physiologiques dues en partie à la sécrétion constante de facteurs pro-angiogéniques. En effet, à l'inverse des processus physiologiques pour lesquels les nouveaux vaisseaux mûrent et deviennent rapidement stables, les vaisseaux tumoraux ne sont pas régulés. Ils ne deviennent pas quiescents ce qui rend les réseaux tumoraux atypiques. Ils présentent une perméabilité constitutive, une dilatation, et surtout il s'agit de réseaux désorganisés avec en finalité un flux de sang anormal. Du fait de cette grande perméabilité, on retrouve sur les sites tumoraux des fuites vasculaires,

des œdèmes, de la fibrose et de l'inflammation, favorisant au passage la dissémination tumorale.

II.1. L'angiogenèse tumorale

Chez un individu sain, les cellules endothéliales sont dans un état quiescent, régulée par une balance de facteurs pro- et anti-angiogéniques. Dans une tumeur, la présence de facteurs déclenchant l'angiogenèse comme l'hypoxie ou l'inflammation, fait basculer la balance en faveur des agents pro-angiogéniques. Ce phénomène est appelé « switch angiogénique » et a été mis en évidence à la fin des années 80 par Folkman [161]–[163] (**Figure 15**). Le développement de modèles murins modifiés génétiquement a permis l'étude de ce *switch* afin de modéliser ce processus et de comprendre les mécanismes impliqués. Un des modèles les plus étudiés est le RIP1-Tag2 de tumeur de pancréas chez le rat. Dans ces tumeurs, l'initiation tumorale commence par de petites tumeurs non-vascularisées, parmi lesquelles une petite proportion se développent et se vascularisent, pouvant aboutir à de plus grosses tumeurs très vascularisées qui peuvent former des métastases vascularisées dans les poumons. Ce modèle, avec d'autres modèles murins, ont permis d'identifier de nombreux facteurs et mécanismes cellulaires permettant le développement tumoral [164].

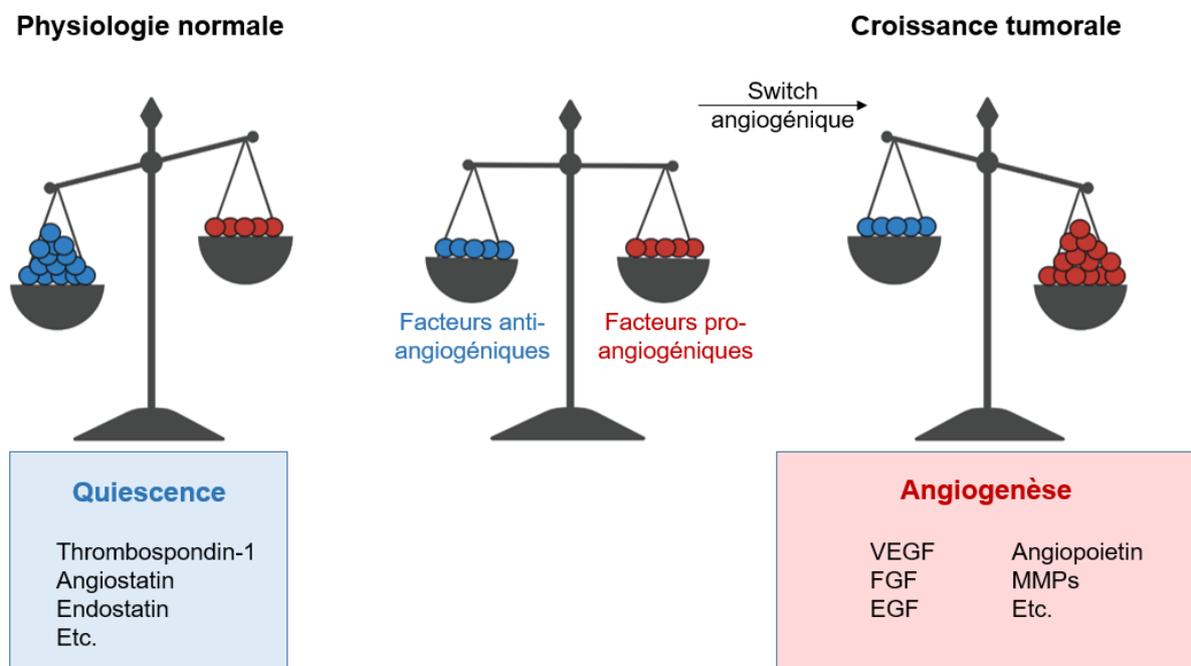


Figure 15: Le switch angiogénique (adaptée de Folkman et al., 1996)

L'hypoxie joue un rôle majeur dans le *switch* angiogénique. La prolifération incontrôlée induit un manque d'oxygène dû au manque d'approvisionnement adapté. L'hypoxie induit de nombreuses modulations de voies de signalisation dont la plus spécifique est celle du facteur inductible de l'hypoxie (HIF), mais on peut également citer PI3K/AKT/mTOR, MAPK ou encore NF- κ B [165]. HIF-1 et HIF-2 sont des facteurs de transcription constitués de deux sous-unités : α et β . La sous-unité β est exprimée constitutionnellement tandis que la sous-unité α est protégée de la dégradation seulement dans des conditions hypoxiques [166]. Un taux élevé de HIF-1 et HIF-2 est lié à une mortalité plus élevée dans différents types de cancers. Dans le cancer du sein par exemple, la surexpression de HIF-1 est un indicateur d'un mauvais pronostic et de phénotype agressif [167], [168]. Les études de gain ou perte de fonction de HIF-1 ont montré son rôle dans la progression tumorale, la vascularisation et la formation de métastases [169]. Cela s'explique par leurs rôles de modulateur transcriptionnel ; HIF-1 et 2 se lient et activent la transcription de gènes cibles jouant des rôles critiques dans la cancérogenèse [170]. Par exemple, la voie HIF promeut l'angiogenèse à travers la régulation transcriptionnelle de VEGF et SDF-1, en modulant l'e-cadhérine (E-CAD), ZEB1 et ZEB2 elle régule la transition épithélio-mésenchymateuse, et elle agit sur la migration et l'invasion par CXCR4, MMP-2 et MMP-9 [165]. Le rôle de HIF dans l'angiogenèse, en plus de la régulation de VEGF, est amplifié par la régulation de facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF-R2, les angiopoïétines, mais également des membres de la famille FGF, PDGF [171].

II.2. *Le mimétisme vasculaire*

II.2.A. *Découverte et propriétés*

En 1999, Maniotis *et al.* publient une étude sur le mélanome agressif montrant dans des coupes de tissus des réseaux interconnectés de matrice extracellulaire dans des zones où il n'y avait pas de nécrose [172]. Des globules rouges ont été détectés dans ces réseaux et ils ont été identifiés comme étant des réseaux vasculaires. En revanche, la microscopie optique, la microscopie à transmission d'électron, et des marquages immunohistochimiques n'ont pas permis de détecter de cellules endothéliales. Parallèlement, ils ont montré que les cellules tumorales de mélanomes agressifs étaient capables de former des réseaux en trois dimensions lorsqu'elles sont mises en culture dans du matrigel ou du collagène de type 1, et ce sans

présence de cellules endothéliales ou de fibroblastes. Ces réseaux étaient semblables à ceux observés dans les coupes. Ils ont mis en évidence que cette capacité semblait être exclusivement réservée aux cellules tumorales agressives. Les mélanocytes normaux ou les cellules de mélanome peu agressives n'étaient en effet pas en capacité de former ces réseaux. Les cellules agressives ont pu remodeler le gel, pour former des micro-vaisseaux *in vitro*. Pour aller plus loin dans leur découverte, un *microarray* d'ADN a été réalisé sur des cellules tumorales hautement agressives *versus* peu agressives. Une réversion génétique vers un état simili-embryonnaire a été observée dans les cellules agressives qui se sont donc transdifférenciées en un phénotype similaire aux cellules endothéliales. Ce mécanisme sera par la suite nommé **mimétisme vasculaire (VM)**.

Le VM permet aux cellules tumorales de former des structures vasculaires contenant du plasma et des cellules sanguines afin de permettre un approvisionnement en nutriments à la tumeur. Il est important de préciser qu'il ne s'agit pas de vaisseaux sanguins à proprement parler mais bien de structures mimant la fonction des réseaux sanguins, apportant toute la particularité de ce mécanisme [173]. Les réseaux vasculaires mimétiques sont des tubes constitués de cellules cancéreuses reposant sur la membrane basale discontinue. Cette membrane est formée de dépôt de glycoprotéines de matrice extracellulaire et elle entoure le lumen central (**Figure 16**). Ces structures riches en matrice sont formées de laminine, qui est une glycoprotéine d'adhésion présente dans la membrane basale. Ces réseaux sont identifiés par des marquages positifs à la coloration PAS (*Periodic Acid Schiff*) qui est utilisée en histologie, marquant les glycoprotéines en rose. De plus, ils ne possèdent pas de marqueurs de cellules endothéliales (CD31, CD34 ou encore l'antigène relatif au facteur VII). La façon clinique standard d'identifier ces réseaux repose sur le marquage PAS+/CD31- lors de biopsie et d'analyses histopathologiques.

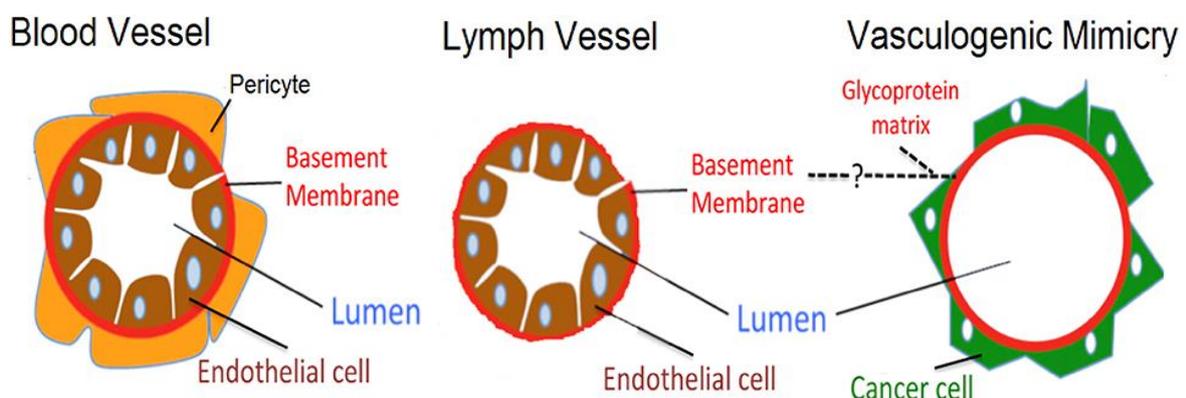


Figure 16: Constitution des différents types de réseaux vasculaire (selon Pinto et al, 2019)

Initialement découvert dans le mélanome, ce processus a aujourd'hui été montré dans d'autres cancers comme le cancer de l'ovaire, la prostate, les poumons, le glioblastome et du sein. Dans ce dernier, une étude sur des xénogreffes chez la souris a révélé dans le centre de tumeurs solides l'absence de nécrose et de fibrose, mais également l'absence de cellules endothéliales [174], suggérant ainsi qu'un réseau vasculaire sans cellule endothéliale était présent.

II.2.B. Mécanismes de régulation

De nombreux facteurs extracellulaires, ainsi que l'hypoxie et l'autophagie sont impliqués dans le mimétisme vasculaire. Il est fréquent de voir du VM dans des conditions hypoxiques, mais il arrive également que des cellules tumorales forment du VM dans des conditions de normoxie [175]. De plus, certains oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs régulent ou contribuent au VM. Les acteurs principalement impliqués dans le VM sont la VE-cadhérine, Notch, et l'hypoxie.

VE-cadhérine

Il s'agit d'une protéine transmembranaire retrouvée généralement dans l'endothélium. Cette protéine joue un rôle dans les jonctions adhérentes. Structuellement, elle contient cinq domaines extracellulaires qui peuvent former des *cis* homodimères avec d'autres molécules de VE-cadhérines. Son domaine intracellulaire peut être modifié par des modifications post-transcriptionnelles ainsi que par des phosphorylations. VE-cadhérine est corrélée dans le cancer du sein et du mélanome à des tumeurs agressives et à de mauvais pronostics [176]. Son inactivation résulte en la diminution d'agressivité, visible par la baisse de prolifération, d'adhésion et d'invasion cellulaire. La diminution de VE-cadhérine par CRISPR/Cas9 ou *silencing* dans des cellules tumorales agressives de mélanome aboutit à l'inhibition de réseaux vasculaires montrant le rôle clé de cette protéine dans le VM [177]. La réexpression de VE-cadhérine permet de rétablir cette capacité de VM [178].

En 2006 Hess *et al.* ont démontré que la VE-cadhérine était capable de réguler l'expression de EPHA2 à la membrane cellulaire, en modulant sa phosphorylation. Ces deux protéines sont co-localisées dans les jonctions cellulaires et sont capables d'interagir directement et indirectement dans le processus de mimétisme vasculaire [179]. Une étape

importante du VM est le clivage de la laminine $5\gamma 2$ en $5\gamma 2x$ et $5\gamma 2'$ permettant un dépôt dense de matrice extracellulaire, et la formation de vaisseaux dans les tumeurs. Cette étape est médiée par EPHA2 qui active la kinase d'adhésion focale FAK, qui a elle-même un rôle essentiel dans le VM [180].

L'hypoxie

L'hypoxie est associée à la malignité, au développement de métastases et à l'angiogenèse. Mais elle est également liée au mimétisme vasculaire. Des études sur le cancer de l'ovaire ont montré que l'hypoxie contribuait à la formation de VM par l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse [181]. Dans le cancer de l'œsophage, une étude réalisée en 2014 a révélé que l'inhibition de HIF-1 α induit l'inhibition de prolifération, la diminution de l'expression de VE-cadhérine, et la diminution du nombre de réseaux vasculaires formés par VM. Dans ce modèle, HIF-1 α module le VM via la régulation de l'expression de VE-cadhérine, qui à son tour inhibe l'expression de EPHA2 [182]. Ainsi, les mécanismes d'action de l'hypoxie sur le VM sont multiples. HIF-1 et -2 peuvent augmenter dans le mélanome l'expression de VEGF C ainsi que celle du récepteur VEGFR3 et moduler ainsi la plasticité cellulaire et le mimétisme vasculaire [183]. L'hypoxie est aussi un régulateur important dans les niches des cellules souches cancéreuses (CSCs). L'hypoxie agit sur différentes voies comme MAPK/ERK, adénosine/STAT3/IL-6, Notch, Hippo, Wnt, pour promouvoir la différenciation multidirectionnelle des CSCs, comme par exemple leur transformation en cellules *endothelial-like* [184], [185].

CSCs, TEM et VM

Les cellules souches cancéreuses (CSCs) qui émergent grâce à l'hypoxie sont connues pour participer directement au développement du VM dans les tumeurs mammaires triples négatives [186] et dans de nombreux cancers. Cependant les mécanismes et les interactions exacts restent encore mal compris. Dans une étude *in vitro* utilisant la lignée mammaire HCC1937, les CSCs triées en fonction de l'expression ALDH+ peuvent former des réseaux vasculaires alors que les cellules ALDH- ne le peuvent pas, indiquant que les cellules avec des propriétés de CSCs (ALDH+) dans la sous-population de HCC1937 sont essentielles dans la capacité à former du VM [187]. De plus, le marqueur de CSC CD133 a été associé au VM dans les différents sous-types de cancer du sein sur un panel de 134 prélèvements de patientes avec une plus forte corrélation dans les tumeurs triples négatives [188]. Dans cette étude de Liu *et al.*, la lignée mammaire triple négative MDA-MB-231 a été sous-clonée et les clones

présentaient une hétérogénéité en termes de marqueurs des CSCs. Les clones présentant des caractéristiques de CSCs étaient capables de former des réseaux vasculaires, permettant d'émettre l'hypothèse que le phénotype CD133+ des cellules MDA-MB-231 est responsable du VM.

La transition épithélio-mésenchymateuse, régulée par les facteurs de transcription SNAI, ZEB, et TWIST joue également un rôle dans la formation de VM. L'inhibition de ZEB1 induit une inhibition de la TEM accompagnée d'une suppression du mimétisme vasculaire dans la lignée mammaire MDA-MB-231 [189]. Dans le carcinome hépatocellulaire, les protéines Bcl-2 et Twist1, co-exprimées dans des conditions hypoxiques, peuvent former un complexe qui permet l'activation transcriptionnelle de divers gènes promouvant la plasticité cellulaire et le mimétisme vasculaire [190]. Les cellules capables de faire du mimétisme vasculaire expriment des facteurs de la TEM.

Les voies de signalisations : Notch

Notch est un récepteur transmembranaire présentant quatre isoformes qui est clivé par la γ -secretase après liaison avec ses ligands [191]. Son domaine intracellulaire est libéré dans le cytoplasme et est importé dans le noyau où il régule l'expression de nombreux gènes, dont l'expression de Nodal. A son tour, Nodal phosphoryle SMAD2/3, permettant son association avec SMAD4, et l'activation de l'expression des gènes cibles de Nodal (comme LEFTY, qui permet sa boucle de rétroaction négative). Notch participe au développement vasculaire embryonnaire et, de ce fait, peut être impliqué dans la formation de mimétisme vasculaire dans le cancer.

Son lien avec le VM a été montré dans le mélanome où son inhibition par des inhibiteurs de la γ -secretase permettait la stabilisation du VM. Dans un modèle de greffes de mélanomes chez la souris *nude*, les tumeurs dans lesquelles Notch était inhibé étaient plus grosses et connectées de réseaux vasculaires [192]. Toujours dans le mélanome, une étude s'est intéressée à Notch4 dans les formes agressives du mélanome et a démontré le lien entre Notch et le VM [193]. Notch4 était requis pour la prolifération cellulaire et la survie des cellules agressives de mélanome, et son lien dans la plasticité cellulaire et la tumorigenèse a été montré.

II.3. Autres processus existants

La majorité de la progression tumorale non-angiogénique passe par la cooptation vasculaire. Ce terme est utilisé pour la première fois en 1999 dans une étude de Holash *et al.* [194]. A l'inverse du modèle généralement admis qu'une tumeur commence par une masse avasculaire et, via l'angiogenèse, progresse grâce à la vascularisation, ils ont montré que certaines tumeurs commencent leur développement par de la coopération avec les vaisseaux de l'hôte préexistants. Ce réseau vasculaire hôte en cooptation ne subit pas d'angiogenèse mais régresse dans un premier temps, menant au développement d'une masse tumorale avasculaire et d'une perte tumorale massive. Ce qu'il en reste pourra par la suite être sauvé par un réseau angiogénique qui permettra alors la croissance tumorale. Ce processus est plus fréquemment observé dans des tumeurs ayant pour origine des organes richement vascularisés comme le cerveau, les poumons, le foie, permettant à la tumeur de coopter les réseaux sanguins adjacents dans les tissus de l'hôte [195]. Ainsi, les cellules tumorales migrent le long du vaisseau préexistant, et détournent le système vasculaire de l'hôte [196].

De plus en plus d'études visant à mieux comprendre ces mécanismes ont vu le jour, à la recherche de stratégies thérapeutiques permettant de normaliser le réseau vasculaire tumoral.

III. Thérapies anti-angiogéniques

Depuis le début de la connaissance de l'angiogenèse tumorale et de son importance dans la croissance tumorale, des hypothèses ont été émises quant à l'intérêt de développer des thérapies anti-angiogéniques. L'angiogenèse étant régulée par une variété de cytokines, plusieurs techniques ont été développées aux cours de ces dernières années pour contrer cette étape, avec plus ou moins de succès.

III.1. Les thérapies anti-angiogéniques basées sur VEGF

Le VEGF, comme décrit ci-dessus, régule la croissance des vaisseaux sanguins et est considéré comme un régulateur essentiel de la vascularisation tumorale. De ce fait, la plupart

des thérapies anti-angiogéniques visent à bloquer cette voie de signalisation afin « d'affamer » les tumeurs et inhiber leur prolifération (**Figure 17**). La plupart des thérapies ciblent VEGFA et VEGFRs ainsi que leurs signaux pro-angiogéniques.

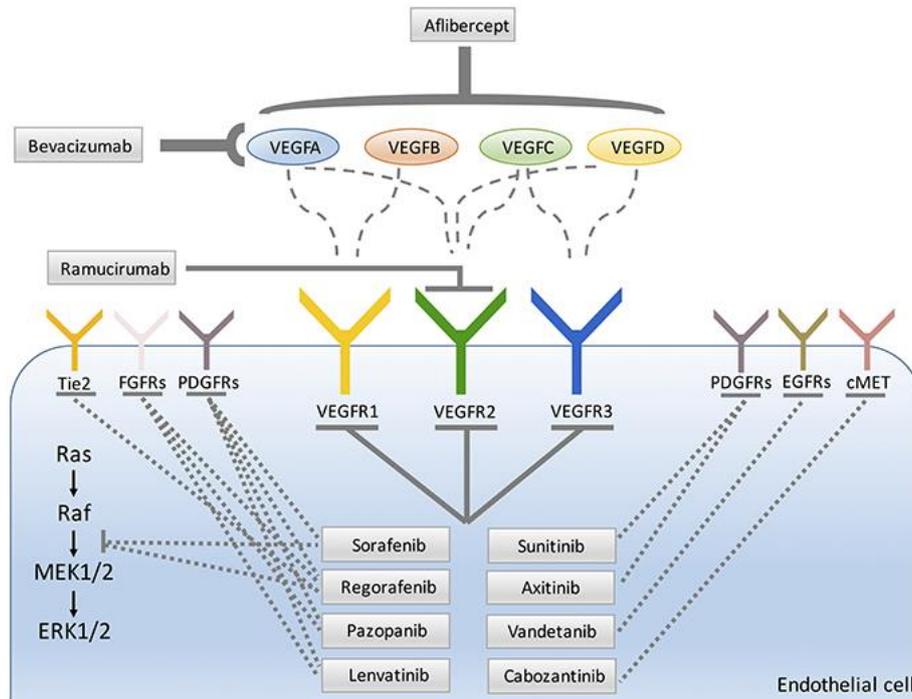


Figure 17: Principales cibles moléculaires des thérapies anti-angiogéniques approuvées (selon Bussolino et al., 2017)

Le pionnier dans ce domaine est l'anticorps anti-VEGF **Bevacizumab** [197], approuvé par la FDA en 2004 en tant que première ligne dans le cancer colorectal métastatique en association avec des chimiothérapies. Il reste à ce jour la thérapie anti-angiogénique la plus décrite et étudiée. Ses applications se sont au fur et à mesure étendues à d'autres cancers comme le cancer du sein, le cancer des poumons non à petites cellules, le glioblastome, le cancer rénal, ovarien et du col de l'utérus. Le Bevacizumab se lie au VEGF-A et bloque son interaction avec son récepteur, ayant pour finalité d'inhiber la voie de signalisation VEGF [198]. Les études cliniques ont montré son intérêt non pas en monothérapie, jugée inefficace, mais en combinaison avec des chimiothérapies ce qui permet d'augmenter la survie sans progression dans divers cancers avec des états métastatiques. Son utilisation dans le cancer du sein reste controversée. Peu de temps après son autorisation par la FDA, des études cliniques de phase II n'ont pas permis de confirmer son efficacité, et l'autorisation fut retirée [199]–[201]. Il reste cependant utilisé dans certains pays.

L'**Aflibercept** est une protéine de fusion soluble qui peut se lier à tous les isoformes de VEGF et de PLGF. Plusieurs études de phase III ont été réalisées dans différents cancers solides, montrant son intérêt en termes de survie globale et survie sans progression. Ce fut le cas dans des études dans le cancer colorectal avec état métastatique en combinaison avec du Leucovorin, 5-fluorouracil et Irinotecan [202], [203].

Le **Ramucirumab** est un anticorps monoclonal ciblant le domaine extracellulaire de VEGFR-2 qui a été autorisé par la FDA en 2014 pour le traitement des cancers gastriques métastatiques [204] en agent seul mais également en association avec du Paclitaxel. Cette autorisation fut étendue aux cancers des poumons non à petites cellules, et au cancer colorectal. Il est aujourd'hui autorisé en monothérapie dans le cancer hépatocellulaire [205]. Des études de phases II et III ont montré l'échec du Ramucirumab dans le cancer du sein à augmenter la survie sans progression et la survie globale [206], en mettant par ailleurs en avant que ce traitement entraîne des effets secondaires supérieurs aux autres.

Des **inhibiteurs de tyrosine kinase** ont été développés pour cibler la fonction intracellulaire catalytique des récepteurs VEGFR et PDGFR [207]. Parmi eux, le Sorafenib et le Sunitinib sont deux thérapies pionnières. Le **Sorafenib** est un inhibiteur de VEGFR, PDGFR et Raf [208], [209]. Il présente une activité antiproliférative, apoptotique, anti-angiogénique et anti-fibrotique. Ce traitement est approuvé dans le carcinome à cellules rénales, l'hépatocarcinome, et le cancer de la thyroïde. Dans le cancer du sein en revanche les effets sont plus minces. Des études cliniques ont montré une plus grande toxicité et une survie globale non augmentée que ce soit dans les tumeurs localement avancées ou métastatiques HER2- [210], [211]. Le **Sunitinib** est un inhibiteur de VEGFR-1 et -2, c-KIT, PDGFR- α , PDGFR- β [212]. Il est approuvé dans le carcinome à cellules rénales, les tumeurs stromales gastro-intestinales et les tumeurs pancréatiques neuroendocrines. De même que pour le Sorafenib, ses résultats dans le cancer du sein restent décevants [213].

Par la suite, d'autres inhibiteurs ont été développés avec des toxicités plus faibles. Ils ont pour but de mieux cibler tout en ayant moins d'effets *off-targets*, afin de permettre de baisser la dose d'administration. Le **Regorafenib** permet d'agir sur l'angiogenèse tumorale, l'oncogenèse, et le microenvironnement tumoral. Il permet également d'inhiber la TEM [214]. S'ajoutent à cette liste le **Pazopanib**, **Cabozantinib**, **Lenvatinib**, **Axitinib** et le **Vandetanib** qui sont approuvées comme thérapies dans des indications spécifiques [215].

Comme nous avons pu le voir, les essais cliniques ne sont pas très positifs concernant l'efficacité de ces traitements dans le cancer du sein. Plusieurs mécanismes de résistance ont été étudiés.

III.2. Mécanismes de résistance aux thérapies anti-angiogéniques VEGF/VEGFR dans le cancer du sein

Les études cliniques et précliniques ont mis en avant le fait que les tumeurs mammaires ont la capacité d'acquérir la résistance aux inhibiteurs angiogéniques à travers divers mécanismes.

La vascularisation non-angiogénique

Comme déjà énoncé, les cellules tumorales agressives mettent en place le mimétisme vasculaire et la cooptation afin de se vasculariser. Il a été montré que le Bevacizumab dans la lignée tumorale mammaire HCC1937 ne permettait pas de bloquer le mimétisme vasculaire [216]. Une autre étude a montré *in vivo* dans un modèle murin que l'administration de Sunitinib augmentait le développement de structures vasculaires de VM, et augmentait les protéines impliquées dans le VM tel que la VE-Cadhérine et TWIST1, conduisant ainsi à une résistance au Sunitinib [217]. Il a de même été étudié dans plusieurs types de cancer que la cooptation était un mécanisme pouvant médier la résistance aux stratégies anti-angiogéniques [196], [218]. Dans le cancer du sein, la cooptation vasculaire est très présente dans les métastases cérébrales. Les serpinines, qui font partie des inhibiteurs des activateurs de plasminogènes (PA), sont sur-régulées dans les métastases du cerveau, permettant leur survie et des capacités de cooptation [218].

Le blocage de la voie VEGF/VEGFR induit une augmentation de l'hypoxie, aboutissant à l'augmentation des facteurs alternatifs à l'angiogenèse comme PDGFs, FGFRs, certaines chimiokines, l'IL-8, etc. [219]. Cela conduit également à l'augmentation du facteur HIF-1 α [220], qui induit la TEM et des facteurs liés à la TEM (TWIST1, SLUG, SNAIL), promouvant l'invasion et la formation de métastases [221].

Le microenvironnement tumoral

Les cellules stromales (leucocytes, péricytes, et fibroblastes) peuvent influencer la réponse aux thérapies anti-angiogéniques. Les cellules endothéliales peuvent médier les mécanismes de résistance. Cette résistance résulte de l'augmentation des transporteurs de cassette de liaison à l'ATP comme les protéines ABCB1 ou ABCG2 [222]. De plus, l'augmentation et l'activation de EGFR et FGFR dans les péricytes et les cellules endothéliales semblent être impliquées dans les mécanismes de résistance au Bevacizumab. Ces voies de signalisation du stroma induisent la survie des cellules endothéliales et augmentent la présence des péricytes autour des vaisseaux tumoraux [223].

La présence des macrophages associés aux tumeurs (TAMs) de type M2 ou de monocytes Tie2+ immatures induisent l'inefficacité des stratégies de blocage de VEGF [190]. La déplétion des TAMs permet d'augmenter l'efficacité des thérapies anti-VEGF [225].

Les fibroblastes associés aux cancers (CAFs) et les cellules *fibrocytes-like* recrutées dans la moelle osseuse sont des cellules qui produisent des facteurs alternatifs pro-angiogéniques. Chez la souris, ces cellules contribuent à la résistance au Bevacizumab. Dans des échantillons de tumeurs des poumons, le nombre de fibrocytes était augmenté dans les tumeurs après traitement au Bevacizumab et corrèle au nombre de cycles de traitements ainsi qu'aux nombres de vaisseaux CD31+ [226].

Un composant important du microenvironnement tumoral est la matrice extracellulaire, qui peut jouer sur l'effet réfractaire des thérapies anti-angiogéniques. Il a été montré chez l'homme et dans le modèle murin de cancer cellulaire rénal métastatique que les thérapies anti-VEGF entraînent un dépôt anormal de protéoglycanes, dont l'acide hyaluronique et des glycosaminoglycanes sulfatés [227]. La déplétion enzymatique de l'acide hyaluronique permet d'accroître l'efficacité du traitement en augmentant sa perfusion dans la tumeur, mettant en avant l'impact de celui-ci en tant que barrière physique aux traitements.

L'hétérogénéité vasculaire et tumorale

Les thérapies anti-angiogéniques basées sur VEGF ciblent les cellules endothéliales dont le mécanisme repose sur cette voie de signalisation. Cependant, et c'est une des raisons expliquant la résistance, toutes les cellules endothéliales ne fonctionnent pas de la même façon

selon le type de vaisseaux et leur localisation. Dans les tumeurs, cette hétérogénéité est encore plus présente et les cellules endothéliales tumorales présentent des phénotypes anormaux ainsi que des changements morphologiques importants [228]. Un des mécanismes responsables de ces différences est la voie PI3K/Akt/mTOR qui induit la synthèse de la thrombospondine-1, un élément critique et déterminant dans le phénotype pro-angiogénique [229]. En conséquence, ces cellules ne répondent pas de la même manière aux thérapies anti-angiogéniques [230]. La culture cellulaire des cellules endothéliales dérivées de tumeurs mammaires (aussi appelées TEC) a mis en évidence qu'elles n'avaient pas la même sénescence, et qu'elles exprimaient des marqueurs de l'angiogenèse et de l'activation endothéliale de manière constante. De plus, elles présentent une augmentation de la résistance à l'apoptose. Ainsi, étudier les effets des drogues anti-angiogéniques *in vitro* sur des cellules endothéliales tumorales semble plus représentatif que sur des cellules endothéliales normales [231].

En plus de cette hétérogénéité vasculaire, il existe une hétérogénéité tumorale. L'analyse de biopsies de tumeurs mammaires a démontré une variété de facteurs pro-angiogéniques dans des phases avancées de cancer du sein comme FGF-2, à l'inverse des stades peu avancés qui expriment plutôt le VEGF [232]. Les cancers invasifs expriment une hétérogénéité de facteurs angiogéniques dès les premiers stades pouvant contribuer aux différences de réponse aux traitements [166]. De nouvelles approches thérapeutiques peuvent être développées grâce à une meilleure compréhension des phénotypes intra-tumoraux des cellules endothéliales. Par exemple, le développement de peptides couplés à des drogues ciblant spécifiquement une gamme plus large de cellules endothéliales a été réalisé dans le début des années 2000 [233], [234]. D'autres approches ont été élaborées mais les études cliniques n'ont pas montré de résultats prometteurs, témoignant de la difficulté de cibler les cellules endothéliales tumorales [235]. Leur efficacité est compromise par la survie de cellules tumorales grâce aux réseaux vasculaires normaux périphériques. De plus, ces thérapies induisent une toxicité cardiovasculaire importante [236].

Les adipocytes et cellules myéloïdes

Des études récentes ont montré que l'obésité pouvait promouvoir la résistance aux thérapies anti-VEGF. L'obésité est associée à une hypoxie des tissus adipeux, dont ceux du sein. Il a été montré que les patientes obèses avec un cancer du sein avaient une augmentation du taux d'IL-6 et de FGF-2, et que leurs réseaux vasculaires étaient moins sensibles aux traitements anti-VEGF [237]. De plus, un modèle murin de cancer du sein a montré que

l'obésité était associée à une augmentation de la production d'IL-6 par les adipocytes et les cellules myéloïdes au sein de la tumeur. Le blocage de l'IL-6 engendre une diminution de la résistance et une normalisation du système vasculaire. La normalisation de FGF-2 par la metformine ou des inhibiteurs spécifiques réduisait de la même manière la densité des vaisseaux et rétablissait la sensibilité aux traitements anti-VEGF chez la souris.

Dans un modèle murin, les tumeurs réfractaires aux anti-VEGF sont associées à une infiltration de cellules myéloïdes [238]. La combinaison de ce traitement avec des anticorps ciblant les cellules myéloïdes permet de réduire la croissance tumorale que les anti-VEGF seuls ne suffisent pas à réduire.

III.3. Autres thérapies

Le constat des thérapies anti-angiogéniques est décevant, du fait qu'il s'agisse d'un mécanisme complexe, encore mal compris. De plus, il a récemment été montré que l'inhibition de l'angiogenèse pouvait réduire la circulation sanguine de la tumeur et donc la délivrance des médicaments, diminuant leur efficacité [239], [240]. L'axe principalement ciblé jusqu'à maintenant était l'axe VEGF/VEGFR, qui semble être inefficace en monothérapie, et présente de nombreux problèmes de résistance. Depuis, les mécanismes compensatoires indépendants à VEGF ont été le sujet de développement de nouvelles thérapies. Les modèles précliniques d'une double stratégie d'inhibition montrent une diminution de l'angiogenèse, mais le passage aux études cliniques reste peu efficace [241].

Inhibiteurs non-VEGF dans le cancer du sein

- FGFR : Une étude clinique visant à étudier l'**Erdafitinib**, un inhibiteur sélectif de pan-FGFR, en combinaison avec du Fulvestrant et Palbociclib est actuellement en cours sur des patientes ayant un cancer du sein métastatique. De plus, le **Futibatinib**, un inhibiteur de pan-FGFR est également en étude clinique de phase II en monothérapie et en combinaison avec le Fulvestrant chez des patients avec une progression locale ou métastatique, qui présentent une amplification du gène *FGFR*. Il existe ainsi plusieurs molécules ciblant les récepteurs FGFR en étude clinique actuellement.
- ANG-1/2 : Une autre stratégie vise à cibler ANG-1/2 avec un *peptibody* (une fusion d'un peptide et d'un anticorps), le **Trebananib**, dont les études cliniques sont encore en cours.

- TGF- β : Le **Bintrafusp- α** est une molécule de fusion bi-fonctionnelle ciblant le TGF- β et PD-L1. Elle s'ajoute à la liste des molécules en essai clinique pour cibler l'angiogenèse de manière VEGF-indépendante dans le cancer du sein.
- Les péricytes : Une des stratégies vise à cibler les péricytes, très impliqués dans la normalisation du réseau vasculaire tumoral [242]. Les études précliniques ont montré des résultats prometteurs, en soulignant le fait que cette stratégie devait être considérée avec précaution du fait qu'une diminution des péricytes peut aussi rompre l'intégrité vasculaire et promouvoir la dissémination métastatique [243].
- miARN : La place des microARNs (miARN) dans la régulation de l'angiogenèse en a fait une cible intéressante. En 2018, Liang *et al.* a montré que le miARN-153 supprimait l'angiogenèse tumorale mammaire en ciblant HIF-1a et ANG-1 [244]. D'autres études de ce type ont permis de montrer que le ciblage de certains micro ARN pouvait permettre de réguler la densité vasculaire et la formation de tubes par les cellules endothéliales [245], [246].
- Les immunothérapies : La désorganisation des vaisseaux tumoraux crée une barrière immunitaire sélective qui limite l'extravasation des cellules immunitaires. De plus, l'hypoxie crée une accumulation de lactate, ainsi que l'activation de l'axe VEGF/VEGFR, qui ensemble promeuvent la tolérance immunitaire [247]. Les cellules endothéliales tumorales expriment PD-L1, et produisent des facteurs immunosuppresseurs contribuant à l'évasion immunitaire tumorale dans le mélanome [248]. La double inhibition de VEGF et ANG-2 entraîne une normalisation des réseaux et la reprogrammation des TAM vers un phénotype anti-tumoral dans le glioblastome [249] montrant le lien entre l'angiogenèse et la réponse immunitaire anti-tumorale. Il a récemment été montré que les immunothérapies permettaient la normalisation des réseaux vasculaires tumoraux [216], [217]. Dans des modèles précliniques de cancer du sein, les immunothérapies ont montré un effet de normalisation de ces réseaux vasculaires, soulignant le potentiel intérêt de combiner des anti-angiogéniques et des immunothérapies [218], [219]. Ce fut le cas dans une étude de Allen *et al.* qui a couplé des inhibiteurs de VEGF et des anticorps anti-PD-L1. L'anti-PD-L1 a permis de sensibiliser la tumeur aux thérapies anti-angiogéniques dans un modèle préclinique de cancer du sein, et a même prolongé l'efficacité de ce traitement. La réciproque était également vraie, les thérapies anti-angiogéniques ont amélioré l'efficacité du traitement anti-PD-L1 [254]. Un essai clinique de phase II qui semble prometteur teste

actuellement cette combinaison chez des patientes présentant un cancer du sein triple négatif [255].

Cibler les alternatives à l'angiogenèse

Cibler de manière simultanée l'angiogenèse et la **cooptation** peut présenter une option thérapeutique intéressante. Il a récemment été mis en avant que l'inhibition de ARP2/3, permettant de réduire la cooptation, en même temps que l'inhibition de l'angiogenèse, était plus efficace que de cibler l'angiogenèse seule dans des modèles précliniques de cancer digestifs [256]. Une revue publiée en 2020 soulignait le fait qu'une meilleure compréhension de la cooptation permettra de mieux prédire la réponse aux thérapies anti-angiogéniques, d'anticiper la réponse aux autres thérapies comme l'immunothérapie, mais surtout elle montre la nécessité de développer des thérapies qui pourront cibler ces deux acteurs de la vascularisation [257].

Il en est de même pour le **mimétisme vasculaire**, dont l'inhibition permettrait d'améliorer les résultats des thérapies anti-angiogéniques. Les effets des thérapies anti-angiogéniques sur la formation de réseaux de VM restent pour le moment peu concluants. Le thalidomide permet de réduire le VM chez les souris C57BL/6, et inhibe les voies VEGF, NF- κ B, MMP-2 et MMP-9 [258]. La Rapamycine agit de la même façon sur le VM en inhibant mTOR et VEGF [259]. Une tétracycline modifiée nommée COL-3, ciblant l'activité des MMPs dans le mélanome métastatique, a été associée à une inhibition du VM ainsi qu'une inhibition de l'expression des gènes associés aux VM [260]. Il a aussi été démontré que le curcumin avait un effet sur la formation de VM, la migration et la prolifération dans le glioblastome et le carcinome hépatocellulaire, en modulant les voies de signalisation STAT3 et AKT [261], [262]. La surexpression de CD44 dans les cellules tumorales faisant du VM a permis d'initier un essai clinique dans lequel est évalué un anti-CD44 sur le VM dans le traitement des tumeurs solides [229]. D'autres molécules permettent de réduire le VM, comme des inhibiteurs de kinases Rho [264], des molécules ciblant la VE-cadhérine [265], des liposomes modifiés pour cibler le VM en diminuant les facteurs qui lui sont liés [266], ou encore l'utilisation de microARN impliqués dans le VM [267, p.]. La découverte des facteurs spécifiques impliqués dans le VM et une meilleure compréhension de ces mécanismes devraient rendre possible les thérapies ciblées permettant d'inhiber la formation de ces réseaux.

Chapitre 3 : Les thérapies dans le cancer du sein : place des inhibiteurs de PARP

Une fois le cancer du sein décelé et le stade tumoral diagnostiqué, un traitement adapté est proposé. Dans les cancers non-métastatiques, le but de la thérapie est d'éradiquer la tumeur du sein et des ganglions, et de prévenir la rechute et la formation de métastases. Pour les tumeurs métastatiques, le but thérapeutique est de prolonger la vie, de détruire les tumeurs secondaires et de pallier aux symptômes.

Lorsque le cancer est local, peu avancé et opérable, la résection chirurgicale locale ainsi que celle des ganglions sentinelles est proposée. Peuvent s'ajouter à cette chirurgie de la radiation post-opératoire ainsi que des thérapies systémiques post-opératoires en fonction de la tumeur.

Lorsque le cancer est plus avancé un traitement systémique est alors mis en place, de manière préopératoire (avec les néoadjuvants) ou postopératoire (avec les adjuvants). Ce traitement systémique est dépendant du grade et de la classification moléculaire de la tumeur. Environ 70 % des cancers du sein diagnostiqués sont hormonodépendants. Concrètement, cela implique qu'un traitement antihormonal peut être prescrit, avec parfois l'addition de chimiothérapies. Dans les tumeurs HER2+, le Trastuzumab est administré, cumulable avec des hormonothérapies. Il s'agit d'un anticorps monoclonal humanisé recombinant dirigé contre le récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain HER2. Dans les tumeurs triples négatives ne répondant ni aux hormonothérapies ni aux thérapies ciblant HER2+, le traitement repose sur de la chimiothérapie, avec anthracyclines, les taxanes et autres molécules [268]–[270]. C'est dans le cas de ces tumeurs métastatiques agressives, réfractaires aux traitements qu'en 2018 a été approuvé le premier traitement d'inhibiteur de PARP dans le cancer du sein pour les tumeurs présentant des mutations BRCA. Dans ce chapitre, le fonctionnement et l'intérêt des inhibiteurs de PARP vont être abordés.

I. La superfamille des Poly(ADP) ribose polymérase (PARP)

PARP est une famille d'enzymes de 17 protéines qui sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires. Parmi elles, PARP1 est décrite comme étant la plus abondante dans les tissus normaux, et représente 85 % de l'activité cellulaire de PARP [271]. Cette protéine a une localisation nucléaire et est exprimée dans toutes les cellules nucléées excepté les neutrophiles. Les 16 autres protéines PARP ont pu être identifiées grâce à l'homologie de séquence du domaine catalytique de PARP1. Comme cette signature n'est pas suffisante pour fournir une classification fonctionnelle, la catégorisation doit être établie en fonction de leur architecture et de leurs différentes fonctions enzymatiques. Bien que d'abord classée en trois sous-groupes, cette famille est maintenant regroupée en cinq sous-familles [272]–[274].

Il y a la classe des ADN-dépendants PARP, ceux des *tankyrases* (avec des répétitions de site de liaison aux ankyrines), des CCCH de doigts de Zinc (qui lient l'ARN viral), les macro PARP (avec des domaines de liaison à l'ADP-ribose). D'autres PARP, qui n'ont à ce jour pas pu être classés selon cette méthode, existent (**Figure 18**).

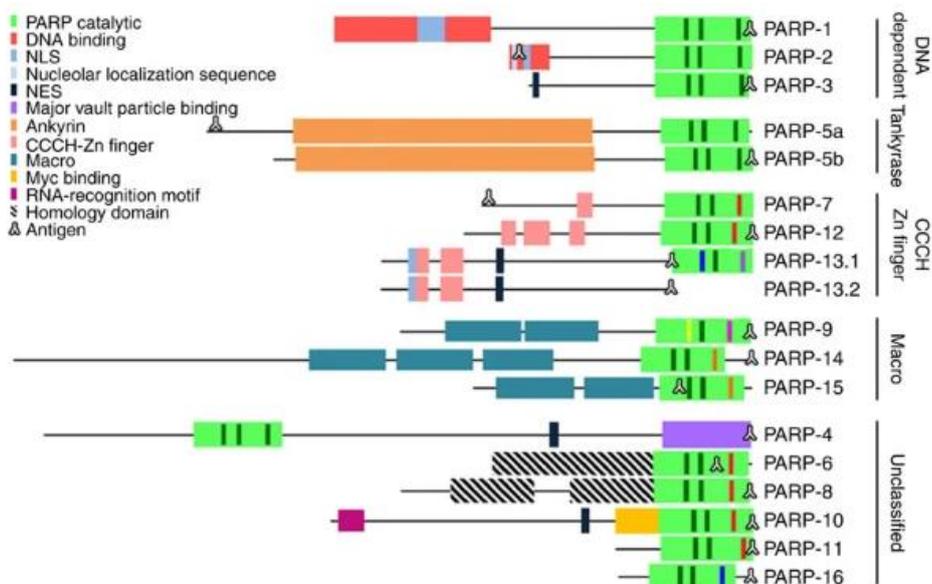


Figure 18: Structures des domaines des protéines PARP (selon Chang et al., 2013)

Ces protéines sont localisées dans les différents compartiments cellulaires dont le noyau, le cytoplasme et les mitochondries. Certains membres dont PARP1-4 ont une activité catalytique de PARylation, une modification post-traductionnelle de fixation de polymères de résidus ADP-ribose (PAR) sur les différents acteurs cellulaires. Cette modification nécessite le substrat nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) et de l'ATP. Le mécanisme de la PARylation est réversible grâce à la dégradation des polymères par deux enzymes : PARglycohydrolase (PARG) et l'ADP-ribosylhydrolase 3 (ARH3) [275]. ARH3 est la seule hydrolase capable de dégrader les mono(ADP-ribose) MAR, PARG dégrade principalement les poly(ADP-ribose) PAR.

PARP-1 est une protéine composée de 1014 acides aminés, contenant 3 domaines [271] (**Figure 19**) : **a.** le domaine amino-terminal avec 2 doigts de Zinc qui est responsable de sa capacité à lier l'ADN **b.** le domaine d'auto-modification (AMD) qui permet de réguler négativement l'activité de PARP1 par autoPARylation **c.** le domaine carboxy-terminal catalytique qui est le domaine de liaison au substrat NAD⁺, synthétise les chaînes PAR sur lui-même, sur les histones et sur les diverses protéines impliquées dans la réparation de l'ADN.

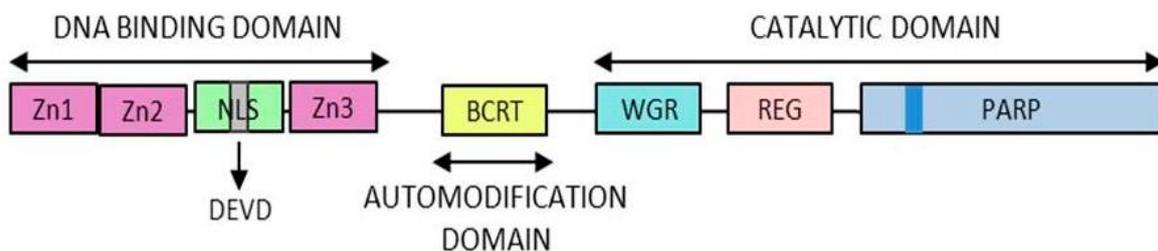


Figure 19: Structure de PARP-1 (selon Javier Oliver et al., 2020))

1.1. PARP1 et la réparation de l'ADN

Les lésions à l'ADN dans une cellule sont courantes, qu'elles soient endogènes (liées par exemple aux ROS) ou exogènes (UVs, agents alkylants, etc.). Pour y faire face, plusieurs voies de réparation de l'ADN existent : DR (réparation directe), NER (réparation par excision de nucléotides), BER (réparation par excision de bases), MMR (réparation des mésappariements, HR (réparation par recombinaison homologue) et NHEJ (jointure d'extrémités non homologues) [276]. Dans chaque voie de réparation, certaines protéines de

réparation ont un rôle central différent. Dans de nombreux cancers ces mécanismes peuvent être dérégulés ce qui conduit à une augmentation de mutations et également à une instabilité génomique, et *in fine* à la progression tumorale [277].

Dans les cellules humaines, l'activation de PARP-1 est l'une des premières réponses à un dommage à l'ADN et est impliquée dans la régulation de réparation simple et double brin. L'ADP-ribosylation des histones et le recrutement d'enzymes permettant le remodelage de la chromatine entraîne un relâchement de la chromatine et ainsi la réparation de l'ADN. Les histones H1 et H2B sont les principaux substrats de PARP1, qui une fois PARylés, permettent à de larges complexes protéiques d'accéder au site de lésion.

Réparation des cassures simple brin (CSB)

Les protéines de réparation de l'ADN impliquées dans la réparation des CSB, comme XRCC1, peuvent directement être recrutées par PARP1 et PARP2 [278], [279]. XRCC1 peut ensuite permettre aux protéines telles que la ligase 3 de l'ADN (LIG3) ou encore l'ADN polymérase β , de poursuivre le processus de réparation (**Figure 20**). PARP1 a également une action sur le système de réparation BER, mais il n'en est pas un élément indispensable [280, p.]. Le système de réparation NER, qui permet de réparer des lésions d'ADN dues à des agents mutagènes comme les irradiations aux UV, est lui aussi lié à l'activité de PARP1. Notamment dans l'étape initiale de reconnaissance du lieu de lésion, où PAR se lie à son site de liaison spécifique sur la protéine XPC, qui est ainsi recrutée sur le site de lésion. XPC et RAD23B s'associent ensuite avec le complexe de protéines de dommage à l'ADN DDB1-DDB2 [281]. PARP1 se lie aussi directement sur DDB2 ce qui induit la stimulation de son activité catalytique. PAR fonctionne également comme signal de localisation en se liant aux domaines macro de la protéine ALC1 (*Amplified in Liver Cancer 1*), permettant ainsi de l'activer et d'exercer son action de modelage de la chromatine sur le site de lésion [282].

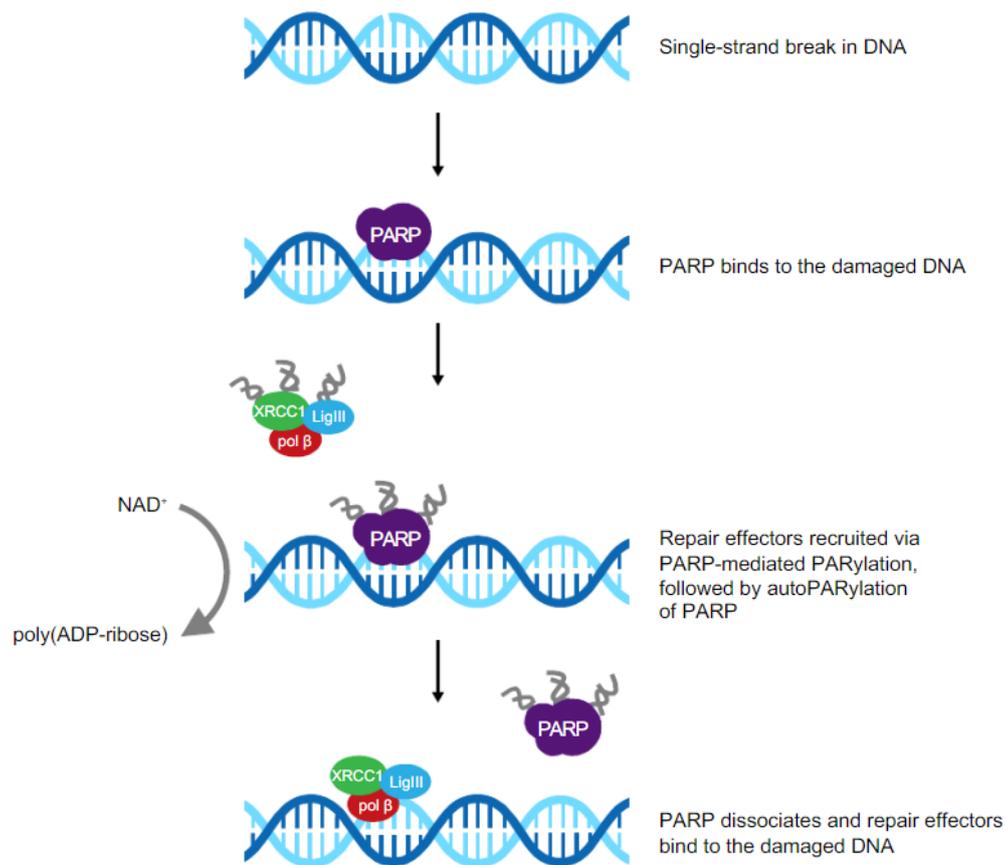


Figure 20: Rôle de PARP dans la réparation des cassures simple brin (selon Cortesi et al., 2021)

Réparation des cassures double brin (DSB)

Les cassures double brins peuvent être réparées soit par HR soit par NHEJ, en fonction du contexte (**Figure 21**). PARP1 reconnaît les lésions, et facilite le recrutement précoce des facteurs de réparation des DSB. PARP1 recrute la protéine ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) en se liant à ses sites de liaison permettant d'activer la signalisation des lésions à l'ADN et d'arrêter le cycle cellulaire. De plus, PARP1 est impliquée dans le recrutement de MRE11 sur le site des DSBs, qui par la suite promeut l'assemblage de RAD51 qui facilite le changement de brin durant la HR [283, p. 11]. Cette liaison peut permettre de déterminer le choix du mécanisme de réparation en induisant la recombinaison homologue où PARP1 contrôle la régulation de nombreuses protéines. Parmi elles, BRCA1 impliqué dans les premières étapes de réparation peut être recruté par PARP1 et par la PARylation [284]. Le système NHEJ est modulé par PARP1. Ce système initie le recrutement des sous-unités catalytiques des protéines kinases dépendantes de l'ADN (DNA-PKcs) grâce aux

hétérodimères KU (KU70 et KU80) qui se lient aux DSBs avec une grande affinité. PARP1 semble minimiser l'association des complexes KU et XRCC4-ADN ligase IV sur l'ADN favorisant ainsi le système HR [285].

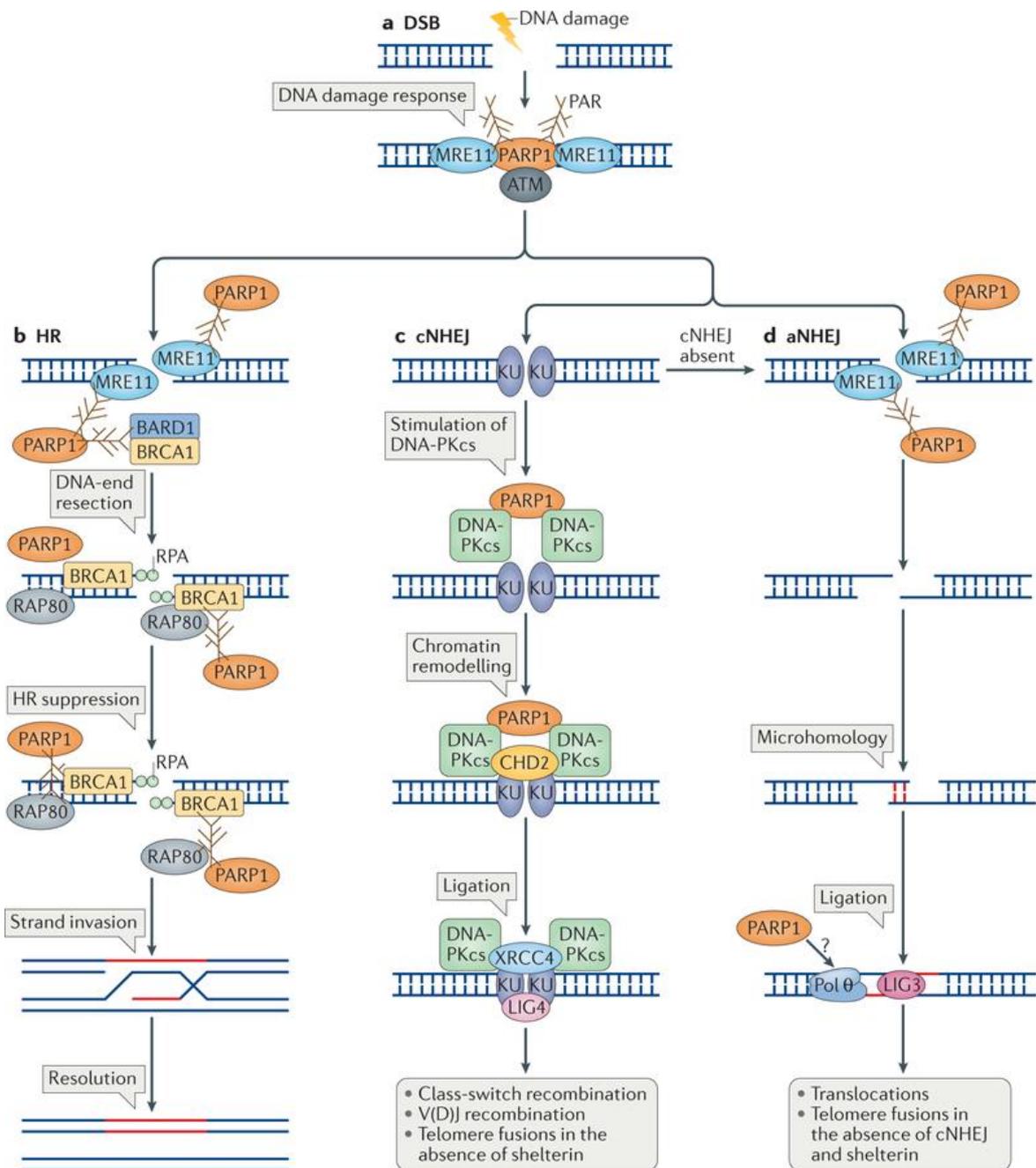


Figure 21: Rôle de PARP1 dans la réparation des cassures double brins (selon Nussenzweig et al., 2017).

PARP1 peut également avoir un rôle dans la transcription de l'ADN. Des études ont montré qu'elle peut modifier l'activité de protéines et leur localisation : les facteurs de

transcription comme SP1 ou Oct-1 sont des cibles de PARP1, dont l'addition de polymères d'ADP-ribose permettent leur régulation [286]. Des plus, ces modifications post-traductionnelles préviennent l'association de facteurs de transcription tels que p53 et NF- κ B à des facteurs d'export nucléaires tels que Crm1, induisant leur maintien dans le noyau [287], [288]. A travers ces mécanismes de régulation de facteurs de transcription et grâce au remodelage de la structure de la chromatine et au recrutement des complexes de réparations de l'ADN, PARP1 a un rôle pivot dans la réparation l'ADN. Il est important de noter qu'elle possède un rôle dans les 6 mécanismes de réparation de l'ADN. PARP2 possède également une activité de PARylation lié aux lésions à l'ADN, cependant PARP3 n'a pas de domaine de liaison à l'ADN. Ainsi, PARP2 semblerait être le deuxième producteur de PAR après PARP1, et peut compenser la perte de PARP1 *in vivo* [289].

1.2. Autres rôles

Au-delà de son rôle dans la réparation de l'ADN, PARP1 est connue pour avoir divers rôles au sein de la cellule.

Les télomères

PARP1 permet le maintien de la longueur des télomères. Des études réalisées chez la souris ont montré que les souris PARP1^{-/-} perdaient environ 30 % de leurs télomères [290]. De plus dans des modèles cellulaires, l'inhibition de PARP induisait une réduction rapide de la longueur des télomères et ce de manière stable dans le temps. Cela peut être expliqué par l'interaction de PARP1 et de TRF2 (*telomeric repeat binding factor 2*), directement responsable de la stabilité et la régulation des télomères. PARP1 PARyle TRF2 qui module sa liaison avec l'ADN télomérique [291]. De plus, PARP1 peut réguler les télomères grâce à son interaction et sa régulation réciproque avec l'hélicase WRN.

La mitose

Le rôle de la PARylation dans les processus mitotiques a été décrit il y a une quarantaine d'années [292]. L'inhibition de PARP donne lieu à de nombreux défauts de la mitose, comme l'hyper amplification du centrosome, un mauvais alignement chromosomique et un mauvais assemblage du fuseau mitotique, l'arrêt de la métaphase, etc [293]. Cela induit des instabilités chromosomiques.

Mort cellulaire

Des dommages à l'ADN importants peuvent provoquer une hyperactivation de PARP-1, conduisant à une accumulation de PAR et une consommation excessive de NAD⁺ et d'ATP. Cette déplétion en NAD⁺ et ATP peut aboutir à la nécrose cellulaire [294]. La cellule n'a *in fine* plus d'énergie, cela peut induire la mort cellulaire par parthanatos, via la relocalisation de l'effecteur de mort AIF (*apoptosis inducing factor*) de la mitochondrie vers le noyau [295]. Ce facteur induit la fragmentation de l'ADN et la condensation de la chromatine.

Processus inflammatoires

PARP1 peut promouvoir les réponses inflammatoires en régulant positivement le facteur de transcription pro-inflammatoire NF- κ B, il s'agit d'une des interactions de PARP1 les plus documentées (**Figure 22**). NF- κ B est composé d'une combinaison dimérique de membres de la famille Rel, avec les sous-unités majeures p65 et p50. L'activation et la translocation nucléaire de NF- κ B nécessite la phosphorylation de l'inhibiteur I κ B α par l'I κ B kinase (IKK), qui cause sa dégradation par ubiquitination grâce au protéasome. Cette dégradation est médiée par NEMO (*NF- κ B Essential Modulator*), un régulateur essentiel de NF- κ B. L'autoPARylation de PARP1 qui suit la détection d'une lésion à l'ADN promeut la formation d'un « signalosome », contenant PARP1 activé, NEMO et ATM. S'en suit la SUMOylation de NEMO, conduisant à l'activation de IKK α et IKK β . Ainsi, NF- κ B est activé et transloqué dans le noyau [296]. L'inhibition de PARP1 permet de prévenir la translocation de la protéine p65 de NF- κ B, cet effet est réversible lorsque PARP1 est de nouveau exprimée [287]. De plus, PARP1 peut interagir avec p300, qui est un coactivateur transcriptionnel nécessaire à NF- κ B [297]. Le rôle direct de PARP1 dans la voie NF- κ B est démontré grâce à des études faites dans le modèle de souris PARP1^{-/-} qui ont montré une inhibition des médiateurs de l'inflammation dépendants de NF- κ B, tels que TNF- α , IL6, iNOS [298].

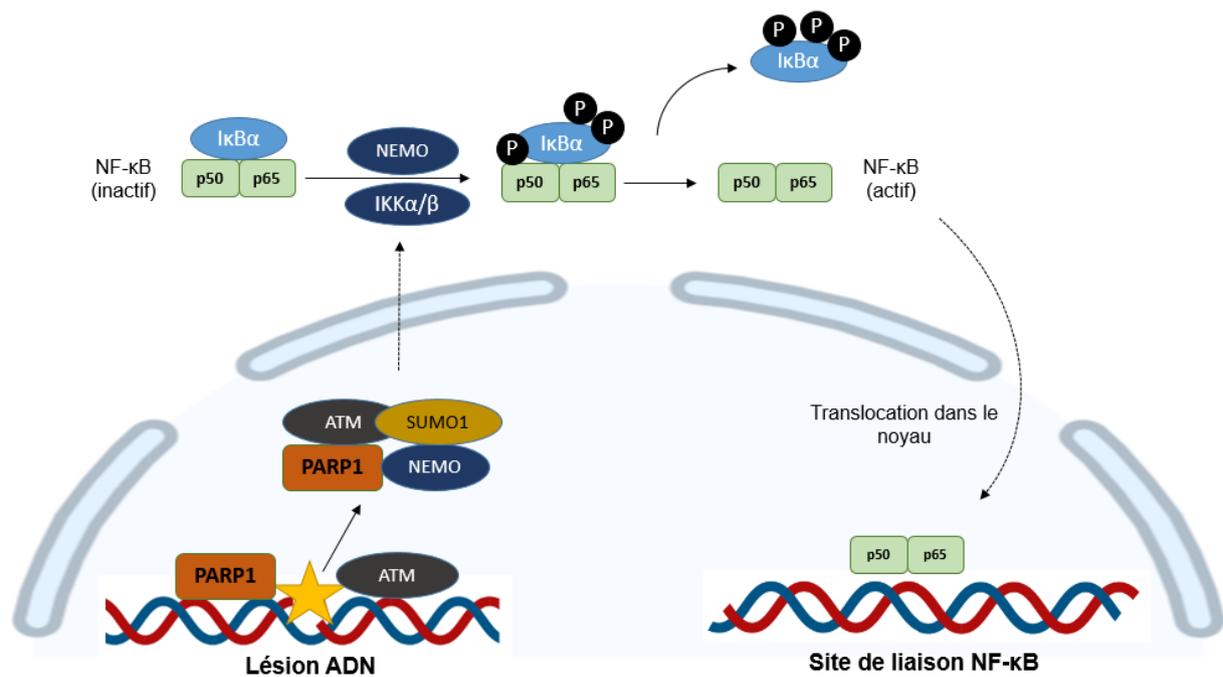


Figure 22: Modèle simplifié de l'activation de NF-κB lié à PARP-1 (adapté de Bürkle et al., 2012).

PARP1 régule également plusieurs molécules inflammatoires comme des cytokines, des chimiokines, des facteurs de transcription. PARP-1 est un facteur clé dans l'inflammation induite par le stress oxydatif, en étant activée et contribuant à la production des espèces réactives d'oxygène et de nitrogène (ROS/NOS) [299]. Par ailleurs, la protéine PAR extracellulaire peut agir en tant qu'alarmine ou DAMP (*Damage Associated Molecular Pattern*), stimulant les macrophages et induisant la réponse inflammatoire [300]. La PARylation de HMGB1, une alarmine impliquée dans l'inflammation et sécrétée dans la nécrose, favorise sa translocation du noyau au cytoplasme puis son relargage. Cette protéine est ensuite reconnue par RAGE (*Receptor for Advanced Glycation Endproducts*) et TLR4 (*Toll-Like Receptor 4*) sur les macrophages, aboutissant à une diminution de l'efferocytose, réduisant ainsi la présence de cellules apoptotiques, maintenant l'inflammation [301].

Métabolisme cellulaire

Les enzymes PARP impactent le métabolisme de nombreuses manières. Il semblerait que PARP1 soit impliqué dans le cycle circadien. Son expression et son activité sont rythmées selon des cycles circadiens chez la souris et chez l'humain [302], [303], induisant des

régulations transcriptionnelles circadiennes dans le muscle squelettique, le foie ou encore le système immunitaire. Elle a également une action sur le système hormonal, en modifiant par exemple les androgènes intramusculaires [304], mais aussi l'insuline [305] et l'expression d'adipokines [306]. Des études récentes suggèrent le rôle de PARP1 et 2 dans la régulation métabolique en influençant la fonction mitochondriale et le métabolisme oxydatif. Son rôle dans le développement de pathologies liées à une résistance à l'insuline a pu être démontré [307].

PARP a également une fonction modulatrice du métabolisme des carbohydrates, en régulant la glycolyse, mais elle a également une implication dans le métabolisme des lipides, et dans l'adipogenèse [308].

1.3. PARP1 et cancer

La surexpression de PARP1 est liée à des tumeurs mammaires de haut grade, une négativité aux récepteurs hormonaux et aux tumeurs TNBC [309]. Il en va de même pour d'autres types de cancers où une haute expression de PARP1 peut être retrouvée et est associée à un mauvais pronostic [310]. Cela suggère un rôle de PARP1 dans les processus oncogéniques. Une étude réalisée sur plus de 8000 échantillons tumoraux a montré que PARP1 était significativement surexprimée dans les tumeurs du sein BRCA muté, triples négatives, mais également dans divers cancers comme le cancer de l'utérus, des ovaires et des poumons [311], [312].

Effet double sur la carcinogenèse

Des études dans des modèles murins PARP1^{-/-} ont également montré que PARP1 avait un rôle dans l'oncogenèse. Dans ces souris, le développement spontané de tumeurs était similaire avec ou sans PARP1, mais le développement de tumeurs malignes utérines, des poumons et du foie avait une incidence supérieure lorsque PARP1 était inhibée [313]. De plus, les tumeurs spontanées se développaient plus précocement dans les souris PARP1^{-/-}. De manière générale, la survie des souris était réduite et le vieillissement accéléré. L'inactivation de PARP1 induit la formation de carcinome ainsi que le développement de tumeurs neuronales chez la souris p53^{-/-} [314]. p53 est un suppresseur de tumeur bien connu pour sa capacité à induire la mort cellulaire, et est impliqué dans de nombreux mécanismes cellulaires. Il permet

l'élimination des cellules ayant subi un stress oncogénique. Il est muté dans de nombreuses tumeurs ce qui conduit à l'évasion de la mort cellulaire médiée par p53. PARP1 et p53 sont donc deux acteurs de la maintenance de la stabilité génétique. Bien que le phénomène ne soit pas encore à ce jour complètement compris, il a été proposé que PARP-1 agisse en amont de p53 dans la signalisation de réparation aux lésions, soit par PARylation de p53 soit de manière indirecte [315]. Il a aussi été montré que p53 et PARP1 coopèrent dans la stabilisation du génome [316].

Ce rôle de PARP1 dans les tumeurs semble être tumeur-dépendant. Une étude a ainsi montré dans un modèle murin PARP1^{-/-} que le développement de carcinome de la peau était réduit en absence de PARP1 [317]. De plus, alors que la dérégulation de la voie NF-κB est un marqueur de la tumorigenèse, l'absence de PARP1 a aboli l'activation de la voie et de ses gènes cibles durant la promotion de la carcinogenèse de la peau. Ainsi, la promotion de ce cancer a été altérée par la modification de la voie NF-κB. Dans le cancer colorectal, les souris PARP1^{-/-} soumises à une induction chimique de la carcinogenèse étaient protégées du développement tumoral, alors que les souris *wild-type* avaient un nombre de tumeurs plus important [318]. De plus ils ont montré que PARP1 réduit l'initiation tumorale et ce de manière MGMT dépendante (*methylguanine-DNA methyltransferase*), mais qu'une fois la tumeur présente, elle avait un effet promoteur de la progression tumorale notamment par la promotion de l'inflammation. L'effet protecteur de PARP1 sur l'initiation semble être lié au fait que son inactivation a des effets anti-inflammatoires, ce qui dans le cancer du pancréas est lié à une diminution du recrutement des macrophages, dans le cancer colorectal est associé à une diminution de l'axe IL-6-STAT3-cyclineD1, et dans la tumeur de la peau une activité NF-κB réduite [319].

Ainsi le rôle de PARP1 dans l'initiation et la promotion de la tumorigenèse peut être soit inhibiteur soit promoteur, en lien avec les rôles multiples de cette enzyme sur l'ADN et l'inflammation.

Implication de PARP sur les « hallmarks of cancer »

- PARP1 est liée à la régulation de la **prolifération** ainsi qu'aux mécanismes de suppression de croissance. Du fait de son rôle dans la réplication, la réparation, sur l'élongation et l'intégrité des télomères, sur les événements mitotiques et les centrosomes comme vu précédemment, elle agit sur la stabilité génétique et la prolifération cellulaire. De plus elle régule plusieurs facteurs de croissance, et agit également en aval de la chaîne de signalisation en interagissant par exemple avec ERK-

1, médiant les altérations épigénétiques. Sa régulation des gènes suppresseurs de tumeurs p53 et pRB, deux acteurs de la sénescence, a déjà été démontrée. Ainsi dans de nombreux cancers dont le cancer du sein, l'inhibition de PARP induit la sénescence [320]. De plus, elle agit sur les mécanismes de perte d'inhibition de contact, dont le processus passe par la diminution de l'expression de PARP1 par les facteurs Sp1 et Sp3 [321].

- L'échappement à la **mort cellulaire** est également médié par PARP1. Comme nous l'avons vu, PARP1 a de nombreuses fonctions sur la réparation des dommages à l'ADN. Elle est aussi impliquée dans les mécanismes de résistance à la mort cellulaire. Par exemple, sa localisation cytoplasmique dans les cellules cancéreuses pancréatiques leur confère une résistance à l'apoptose lorsque celle-ci est induite par le récepteur de mort de type 5 (DR5) [322]. PARP1 est également un régulateur négatif de la voie de signalisation PI3K-Akt favorisant la survie cellulaire.
- Dans les cellules tumorales, des mécanismes de maintenance des télomères peuvent être réactivés pour maintenir une longueur suffisante pour protéger les cellules de la sénescence, et leur conférer une **immortalité** de réplication. PARP1 peut s'accumuler sur les télomères dont l'ADN est lésé ou lorsqu'il y a une érosion due à la déficience de la télomérase [323]. Par ailleurs, PARP1 peut réguler la télomérase, en recrutant KLF4 sur le promoteur hTERT, afin de maintenir une expression de la télomérase. Elle peut également PARyler directement hTERT, et réguler les protéines associées à la télomérase comme TEP1 [324].
- **L'instabilité génomique** et l'hyper-mutabilité sont également des « hallmarks of cancer ». PARP, à travers ses régulations dans les divers systèmes de réparation de l'ADN, semble agir en tant que protecteur du génome, ce qu'on appelle plus communément « *genome caretakers* ». Les gènes souvent désignés ainsi sont également ceux qui sont fréquemment mutés dans les cancers avec des prédispositions héréditaires.
- Les cellules tumorales mettent en place une **reprogrammation métabolique**, qui leur permet de subvenir à leur augmentation des besoins énergétiques. Parmi eux, nous retrouvons l'effet Warburg. PARP a une grande influence sur le métabolisme tumoral, de par ses régulations transcriptionnelles, mais également par la PARylation/MARylation de protéines métaboliques, ou encore via les changements dans les taux de NAD⁺/ATP. Un des exemples de ces régulations est observé sur la β -oxydation des acides gras (FAO), régulée entre autres par MYC, JAK et STAT3 ainsi

que par les récepteurs PPARs. PPAR- α peut être PARylé par PARP-1, aboutissant à la suppression de la FAO [325].

- Des études d'inhibition de PARP ont aussi pu montrer qu'il peut favoriser **l'angiogenèse**. Son inhibition *in vitro* a montré une abolition de l'action des cellules endothéliales en réponse à des stimuli angiogéniques, et une réduction *in vivo* dans la souris de l'angiogenèse [326]. Dans une étude sur le mélanome dans un modèle murin, une inhibition de PARP aboutit à une réduction de l'agressivité tumorale, mais également à une réduction de l'expression de marqueurs de l'angiogenèse dont PECAM-1/CD31 ainsi que des médiateurs pro-inflammatoires [327]. PARP1 a une action sur les acteurs de l'angiogenèse, notamment à travers la PARylation du facteur HIF-1 qu'il module directement [328]. PARP-1 favorise également l'activité de VEGF, en effet l'inhibition de PARP-1 permet *in vitro* la diminution de la formation de tubes sur matrigel de la lignée cellulaire HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) due à la réduction des taux de VEGF et FGF [329]. Il a été montré dans le mélanome que la perte de PARP induit la diminution de la vimentine (impliquée dans l'angiogenèse) et l'augmentation de la VE-cadhérine dans les HUVEC. Dans le mélanome toujours, il a été constaté une diminution du mimétisme vasculaire lorsque PARP1 était inhibée [330].
- PARP est associée à **l'invasion** et à la formation de **métastases**. Elle peut avoir des effets opposés sur la TEM en fonction des cancers. PARP1 peut se lier à HOXB7, qui est un promoteur de la TEM dans le cancer du sein [331], et sa PARylation aboutit à la réduction de son activité transcriptionnelle [332]. L'augmentation de PARP1 est également associée à l'activation de MMP2 et MMP9 et l'inhibition de TIMP, des acteurs de la restructuration de la matrice extracellulaire [333]. Il a été montré dans des TNBC que PARP1 interagit avec la sous-unité p65 NF- κ B pour réguler positivement CCL2, impliquée dans l'invasion tumorale [334].
- De plus, PARP1 est impliquée dans les mécanismes **d'échappement au système immunitaire**, et ce de plusieurs manières. Il a été montré dans plusieurs études que le développement des T régulateurs est régulé par PARP1, qui PARyle Foxp3, favorisant ainsi le développement des Tregs [335]. A l'inverse, les souris présentant une double déficience PARP-1/-2 ont une diminution du nombre de lymphocytes T, une maturation dans le thymus déficiente et une diminution du nombre des lymphocytes périphériques CD4⁺ et CD8⁺ [336]. PARP1 et 2 promeuvent aussi le développement et le fonctionnement des lymphocytes B [337]. Elles modulent également les composants du

système immunitaire inné avec les neutrophiles, les macrophages, les cellules dendritiques et les *natural killer* NK [338].

II. Les inhibiteurs de PARP-1 (PARPi)

Dans les années 1990, la recherche est passée de la compréhension de la PARylation, de PARP et de ses fonctions, aux implications physiologiques et pathologiques des inhibiteurs de PARP. Du fait du lien qui a été montré entre PARP et de nombreux cancers humains, les PARPs sont devenus une cible thérapeutique intéressante. Les premiers inhibiteurs développés étaient des analogues du nicotinamide, dont le 3-aminobenzamide (3AB). Puis est arrivée la deuxième génération d'inhibiteurs dans les années 90, et enfin ceux actuellement utilisés en clinique qui représentent la troisième génération et possèdent une meilleure efficacité et spécificité pour PARP [273]. Ceux de deuxième et troisième génération ont été optimisés et sont basés sur la structure des carboxamides benzimidazoles tricycliques.

Initialement, ils étaient développés pour avoir une action de chimio-sensibilisateurs. En 2005, une étude a montré l'efficacité *in vitro* et *in vivo* des inhibiteurs de PARP sur les tumeurs formées à partir de cellules souches embryonnaires BRCA muté [339]. En 2009, une étude de phase I dans des cancers de l'ovaire, du sein et de la prostate avec mutation BRCA1 et 2, a mis en avant l'activité anti-tumorale de l'Olaparib (AZD2281) [340]. En présence d'inhibiteurs de PARP (PARPi), les lésions simple brin ne sont plus réparées par le BER, et sont converties en lésions double brin, qui induisent la mort cellulaire lorsque BRCA est muté. Ce traitement fut le premier approuvé dans le traitement des tumeurs BRCA muté dans le cancer de l'ovaire, du sein, du pancréas de la prostate et dans d'autres cancers.

II.1. Le mécanisme

Le principe du développement des inhibiteurs de PARP en oncologie est le principe synergique de la **léthalité synthétique** ; deux conditions qui indépendamment ne causent pas la mortalité, aboutissent à la mort cellulaire quand elles sont associées. Comme nous l'avons vu, certains cancers ont un défaut de réparation de l'ADN comme par exemple les mutations BRCA1 et 2 retrouvées dans certains carcinomes, impactant la recombinaison homologue. La

réparation repose alors sur PARP1 et la réparation par excision de bases (BER). Lorsque des inhibiteurs de PARP sont utilisés dans ce cadre, ces cellules n'ont alors plus de moyen de réparer les lésions et cela aboutit à la mort cellulaire (**Figure 23**).

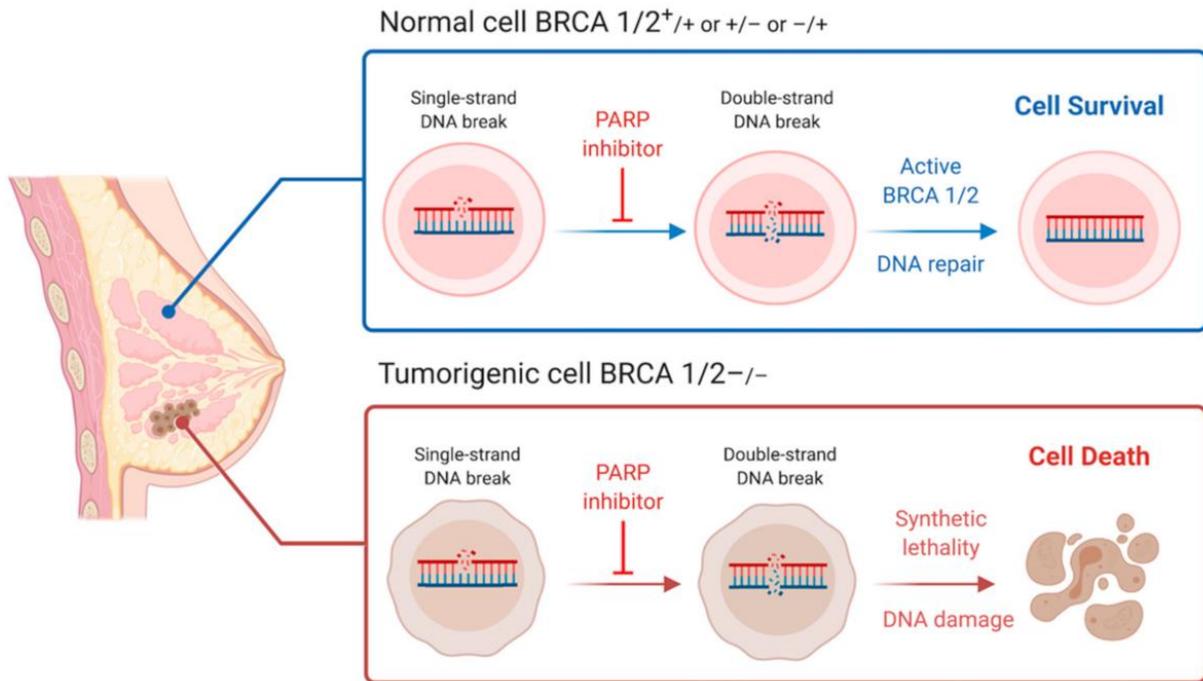


Figure 23: Principe d'action des inhibiteurs de PARP : la létalité synthétique (selon Shi et al., 2021)

La majorité des inhibiteurs sont développés pour inhiber de manière compétitive le domaine catalytique de PARP, empêchant le substrat NAD⁺ de se lier à son site catalytique. Mais il ne s'agit pas du seul mécanisme d'action des inhibiteurs. Les PARPi peuvent se lier au site actif de PARP et inhiber son activité enzymatique ou se lier au complexe PARP-chromatine, et bloquer l'enzyme sur la chromatine au site des lésions dans un état non actif. L'ensemble PARPi-PARP1 avec le complexe d'ADN aboutit à l'accumulation de lésions simple brin qui ne peuvent pas être réparées, empêchant l'avancement au niveau de la fourche de réplication, et résultant en des lésions double brin [341]. Cet effet cytotoxique dit de « *trapping* » a été décrit par l'équipe de Pommier [342]. Par la suite, les études ont montré que les différents PARPi, bien qu'efficaces à inhiber PARP1/2, n'ont pas la même capacité à bloquer mécaniquement PARP. Il semblerait que cela dépende de la drogue utilisée, mais également de son utilisation en monothérapie ou thérapie combinée [343], [344]. Par exemple, lorsque PARPi est couplé avec un inhibiteur de la topoisomérase I (TOP1), l'activité

cytotoxique repose peu sur le système de blocage. A l'inverse, l'addition d'un agent alkylant comme la témozolomide, semble reposer largement sur le blocage [289], [345].

Il existe plusieurs biomarqueurs concernant l'utilisation des inhibiteurs de PARP. Les mutations des gènes *BRCA1* et *BRCA2* en font partie. Les femmes présentant un cancer du sein ou de l'ovaire sont testées actuellement en routine pour les mutations sur ces gènes, et peuvent être traitées par inhibiteurs de PARP si c'est le cas. Cependant, avec le temps, il a été montré que le statut *BRCA* ne corrèle pas toujours avec la réponse aux PARPi, mettant en avant la nécessité de trouver d'autres marqueurs prédictifs [346]. Des études récentes mettent en avant que l'Olaparib, un PARPi, pourrait être efficace chez des patients qui n'ont pas de mutation *BRCA1/2* mais qui présentent des mutations dans d'autres gènes impliqués dans les mécanismes de réponses aux lésions de l'ADN. Plusieurs mutations de gène de la RH ont été identifiées comme potentiels biomarqueurs tels que *ATM*, *FANC*, *CHK2*, *RAD51B/C* et *CDK12* [347], [348]. De manière plus générale il est possible de définir un score de déficience de recombinaison homologue qui a été montré comme étant prédictif dans les tumeurs TNBC *BRCA1/2* mutées ou dans le cancer de l'ovaire [349]. Diverses études ont cependant montré que ce n'était pas un biomarqueur parfait ; un score de déficience de recombinaison homologue (HRD) élevé est associé à une meilleure survie sans progression après traitement avec le Niraparib (PARPi), dans le cancer de l'ovaire *BRCA* non muté. En revanche, une autre étude a montré que le statut HRD n'est pas corrélé avec la réponse suite au traitement par le Veliparib (un autre PARPi) [350], [351], montrant que HRD n'est pas le seul facteur qui permet de déterminer la sensibilité aux inhibiteurs de PARP.

Le terme BRCAness a vu le jour et permet de décrire les caractéristiques de la HRD mimant la mutation des gènes *BRCA*. Des études récentes ont permis d'établir que le score de BRCAness serait un très bon indicateur de réponse aux PARPi [352], [353]. Ainsi, l'utilisation des inhibiteurs de PARP pourraient être élargie aux patients non mutés *BRCA* mais qui présentent des mutations semblables dans la RH. Des essais cliniques tels que ARIEL2, ARIEL3 ou encore NOVA sont en cours pour déterminer l'utilité des PARPi sur des tumeurs dans le cancer de l'ovaire.

Ces notions sont reprises et résumées dans le schéma explicatif de la **Figure 24**.

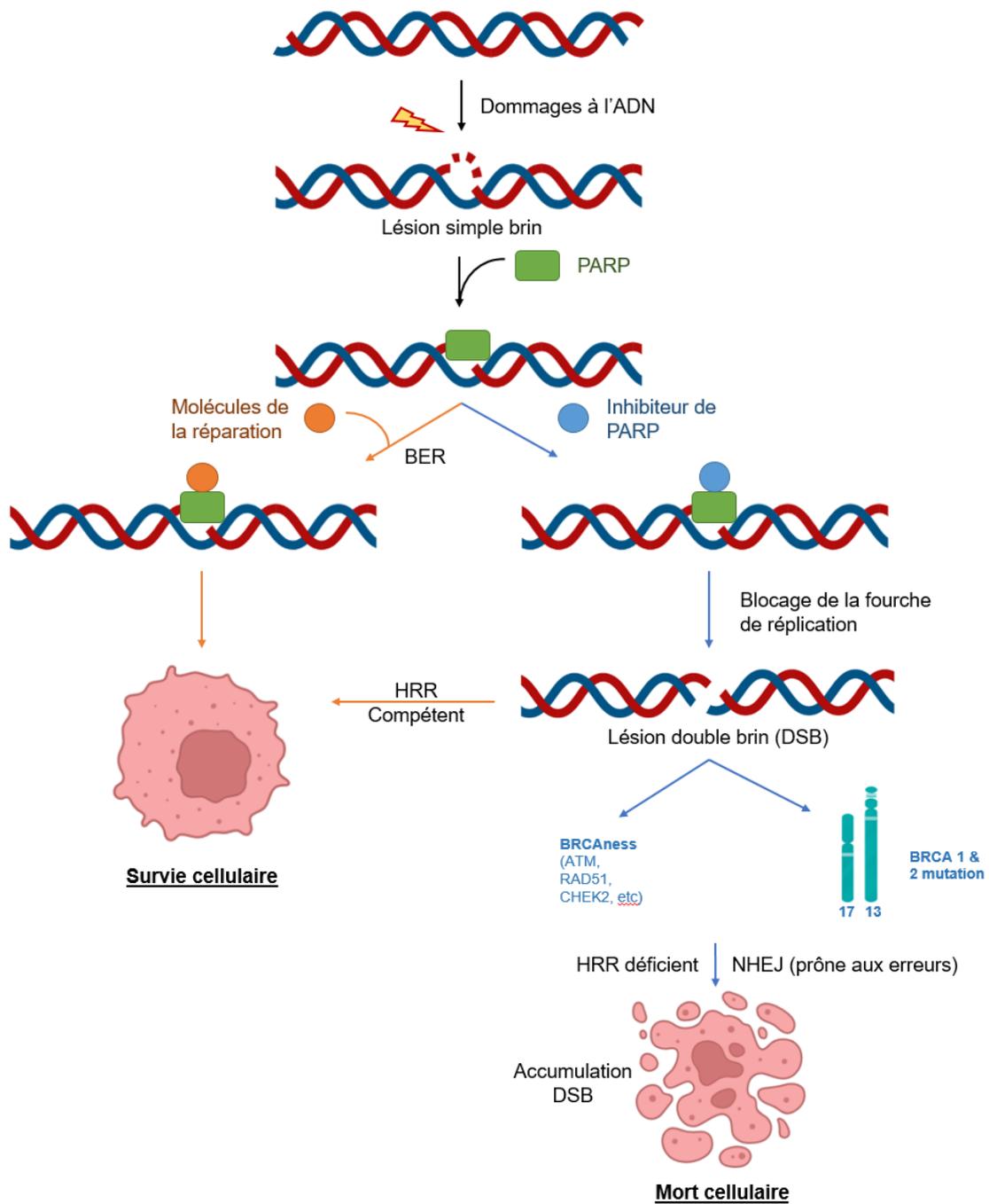


Figure 24: Mécanismes moléculaires des inhibiteurs de PARP (adapté de Shi et al., 2020)

II.2. L'utilisation en clinique dans le cancer du sein

En monothérapie

L'Olaparib et le Talazoparib sont deux monothérapies autorisées dans le traitement du cancer du sein HER2- avec délétion de BRCA [354]. L'Olaparib est de plus approuvé dans les cancers du sein métastatiques par l'agence du médicament américaine (FDA) et est approuvé par l'agence du médicament européenne (EMA) dans les cancers du sein localement avancés et métastatiques. Il est approuvé pour des cancers métastatiques déjà traités par chimiothérapie ou positifs aux récepteurs hormonaux après thérapie endocrine. Le Talazoparib est lui autorisé par la FDA et la EMA pour les cancers localement avancés et métastatiques. Ces autorisations ont été données dans les années 2018-2019 suites aux résultats positifs des essais cliniques de phase III OlympiAD et EMBRACA qui ont montré des avancées en terme de survie sans progression [355]. OlympiAD qui était un essai multicentrique international a permis de comparer l'efficacité de l'Olaparib *versus* la thérapie standard du choix du praticien. Cette étude a permis de montrer que la toxicité peut être appréhendée et que le gain pour les patients avec ce traitement est réel. L'essai EMBRACA a lui permis de relever l'efficacité du Talazoparib *versus* un agent standard [356]. Une comparaison de ces deux études suggère qu'il ne semble pas y avoir de différence d'efficacité entre Olaparib et Talazoparib vis-à-vis de la survie sans progression [357].

Le Niraparib, Rucaparib et Veliparib sont en revanche toujours en essais cliniques en tant que monothérapie pour les cancers BRCA mutés.

Il y a actuellement des essais cliniques qui s'intéressent aux traitements par PARPi des premiers stades de tumeurs mammaires ; une étude clinique de phase III avec Veliparib en néoadjuvant, une étude clinique de phase I/II avec le Niraparib et le Talazoparib en néoadjuvant, et une étude clinique de phase II/III sont en cours concernant le traitement Olaparib en tant que néoadjuvant et adjuvant.

En combinaison

Des études cliniques ont été menées pour tester les inhibiteurs de PARP en combinaison avec des agents cytotoxiques de chimiothérapies dans les cancers métastatiques mammaires. Le rationnel de ces combinaisons repose sur le lien entre HDR, la réparation de l'ADN et la létalité synergique. L'augmentation de l'instabilité génomique dans les cellules tumorales HRD

les rend plus sensibles aux lésions à l'ADN causées par les sels de platine. Le Veliparib semble être particulièrement intéressant couplé avec l'agent cytotoxique Témazolomide. L'efficacité de cette combinaison et sa bonne tolérance ont été confirmées en phase II. Ce qui ressort de ces études, est l'effet bénéfique d'une combinaison avec du cisplatine, du carboplatine, ainsi que le Topotécan dans les cancers BRCAness, avec des effets secondaires plus ou moins satisfaisants. L'association Olaparib-Topocan semblerait avoir beaucoup d'effets secondaires hématologiques, alors que les combinaisons avec Veliparib sont mieux tolérées. Il a été émis l'hypothèse que l'efficacité d'une combinaison entre un PARPi et un autre agent de chimiothérapie reposerait en partie sur le mécanisme d'action des molécules. Certains PARPi ont une activité de suppression catalytique de PARP forte (Veliparib) alors que d'autres utilisent d'avantage le système de blocage « *trapping* » (Olaparib, Talazoparib). Ainsi, les PARPi qui ont un système de blocage seraient plus efficace avec des agents alkylants, alors que ceux s'appuyant sur l'activité catalytique seraient plus appropriés en combinaison avec des inhibiteurs de la topoisomérase I [358].

Une autre combinaison prometteuse est l'association avec des **immunothérapies** du fait que l'Olaparib induit des dommages à l'ADN capable d'attirer des lymphocytes tumoraux infiltrants, d'augmenter PD-L1 et de libérer des néo-antigènes tumoraux après la mort cellulaire. L'association de l'Olaparib avec un anticorps anti-PD-L1 a été évaluée en phase I et a montré des résultats satisfaisants chez des patientes *BRCA* muté et non muté [359]. L'essai de phase II MEDIOLA testant la même combinaison a montré un effet supérieur à l'utilisation de l'Olaparib seul [360]. Ces résultats ont permis de continuer les essais et notamment de les ouvrir aux patients ayant un TNBC *BRCA* non muté. De plus, une étude de phase II couplant le Niraparib avec un anticorps anti-PD-L1 a aussi montré qu'indépendamment du statut *BRCA* la réponse au traitement semble différer en fonction du statut PD-L1 (en faisant un biomarqueur potentiel) [361]. Une étude *in vitro* dans des lignées tumorales mammaires et *in vivo* sur un modèle murin a montré que PARPi augmente l'expression de PD-L1 [362]. De plus, le blocage de PD-L1 permettrait de resensibiliser les cellules tumorales à l'activité cytotoxique des lymphocytes T, augmentant l'efficacité thérapeutique en combinaison *in vivo*.

La combinaison entre les inhibiteurs de PARP et des **traitements anti-angiogéniques** est aussi en essai clinique. Les premiers résultats dans le cancer de l'ovaire montrant un bénéfice de cette combinaison [363] ont incité le développement d'essais dans le cancer du sein. Une phase I a ainsi commencé en couplant un inhibiteur de PARP à l'Apatinib (anti-

angiogénique), et cela a permis de montrer que la combinaison semble être bien tolérée, permettant de poursuivre l'essai [364].

II.3. La résistance aux inhibiteurs de PARP

Le problème de développement de résistance aux thérapies anti-tumorales s'applique également aux inhibiteurs de PARP. Les mécanismes sous-jacents au développement de cette résistance restent mal compris à ce jour. Plusieurs pistes pour expliquer cela ont été avancées.

La restauration de l'activité de réparation homologue

Un des mécanismes d'acquisition de résistance aux inhibiteurs de PARP est la restauration de la HR (**Figure 25**). Cela a lieu grâce à des mutations de réversion notamment via la réactivation de *BRCA1/2*. Ces mutations secondaires ont pu être identifiées en amont chez les patients réfractaires par la suite aux inhibiteurs de PARP, mais elles étaient également présentes en grand nombre dans le plasma des patients après traitements aux inhibiteurs de PARP, dans le cancer du sein et de l'ovaire [365]. De plus, il a été montré qu'un défaut de réparation homologue lié à une mutation *BRCA1* peut être réactivé suite à une défaillance de la voie de réparation NHEJ. La perte de fonction de la protéine 53BP1, impliquée dans NHEJ, rétablit la voie de réparation HR, et induit la résistance aux inhibiteurs de PARP [366]. Cela ne s'applique pas dans le cas de mutations *BRCA2*. Il a aussi été mis en évidence le rôle des miARN dans la résistance aux inhibiteurs de PARP. La surexpression de miR-622 induit la désensibilisation des cellules tumorales mammaires *BRCA*-mutées à l'Olaparib et au Veliparib. Cette désensibilisation serait due au fait que miR-622 médie l'expression de Ku70/80, bloquant ainsi le mécanisme de réparation NHEJ, et rétablissant le système HR [367].

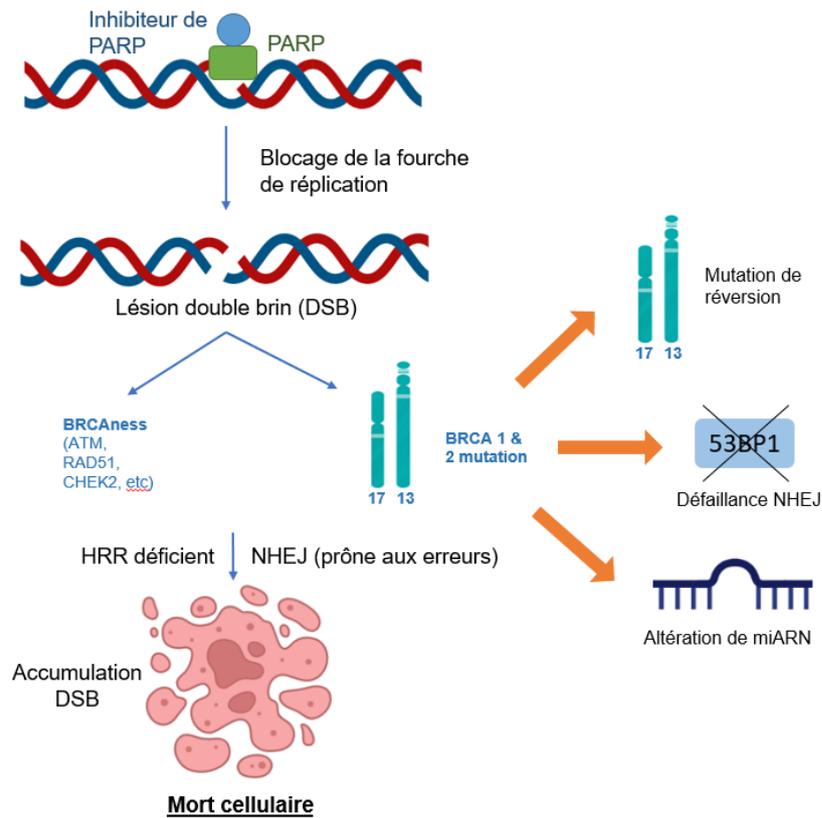


Figure 25: Mécanismes de résistance : restauration de l'activité de HR (adapté de Shi et al., 2020)

Diminution de la disponibilité cellulaire de PARPi

Dans le modèle murin de cancer du sein muté BRCA, la majorité des tumeurs résistantes aux inhibiteurs de PARP présentaient une surexpression des gènes transporteurs de l'efflux de drogues (comme *ABCB1A/B*, codant pour MDR1) [368]. Cette résistance, aussi montrée dans le cancer de l'ovaire, semble être réversible *in vitro* lorsque les cellules sont traitées avec un inhibiteur de *ABCB1* [369]. Ce phénomène est décrit avec le traitement Olaparib, mais les résultats ne sont cependant pas retrouvés avec le traitement Veliparib, montrant qu'il ne s'agit pas d'un mécanisme unique pouvant expliquer la résistance (**Figure 26**).

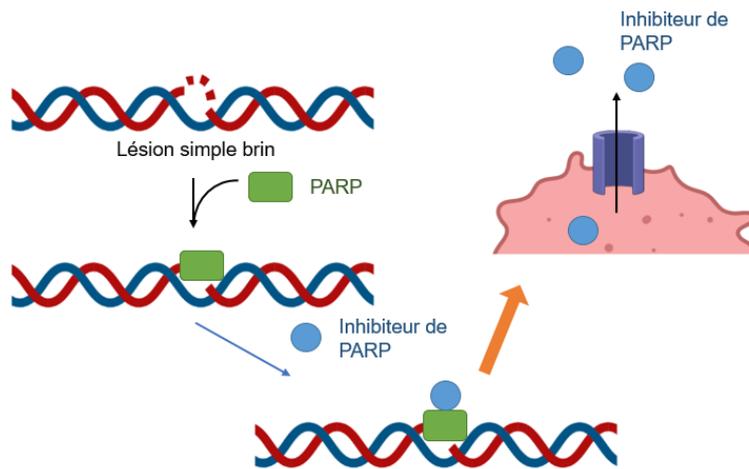


Figure 26: Mécanismes de résistance : drogue efflux (adapté de Shi et al., 2020)

La stabilisation de la fourche de réplication

BRCA1 et 2 ont un rôle dans le blocage de la fourche de réplication. Lorsqu'ils sont mutés, certaines nucléases comme MRE11 et MUS81 peuvent alors se mettre sur la fourche de réplication menant à la déstabilisation de la fourche, et à des aberrations chromosomiques. EZH2 et PTIP, impliquées dans le recrutement de ces nucléases peuvent médier la sensibilité aux inhibiteurs de PARP [370], [371]. La perte de PTIP, inhibe le recrutement de MRE11 au site du blocage de la fourche de réplication, pour minimiser la dégradation du brin naissant d'ADN. En résulte la stabilisation de la fourche, associée avec des lésions doubles brins dans les cellules *BRCA1/2* et cela confère la résistance aux inhibiteurs de PARP (**Figure 27**). La perte de EZH2 induit la résistance aux PARPi dans les *BRCA2* mutées seulement [372].

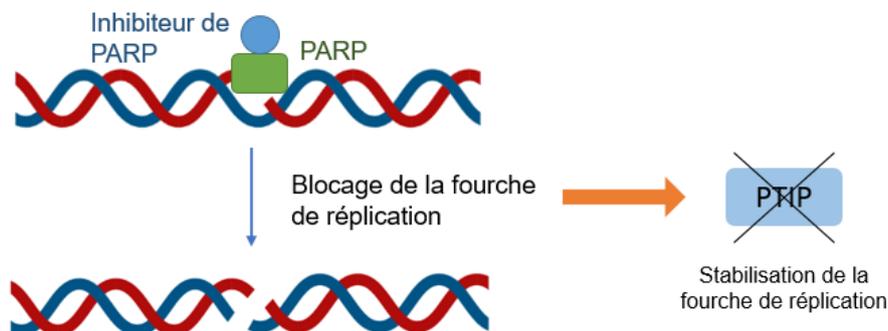


Figure 27: Mécanismes de résistance : Stabilisation de la fourche de réplication (adapté de Shi et al., 2020)

Diminution de PARP1 et PARG

Le blocage de PARP par PARPi induit l'accumulation de lésions simples brin non réparées et une mauvaise progression de la fourche de réplication, menant à la mort cellulaire. Il semblerait qu'un lien existe entre le PARP « *trapping* » et l'acquisition de résistance aux PARPi. Pettitt *et al.* ont identifié une mutation de PARP1, fréquente dans les tumeurs de patients résistants aux PARPi, qui est associée avec une diminution de l'activité de blocage de PARP1 sur l'ADN [373]. L'activité de PARP est inversée par la glycohydrolase PAR (PARG), responsable de la dégradation des chaînes PAR. Des séquençages génétiques de souris BRCA2-déficientes ont permis d'identifier la perte sélective de PARG comme une cause possible de résistance aux inhibiteurs de PARP [374]. Il a ainsi été retrouvé des populations PARG-négatives dans le cancer du sein triples négatifs. La suppression de PARG permet de nouveau la formation de PAR, de diminuer le blocage de PARP sur l'ADN, et réhabilite la signalisation de PARP1 (**Figure 28**).

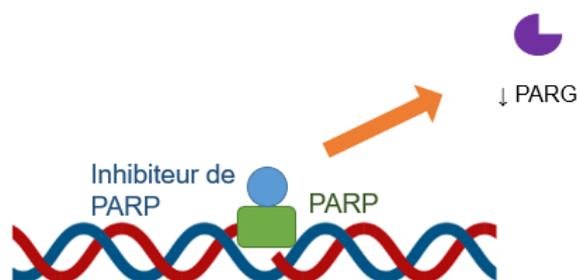


Figure 28: Mécanisme de résistance : Diminution de PARG (adapté de Shi *et al.*, 2020)

Dérégulation de voies de signalisation

La résistance aux inhibiteurs de PARP est associée à la dérégulation de plusieurs voies de signalisation. Par exemple, le récepteur de tyrosine kinase c-MET phosphoryle PARP-1, permettant l'activation de son activité enzymatique réduisant ainsi sa liaison avec les PARPi, induisant de la résistance aux inhibiteurs de PARP. Une combinaison PARPi et inhibiteurs de c-MET aurait un effet synergique sur la suppression de la croissance des cellules tumorales mammaires *in vitro* et *in vivo* [375]. Le traitement avec PARPi augmente la voie pro-survie PI3K/AKT, qui est un régulateur de la prolifération et croissance cellulaire [376]. ATM et ATR, deux sérine/thréonine kinases, sont des facteurs essentiels dans la réparation de l'ADN et leur

augmentation confère la résistance aux inhibiteurs de PARP via la restauration de la HR [377]. Leur inhibition dans les cellules tumorales BRCA-mutées et résistantes aux inhibiteurs permet de contrer les mécanismes de résistance (en bloquant la réparation homologue et la stabilisation de la fourche de réplication) [378]. Des données de séquençages d'ARN ont également permis de montrer que la voie NF- κ B est augmentée dans les cellules résistantes aux inhibiteurs de PARP, et que l'inhibition de certains composants de NF- κ B permet de rendre les cellules sensibles de nouveau. Ainsi, il semblerait que les cellules résistantes aux inhibiteurs de PARP soient plus sensibles aux inhibiteurs de NF- κ B que les cellules non résistantes. L'association d'un inhibiteur de NF- κ B et de PARPi serait ainsi efficace sur les cellules résistantes [379].

Ainsi, il est important de développer des outils permettant de prévoir l'efficacité des inhibiteurs de PARP avant traitement, et il serait bénéfique de développer des approches thérapeutiques ciblant les mécanismes de résistance qui se mettent en place pour rendre de nouveau sensibles les tumeurs aux inhibiteurs de PARP.

OBJECTIFS

Le **cancer du sein** est le cancer féminin le plus fréquent, et malgré les progrès thérapeutiques il reste la première cause de décès par cancer chez la femme du fait du développement de résistances au traitement et de la formation de métastases.

L'angiogenèse permet la vascularisation des tumeurs et est une condition essentielle au développement tumoral et au processus métastatique. Toutefois des résultats récents ont montré qu'il existe un nouveau mécanisme appelé **mimétisme vasculaire** (VM) qui correspond à la capacité de certaines cellules tumorales particulièrement agressives à imiter le réseau développé par les cellules endothéliales. Le mimétisme vasculaire représente donc un moyen supplémentaire pour les cellules tumorales agressives de devenir vascularisées. La capacité des cellules à former du VM est corrélée à des stades agressifs et un mauvais pronostic dans le cancer du sein. Le VM peut expliquer une partie des résistances observées dans les traitements anti-angiogéniques. Une meilleure compréhension du VM et la découverte de thérapies ciblées afin d'inhiber ces réseaux sont intéressantes.

Les **inhibiteurs de PARP** représentent une nouvelle arme thérapeutique dans les cancers du sein agressifs avec mutation *BRCA1* et *BRCA2*. Récemment ces molécules ont montré un bénéfice également sur les tumeurs mammaires triples négatives et HER2+ indépendamment du statut BRCA. Plusieurs études ont permis de mettre en évidence leurs effets anti-angiogéniques. En revanche, leurs **effets sur le mimétisme vasculaire** restent peu étudiés.

Ainsi l'objectif de mon travail de thèse vise à évaluer **l'impact des inhibiteurs de PARP sur le mimétisme vasculaire** dans le cancer du sein. Nous avons souhaité également caractériser les **voies de signalisations cellulaires impliquées** dans les effets observés.

Nous avons dans un premier temps identifié les **lignées** tumorales mammaires **capables de former des réseaux de mimétisme vasculaire**. Dans un deuxième temps testé **trois inhibiteurs de PARP** (Olaparib, Talazoparib et Veliparib) sur ces lignées et étudié leurs *effets* sur la capacité à former du VM. Dans un troisième temps, nous avons déterminé les voies de signalisation ainsi que les acteurs impliqués dans ces mécanismes.

RESULTATS

ARTICLE

I. Résumé de l'article

Les inhibiteurs de poly-(ADP-ribose)-polymérase (PARPi) sont une catégorie de thérapies ciblées qui inhibent les protéines PARP, impliquées dans de nombreux processus cellulaires. Les PARPi peuvent agir en tant que modulateur de l'angiogenèse, en l'inhibant. Cependant l'interaction entre les inhibiteurs de PARP et le mimétisme vasculaire (VM) dans le cancer du sein restent à ce jour mal connus. Afin de déterminer si les PARPi peuvent réguler la formation de réseaux vasculaires tumoraux, nous avons testé si les traitements Olaparib, Talazoparib et Veliparib peuvent inhiber le VM des cellules tumorales mammaires. Ainsi nous avons montré que les PARPi peuvent agir en tant qu'inhibiteur de la formation de réseaux de VM dans les cellules tumorales mammaires de sous-type triple négatif, indépendamment du statut BRCA. En étudiant les mécanismes impliqués dans cette inhibition, nous avons montré que les inhibiteurs de PARP peuvent interagir et inhiber la voie de signalisation NF- κ B, menant à l'inhibition du VM. Nous avons de plus démontré que les PARPi diminuent l'expression de la protéine angiogénique PTX3. La supplémentation de PTX3 annule les effets inhibiteurs sur le VM des PARPi. En conclusion, nos résultats indiquent que les PARPi, en ciblant le mimétisme vasculaire, peuvent apporter une nouvelle approche thérapeutique dans le cancer du sein triple négatif.

II. Manuscrit de l'article



1 Article

2 PARP Inhibitor inhibits vasculogenic mimicry through a NF-κB- 3 PTX3 axis signaling in breast cancer cells

4
5 Justine Chivot ¹, Nathalie Ferrand ¹, Aude Fert ¹, Romain Morichon ² and Michèle Sabbah ^{1,3*}

6
7 ¹ Team Cancer Biology and Therapeutics, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), Institut Universitaire
8 de Cancérologie, Sorbonne University, Inserm UMR_S 938, 75012 Paris, France; justine.chivot@gmail.com;
9 nathalie.ferrand@inserm.fr ; aude.fert@sorbonne-universite.fr

10 ² CRSA Cytométrie Imagerie Saint-Antoine, Sorbonne University, 75012 Paris, France;
11 romain.morichon@sorbonne-universite.fr

12 ³ Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), 75016 Paris, France

13 * Correspondence: michele.sabbah@inserm.fr; Tel.: +33-1-492-846-93

14

15
16 **Abstract:** Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors (PARPi) are targeted therapies that inhibit PARP
17 proteins which are involved in a variety of cell functions. PARPi may acts as modulator of angio-
18 genesis; however, the relationship between PARPi and vasculogenic mimicry (VM) in breast cancer
19 remains unclear. To determine whether PARPi regulate vascular channel formation, we assessed
20 whether treatment with Olaparib, Talazoparib and Veliparib inhibits vascular channel formation by
21 breast cancer cell lines. Her, we found that PARPis act as potent inhibitors of VM formation in triple
22 negative breast cancer cells independently of BRCA status. Mechanistically, we find that PARPi
inhibits NF-κB signaling leading to inhibition of VM. We further show that PARPi decrease expres-
sion of the angiogenic factor PTX3. Moreover, PTX3 abrogated PARPi-VM inhibition. In conclusion,
our results indicate that PARPi by targeting VM may provide a new therapeutic approach for triple
negative breast cancer.

Citation: Lastname, F.; Lastname, F.;
Lastname, F. Title. *Int. J. Mol. Sci.*
2022, 23, x.
<https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Firstname Last-
name

26 **Keywords:** PARP inhibitor; vasculogenic mimicry, PTX3, NF-κB signaling

Received: date

Accepted: date

Published: date

28
29
30 **Publisher’s Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional
31 claims in published maps and institu-
32 tional affiliations.



34
35
36 **Copyright:** © 2022 by the author
37 Submitted for possible open access
38 publication under the terms and
39 conditions of the Creative Commons
40 Attribution (CC BY) license
41 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Breast cancer is the most diagnosed cancer along women worldwide and is the lead-
ing cause of death cancer in women [1]. In breast cancer patients, assessment of the estro-
gen and progesterone receptors (ER, PR), along with the human epidermal growth factor
receptor 2 (HER2) has been critical for predicting response to hormonal and targeted ther-
apies. Approximately 15% of breast tumors are totally devoid of these three receptors har-
boring thus a triple-negative breast cancers (TNBC) phenotype [2]. In view of their specific
behavior compared to other subtypes, the treatment of TNBC remains challenging due to
the aggressiveness, increased risk of relapse, and limited target therapies [3]. Several data
support a central role for angiogenesis in breast cancer growth and metastasis. However,
the effect of anti-angiogenic monotherapy appears to be limited in breast cancer [4]. Fur-
thermore, an angiogenesis-independent pathway known as vasculogenic mimicry (VM)
has been reported in very aggressive tumors. VM was first reported in melanoma but is
now described in many invasive and metastatic cancers [5]. This phenomenon describes

the formation of vascular-like network lined by tumor cells rather than endothelial cells that express certain typical endothelial proteins [6]. Many TNBCs form vascular networks and this process may play an important role in resistance to anti-angiogenic treatments [7, 8].

PARPi are small inhibitors of the poly-(ADP)-ribose polymerase (PARP) family of DNA repair enzymes [9, 10]. Several PARPi have been approved by the Food Drug Administration (FDA) to treat different cancers. These drugs have shown great efficacy in the treatment of BRCA1/2-mutated tumors such as ovarian and breast cancer [11, 12]. These molecules have an anti-tumor activity by inhibiting PARP activity and act by operating on the principle of synthetic lethality and leads to cytotoxicity in BRCA deficient cells [13]. However, there is strong evidence from preclinical and mechanistic studies with PARPi that support the use of PARPi irrespective of BRCA1/2 status or HR-mediated repair in triple negative breast cancer and seems highly promising for the HER2+ tumors which become resistant to trastuzumab [14-16]. PARP proteins mediate many biological actions in addition to DNA repair, they act as transcriptional regulators of inflammation, apoptosis, chromatin modification, hypoxic response, epithelial mesenchymal transition, autophagy and cancer stem cell programming [17]. It was also observed that apart from PARP inhibition, some of these molecules target a variety of kinases implicated in signal transduction pathways in both healthy and malignant cells [18]. All these processes are involved in tumor progression and highlight the relevance to use PARPi as a therapeutic approach. The role of PARP-1 in promoting angiogenesis that fuels the growth of tumors can also be target of PARPi, because PARP-1 depletion or PARPi reduce vessel formation [19] and expression of markers of angiogenesis in melanoma [20] or endothelial cells [21]. Moreover, the anti-angiogenic properties of PARP inhibitors has been demonstrated both in vitro and in vivo. PARP inhibition causes loss of ERK2 stimulation by decreasing the activity of critical pro-angiogenic factors including vascular endothelial growth factor (VEGF), transmembrane signaling protein syndecan-4 (SDC-4), platelet/endothelial cell adhesion molecule (PECAM1/CD31), and hypoxia inducible factor (HIF) [19-24]. This ultimately results in reduced angiogenesis and inflammation. Interestingly, a recent study showed that progression free survival was superior in ovarian cancer patients who received a combination of the PARPi olaparib combined with the humanized monoclonal antibody bevacizumab that inhibited VEGF compared to bevacizumab alone [25].

In the present study we found that three different PARPis can inhibit the VM formation in triple negative breast cancer cell lines. Mechanistically, we uncovered that PARPi by targeting the NF- κ B signaling pathway identify PTX3 as a new potential candidate involved in the VM formation.

2. Results

2.1. VM formation in triple negative breast cancer cells is independent of BRCA status

Numerous studies have highlighted the presence of a network of VM in the most aggressive breast cancers. First, we screened a large panel of 15 established breast cancer cell lines in order to identify those that form networks of matrix-rich tubular structures in three-dimensional culture (Table 1). Although all basal cell lines do not form VM, microscopy experiments revealed that cell lines capable of forming VM form channels in a similar manner to endothelial HMEC-1 cells (Figure 1). Moreover, they are associated with the basal-like breast cancer subtype and thus independently of the BRCA1/2 status (Figure 1).

Cell line	Classification	ER	PR	HER2	Tumor	BRCA Statut
T47D	Lum A	+	+	-	IDC	WT
BT474	Lum B	+	+	+	IDC	BRCA2
MCF-7	Lum A	+	+	-	IDC	WT
ZR-75.1	Lum A	+	+ -	-	IDC	WT
SKBR3	HER2	-	-	+	AC	WT
MDA-MB-436	Basal A	-	-	-	AC	BRCA1
HCC38	Basal B (Claudin Low)	-	-	-	DC	WT
SUM1315 M02	Basal B	-	-	-	IDC	BRCA1
BT549	Basal B (Claudin Low)	-	-	-	DC	BRCA1
SUM149	Basal B (Claudin Low)	-	-	-	DC	BRCA1
HCC1937	Basal A	-	-	-	DC	BRCA1
BT20	Basal A	-	-	-	IDC	WT
MDA-MB-231	Basal B	-	-	-	IDC	WT
HS578T	Basal B (Claudin Low)	-	-	-	IDC	WT
SUM159	Basal B (Claudin Low)	-	-	-	AnC	WT

Table 1. Characteristics of breast cancer cell lines used in this study. Lum A: Luminal A; Lum B: Luminal B; IDC : Invasive Ductal Carcinoma; AC : Adenocarcinoma ; DC : Ductal Carcinoma ; AnC : Anaplastic Carcinoma

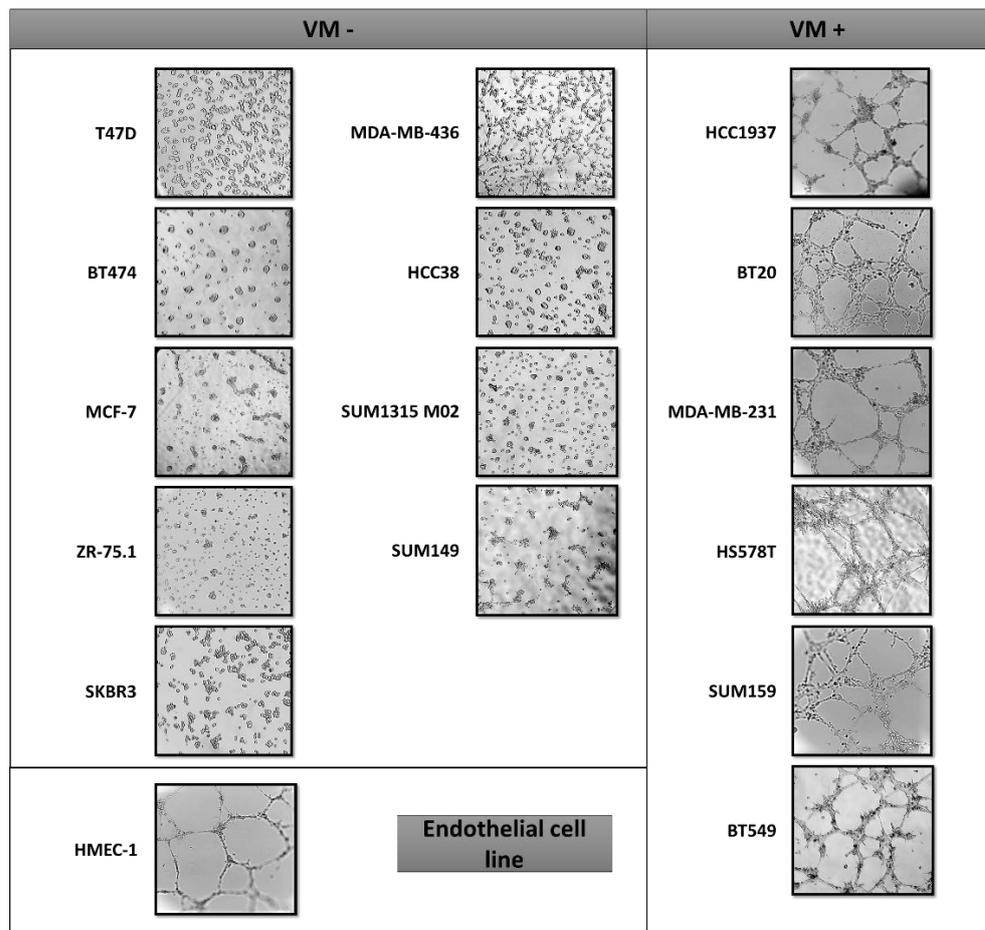


Figure 1. Vascular mimicking ability on breast cancer cell lines' subtypes. Phase contrast images show vascular channels formation. Images were captured 24h after plating on Matrigel. Experiments were realized at least 3 times.

2.2. PARP inhibition suppresses vasculogenic mimicry in breast cancer cells

Because PARP-1 is involved in angiogenesis, we next investigate the impact of PARP inhibitor (PARPi) on the VM formation of three breast tumor cell lines and an endothelial one. We focus here on three PARPis: olaparib (AZD2281), talazoparib (BMN 673) and veliparib (ABT-888). Olaparib and talazoparib have been approved by FDA for treating advanced ovarian, pancreatic and breast cancers, Veliparib does not yet have an approved label; nevertheless, there are currently promising results available in preclinical and early clinical settings. These three PARPis have been shown to target PARP1/2 activity [26–28]. Cells were treated for 72h with non-cytotoxic doses of PARPi determined by staining with Annexin (Supplemental S1). PARPi treatments inhibited the formation of tubular network in both breast tumor cell lines and endothelial cell line HMEC-1 (Figure 2). Olaparib seems to have greater potency than talazoparib and veliparib, particularly in BT20 and HMEC-1 cells.

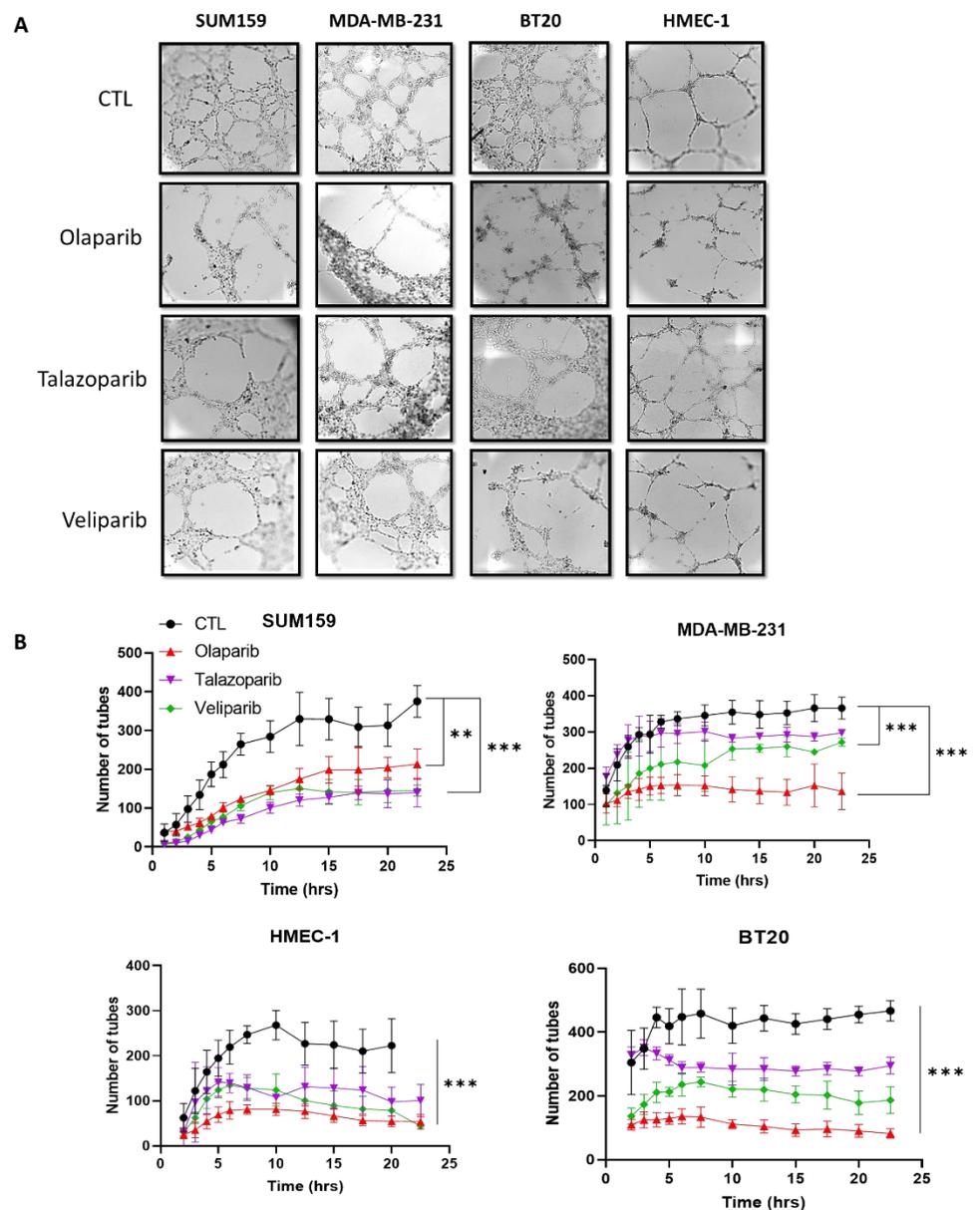


Figure 2. Effect of PARPi on vascular mimicry. Time-lapse video microscopy experiments were realized on HMEC-1 endothelial cells, and breast cancer MDA-MB-231, SUM159 and BT20 cells treated for 72 h with Olaparib (20 μ M), Talazoparib (10 nM) and Veliparib (20 μ M) before being seeded on Matrigel. (A) Representative pictures taken at 24 hours. (B)

117 Quantification of length of tube formed. Experiments were realized at least 3 times and
118 data are expressed as mean \pm SEM., ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

119 2.3. PARPi treatment caused decreased expression of angiogenic proteins

120 In order to evaluate the PARPi effect on the level of angiogenic molecules, the cell
121 culture supernatants from SUM159 and HMEC-1 cells treated with vehicle or olaparib
122 (20 μ M) for 72 hours were tested on a human angiogenesis array containing 55 different
123 angiogenic proteins. Several angiogenic proteins were down regulated by olaparib on
124 membrane arrays (Figure 3A). Interestingly, as shown in Figure 3, there were differences
125 in both constitutive and olaparib treated angiogenic protein expression between HMEC-
126 1 and SUM159 cell lines. We found major differences in IL-8, PTX3 and VEGF expression
127 when SUM159 were treated with olaparib compared to HMEC-1. These results were con-
128 firmed by ELISA assays showing a significative lower concentration of PTX3 and VEGF
129 in SUM159 compared to HMEC-1 when treated separately with the three PARPis. How-
130 ever, ELISA assays did not confirm IL-8 decrease in SUM159 cells treated with olaparib.
131 As expected VEGF was weakly expressed in unstimulated HMEC-1.
132

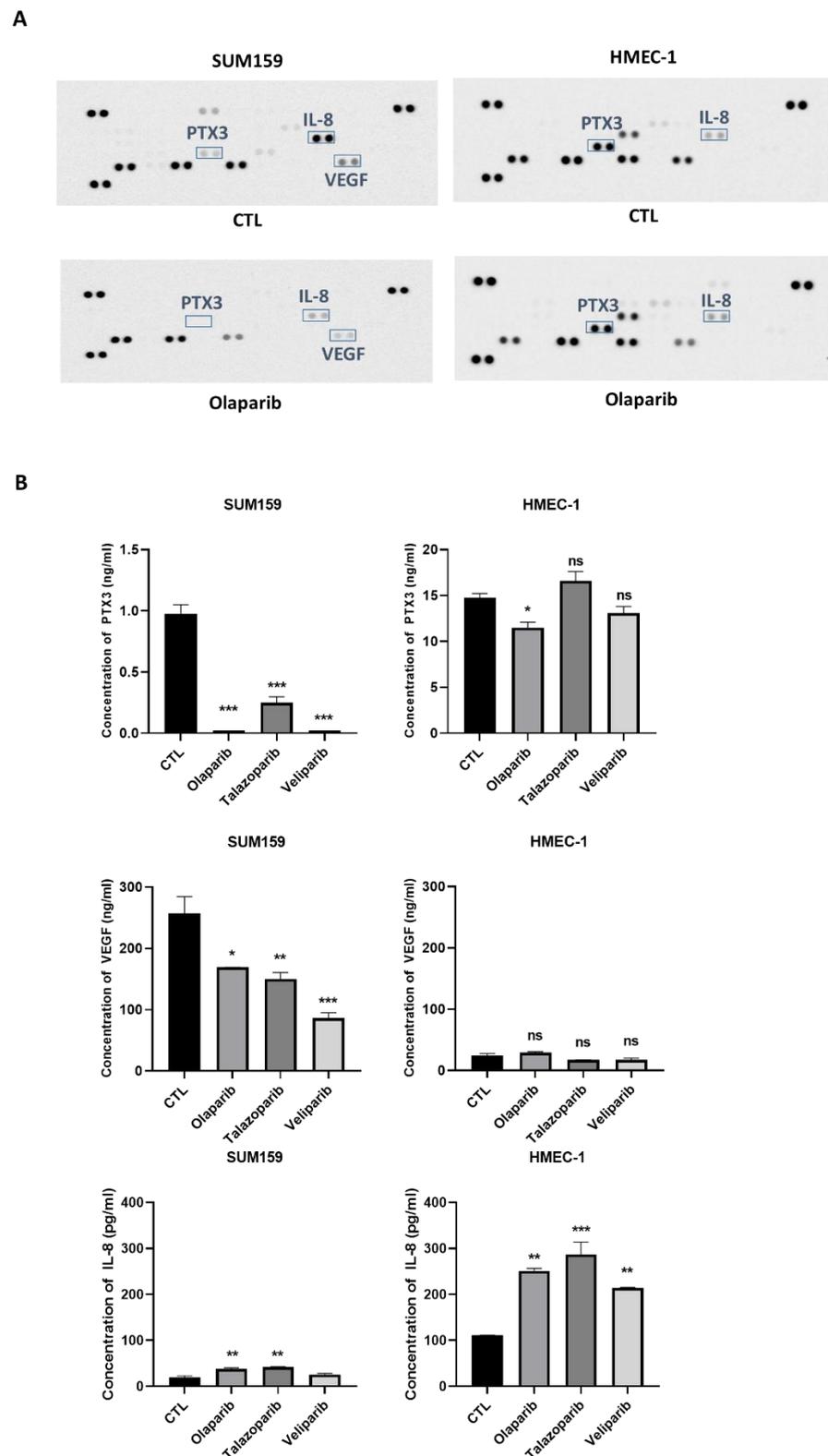


Figure 3. PARPi modifies secretion of angiogenesis-related protein PTX3 and VEGF. A) Cells were treated for 72h with Olaparib at 20 μ M and after overnight incubation without SVF, serum-free conditioned medium was applied onto human angiogenic array membranes. The boxes indicate major angiogenic regulated-molecules. (B) PTX3, VEGF and IL-8 concentrations in supernatant of SUM159 and HMEC-1 were measured by ELISA after 72h of treatment by Olaparib (20 μ M), Talazoparib (10 nM) and Veliparib (20 μ M).

133
134
135
136
137
138
139
140

2.4. *NFκB* inactivation is required for PARPi-VM inhibition

PARP1 is known to interact with the nuclear factor-kappa B (NF-κB) [29] which induces the transcription of various genes including those related to the production of angiogenic molecules and cytokines [30, 31]. On this basis, we analyzed the mRNA levels of NFκB-target genes regulated by Olaparib treatment in SUM159 cells. A decreased expression was observed for the PTX3, VEGF and IL-8 genes when cells are treated for 72 h with Olaparib. Interestingly, Thrombospondin-1 (THSB1) an important inhibitor of angiogenesis [32] was up-regulated in SUM159 cells treated with olaparib (Figure 4A).

We next aimed to analyze the influence of Olaparib on the basal level of total p65 protein and its phosphorylated form. The results of western blot analysis in SUM159 cellular extracts indicated that constitutively expressed p65 levels correlated with protein phosphorylation at serine 536. Conversely, when SUM159 cells were treated with 20μM olaparib, we detected reduced of total p65 and phospho-p65 levels (Figure 4A). We then investigated whether induced expression of IκBα might also contribute to olaparib-decrease of p65 expression levels. We showed a significant increase of IκBα and a slight decrease of the activator IKKα (Figure 4B). To check NF-κB activity, SUM159 cells were transfected with a reporter vector, 3κB-Luc, containing three tandem NF-κB binding sites upstream of the luciferase gene along with a β-galactosidase expression construct. Cells were treated with TNF-α, a known activator of NF-κB, and exposed to BAY 11-7082, an inhibitor of NF-κB or olaparib. Luciferase activity was determined [33]. The NF-κB activity was significantly increased upon treatment with TNF-α, and decreased when cells are pretreated with BAY 11-7082 or olaparib (Figure 4C). No effect on the NF-κB activity was observed when cells are incubated with BAY 11-7082 or olaparib alone.

We then investigated the influence of NF-κB signaling during VM by using BAY 11-7082. When SUM159 cells were treated with the inhibitor, a reduced tube formation was observed in a similar manner to that observed with olaparib (Figure 4D).

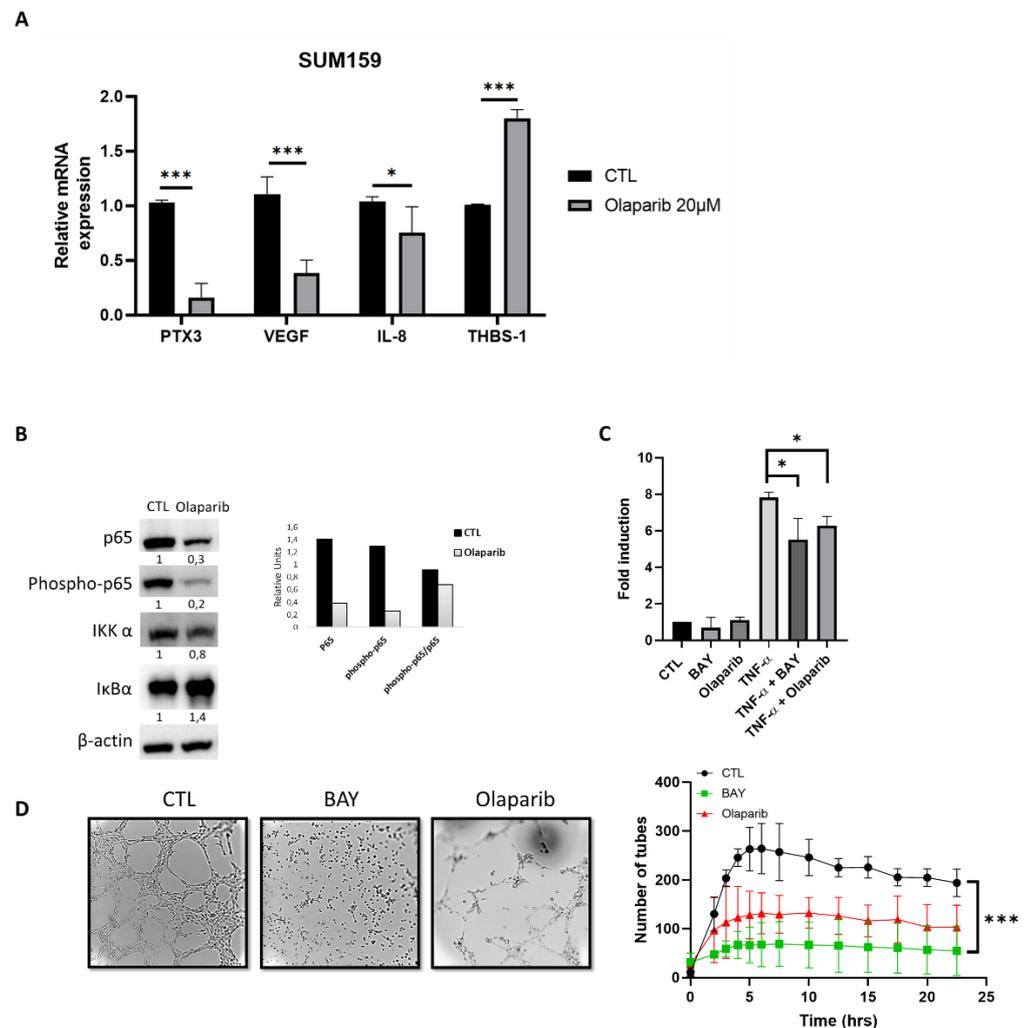


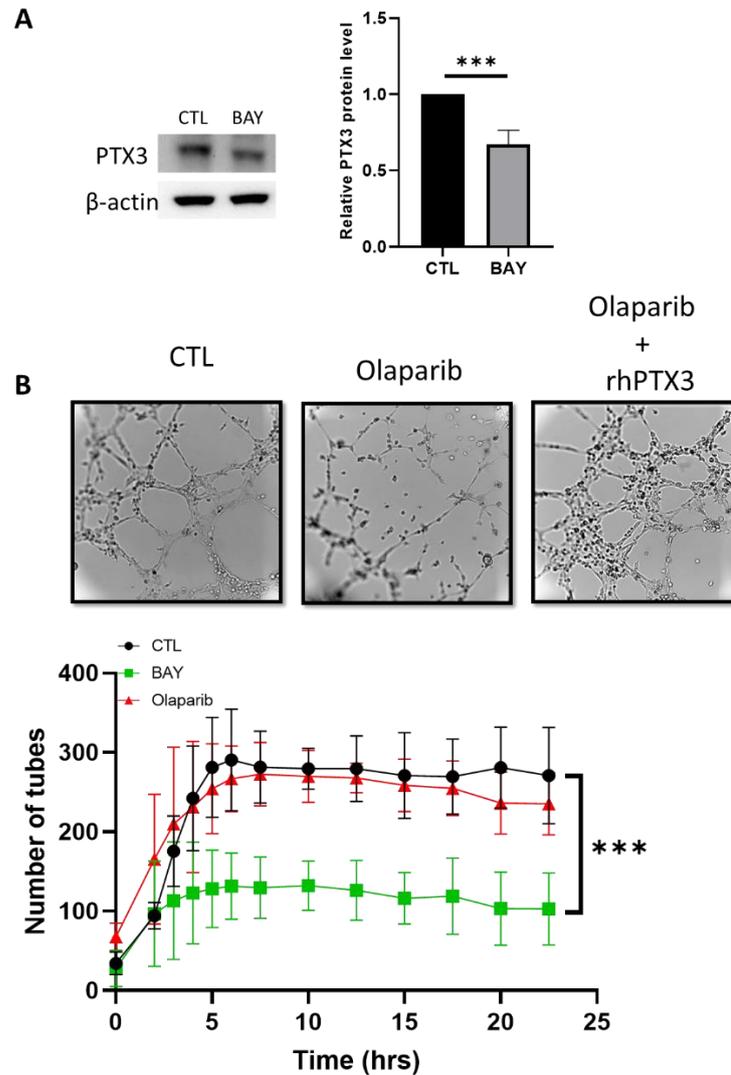
Figure 4. VM is regulated by PARPi through NF- κ B signaling. (A) RNA was isolated from SUM159 cells and gene expression was analyzed by qRT-PCR. The results, after represent the relative transcript levels and are expressed as mean \pm SEM from three independent experiments. (B) Western blot analysis of NF- κ B p65 and phospho-p65 protein, IKK α and I κ B α in SUM159 cellular extracts treated or not with 20 μ M Olaparib for 90 min. Ratio of phospho-p65/p65 are showed as histograms after quantification and normalization with β -actin. (C). SUM159 cells were transfected with plasmids encoding a NF- κ B luciferase reporter gene and a plasmid encoding β -galactosidase. Cells were pre-treated 5h with NF- κ B inhibitor BAY-11-7082 (2,5 μ M) or with Olaparib (20 μ M) and were then treated overnight with TNF- α (10 ng/ml). Data are average of three biological replicates, each performed in triplicate. Fold induction compared to the control condition. (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001). (D). Effect of NF- κ B inhibitor BAY-11-7082 on tube formation assay after 24h of treatment with Bay at 2,5 μ M or 20 μ M Olaparib. Representative pictures were taken at 24 hours and tubes formations quantified. Experiments were realized at least 3 times and data are expressed as mean \pm SEM. * p < 0,05, *** p < 0,001.

2.5. A NF- κ B-PTX3 axis is required for VM inhibition by PARPi

We next wished to validate NF- κ B target genes that could be candidates involved in PARPi VM inhibition. Interestingly, reduced NF- κ B activity with BAY 11-7082 in SUM159 cells reduced the level of PTX3 expression (Figure 5A). To further assess the role of PTX3 in this process, we treated SUM159 cells at the same time with recombinant human PTX3 and olaparib before being plated on Matrigel. We found that PTX3 treatment was able to significantly reduce the effect of olaparib on the VM formation as compared to olaparib

191
192
193
194

treatment (Figure 5B). This section may be divided by subheadings. It should provide a concise and precise description of the experimental results, their interpretation, as well as the experimental conclusions that can be drawn.



195

Figure 5. PTX3 reverse PARPi effect on VM formation. . A. Western blot analysis of PTX3 in SUM159 cells after 24h of treatment with BAY-11-7082 (2,5 μ M). B. Cells were treated 72h with Olaparib (20 μ M) and a human recombinant PTX3 was added for 24h (1 μ g/ml). Representative pictures are taken at 24 hours and tubes formation were quantified. Experiments were realized at least 3 times and data are expressed as mean \pm SEM. *** p<0,001.

196
197
198
199
200
201
202
203

3. Discussion

PARP inhibitors (PARPi) represent an important group of therapeutic molecules particularly used in BRCA mutated or HR deficient breast tumors. However, recent data showed that certain PARPi in pre-clinical studies could inhibit proliferation and promote the death of triple negative breast cancer cells without BRCA mutations [16, 34, 35]. Angiogenesis is crucial for tumor growth and some studies have shown that PARPi present anti-angiogenic activity and may affect endothelial cell function. However, the mechanism underlying the effects of PARPi on vascular plasticity remains relatively unknown.

204 In the present study, we provide evidence that PARPi could impair VM formation to
205 inhibit tumor progression via its action to inhibit NF- κ B activity which subsequently leads
206 to a decrease of PTX3.

207 We have demonstrated that three different PARPi known to target PARP1/2 activity,
208 olaparib, talazoparib and veliparib, impair VM formation of triple negative breast cancer
209 cells independently of BRCA1/2 status. Furthermore, our data showed that the status of
210 BRCA is not a predictive biomarker of VM formation in TNBC since some BRCA-mutant
211 HCC1937 or BT549 cell lines could form network and others such as MDA-MB-436 and
212 SUM1315MO2 do not.

213 Here, we observe that PARPi reduces expression of angiogenic factors in endothelial
214 and tumor cells and most of these factors are regulated by NF- κ B. Our results suggest that
215 PARPi could inhibit NF- κ B activity in breast cancer cells. Actually, the effect of PARPi on
216 NF- κ B expression and activity is controversial and seems to be dependent on cell type.
217 While PARP-1 invalidation or olaparib treatment inhibit expression and phosphorylation
218 of NF- κ B in small-cell lung cancer, olaparib treatment activates NF- κ B in acute myeloid
219 leukemia blasts [36, 37]. Moreover, susceptibility of HER2+ breast cancer to PARPi has
220 been observed and the molecular mechanisms are attributed to the inhibition of NF- κ B
221 signaling [38]. Additionally, NF- κ B is frequently activated in TNBC and inhibition of NF- κ B
222 activity suppresses growth of TNBC cells [39, 40]. The transcription factor NF- κ B has
223 been connected with multiple aspects of angiogenesis but its role has not been investi-
224 gated in vasculogenic mimicry. In the present study, we provide evidence that pharma-
225 cological inhibition of NF- κ B factor with BAY 11-7082 could impair VM formation.

226 Pentraxin-3 (PTX3) is a member of the pentraxin family, which includes CRP, in-
227 volved in innate immune response, complement activation and inflammation [39]. PTX3
228 in cancer can act as an oncosuppressor or a protumorigenic factor [40]. PTX3 has been
229 suggested to play a significant role in cancer-related inflammation and was shown to be
230 increased in lung, prostate, ovarian, liver and pancreatic carcinoma [41-45]. In breast can-
231 cer, PTX3 expression is correlated with poorly differentiated aggressive triple negative
232 breast cancer [46, 47]. Interestingly, PTX3 was found to induce an NF- κ B signaling path-
233 way in invasive melanoma [48]. Moreover, NF- κ B activation is involved in PTX3 expres-
234 sion [49, 50]. Our results reveal that PTX3 could suppresses the VM-inhibition induced by
235 olaparib suggesting that PTX3 could act to induce NF- κ B signaling and thus inhibiting the
236 effect of olaparib.

237 Angiogenesis is crucial for tumor growth and studies have demonstrated that PTX3
238 could be an inducer or an inhibitor of angiogenesis. Enhanced expression of PTX3 corre-
239 lates with IL8-VEGF signaling axis and increase invasion in glioblastoma cells [51]
240 whereas serum PTX3, IL-8 and VEGF levels decreased in gastric carcinoma [52]. In addi-
241 tion, high PTX3 levels have been observed in tumor endothelial cells [53]. This is con-
242 sistent with our results showing a decrease of PTX3, IL-8 and VEGF in SUM159 cells
243 treated with olaparib.

244 Several studies showed a PARP-1 dependent activation of NF- κ B, a major factor dur-
245 ing inflammation. Proteins involved in DNA repair can serve to promote NF- κ B transcrip-
246 tion of pro-inflammatory genes. Similar to inhibition of PARP1, inhibition of BER glyco-
247 sylase OGG1 inhibited NF- κ B activity [54, 55] suggesting that targeting proteins involved
248 in pro-inflammatory signaling could be effective to inhibit VM. Although NF- κ B signal-
249 ing mediates immune response for eliminating tumor cells, inflammation pathway can
250 lead to a malignant phenotype, facilitating escape from immune surveillance [56]. Fur-
251 thermore, PARP inhibitors can also enhance anticancer activity of PD-1/PD-L1 or CTLA-
252 4 inhibition demonstrating that the immunogenic effects of PARP can also be exploited
253 for cancer therapy [57, 58]. Moreover, we have recently shown that inhibiting
254 Hippo/YAP/TAZ signaling could inhibit VM formation [59].

255 A crosstalk between Hippo-YAP and NF- κ B signaling has been demonstrated [60].
256 In many case Hippo-YAP signaling was activated by NF- κ B signaling and inflammatory

257 responses. As YAP/TAZ inhibitors are currently under development, a combination of
258 these inhibitors with PARPI could be a novel approach to inhibit VM formation.

259 In conclusion, we identified a novel molecular mechanism requiring NF- κ B inhibi-
260 tion that may contribute to prevent the formation of VM by PARP inhibitor. Our study
261 provides a rationale for targeting PTX3-mediated NF- κ B by PARPi as part of a novel ther-
262 apeutic approach for triple negative breast cancer.

263 4. Materials and Methods

264 4.1. Cell lines and drug treatment

265 Human breast cancer cells were purchased from the ATCC (American Type Culture
266 Collections, VA, USA). MCF-7, ZR-75.1, HCC38, BT-20, MDA-MB-231 and HS578T were
267 cultured in DMEM (Dulbecco modified Eagle's medium) supplemented with 10% FBS
268 (fetal bovine serum) and 1% penicillin-streptomycin. T47D, BT474, SKBR-3, MDA-MB-
269 436, BT549 and HCC1937 were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS and
270 1% penicillin-streptomycin. SUM1315MO2 were cultured in Ham's F12 medium, supple-
271 mented with 5% heat-inactivated FBS, 1% penicillin-streptomycin, 10 mM HEPES, 5 μ g/ml
272 insulin and 10 ng/ml human recombinant EGF. SUM149 and SUM159 were maintained in
273 Ham's F12 medium, with 5% heat-inactivated FBS, 1% penicillin-streptomycin, 10 mM
274 HEPES, 5 μ g/ml insulin and 2 μ g/ml hydrocortisone. Human dermal microvascular en-
275 dothelial cells HMEC-1 were cultured in MCDB 131 medium supplemented with 10%
276 FBS, L-Glutamine 1%, 10 ng/ml human recombinant EGF, and 1 μ g/ml hydrocortisone.

277 Olaparib (AZD2281), Veliparib (ABT-888), Talazoparib (BMN 673) and BAY11-7082
278 were purchased from Euromedex and reconstituted as described by the producer. Cells
279 were treated with Olaparib at 20 μ M, Veliparib at 10nM and Talazoparib at 20 μ M. BAY11-
280 7082 was used at a concentration of 2.5 μ M.

281 4.2. Tube formation assay

282 Tube Formation Assays were performed according to manufacturer's instructions. μ -
283 Slide Angiogenesis (Ibidi 81506, Biovalley, Illkirch-Graffenstaden, France) were used and
284 pre-coated with 10 μ L of Matrigel® Growth Factor Reduced, Phenol Red-Free (#356231,
285 Corning, New York, NY, USA) and were allowed to polymerize at 37 °C for at least 30
286 min. Cells (2 to 3 \times 10⁵ cells/mL) were seeded into each well in triplicate and maintained
287 in appropriate medium supplemented with 2% (v/v) FBS. A time-lapse video was rec-
288 orded for 24 h to follow the formation of the tubules, using an IX83 inverted microscope
289 (Olympus, Tokyo, Japan) with a motorized stage and an equipped 37°C 5% CO2 thermo-
290 stat chamber (Pecon cell vivo). The images were analyzed using ImageJ software and the
291 plugin Angiogenesis Analyzer [61].

292 4.3. Real-time RT-PCR

293 Total RNA was extracted from all cell lines using the RNeasy® Plus Micro Kit (Qi-
294 agen). RNA quantity and purity were determined by using a Spectrophotometer DS-11
295 (Denovix, Wilmington, DE, USA). One microgram of total RNA from each sample was
296 reverse transcribed, and real-time RT-PCR measurements were performed as described
297 previously [62] using an apparatus Aria MX (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)
298 with the corresponding SYBR® Green kit, according to the PROMEGA manufacturer's
299 recommendations. Data were analyzed using the comparative threshold cycle 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}
300 method; the expression of 36B4 (RPL0) and β -actin were used to normalize data. The ex-
301 pression of the genes was expressed as the fold change in the samples compared to the
302 control condition. All values are averages of at least three independent experiments done
303 in duplicate. Gene specific primers were purchased from Sigma Aldrich-Merck and are
304 listed as follows.
305
306
307
308

Target	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')
β-Actin	GGACTTCG AGCAAGAGATGG	AGCACTGTGTTGGCGTACAG
36B4	TCGACAATGGCAGCATCTAC	GCCTTGACCTTTTCAGCAAG
PTX3	CGTCTCTCCAGCAATGCAT	AAGAGCTTGTCCCATTCCGA
VEGF	ATGACCCAGTTTGGGAACA	TCCTGAATCTTCCAGGCAGT
uPA	TGCCCTGAAGTCGTTAGTGT	ATCTCCTGTGCQTGGGTGQQ
PAI1	CTCTCTCTGCCCTCACCAAC	GTGGAGAGGCTCTTGGTCTG
IL-8	TAGCAAAATTGAGGCCAAGG	AAACAAGGCACAGTGGAAC
TIMP-1	CTTCTGCAATTCCGACCTCGT	ACGCTGGTATAAGGTGGTCTG
THSB1	TTGTCTTTGGAACCACACCA	CTGGACAGTCTCATCACAGGA

4.4. Western blot

Cell extracts were obtained after lysis with RIPA buffer (0.5% sodium deoxycholate, 50 mM Tris-HCl; pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.1% SDS) supplemented with protease and a phosphatase inhibitor cocktail (Roche, Basel, Switzerland) and equal amounts of protein were loaded onto SDS-PAGE gels. After transfer onto nitrocellulose membrane, blots were incubated overnight at 4 °C with the appropriate antibody, followed by incubation with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1/2000, Cell Signaling, Danvers, MA, USA). Bands were visualized using the Clarity™ Western ECL substrate on Chemidoc systems (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Immunoblot analyses were performed by using antibodies directed against P65 (8242T), P-P65 (3033S), IKKα (11930S), IκBα (4814T), actin-HRP (5125S) (Cell Signaling). PTX3 antibody (SC-373951) was purchased from Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany. Protein expression was quantified by densitometry analysis of the immunoblots using Image Lab software developed by Bio-Rad.

4.5. ELISA

Cells lines were plated in P60 at a density of 380 000 cells/well in standard growth conditions for 72h and treated with Olaparib (20μM), Veliparib (10nM) and Talazoparib (20μM). Medium were then aspirated and replaced with serum-free medium for a 16 hours' incubation. Supernatants were collected, particulates were removed by centrifugation and protein concentration was measured using BCA assay (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts). Secreted VEGF and PTX3 in cell culture supernatants were measured by the Human VEGF and Human Pentraxin 3/TGS-14 Quantikine ELISA kit (R&D Systems).

4.6. Luciferase assay

For luciferase reporter gene assays, cells were seeded in 12-well plates and transfected with NF-κB-luciferase and β-Galactosidase reporter plasmids using the Fugene HD reagent (Promega, Madison, WI, USA). Twenty-four hours later, cells were lysed and luciferase and β-galactosidase activities were measured using a luciferase assay (Promega, Madison, WI, USA) and the Galacto Star system (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) as described before [33]. Relative NF-κB promoter activity was calculated following normalization against β-galactosidase activity.

4.7. Human angiogenesis proteome array

Cells lines were plated in P100 at a density of 1.5×10^6 cells/well in standard growth conditions and treated 72h with Olaparib (20μM), Veliparib (10nM) and Talazoparib (20μM). Media were then replaced with serum-free media for 16 hours. Serum-free conditioned media were applied after quantification with BCA assay (ThermoScientific) to

angiogenesis array membrane (Proteome Profiler Human Angiogenesis Array Kit; R&D System, Minneapolis, MN, USA), in accordance with the manufacturer's instructions, to detect relative levels of 55 angiogenic molecules. Quantification of secretome-containing proteins was performed via standard densitometry using Chemidoc systems (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), and the analysis was made using Image Lab software developed by Bio-Rad.

4.8. Flow cytometry and cell viability

The toxicity of Olaparib (20 μ M), Veliparib (10nM) and Talazoparib (20 μ M) was analyzed after 24h, 48h and 72h of treatments. Etoposide was used as a positive control (200 μ M for 24h). Annexin-V-PE (0.1 μ g/ml; BD Biosciences) was used for the assessment of phosphatidylserine exposure and therefore to detect apoptotic cells, 7AAD for cell viability analysis. Assessments were performed in a Cytoflex (Beckman), and data were analyzed using Kaluza software.

4.9. Statistical analysis

Each experiment was repeated at least three times independently. All statistical analyses were performed with Prism software v.6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Averaged data were reported as means \pm SEM. For comparisons between two groups, an ANOVA test was used, and a multiple t-test was used to compare columns. Statistical significance was accepted for $p < 0.05$. Symbols: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

5. Conclusions

In summary, our study shows that PARP inhibitors inhibit vasculogenic mimicry in breast cancer. We showed that PARPi inhibited tube formation by modulating the NF- κ B signaling pathway resulting in a downregulation of PTX3. NF- κ B signaling and PTX3, provide biomarkers for a precision medicine approach to breast cancer and may represent potential druggable targets for the future in combination with PARPi.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: title; Table S1: title; Video S1: title.

Author Contributions: Conceptualization, J.C., and M.S.; methodology, J.C., N.F. and M.S. software, J.C., N.F. and R.M.; validation, J.C. and M.S.; formal analysis, J.C. and M.S.; investigation, J.C., N.F., A.F.; R.M. and M.S.; data curation, J.C., A.F., R.M. and M.S.; writing—original draft preparation, J.C. and M.S.; writing—review and editing, J.C. and M.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: J.C. was supported by a fellowship from Sorbonne University

Institutional Review Board Statement: Not applicable

Informed Consent Statement: Not applicable

Data Availability Statement: Not applicable

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

References

1. Global Burden of Disease Cancer C, Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, Hamavid H, Moradi-Lakeh M et al. The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncol* 2015; 1: 505-527.
2. Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment. *JAMA* 2019; 321: 316.
3. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2010; 363: 1938-1948.

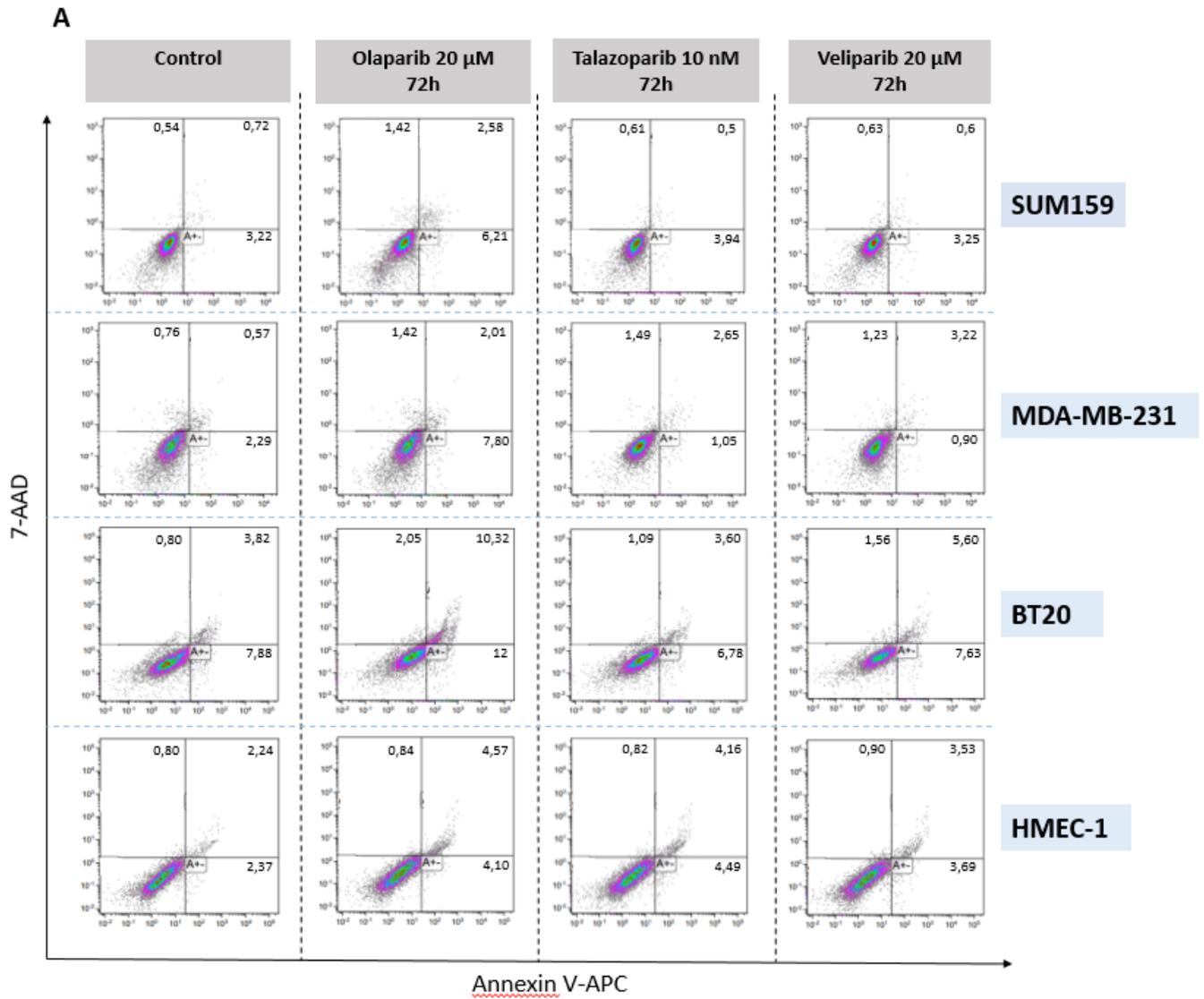
- 396 4. Gligorov J, Doval D, Bines J, Alba E, Cortes P, Pierga JY et al. Maintenance capecita-
397 bine and bevacizumab versus bevacizumab alone after initial first-line bevacizumab and
398 docetaxel for patients with HER2-negative metastatic breast cancer (IMELDA): a ran-
399 domised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014; 15: 1351-1360.
- 400 5. Kirschmann DA, Seftor EA, Hardy KM, Seftor RE, Hendrix MJ. Molecular path-
401 ways: vasculogenic mimicry in tumor cells: diagnostic and therapeutic implications. *Clin*
402 *Cancer Res* 2012; 18: 2726-2732.
- 403 6. Hendrix MJ, Seftor EA, Meltzer PS, Gardner LM, Hess AR, Kirschmann DA et al.
404 Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma
405 cells: role in vasculogenic mimicry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 8018-8023.
- 406 7. Sun H, Zhang D, Yao Z, Lin X, Liu J, Gu Q et al. Anti-angiogenic treatment pro-
407 motes triple-negative breast cancer invasion via vasculogenic mimicry. *Cancer Biol Ther*
408 2017; 18: 205-213.
- 409 8. Wagenblast E, Soto M, Gutierrez-Angel S, Hartl CA, Gable AL, Maceli AR et al. A
410 model of breast cancer heterogeneity reveals vascular mimicry as a driver of metastasis.
411 *Nature* 2015; 520: 358-362.
- 412 9. Curtin NJ, Szabo C. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition: past, present and fu-
413 ture. *Nat Rev Drug Discov* 2020; 19: 711-736.
- 414 10. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB et al. Target-
415 ing the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 2005;
416 434: 917-921.
- 417 11. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E et al. Specific
418 killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase.
419 *Nature* 2005; 434: 913-917.
- 420 12. Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M et al. Inhibition of
421 poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med*
422 2009; 361: 123-134.
- 423 13. Pommier Y, O'Connor MJ, de Bono J. Laying a trap to kill cancer cells: PARP inhibi-
424 tors and their mechanisms of action. *Sci Transl Med* 2016; 8: 362ps317.
- 425 14. Evans KW, Yuca E, Akcakanat A, Scott SM, Arango NP, Zheng X et al. A Popula-
426 tion of Heterogeneous Breast Cancer Patient-Derived Xenografts Demonstrate Broad
427 Activity of PARP Inhibitor in BRCA1/2 Wild-Type Tumors. *Clin Cancer Res* 2017; 23:
428 6468-6477.
- 429 15. Hassan S, Esch A, Liby T, Gray JW, Heiser LM. Pathway-Enriched Gene Signature
430 Associated with 53BP1 Response to PARP Inhibition in Triple-Negative Breast Cancer.
431 *Mol Cancer Ther* 2017; 16: 2892-2901.
- 432 16. Keung MY, Wu Y, Badar F, Vadgama JV. Response of Breast Cancer Cells to PARP
433 Inhibitors Is Independent of BRCA Status. *J Clin Med* 2020; 9.
- 434 17. Marti JM, Fernandez-Cortes M, Serrano-Saenz S, Zamudio-Martinez E, Delgado-
435 Bellido D, Garcia-Diaz A et al. The Multifactorial Role of PARP-1 in Tumor Microenvi-
436 ronment. *Cancers (Basel)* 2020; 12.
- 437 18. Antolin AA, Ameratunga M, Banerji U, Clarke PA, Workman P, Al-Lazikani B. The
438 kinase polypharmacology landscape of clinical PARP inhibitors. *Sci Rep* 2020; 10: 2585.
- 439 19. Tentori L, Lacal PM, Muzi A, Dorio AS, Leonetti C, Scarsella M et al. Poly(ADP-
440 ribose) polymerase (PARP) inhibition or PARP-1 gene deletion reduces angiogenesis.
441 *Eur J Cancer* 2007; 43: 2124-2133.
- 442 20. Tentori L, Muzi A, Dorio AS, Bultrini S, Mazzon E, Lacal PM et al. Stable depletion
443 of poly (ADP-ribose) polymerase-1 reduces in vivo melanoma growth and increases
444 chemosensitivity. *Eur J Cancer* 2008; 44: 1302-1314.

- 445 21. Rodriguez MI, Peralta-Leal A, O'Valle F, Rodriguez-Vargas JM, Gonzalez-Flores A,
446 Majuelos-Melguizo J et al. PARP-1 regulates metastatic melanoma through modulation
447 of vimentin-induced malignant transformation. *PLoS Genet* 2013; 9: e1003531.
- 448 22. Lacal PM, Tentori L, Muzi A, Ruffini F, Dorio AS, Xu W et al. Pharmacological inhi-
449 bition of poly(ADP-ribose) polymerase activity down-regulates the expression of
450 syndecan-4 and Id-1 in endothelial cells. *Int J Oncol* 2009; 34: 861-872.
- 451 23. Martin-Oliva D, Aguilar-Quesada R, O'Valle F, Munoz-Gamez JA, Martinez-
452 Romero R, Garcia Del Moral R et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase modu-
453 lates tumor-related gene expression, including hypoxia-inducible factor-1 activation,
454 during skin carcinogenesis. *Cancer Res* 2006; 66: 5744-5756.
- 455 24. Rajesh M, Mukhopadhyay P, Godlewski G, Batkai S, Hasko G, Liaudet L et al.
456 Poly(ADP-ribose)polymerase inhibition decreases angiogenesis. *Biochem Biophys Res*
457 *Commun* 2006; 350: 1056-1062.
- 458 25. Lorusso D, Guy H, Samyshkin Y, Hawkes C, Estenson K, Coleman RL. Feasibility
459 Study of a Network Meta-Analysis and Unanchored Population-Adjusted Indirect Treat-
460 ment Comparison of Niraparib, Olaparib, and Bevacizumab as Maintenance Therapies
461 in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *Cancers (Basel)* 2022; 14.
- 462 26. Murai J, Huang SY, Das BB, Renaud A, Zhang Y, Doroshow JH et al. Trapping of
463 PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Res* 2012; 72: 5588-5599.
- 464 27. Murai J, Huang SY, Renaud A, Zhang Y, Ji J, Takeda S et al. Stereospecific PARP
465 trapping by BMN 673 and comparison with olaparib and rucaparib. *Mol Cancer Ther*
466 2014; 13: 433-443.
- 467 28. Sonnenblick A, de Azambuja E, Azim HA, Jr., Piccart M. An update on PARP in-
468 hibitors--moving to the adjuvant setting. *Nat Rev Clin Oncol* 2015; 12: 27-41.
- 469 29. Mangerich A, Burkle A. Pleiotropic cellular functions of PARP1 in longevity and
470 aging: genome maintenance meets inflammation. *Oxid Med Cell Longev* 2012; 2012:
471 321653.
- 472 30. Tabruyn SP, Griffioen AW. NF-kappa B: a new player in angiostatic therapy. *Angi-*
473 *ogenesis* 2008; 11: 101-106.
- 474 31. Zinatizadeh MR, Schock B, Chalbatani GM, Zarandi PK, Jalali SA, Miri SR. The Nu-
475 clear Factor Kappa B (NF-kB) signaling in cancer development and immune diseases.
476 *Genes Dis* 2021; 8: 287-297.
- 477 32. Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad F, Le Beau MM, Lemons RS, Frazier WA et al. A
478 tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and function-
479 ally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci U S A*
480 1990; 87: 6624-6628.
- 481 33. Sabbah M, Prunier C, Ferrand N, Megalophonos V, Lambein K, De Wever O et al.
482 CCN5, a novel transcriptional repressor of the transforming growth factor beta signaling
483 pathway. *Mol Cell Biol* 2011; 31: 1459-1469.
- 484 34. Inbar-Rozensal D, Castiel A, Visochek L, Castel D, Dantzer F, Izraeli S et al. A selec-
485 tive eradication of human nonhereditary breast cancer cells by phenanthridine-derived
486 polyADP-ribose polymerase inhibitors. *Breast Cancer Res* 2009; 11: R78.
- 487 35. McCabe N, Turner NC, Lord CJ, Kluzek K, Bialkowska A, Swift S et al. Deficiency
488 in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to
489 poly(ADP-ribose) polymerase inhibition. *Cancer Res* 2006; 66: 8109-8115.
- 490 36. Chowdhury P, Dey P, Ghosh S, Sarma A, Ghosh U. Reduction of metastatic poten-
491 tial by inhibiting EGFR/Akt/p38/ERK signaling pathway and epithelial-mesenchymal
492 transition after carbon ion exposure is potentiated by PARP-1 inhibition in non-small-
493 cell lung cancer. *BMC Cancer* 2019; 19: 829.

- 494 37. Faraoni I, Aloisio F, De Gabrieli A, Consalvo MI, Lavorgna S, Voso MT et al. The
495 poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib induces up-regulation of death recep-
496 tors in primary acute myeloid leukemia blasts by NF-kappaB activation. *Cancer Lett*
497 2018; 423: 127-138.
- 498 38. Nowsheen S, Cooper T, Bonner JA, LoBuglio AF, Yang ES. HER2 overexpression
499 renders human breast cancers sensitive to PARP inhibition independently of any defect
500 in homologous recombination DNA repair. *Cancer Res* 2012; 72: 4796-4806.
- 501 39. Alles VV, Bottazzi B, Peri G, Golay J, Introna M, Mantovani A. Inducible expression
502 of PTX3, a new member of the pentraxin family, in human mononuclear phagocytes.
503 *Blood* 1994; 84: 3483-3493.
- 504 40. Giacomini A, Ghedini GC, Presta M, Ronca R. Long pentraxin 3: A novel multifac-
505 eted player in cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2018; 1869: 53-63.
- 506 41. Carmo RF, Aroucha D, Vasconcelos LR, Pereira LM, Moura P, Cavalcanti MS. Ge-
507 netic variation in PTX3 and plasma levels associated with hepatocellular carcinoma in
508 patients with HCV. *J Viral Hepat* 2016; 23: 116-122.
- 509 42. Diamandis EP, Goodglick L, Planque C, Thornquist MD. Pentraxin-3 is a novel bi-
510 omarker of lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 2395-2399.
- 511 43. Kondo S, Ueno H, Hosoi H, Hashimoto J, Morizane C, Koizumi F et al. Clinical im-
512 pact of pentraxin family expression on prognosis of pancreatic carcinoma. *Br J Cancer*
513 2013; 109: 739-746.
- 514 44. Stallone G, Cormio L, Netti GS, Infante B, Selvaggio O, Fino GD et al. Pentraxin 3: a
515 novel biomarker for predicting progression from prostatic inflammation to prostate can-
516 cer. *Cancer Res* 2014; 74: 4230-4238.
- 517 45. Tothill RW, Tinker AV, George J, Brown R, Fox SB, Lade S et al. Novel molecular
518 subtypes of serous and endometrioid ovarian cancer linked to clinical outcome. *Clin*
519 *Cancer Res* 2008; 14: 5198-5208.
- 520 46. Scimeca M, Antonacci C, Colombo D, Bonfiglio R, Buonomo OC, Bonanno E.
521 Emerging prognostic markers related to mesenchymal characteristics of poorly differen-
522 tiated breast cancers. *Tumour Biol* 2016; 37: 5427-5435.
- 523 47. Thomas C, Henry W, CuiFFo BG, Collmann AY, Marangoni E, Benhamo V et al.
524 Pentraxin-3 is a PI3K signaling target that promotes stem cell-like traits in basal-like
525 breast cancers. *Sci Signal* 2017; 10.
- 526 48. Rathore M, Girard C, Ohanna M, Tichet M, Ben Jouira R, Garcia E et al. Cancer cell-
527 derived long pentraxin 3 (PTX3) promotes melanoma migration through a toll-like re-
528 ceptor 4 (TLR4)/NF-kappaB signaling pathway. *Oncogene* 2019; 38: 5873-5889.
- 529 49. Choi B, Lee EJ, Song DH, Yoon SC, Chung YH, Jang Y et al. Elevated Pentraxin 3 in
530 bone metastatic breast cancer is correlated with osteolytic function. *Oncotarget* 2014; 5:
531 481-492.
- 532 50. Ravenna L, Sale P, Di Vito M, Russo A, Salvatori L, Tafani M et al. Up-regulation of
533 the inflammatory-reparative phenotype in human prostate carcinoma. *Prostate* 2009; 69:
534 1245-1255.
- 535 51. Wesley UV, Sutton I, Clark PA, Cunningham K, Larrain C, Kuo JS et al. Enhanced
536 expression of pentraxin-3 in glioblastoma cells correlates with increased invasion and
537 IL8-VEGF signaling axis. *Brain Res* 2022; 1776: 147752.
- 538 52. Yeni M, Korkut E, Aksungur N, Kara S, Askin S, Kartal M. Determination of Pen-
539 traxin-3, Interleukin-8 and Vascular Endothelial Growth Factor Levels in Patients with
540 Gastric Adenocarcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 2021; 22: 1507-1512.
- 541 53. Hida K, Maishi N, Kawamoto T, Akiyama K, Ohga N, Hida Y et al. Tumor endo-
542 thelial cells express high pentraxin 3 levels. *Pathol Int* 2016; 66: 687-694.

- 543 54. Aguilera-Aguirre L, Bacsı A, Radak Z, Hazra TK, Mitra S, Sur S et al. Innate inflam-
544 mation induced by the 8-oxoguanine DNA glycosylase-1-KRAS-NF-kappaB pathway. *J*
545 *Immunol* 2014; 193: 4643-4653.
- 546 55. Ba X, Bacsı A, Luo J, Aguilera-Aguirre L, Zeng X, Radak Z et al. 8-oxoguanine DNA
547 glycosylase-1 augments proinflammatory gene expression by facilitating the recruitment
548 of site-specific transcription factors. *J Immunol* 2014; 192: 2384-2394.
- 549 56. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and
550 cancer. *Mol Cancer* 2013; 12: 86.
- 551 57. Ding L, Chen X, Xu X, Qian Y, Liang G, Yao F et al. PARP1 Suppresses the Tran-
552 scription of PD-L1 by Poly(ADP-Ribosyl)ating STAT3. *Cancer Immunol Res* 2019; 7: 136-
553 149.
- 554 58. Jiao S, Xia W, Yamaguchi H, Wei Y, Chen MK, Hsu JM et al. PARP Inhibitor Upreg-
555 ulates PD-L1 Expression and Enhances Cancer-Associated Immunosuppression. *Clin*
556 *Cancer Res* 2017; 23: 3711-3720.
- 557 59. Ferrand N, Fert A, Morichon R, Radosevic-Robin N, Zaoui M, Sabbah M.
558 WISP2/CCN5 Suppresses Vasculogenic Mimicry through Inhibition of YAP/TAZ Signal-
559 ing in Breast Cancer Cells. *Cancers (Basel)* 2022; 14.
- 560 60. Wang S, Zhou L, Ling L, Meng X, Chu F, Zhang S et al. The Crosstalk Between
561 Hippo-YAP Pathway and Innate Immunity. *Front Immunol* 2020; 11: 323.
- 562 61. Carpentier G, Berndt S, Ferratge S, Rasband W, Cuendet M, Uzan G et al. Angio-
563 genesis Analyzer for ImageJ - A comparative morphometric analysis of "Endothelial
564 Tube Formation Assay" and "Fibrin Bead Assay". *Sci Rep* 2020; 10: 11568.
- 565 62. Ferrand N, Gnanapragasam A, Dorothee G, Redeuilh G, Larsen AK, Sabbah M.
566 Loss of WISP2/CCN5 in estrogen-dependent MCF7 human breast cancer cells promotes a
567 stem-like cell phenotype. *PLoS One* 2014; 9: e87878.

III. Supplementary data :



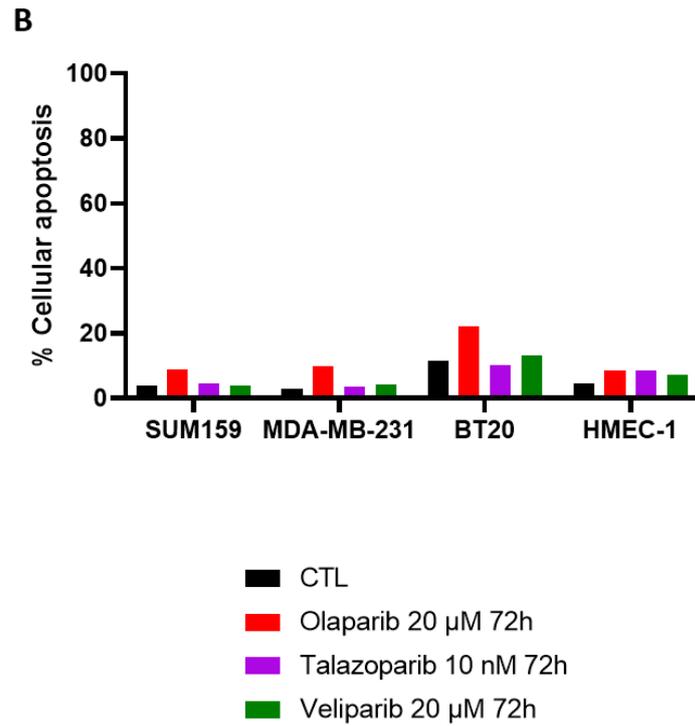


Figure S1. Effect of PARP inhibitors on SUM159, MDA-MB-231, BT20 and HMEC-1. A. Cells were treated for 72h with Olaparib, Talazoparib and Veliparib. They were stained with a combination of annexin V and 7-AAD and analyzed by flow cytometry. Cells positive for annexin V staining were counted as apoptotic cells. **B.** The bar graph showed quantification of apoptosis, comparing the number of cells which are Annexin V (+)/7-AAD (-) or Annexine V (+)/7-AAD (+).

RESULTATS COMPLEMENTAIRES

I. Objectifs

Avec la mise en place de l'angiogenèse et du mimétisme vasculaire, les cellules tumorales développent des stratégies pour proliférer rapidement et métastaser. Le système immunitaire interagit avec les tumeurs tout au long de ce processus [380]. Les cellules cancéreuses mettent en place des mécanismes d'échappement au système immunitaire grâce entre autres à l'expression du ligand PD-L1 (programmed cell death ligand 1). C'est un ligand qui, quand lié à son récepteur PD-1, limite les fonctions cytotoxiques des lymphocytes T effecteurs [381]. Les inhibiteurs des checkpoints immunitaires sont les seules immunothérapies approuvées actuellement dans le cancer du sein, et l'expression tumorale de PD-L1 ainsi que le statut des microsatellites sont les biomarqueurs principaux de ces traitements [382]. Des anti-PD-1/PD-L1 sont approuvés en monothérapie et en combinaison avec d'autres thérapies comme des chimiothérapies, avec des résultats encourageant dans le traitement des cancers du sein métastatique [383].

Il a été suggéré que PD-L1 pouvait avoir un lien avec l'angiogenèse. Une étude de 2017 a mis en avant l'existence d'une corrélation entre l'expression de VEGF et PD-L1 dans le gliome [384]. Le VEGF est connu pour avoir un effet suppresseur de l'immunité dans le microenvironnement tumoral, et altérer l'efficacité des immunothérapies ce qui a entraîné le développement de thérapies combinant anti-VEGF et anti-PD-L1 [385]. De plus, PD-L1 semblerait avoir un rôle direct avec l'angiogenèse dans le cancer de l'ovaire. Une étude a montré que PD-L1 était capable d'induire l'angiogenèse et de promouvoir la migration *in vitro* et *in vivo* des cellules tumorales ovariennes. Cela serait dû à une interaction directe entre PD-L1 et VEGFR2, qui induit l'activation de la voie FAK/AKT, induisant l'angiogenèse [386].

En se basant sur ces données, nous avons voulu déterminer dans un premier temps s'il existait un lien entre l'expression de **PD-L1** et la **capacité des cellules à former du mimétisme vasculaire**.

Dans un second temps, étant donné les résultats prometteurs de plusieurs essais cliniques combinant les inhibiteurs de PARP avec des immunothérapies anti-PD-L1, nous nous sommes intéressés à l'**impact des PARPi sur PD-L1** et ses conséquences sur le mimétisme vasculaire.

II. Résultats

II.1. Analyse de l'expression de PD-L1 sur un large panel de lignées cellulaires tumorales mammaires

L'expression de PD-L1 a été mesurée par cytométrie en flux dans plusieurs lignées cellulaires tumorales mammaires et dans la lignée endothéliale HMEC-1 (**Figure 29**).

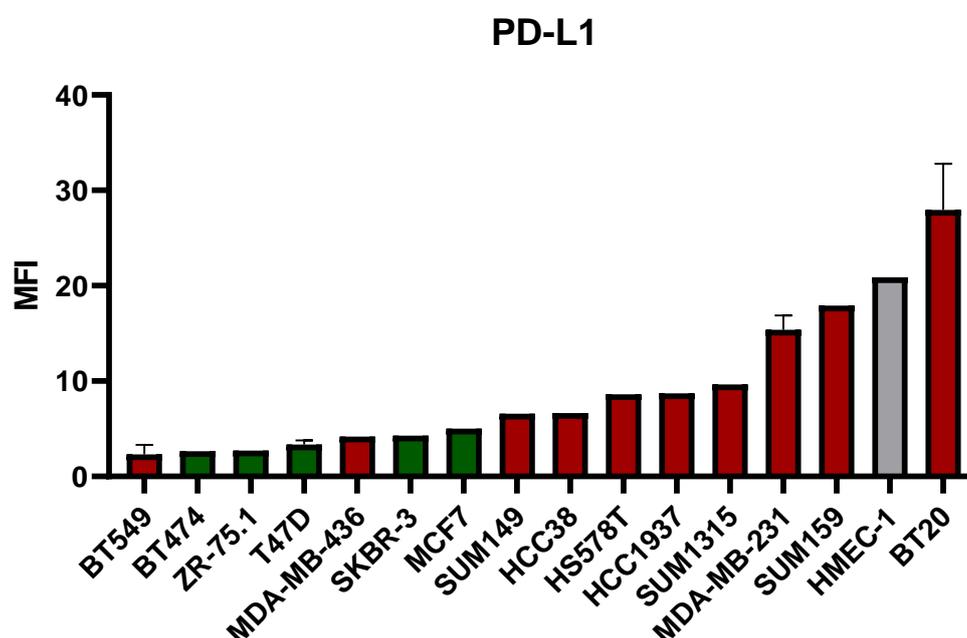


Figure 29: Expression de PD-L1 dans un panel de lignées tumorales mammaires et dans la lignée endothéliale HMEC-1. Les cellules ont été marquées avec un anticorps anti-CD274 (PD-L1) APC et l'expression de PD-L1 a été mesurée par cytométrie de flux. Les lignées sont classées par expression, mesurée en moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) En **rouge** sont indiquées les lignées de sous-type basale, en **vert** les sous-types luminales et HER2.

Ainsi, la **Figure 29** montre des différences considérables d'expression de PD-L1 à la surface des cellules entre les différentes lignées. Les lignées luminales (T47D, BT474, MCF-7, ZR-75.1) présentent une expression faible de PD-L1. A l'inverse, les lignées plus agressives (comme les BT20, SUM159 et les MDA-MB-231) présentent une forte expression de PD-L1. A noter ici que la lignée endothéliale HMEC-1 exprime fortement cette protéine. Ces résultats

sont en accord avec d'autres études réalisées sur un nombre plus restreint de lignées cellulaires [387].

II.2. Corrélation entre l'expression de PD-L1 et le VM

L'expression de PD-L1 a été mise en relation avec la capacité de ces lignées à former du mimétisme vasculaire (**Figure 30**). Pour chaque lignée, l'expression de PD-L1 et le nombre de tubes formés sur matrigel ont été quantifiés.

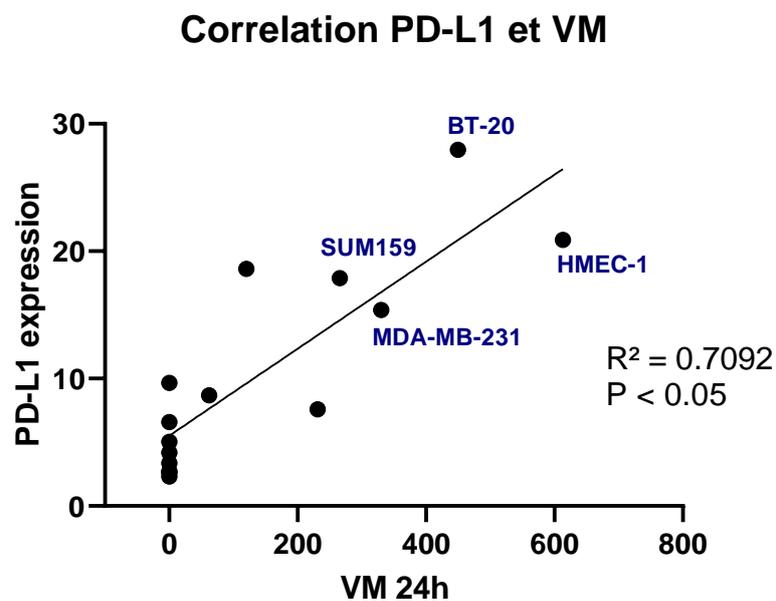


Figure 30: Corrélation entre PD-L1 et le VM. En abscisse, le nombre de réseaux formés par les lignées déposées sur du matrigel. En ordonnée, l'expression de PD-L1 en MFI en cytométrie de flux.

Il existe donc une corrélation entre l'expression de PD-L1 et la capacité à faire du mimétisme vasculaire dans les lignées cellulaires testées.

II.3. Effets des inhibiteurs de PARP et de NF- κ B sur l'expression de PD-L1

Nous avons décidé d'analyser les effets des PARPi sur trois lignées cellulaires qui montraient la plus forte corrélation entre l'expression de PD-L1 et VM. L'expression de PD-L1 dans les lignées SUM159, MDA-MB-231 et BT20 a été caractérisée par cytométrie en flux après 48h et 72h de traitement avec l'Olaparib, Talazoparib et Veliparib (**Figure 31**).

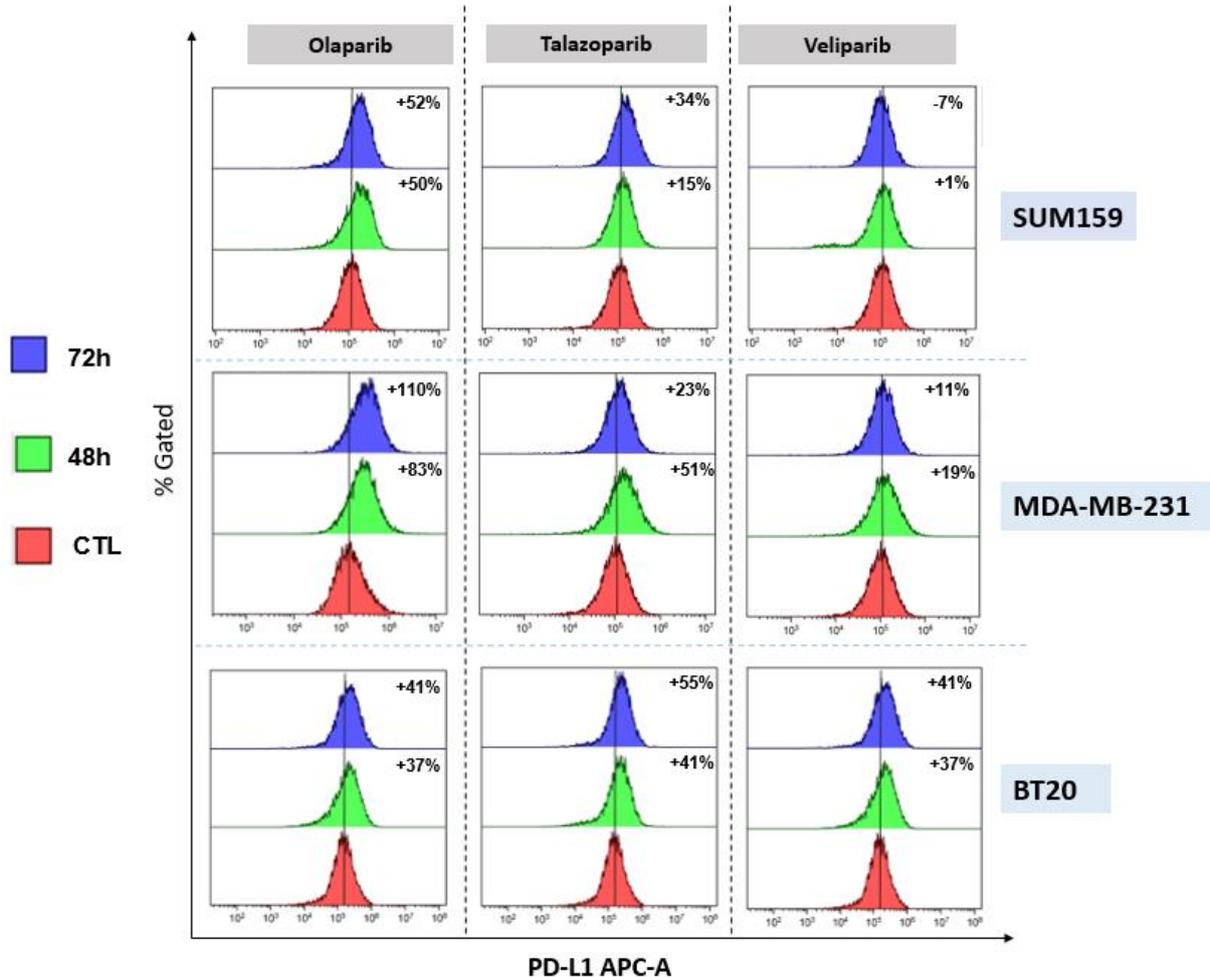


Figure 31: Effets des inhibiteurs de PARP1 sur PD-L1. Les cellules ont été traitées durant 48 et 72h avec l'Olaparib (20 μ M), le Talazoparib (10 nM) et le Veliparib (20 μ M). Elles ont ensuite été marquées avec un anticorps anti-CD274 (PD-L1) APC et l'expression de PD-L1 a été mesurée par cytométrie en flux. Le pourcentage fait référence à l'augmentation par rapport au contrôle de la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI).

Nous observons que l'Olaparib induit une augmentation de PD-L1 dépendante du temps de traitement dans les trois lignées cellulaires testées. Talazoparib induit lui aussi une

augmentation de l'expression de PD-L1, mais moins importante comparée au traitement Olaparib. Par contre, nous observons un effet du Veliparib uniquement sur la lignée BT20. L'ensemble de ces résultats suggèrent que les PARPi induisent une augmentation d'expression de PD-L1 mais de manière temps, lignée cellulaire et drogue dépendants.

Dans l'article présenté dans ce manuscrit, nous avons montré l'impact des inhibiteurs de PARP sur la voie de signalisation NF- κ B en lien avec le mimétisme vasculaire. Afin de comprendre par quels mécanismes les inhibiteurs de PARP induisent l'augmentation de PD-L1, des expériences préliminaires ont été réalisées afin de déterminer si la signalisation NF- κ B pouvait induire cette augmentation (**Figure 32**). Les cellules SUM159 ont donc été traitées en présence de l'inhibiteur de NF- κ B BAY11-7082 et l'expression protéique de PD-L1 a été analysée.

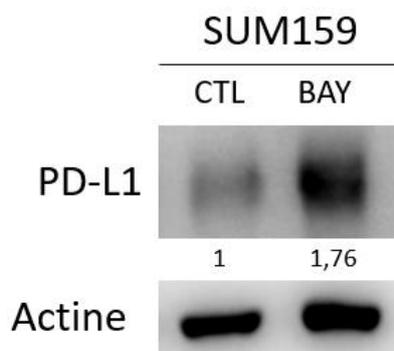


Figure 32: Effets de BAY11-7082 sur PD-L1. Les SUM159 ont été traitées durant 24h avec l'inhibiteur de NF- κ B BAY-11-7082 à 2.5 μ M. Les résultats de l'expression de la protéine PD-L1 ont été analysés en western blot, normalisé avec l'actine. Les ratios d'induction sont calculés par rapport au contrôle.

Nos résultats montrent une augmentation protéique de PD-L1 en présence de BAY11-7082. Une des explications possibles à l'augmentation de PD-L1 par les PARPi pourrait donc être l'inhibition de NF- κ B. D'autres études ont montré qu'une induction de PD-L1 par les PARPi nécessitait l'inactivation de la signalisation GSK3 β [362]. Aussi, une hypothèse avancée dans l'explication de cette augmentation résiderait dans l'activation du GMP-AMP synthase cyclique (cGAS) lié aux dommages à l'ADN induits par les PARPi. cGAS une fois activé peut catalyser la génération de dinucléotide cyclique et promouvoir la voie de signalisation STING, qui permettrait *in fine* l'augmentation de PD-L1 [388].

II.4. Impact de PD-L1 sur le mimétisme vasculaire

Afin de déterminer le rôle de PD-L1 dans le VM, nous avons invalidé son expression par des siARN dans la lignée cellulaire SUM159. Nous observons sur la **figure 33** une diminution de l'expression de PD-L1 en présence du siARN dirigé contre PD-L1 comparé à un siARN non spécifique.

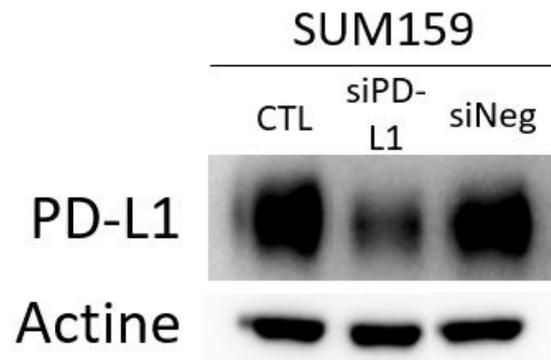


Figure 33: Inhibition de PD-L1 par transfection avec un siARN. Les SUM159 ont été transfectées avec un siARN ciblant PD-L1 et un siARN contrôle négatif nommé ici siNeg. Les résultats ont été analysés par Western Blot en normalisant avec l'actine.

Les effets fonctionnels de la perte de PD-L1 ont ensuite été étudiés par des expériences de formation de tubes sur matrigel (**Figure 34**). La transfection par le siARN contrôle induit une légère réduction du nombre de tubes formés par les cellules SUM159. Cette diminution reste cependant négligeable.

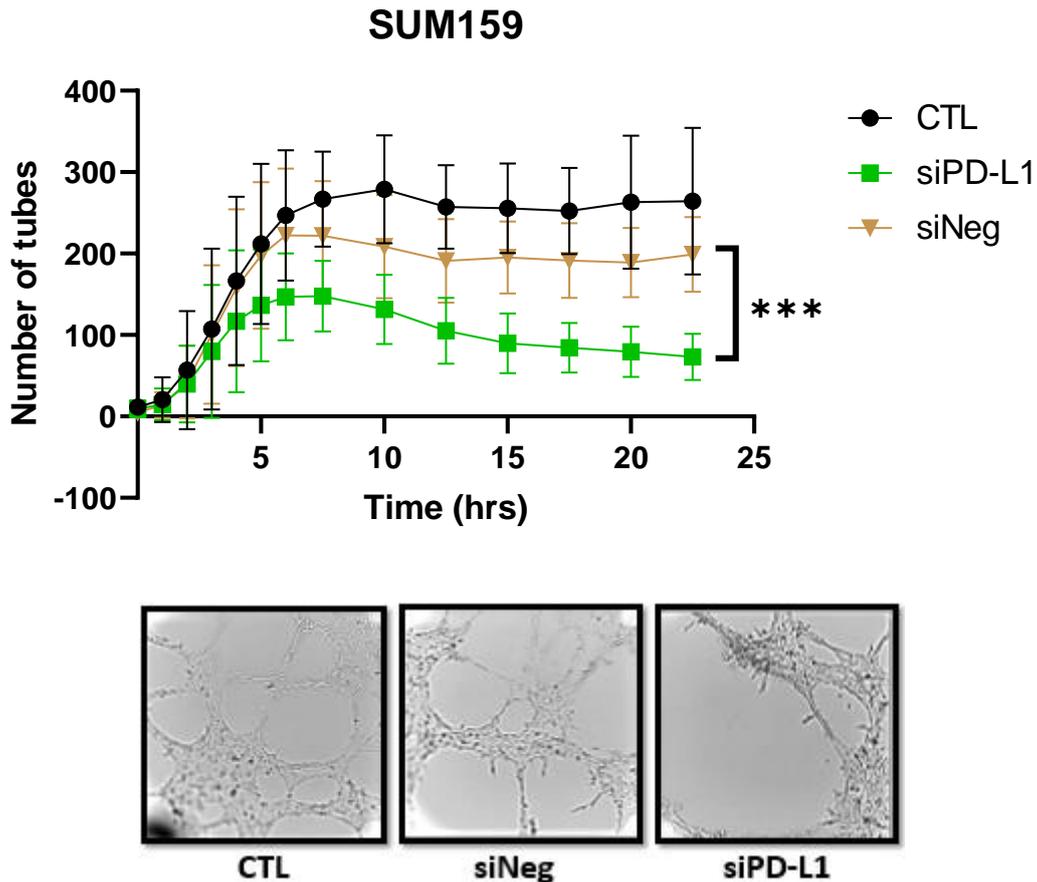


Figure 34: Effets de l'inactivation de PD-L1 sur le VM. Les cellules SUM159 ont été transfectées avec des siARN ciblant PD-L1 et un siNeg ne ciblant aucun élément utilisé en contrôle négatif. 24h après la transfection les cellules ont été déposées sur du matrigel et une expérience de formation de tube est réalisée. Les résultats sont analysés par vidéomicroscopie et représentent ici le nombre de tubes formés en fonction du temps en heures sur 24h. Une image prise à 20h, représentative de chaque condition, est affichée.

En revanche, le siPD-L1 induit une diminution significative et drastique du nombre de tubes formés et comptabilisés. Une fois PD-L1 diminué, les cellules ne sont plus en capacité de former des réseaux nombreux de mimétisme vasculaire. Cette expérience révèle une interaction entre l'expression de PD-L1 et le VM, ainsi que la nécessité de PD-L1 dans la capacité à former des réseaux de mimétisme vasculaire.

III. Conclusion

Ces résultats ont permis de confirmer que l'inhibition de PARP aboutit à une augmentation de l'expression de PD-L1. Nous avons pu également mettre en évidence que PD-L1 est régulé directement ou indirectement par la voie de signalisation NF- κ B, menant à l'hypothèse que les PARPi réguleraient PD-L1 en partie à travers la voie NF- κ B. Il serait intéressant d'étudier plus en détail la régulation de PD-L1 par cette voie de signalisation afin de voir si cette hypothèse se confirme. Une meilleure compréhension des mécanismes influençant l'expression de PD-L1 dans le cadre des thérapies PARPi est essentielle afin d'avoir une vision globale de ses régulations et de développer les combinaisons thérapeutiques les plus efficaces.

De plus, nous avons montré dans ce travail le rôle de PD-L1 dans la capacité de la lignée cellulaire SUM159 à former des réseaux de mimétisme vasculaire. Une corrélation a pu être observée entre le nombre de réseaux formés et la forte expression de PD-L1. En outre, l'inhibition transitoire de PD-L1 empêche la formation de réseaux de VM. C'est une information très intéressante qui permet d'élargir le champ d'action connu de PD-L1. La littérature montre déjà son lien avec l'angiogenèse, il semblerait également avoir un lien avec le mimétisme vasculaire et pourrait le réguler. Comprendre par la suite les mécanismes impliqués dans cette régulation serait bénéfique tant dans la compréhension de PD-L1 que dans la compréhension du mimétisme vasculaire, qui sont rappelons-le deux facteurs d'agressivité dans le cancer du sein.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'angiogenèse, comme décrit dans la deuxième partie de l'introduction, est un processus clé dans la progression tumorale et la dissémination métastatique. Depuis sa découverte, des thérapies anti-angiogéniques ont été développées avec plus ou moins de succès du fait de l'hétérogénéité des tumeurs et des résistances aux traitements. Un mécanisme plus récent a été décrit, nommé le mimétisme vasculaire (VM), qui comme son nom l'indique désigne la capacité de certaines cellules tumorales agressives à former d'elles-mêmes des réseaux mimant les réseaux vasculaires. Cette capacité est un facteur d'agressivité, et peut expliquer des mécanismes de résistance aux traitements anti-angiogéniques.

Dans l'éventail des thérapies disponibles et utilisées dans le cancer du sein en clinique s'ajoutent depuis quelques années les inhibiteurs de PARP. Ils ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques dans le cancer du sein, qui reste à ce jour la première cause de mortalité par cancer chez la femme. Leur toxicité a été constatée dans le cadre de cancers avec mutations *BRCA1* et 2, ou avec mutations de gènes impliqués dans la recombinaison homologue. Des études récentes ont montrées qu'ils pouvaient avoir un effet anti-angiogénique et altérer la fonction des cellules endothéliales. En revanche, leurs effets sur le mimétisme vasculaire dans le cancer du sein restent à ce jour peu étudiés.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons montré l'effet inhibiteur de plusieurs inhibiteurs de PARP sur le VM dans plusieurs lignées cellulaires tumorales mammaires. Nous avons également pu étudier de manière plus approfondie les mécanismes impliqués, et mis en avant le rôle de la voie de signalisation NF- κ B, menant à une diminution de la protéine PTX3. Nous avons utilisé des modèles *in vitro* qui nous ont permis d'obtenir des conclusions, qui doivent cependant être discutées à la lumière de la littérature en tenant compte des limites des modèles utilisés.

Les résultats présentés dans cette thèse ont été réalisés sur des **lignées cellulaires tumorales** mammaires. Le cancer du sein présente une grande hétérogénéité et, comme vu précédemment lors de la présentation des classifications, de nombreux sous-groupes existent. Ces sous-groupes évoluent et réagissent aux thérapies de manière différente. Afin d'être le plus représentatif dans cette étude, nous avons testé la capacité à faire du mimétisme vasculaire de 17 lignées cellulaires tumorales appartenant à différents sous-types moléculaires. Plusieurs études ont montré le lien existant dans les tumeurs mammaires entre les sous-types agressifs et les marqueurs du VM [389]. Nous retrouvons donc des résultats cohérents, puisque les 6 lignées que nous avons identifiées comme capables de former des réseaux de VM sont de sous-type

basal. Cependant, nos résultats montrent que toutes les lignées basales ne sont pas capables de former des réseaux de VM. La simple classification moléculaire ne permet pas de prédire si une lignée a cette capacité, suggérant que d'autres facteurs rentrent en jeu. Les mécanismes de régulation du VM, tels que l'expression de VE-cadhérine et le pourcentage de CSC qui sont différents parmi ces lignées, peuvent expliquer les différences de capacité à faire du mimétisme vasculaire. De plus, nous avons également montré que le statut BRCA n'est pas lié à la capacité à faire du VM. En effet, des lignées BRCA mutées BT549 et HCC1937 sont capables de former des réseaux, alors que les SUM1315 et SUM149 (BRCA muté également) n'ont pas cette capacité.

Pour la suite des expériences, nous avons sélectionné un **panel** de 4 lignées ; une lignée endothéliale HMEC-1, deux lignées basales B : SUM159 et MDA-MB-231 et une lignée basale A : BT20. Comme dans toute étude *in vitro* de culture cellulaire en 2D, une part importante de l'information peut être omise. Le microenvironnement tumoral, très important dans de nombreux mécanismes tumoraux, n'est pas présent. Les résultats obtenus avec ce modèle cellulaire ne reflètent donc pas nécessairement toute la diversité des mécanismes existants.

Pour étudier l'inhibition de PARP, nous nous sommes intéressés à **trois inhibiteurs**. Nous avons testé deux inhibiteurs ayant une autorisation de mise sur le marché, l'Olaparib et le Talazoparib, et nous avons également testé le Veliparib sur lequel des essais cliniques sont actuellement en cours. Ces inhibiteurs ne possèdent pas tous exactement les mêmes **mécanismes d'inhibition de PARP**. Pour rappel, les mécanismes ne reposent pas seulement sur l'inhibition catalytique de PARP. Il a été montré que les cellules exprimant PARP1 sont plus sensibles aux inhibiteurs de PARP combinés avec un agent alkylant que les cellules PARP1^{-/-}, indiquant que l'inhibition par les inhibiteurs de PARP possèdent une activité autre qu'un simple effet de déplétion de PARP [342], [390]. C'est sur cette base que l'hypothèse du *trapping* a été développée puis validée. Des études ont montré que le Talazoparib avait un grand potentiel de *trapping*. L'Olaparib possède également cette capacité, mais de manière plus réduite. En revanche le Veliparib diffère sur ce point, il ne fait que très peu de *trapping*.

Nos travaux ont montré **l'inhibition du réseau vasculaire** par ces trois inhibiteurs de PARP dans les MDA-MB-231, les BT20, les SUM159 et la lignée endothéliale HMEC-1. Si l'on regarde plus précisément ces effets, les inhibiteurs peuvent être classés en termes d'efficacité du plus efficace au moins efficace de la manière suivante : Olaparib, Veliparib et

Talazoparib. Les **différences d'efficacité** entre ces trois molécules ne peuvent donc être dues au mécanisme de *trapping*. En s'intéressant à la spécificité de ciblage par les différents PARPi, des études ont montré que le Talazoparib présente un meilleur ciblage de PARP1 que l'Olaparib et le Veliparib. Concernant l'inhibition de PARP2, le Veliparib est celui qui l'inhibe le plus spécifiquement [391]. Ainsi, cela ne semble pas influencer la réponse aux traitements concernant le mimétisme vasculaire. D'autres mécanismes d'action ou de régulation pourraient expliquer ces différences mais cela ne semble pas être une différence ni de *trapping* ni d'inhibition catalytique.

Les lignées utilisées ici ne présentent pas de mutations *BRCA1* ou *BRCA2*. Les MDA-MB-231 et les BT20, dans une étude s'intéressant au statut BRCAness, ne sont pas considérés comme ayant des mutations *BRCA-like* [392]. À ce jour, il existe peu d'études qui se sont intéressées aux mutations de la recombinaison homologue dans les SUM159. Il semblerait qu'il n'y ait pas de mutations connues *BRCA-like*. Par conséquent, les effets observés semblent **indépendants du statut mutationnel BRCA**.

À la suite de ces résultats, la sécrétion de protéines angiogéniques par les lignées SUM159 et HMEC a été étudiée. Les résultats de *l'angiogenesis proteome array* ont montré que plusieurs **protéines impliquées dans l'angiogenèse** sont inhibées après traitement à l'Olaparib. Parmi elles, PTX3, VEGF et IL-8 sont inhibées dans les cellules SUM159 mais pas dans la lignée endothéliale HMEC-1. Après confirmation par ELISA et ce avec les trois inhibiteurs de PARP, nous nous sommes intéressés à ces régulations d'un point de vue génomique et avons pu confirmer la diminution génique de *PTX3*, *VEGF* et *IL-8*. De façon intéressante, nous avons pu mettre en évidence une régulation par les PARPi de nombreux autres gènes impliqués dans l'angiogenèse tels que *uPA*, *Serpine-E1* et *TIMP-1*, qui avaient été retrouvés diminués également dans les HMEC sur les *angiogenesis proteome array*. Il a été montré que des taux élevés de PTX3 induisent l'invasion et l'angiogenèse dans le glioblastome, à travers un axe IL-8/VEGF dans le microenvironnement tumoral [393, p. 101]. Dans le cancer du sein, les augmentations d'IL8, de PTX3 et VEGF sont corrélés à des mauvais pronostics [394]–[396]. De plus, toujours dans le cancer du sein, *Serpine-E1* et *uPA* peuvent promouvoir la progression tumorale et la formation de métastases [397]. Il s'agit donc de marqueurs d'agressivité, dont l'expression est diminuée par les inhibiteurs de PARP.

De manière intéressante nous avons constaté que ces protéines sont toutes régulées par la voie de signalisation NF- κ B. Il a été montré dans les MDA-MB-231 que l'inhibition de

NF- κ B induit la diminution de VEGF [398]. Les régulations de PTX3, IL-8, Serpine-E1, uPA et TIMP-1 sont également soumises à la signalisation **NF- κ B** [399]. Cela nous a amenés à nous intéresser à cette voie. Plusieurs études ont mis en évidence le lien existant entre **PARP1 et NF- κ B**. Il a été montré que PARP-1 est requis dans l'expression génique des gènes dépendant de NF- κ B, agissant ainsi en tant que coactivateur transcriptionnel de cette voie de signalisation [400]. Dans notre étude nous avons montré que l'activité de NF- κ B était diminuée par le traitement Olaparib, et parallèlement que les cibles transcriptionnelles de ce dernier avaient une expression diminuée. Ces résultats sont en accord avec ce qui est connu du lien entre PARP1 et NF- κ B. De manière plus générale, les protéines impliquées dans la réparation de l'ADN peuvent promouvoir la transcription de NF- κ B. Il a ainsi été montré que la 8-oxoguanine glycosylase (OGG1), impliquée dans la réparation par excision de base (BER), peut faciliter l'activité transcriptionnelle de ce NF- κ B. Similairement à ce que nous observons avec les PARPi, son inhibition induit l'inhibition de l'activité de NF- κ B [401].

Afin d'explorer le rôle de **NF- κ B dans l'inhibition du mimétisme vasculaire**, un traitement par BAY 11-7082 (un inhibiteur spécifique de NF- κ B) a été réalisé. Il a été possible d'observer qu'il induit une inhibition du VM similaire à celle constatée par l'Olaparib, démontrant son rôle dans le VM. À ce jour, les connaissances sur le rôle de NF- κ B dans le mimétisme vasculaire restent parcellaires, mais les études tendent à montrer qu'il peut le promouvoir. En effet, il pourrait promouvoir la transition d'un phénotype épithéliale vers un phénotype endothéliale, ce qu'on appelle l'EET [402]. À travers nos résultats, nous montrons que cette signalisation est un élément essentiel de la mise en place de ce processus.

Il a été montré que la protéine **PTX3** joue un rôle important dans la transition épithélio-mésenchymateuse et l'angiogenèse. De plus, cette protéine est régulée négativement par les PARPi, et par NF- κ B comme nous l'avons montré. Nous avons par conséquent voulu déterminer son implication dans l'inhibition du mimétisme vasculaire. Sa réintroduction après traitements à l'Olaparib permet **d'annuler les effets** délétères observés sur **le VM**. Ainsi, nous avons montré son implication directe dans la capacité à former des réseaux de VM.

Il est intéressant de noter que **PTX3 pourrait également réguler NF- κ B**. En effet, il a été montré dans le mélanome que la production de PTX3 par les cellules tumorales peut activer la voie de signalisation NF- κ B pour promouvoir la migration et l'invasion [403]. Il serait intéressant pour compléter notre étude et afin de mieux caractériser ces interactions de regarder si l'inhibition temporaire par siARN de PTX3 induit également une diminution du VM et une

altération de la voie NF- κ B. Aussi, nous avons montré que la supplémentation de PTX3 après le traitement par l'Olaparib permet de reformer des réseaux de mimétisme vasculaire. Pour compléter ces résultats, il serait intéressant de traiter les cellules tumorales mammaires avec l'inhibiteur de NF- κ B, afin d'empêcher la formation de réseau, et de réintroduire PTX3 avec une protéine recombinante afin de déterminer si elle est capable de rétablir cette capacité.

Plusieurs études se sont intéressées à **NF- κ B en lien avec les inhibiteurs de PARP**. Dans l'une d'entre elles, des cellules tumorales mammaires résistantes aux PARPi ont été générées. Il a été montré dans ces lignées une augmentation de la voie de signalisation NF- κ B. Aussi, ces cellules devenues résistantes étaient devenues sensibles à l'inhibiteur (BAY 11-7082) de NF- κ B, comparées aux cellules parentales. L'acquisition de **résistance** par l'augmentation de NF- κ B a déjà été montrée dans le cadre d'autres traitements anti-tumoraux. Il serait pertinent de comparer l'activité de NF- κ B basale de nos différentes lignées cellulaires avec les effets observés sur le VM, mais également sur l'apoptose en lien avec les PARPi. Dans une autre étude, l'activité constitutive de NF- κ B a été mesurée parmi 35 lignées tumorales mammaires. Il y est possible de voir que les cellules BT-20 et MDA-MB-231 sont parmi les lignées ayant la plus forte activité basale NF- κ B [404]. Cette étude n'incluait pas les cellules SUM159. À noter également que les lignées capables de faire du mimétisme vasculaire semblent toutes, si l'on s'en réfère à cette publication, avoir une forte activité NF- κ B. Nous pourrions nous demander quel serait l'effet d'une augmentation induite de NF- κ B dans une lignée avec un taux basal faible et qui n'a pas la capacité de faire du VM. Ainsi, si une lignée luminaire ou basal qui ne fait pas de VM peut gagner cette capacité à travers l'augmentation de la voie NF- κ B, cela permettrait d'établir de manière certaine son implication dans ce processus. Mieux connaître les rouages biologiques de ce mécanisme permet à terme de mieux le cibler.

Le mimétisme vasculaire est un procédé nécessitant de la **prolifération, de la migration et de l'invasion**. Ce ne sont pas des aspects auxquels nous nous sommes intéressés en regard des inhibiteurs de PARP. Il est connu cependant que les PARPi exercent des activités anti-tumorales à travers l'induction de l'apoptose, mais également en exerçant des effets antiprolifératifs, en diminuant l'invasion et la migration. Ainsi, plusieurs études ont démontrées qu'ils réduisent la prolifération *in vitro* de lignées tumorales mammaires [405]. Dans le carcinome hépatocellulaire, l'inhibition de PARP aboutit aussi à une diminution de la prolifération et de la migration des cellules tumorales [406]. Une diminution de la prolifération, de l'invasion et de la migration par les inhibiteurs de PARP semble assez logiquement pouvoir

inhiber la formation de réseaux de mimétisme vasculaire dans les lignées tumorales mammaires.

Il serait par la suite intéressant d'étudier les effets des **inhibiteurs de PARP sur le VM *in vivo***. Le modèle murin est un modèle qui permet de tester l'efficacité de traitements anti-angiogéniques. Dans des études explorant le mimétisme vasculaire, le modèle murin peut également être utilisé grâce aux xénogreffes de tumeurs. Les structures de VM sont alors marquées avec le marquage CD31+/PAS+, qui permet de différencier le VM des réseaux endothéliaux issus de l'angiogenèse. L'efficacité des inhibiteurs de PARP sur l'angiogenèse et la formation de réseaux de VM a déjà été étudiée chez la souris dans une étude en 2013 dans des xénogreffes de mélanome [407]. En revanche cela n'a pas été étudié dans le cancer du sein. Au vu des résultats encourageant de nos modèles cellulaires, il serait intéressant d'étudier l'efficacité de l'Olaparib, du Talazoparib et de Veliparib sur le VM des tumeurs mammaires chez la souris. De plus, cela nous permettrait d'étudier si les métastases présentent également des réseaux susceptibles d'être abolis par les PARPi. Cette étude *in vivo* permettrait d'étudier la fonctionnalité des réseaux formés, afin de déterminer s'ils sont opérationnels avant et après traitements (en marquant les cellules sanguines circulantes dans ces réseaux). Pour aller plus loin, la voie de signalisation NF-κB pourrait être étudiée via des marquages spécifiques afin de voir si elle est modifiée *in vivo* par les PARPi, en corrélation avec l'inhibition de VM.

Le modèle murin présentant également ses limites en terme de reproductibilité chez l'homme, étudier les effets des PARPi sur le VM dans **des biopsies issues de tumeurs mammaires** pourrait être pertinent. Des essais cliniques existent cherchant à étudier la combinaison des inhibiteurs de PARP à des thérapies anti-angiogéniques, dont le Bevacizumab. Ils ont donné lieu à des autorisations de combinaison de l'Olaparib et du Bevacizumab en thérapie de maintien dans le cancer de l'ovaire. Réaliser des marquages CD31/PAS dans des biopsies de tumeurs mammaires agressives avant et après traitement aux inhibiteurs de PARP permettrait de voir l'impact réel de ces inhibiteurs sur le VM. Il serait également possible de réaliser des marquages permettant de déterminer la modulation de NF-κB. Valider nos résultats dans les échantillons de tumeurs mammaires permettrait de valider l'effets des PARPi sur le VM.

Il a été proposé que la meilleure stratégie pour inhiber la formation de vaisseaux dans les tumeurs serait de cibler simultanément l'angiogenèse et le mimétisme vasculaire. L'utilisation de molécules pouvant induire une inhibition de VM serait donc très intéressante

d'un point de vue **thérapeutique**. Actuellement, plusieurs molécules ont été identifiées comme pouvant inhiber le VM. La brucine, une herbe traditionnelle, est décrite comme supprimant le VM à travers l'inhibition de EphA2/MMP2/MMP9 dans la lignée MDA-MB-231 [408]. Il a été décrit dans cette même lignée que l'isoxanthohumol permet également d'inhiber la formation de réseaux de VM à travers l'inhibition de l'IFN- γ , l'IL-4 et d'IL-6 [409]. Il a été montré dans le mélanome que le Thalidomide réduit les réseaux de VM, et une étude a mis en avant le potentiel rôle de la signalisation NF- κ B dans l'inhibition de réseaux par ce traitement [258], ce qui fait écho à nos résultats. Dans la lignée de ces papiers, les travaux que nous présentons permettent d'apporter un nouvel inhibiteur du mimétisme vasculaire dans le cancer du sein. Nos données renforcent l'intérêt thérapeutique d'une combinaison alliant inhibiteurs de PARP et thérapies anti-angiogéniques, en montrant un nouveau bénéfice qui serait de cibler l'angiogenèse et le mimétisme vasculaire.

En conclusion, les résultats obtenus au cours de ma thèse ont permis d'élargir la compréhension des inhibiteurs de PARP et du mimétisme vasculaire. En effet, notre approche a permis de montrer les **effets inhibiteurs des PARPi sur le VM**, et le **rôle clé de la signalisation NF- κ B et de la protéine PTX3** dans ce processus. Nos données permettent d'approfondir la compréhension mécanistique de la formation de VM par les cellules tumorales mammaires. Le mimétisme vasculaire étant un facteur d'agressivité mais également un mécanisme de résistance aux thérapies anti-angiogénique, il représente une **cible thérapeutique intéressante**. Notre étude suggère que le ciblage d'un axe NF- κ B-PTX3 par les PARPi pourrait être une nouvelle approche thérapeutique pour le cancer du sein triple négatif. Une meilleure compréhension du VM et des effets des PARPi sur ce dernier pourrait à terme conduire à l'optimisation des approches thérapeutiques pour cibler les tumeurs agressives mammaires.

REFERENCES

- [1] « Anatomie de la glande mammaire », p. 21.
- [2] « Les seins - Société canadienne du cancer », www.cancer.ca. <https://www.cancer.ca:443/fr-ca/cancer-information/cancer-type/breast/breast-cancer/the-breasts/?region=on> (consulté le 20 mars 2020).
- [3] M. D. Sternlicht, H. Kouros-Mehr, P. Lu, et Z. Werb, « Hormonal and local control of mammary branching morphogenesis », *Differentiation*, vol. 74, n° 7, p. 365-381, sept. 2006, doi: 10.1111/j.1432-0436.2006.00105.x.
- [4] « Cancer du sein », *Ligue contre le cancer*. /article/26094_cancer-du-sein (consulté le 3 septembre 2019).
- [5] T. I. A. for R. on Cancer (IARC), « Global Cancer Observatory ». <https://gco.iarc.fr/> (consulté le 26 juillet 2022).
- [6] M. Akram, M. Iqbal, M. Daniyal, et A. U. Khan, « Awareness and current knowledge of breast cancer », *Biol. Res.*, vol. 50, n° 1, p. 33, oct. 2017, doi: 10.1186/s40659-017-0140-9.
- [7] A. Buzyn, « Les apports des Plans cancer à la cancérologie », *Oncologie*, vol. 16, n° S1, p. 4-6, sept. 2014, doi: 10.1007/s10269-014-2438-3.
- [8] R. G. do Nascimento et K. M. Otoni, « Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know? », *Mastology*, vol. 30, p. e20200024, 2020, doi: 10.29289/25945394202020200024.
- [9] C. W. Elston et I. O. Ellis, « 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*, vol. 19, n° 5, p. 403-410, nov. 1991, doi: 10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x.
- [10] « Item 309 (ex item 159) – Tumeurs du sein », p. 11.
- [11] E. A. Rakha *et al.*, « Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade », *Breast Cancer Res*, vol. 12, n° 4, p. 207, 2010, doi: 10.1186/bcr2607.
- [12] C. M. Perou *et al.*, « Molecular portraits of human breast tumours », *Nature*, vol. 406, n° 6797, p. 747-752, août 2000, doi: 10.1038/35021093.
- [13] D. Netanel, A. Avraham, A. Ben-Baruch, E. Evron, et R. Shamir, « Expression and methylation patterns partition luminal-A breast tumors into distinct prognostic subgroups », *Breast Cancer Research*, vol. 18, n° 1, p. 74, juill. 2016, doi: 10.1186/s13058-016-0724-2.

- [14] P. Poudel, G. Nyamundanda, Y. Patil, M. C. U. Cheang, et A. Sadanandam, « Heterocellular gene signatures reveal luminal-A breast cancer heterogeneity and differential therapeutic responses », *npj Breast Cancer*, vol. 5, n° 1, Art. n° 1, août 2019, doi: 10.1038/s41523-019-0116-8.
- [15] B. D. Lehmann *et al.*, « Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection », *PLoS One*, vol. 11, n° 6, p. e0157368, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0157368.
- [16] B. D. Lehmann *et al.*, « Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies », *J Clin Invest*, vol. 121, n° 7, p. 2750-2767, juill. 2011, doi: 10.1172/JCI45014.
- [17] « TNM staging for breast cancer | Breast cancer | Cancer Research UK ». <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/stages-types-grades/tnm-staging> (consulté le 17 mars 2022).
- [18] M. Lacroix-Triki et F. Penault-Llorca, « Classification TNM pour le cancer du sein (8e édition) », p. 3, 2017.
- [19] Y.-S. Sun *et al.*, « Risk Factors and Preventions of Breast Cancer », *Int J Biol Sci*, vol. 13, n° 11, p. 1387-1397, nov. 2017, doi: 10.7150/ijbs.21635.
- [20] « Cancer du sein », *Ligue contre le cancer*. /article/26094_cancer-du-sein (consulté le 4 septembre 2019).
- [21] M. Kamińska, T. Ciszewski, K. Łopacka-Szatan, P. Miotła, et E. Starosławska, « Breast cancer risk factors », *Prz Menopauzalny*, vol. 14, n° 3, p. 196-202, sept. 2015, doi: 10.5114/pm.2015.54346.
- [22] L. A. Brinton, C. Schairer, R. N. Hoover, et J. F. Fraumeni, « Menstrual Factors and Risk of Breast Cancer », *Cancer Investigation*, vol. 6, n° 3, p. 245-254, janv. 1988, doi: 10.3109/07357908809080645.
- [23] J. Cuzick *et al.*, « Selective oestrogen receptor modulators in prevention of breast cancer: an updated meta-analysis of individual participant data », *The Lancet*, vol. 381, n° 9880, p. 1827-1834, mai 2013, doi: 10.1016/S0140-6736(13)60140-3.
- [24] B. Lesieur *et al.*, « Risque de cancer du sein lié à la grossesse », /data/revues/03682315/00370001/07004231/, mai 2008, Consulté le: 27 mars 2020. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/en/article/162373>
- [25] « Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50 302 women with breast cancer and 96 973 women without the disease », *The Lancet*, vol. 360, n° 9328, p. 187-195, juill. 2002, doi: 10.1016/S0140-6736(02)09454-0.
- [26] A. Husby, J. Wohlfahrt, N. Øyen, et M. Melbye, « Pregnancy duration and breast cancer risk », *Nat Commun*, vol. 9, oct. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-06748-3.

- [27] « Antécédents familiaux - Facteurs de risque ». <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Facteurs-de-risque/Antecedents-familiaux> (consulté le 16 avril 2021).
- [28] G. A. Colditz, « Epidemiology of breast cancer: Findings from the nurses' health study », *Cancer*, vol. 71, n° S4, p. 1480-1489, 1993, doi: 10.1002/cncr.2820710413.
- [29] R. Dent *et al.*, « Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence », *Clin Cancer Res*, vol. 13, n° 15, p. 4429-4434, août 2007, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-3045.
- [30] T. Saphner, D. C. Tormey, et R. Gray, « Annual hazard rates of recurrence for breast cancer after primary therapy. », *JCO*, vol. 14, n° 10, p. 2738-2746, oct. 1996, doi: 10.1200/JCO.1996.14.10.2738.
- [31] Y. Zhu *et al.*, « BRCA mutations and survival in breast cancer: an updated systematic review and meta-analysis », *Oncotarget*, vol. 7, n° 43, p. 70113-70127, sept. 2016, doi: 10.18632/oncotarget.12158.
- [32] S. Mazoyer *et al.*, « Linkage analysis of 19 French breast cancer families, with five chromosome 17q markers. », *Am J Hum Genet*, vol. 52, n° 4, p. 754-760, avr. 1993.
- [33] I. Hedenfalk *et al.*, « Gene-Expression Profiles in Hereditary Breast Cancer », *New England Journal of Medicine*, vol. 344, n° 8, p. 539-548, févr. 2001, doi: 10.1056/NEJM200102223440801.
- [34] P. L. Welch, K. N. Owens, et M.-C. King, « Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2 », *Trends in Genetics*, vol. 16, n° 2, p. 69-74, févr. 2000, doi: 10.1016/S0168-9525(99)01930-7.
- [35] M. Tirkkonen *et al.*, « Distinct Somatic Genetic Changes Associated with Tumor Progression in Carriers of BRCA1 and BRCA2 Germ-line Mutations », *Cancer Res*, vol. 57, n° 7, p. 1222-1227, avr. 1997.
- [36] V. G. Vogel, « Epidemiology of Breast Cancer », in *The Breast*, Elsevier, 2018, p. 207-218.e4. doi: 10.1016/B978-0-323-35955-9.00015-5.
- [37] P. E. Freer, « Mammographic Breast Density: Impact on Breast Cancer Risk and Implications for Screening », *RadioGraphics*, vol. 35, n° 2, p. 302-315, mars 2015, doi: 10.1148/rg.352140106.
- [38] C. I. Lee, L. E. Chen, et J. G. Elmore, « Risk-Based Breast Cancer Screening: Implications of Breast Density », *Med Clin North Am*, vol. 101, n° 4, p. 725-741, juill. 2017, doi: 10.1016/j.mcna.2017.03.005.
- [39] J. Wolfe, « Breast patterns as an index of risk for developing breast cancer », *American Journal of Roentgenology*, vol. 126, n° 6, p. 1130-1137, juin 1976, doi: 10.2214/ajr.126.6.1130.

- [40] V. A. McCormack, « Breast Density and Parenchymal Patterns as Markers of Breast Cancer Risk: A Meta-analysis », *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, vol. 15, n° 6, p. 1159-1169, juin 2006, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-06-0034.
- [41] W. T. Yang *et al.*, « Decreased TGF β signaling and increased COX2 expression in high risk women with increased mammographic breast density », *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 119, n° 2, p. 305-314, janv. 2010, doi: 10.1007/s10549-009-0350-0.
- [42] SPF, « Baromètre santé 2016 Contraception ». /determinants-de-sante/sante-sexuelle/barometre-sante-2016-contraception (consulté le 21 avril 2021).
- [43] R. Bonfiglio et M. L. Di Pietro, « The impact of oral contraceptive use on breast cancer risk: State of the art and future perspectives in the era of 4P medicine », *Seminars in Cancer Biology*, janv. 2021, doi: 10.1016/j.semcancer.2020.10.008.
- [44] A. Gompel, « Hormones et cancers du sein », *La Presse Médicale*, vol. 48, n° 10, p. 1085-1091, oct. 2019, doi: 10.1016/j.lpm.2019.09.021.
- [45] L. S. Mørch, C. W. Skovlund, P. C. Hannaford, L. Iversen, S. Fielding, et Ø. Lidegaard, « Contemporary Hormonal Contraception and the Risk of Breast Cancer », <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1700732>, 6 décembre 2017. <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1700732> (consulté le 22 avril 2021).
- [46] R. T. Chlebowski *et al.*, « Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial », *JAMA*, vol. 289, n° 24, p. 3243-3253, juin 2003, doi: 10.1001/jama.289.24.3243.
- [47] M. K. Ostroot, K. Heslin, J. J. F. Kram, J. A. Tjoe, et B. Dorton, « Breast cancer recurrence risk after hormonal contraceptive use in survivors of reproductive age », *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, vol. 258, p. 174-178, mars 2021, doi: 10.1016/j.ejogrb.2020.12.035.
- [48] « Ménopause », *Inserm - La science pour la santé*. <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/menopause> (consulté le 21 avril 2021).
- [49] Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators, « Risks and Benefits of Estrogen Plus Progestin in Healthy Postmenopausal Women: Principal Results From the Women's Health Initiative Randomized Controlled Trial », *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, vol. 288, n° 3, p. 321-333, juill. 2002, doi: 10.1001/jama.288.3.321.
- [50] « Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study », *The Lancet*, vol. 362, n° 9382, p. 419-427, août 2003, doi: 10.1016/S0140-6736(03)14065-2.
- [51] « Obésité », *Inserm - La science pour la santé*. <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/obesite> (consulté le 22 avril 2021).

- [52] « Surpoids et obésité de l'adulte : prise en charge médicale de premier recours », *Haute Autorité de Santé*. https://www.has-sante.fr/jcms/c_964938/fr/surpoids-et-obesite-de-l-adulte-prise-en-charge-medicale-de-premier-recours (consulté le 22 avril 2021).
- [53] C. Kang, D. LeRoith, et E. J. Gallagher, « Diabetes, Obesity, and Breast Cancer », *Endocrinology*, vol. 159, n° 11, p. 3801-3812, sept. 2018, doi: 10.1210/en.2018-00574.
- [54] F. P. Turkoz *et al.*, « Association between common risk factors and molecular subtypes in breast cancer patients », *Breast*, vol. 22, n° 3, p. 344-350, juin 2013, doi: 10.1016/j.breast.2012.08.005.
- [55] M. M. Gaudet *et al.*, « Risk factors by molecular subtypes of breast cancer across a population-based study of women 56 years or younger », *Breast Cancer Res Treat*, vol. 130, n° 2, p. 587-597, nov. 2011, doi: 10.1007/s10549-011-1616-x.
- [56] H. K. Bronsveld *et al.*, « Diabetes and Breast Cancer Subtypes », *PLoS One*, vol. 12, n° 1, p. e0170084, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0170084.
- [57] A. Engin, « Obesity-associated Breast Cancer: Analysis of risk factors », in *Obesity and Lipotoxicity*, A. B. Engin et A. Engin, Éd. Cham: Springer International Publishing, 2017, p. 571-606. doi: 10.1007/978-3-319-48382-5_25.
- [58] M. Amieva et R. M. Peek, « Pathobiology of Helicobacter pylori-Induced Gastric Cancer », *Gastroenterology*, vol. 150, n° 1, p. 64-78, janv. 2016, doi: 10.1053/j.gastro.2015.09.004.
- [59] R. E. Ley, P. J. Turnbaugh, S. Klein, et J. I. Gordon, « Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity », *Nature*, vol. 444, n° 7122, p. 1022-1023, déc. 2006, doi: 10.1038/4441022a.
- [60] J. J. Goedert *et al.*, « Investigation of the association between the fecal microbiota and breast cancer in postmenopausal women: a population-based case-control pilot study », *J Natl Cancer Inst*, vol. 107, n° 8, août 2015, doi: 10.1093/jnci/djv147.
- [61] B. A. Helmk, M. A. W. Khan, A. Hermann, V. Gopalakrishnan, et J. A. Wargo, « The microbiome, cancer, and cancer therapy », *Nature Medicine*, vol. 25, n° 3, Art. n° 3, mars 2019, doi: 10.1038/s41591-019-0377-7.
- [62] J. J. Anderson *et al.*, « Red and processed meat consumption and breast cancer: UK Biobank cohort study and meta-analysis », *Eur J Cancer*, vol. 90, p. 73-82, févr. 2018, doi: 10.1016/j.ejca.2017.11.022.
- [63] A. Buja, M. Pierbon, L. Lago, G. Grotto, et V. Baldo, « Breast Cancer Primary Prevention and Diet: An Umbrella Review », *Int J Environ Res Public Health*, vol. 17, n° 13, p. 4731, juill. 2020, doi: 10.3390/ijerph17134731.
- [64] E. V. García, M. Sala-Serra, X. Contente-Garcia, G. Serral Cano, et R. Puigpinós-Riera, « The association between breast cancer and consumption of dairy products: a systematic review », *Nutr Hosp*, vol. 34, n° 3, p. 589-598, juill. 2020, doi: 10.20960/nh.02649.

- [65] C. H. Kroenke, M. L. Kwan, C. Sweeney, A. Castillo, et B. J. Caan, « High- and Low-Fat Dairy Intake, Recurrence, and Mortality After Breast Cancer Diagnosis », *J Natl Cancer Inst*, vol. 105, n° 9, p. 616-623, mai 2013, doi: 10.1093/jnci/djt027.
- [66] C. C. Douglas, S. A. Johnson, et B. H. Arjmandi, « Soy and its isoflavones: the truth behind the science in breast cancer », *Anticancer Agents Med Chem*, vol. 13, n° 8, p. 1178-1187, oct. 2013, doi: 10.2174/18715206113139990320.
- [67] H. K. Seitz, C. Pelucchi, V. Bagnardi, et C. La Vecchia, « Epidemiology and pathophysiology of alcohol and breast cancer: Update 2012 », *Alcohol Alcohol*, vol. 47, n° 3, p. 204-212, juin 2012, doi: 10.1093/alcalc/ags011.
- [68] J. L. Freudenheim, « Alcohol's Effects on Breast Cancer in Women », *Alcohol Res*, vol. 40, n° 2, p. 11, juin 2020, doi: 10.35946/arcr.v40.2.11.
- [69] A. Macacu, P. Autier, M. Boniol, et P. Boyle, « Active and passive smoking and risk of breast cancer: a meta-analysis », *Breast Cancer Res Treat*, vol. 154, n° 2, p. 213-224, nov. 2015, doi: 10.1007/s10549-015-3628-4.
- [70] M. E. Jones, M. J. Schoemaker, L. B. Wright, A. Ashworth, et A. J. Swerdlow, « Smoking and risk of breast cancer in the Generations Study cohort », *Breast Cancer Res*, vol. 19, n° 1, p. 118, nov. 2017, doi: 10.1186/s13058-017-0908-4.
- [71] P. Baade, « Geographical Variation in Breast Cancer Outcomes », *Int J Environ Res Public Health*, vol. 14, n° 5, p. 523, mai 2017, doi: 10.3390/ijerph14050523.
- [72] M. S. Dreyer, A. B. Nattinger, E. L. McGinley, et L. E. Pezzin, « SOCIOECONOMIC STATUS AND BREAST CANCER TREATMENT », *Breast Cancer Res Treat*, vol. 167, n° 1, p. 1-8, janv. 2018, doi: 10.1007/s10549-017-4490-3.
- [73] G. Kienle et H. Kiene, « From Reductionism to Holism: Systems-oriented Approaches in Cancer Research », *Glob Adv Health Med*, vol. 1, n° 5, p. 68-77, nov. 2012, doi: 10.7453/gahmj.2012.1.5.015.
- [74] A. Weston et C. C. Harris, « Multistage Carcinogenesis », *Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition*, 2003, Consulté le: 28 mars 2022. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13982/>
- [75] J. Russo et I. H. Russo, « THE ROLE OF ESTROGEN IN THE INITIATION OF BREAST CANCER », *J Steroid Biochem Mol Biol*, vol. 102, n° 1-5, p. 89-96, déc. 2006, doi: 10.1016/j.jsbmb.2006.09.004.
- [76] « Viruses that Can Lead to Cancer ». <https://www.cancer.org/cancer/cancer-causes/infectious-agents/infections-that-can-lead-to-cancer/viruses.html> (consulté le 29 mars 2022).
- [77] J. L. Bos, « ras oncogenes in human cancer: a review », *Cancer Res*, vol. 49, n° 17, p. 4682-4689, sept. 1989.

- [78] D. Thompson et D. Easton, « The genetic epidemiology of breast cancer genes », *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, vol. 9, n° 3, p. 221-236, juill. 2004, doi: 10.1023/B:JOMG.0000048770.90334.3b.
- [79] H. Takahashi, H. Ogata, R. Nishigaki, D. H. Broide, et M. Karin, « Tobacco Smoke Promotes Lung Tumorigenesis by Triggering IKK β - and JNK1-Dependent Inflammation », *Cancer Cell*, vol. 17, n° 1, p. 89-97, janv. 2010, doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.008.
- [80] D. Hanahan et R. A. Weinberg, « The Hallmarks of Cancer », *Cell*, vol. 100, n° 1, p. 57-70, janv. 2000, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
- [81] D. Hanahan et R. A. Weinberg, « Hallmarks of Cancer: The Next Generation », *Cell*, vol. 144, n° 5, p. 646-674, mars 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [82] « New Dimensions in Cancer Biology: Updated Hallmarks of Cancer Published », *American Association for Cancer Research (AACR)*, 21 janvier 2022. <https://www.aacr.org/blog/2022/01/21/new-dimensions-in-cancer-biology-updated-hallmarks-of-cancer-published/> (consulté le 29 mars 2022).
- [83] A. Dzutsev *et al.*, « Microbes and Cancer », *Annual Review of Immunology*, vol. 35, n° 1, p. 199-228, 2017, doi: 10.1146/annurev-immunol-051116-052133.
- [84] T. Brabletz, R. Kalluri, M. A. Nieto, et R. A. Weinberg, « EMT in cancer », *Nat Rev Cancer*, vol. 18, n° 2, p. 128-134, févr. 2018, doi: 10.1038/nrc.2017.118.
- [85] A. J. Trimboli *et al.*, « Direct Evidence for Epithelial-Mesenchymal Transitions in Breast Cancer », *Cancer Research*, vol. 68, n° 3, p. 937-945, févr. 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2148.
- [86] S. Imani, H. Hosseini-fard, J. Cheng, C. Wei, et J. Fu, « Prognostic Value of EMT-inducing Transcription Factors (EMT-TFs) in Metastatic Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis », *Sci Rep*, vol. 6, n° 1, Art. n° 1, juin 2016, doi: 10.1038/srep28587.
- [87] M. A. Tapia *et al.*, « Inhibition of the canonical IKK/NF kappa B pathway sensitizes human cancer cells to doxorubicin », *Cell Cycle*, vol. 6, n° 18, p. 2284-2292, sept. 2007, doi: 10.4161/cc.6.18.4721.
- [88] S. Elzamly *et al.*, « Epithelial-Mesenchymal Transition Markers in Breast Cancer and Pathological Response after Neoadjuvant Chemotherapy », *Breast Cancer (Auckl)*, vol. 12, p. 1178223418788074, août 2018, doi: 10.1177/1178223418788074.
- [89] M. H. Jang, H. J. Kim, E. J. Kim, Y. R. Chung, et S. Y. Park, « Expression of epithelial-mesenchymal transition-related markers in triple-negative breast cancer: ZEB1 as a potential biomarker for poor clinical outcome », *Hum Pathol*, vol. 46, n° 9, p. 1267-1274, sept. 2015, doi: 10.1016/j.humpath.2015.05.010.
- [90] C. L. Sommers *et al.*, « Loss of epithelial markers and acquisition of vimentin expression in adriamycin- and vinblastine-resistant human breast cancer cell lines », *Cancer Res*, vol. 52, n° 19, p. 5190-5197, oct. 1992.

- [91] A. Singh et J. Settleman, « EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer », *Oncogene*, vol. 29, n° 34, Art. n° 34, août 2010, doi: 10.1038/onc.2010.215.
- [92] J. Huang, H. Li, et G. Ren, « Epithelial-mesenchymal transition and drug resistance in breast cancer (Review) », *International Journal of Oncology*, vol. 47, n° 3, p. 840-848, sept. 2015, doi: 10.3892/ijo.2015.3084.
- [93] D. Nassar et C. Blanpain, « Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications », *Annu Rev Pathol*, vol. 11, p. 47-76, mai 2016, doi: 10.1146/annurev-pathol-012615-044438.
- [94] X. Zhang, K. Powell, et L. Li, « Breast Cancer Stem Cells: Biomarkers, Identification and Isolation Methods, Regulating Mechanisms, Cellular Origin, and Beyond », *Cancers (Basel)*, vol. 12, n° 12, p. 3765, déc. 2020, doi: 10.3390/cancers12123765.
- [95] M. Luo, M. Brooks, et M. S. Wicha, « Epithelial-mesenchymal plasticity of breast cancer stem cells: implications for metastasis and therapeutic resistance », *Curr Pharm Des*, vol. 21, n° 10, p. 1301-1310, 2015, doi: 10.2174/1381612821666141211120604.
- [96] M. L. De Angelis, F. Francescangeli, et A. Zeuner, « Breast Cancer Stem Cells as Drivers of Tumor Chemoresistance, Dormancy and Relapse: New Challenges and Therapeutic Opportunities », *Cancers*, vol. 11, n° 10, Art. n° 10, oct. 2019, doi: 10.3390/cancers11101569.
- [97] K. Song et M. Farzaneh, « Signaling pathways governing breast cancer stem cells behavior », *Stem Cell Research & Therapy*, vol. 12, n° 1, p. 245, avr. 2021, doi: 10.1186/s13287-021-02321-w.
- [98] A. Lorico et G. Rappa, « Phenotypic Heterogeneity of Breast Cancer Stem Cells », *Journal of Oncology*, vol. 2011, p. e135039, janv. 2011, doi: 10.1155/2011/135039.
- [99] G. J. Yoshida et H. Saya, « Therapeutic strategies targeting cancer stem cells », *Cancer Sci*, vol. 107, n° 1, p. 5-11, janv. 2016, doi: 10.1111/cas.12817.
- [100] A.-P. Morel, M. Lièvre, C. Thomas, G. Hinkal, S. Ansieau, et A. Puisieux, « Generation of Breast Cancer Stem Cells through Epithelial-Mesenchymal Transition », *PLoS One*, vol. 3, n° 8, p. e2888, août 2008, doi: 10.1371/journal.pone.0002888.
- [101] S. A. Mani *et al.*, « The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells », *Cell*, vol. 133, n° 4, p. 704-715, mai 2008, doi: 10.1016/j.cell.2008.03.027.
- [102] C. L. Chaffer et R. A. Weinberg, « A Perspective on Cancer Cell Metastasis », *Science*, vol. 331, n° 6024, p. 1559-1564, mars 2011, doi: 10.1126/science.1203543.
- [103] G. Doglioni, S. Parik, et S.-M. Fendt, « Interactions in the (Pre)metastatic Niche Support Metastasis Formation », *Frontiers in Oncology*, vol. 9, 2019, Consulté le: 1 avril 2022. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2019.00219>

- [104] H. Peinado *et al.*, « Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases », *Nat Rev Cancer*, vol. 17, n° 5, p. 302-317, mai 2017, doi: 10.1038/nrc.2017.6.
- [105] C. M. Ghajar *et al.*, « The perivascular niche regulates breast tumour dormancy », *Nat Cell Biol*, vol. 15, n° 7, Art. n° 7, juill. 2013, doi: 10.1038/ncb2767.
- [106] M.-T. Chen *et al.*, « Comparison of patterns and prognosis among distant metastatic breast cancer patients by age groups: a SEER population-based analysis », *Sci Rep*, vol. 7, n° 1, Art. n° 1, août 2017, doi: 10.1038/s41598-017-10166-8.
- [107] S. J. Turley, V. Cremasco, et J. L. Astarita, « Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment », *Nat Rev Immunol*, vol. 15, n° 11, p. 669-682, nov. 2015, doi: 10.1038/nri3902.
- [108] M. Oshi *et al.*, « M1 Macrophage and M1/M2 ratio defined by transcriptomic signatures resemble only part of their conventional clinical characteristics in breast cancer », *Sci Rep*, vol. 10, n° 1, Art. n° 1, oct. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-73624-w.
- [109] D. G. DeNardo et L. M. Coussens, « Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression », *Breast Cancer Res*, vol. 9, n° 4, p. 212, 2007, doi: 10.1186/bcr1746.
- [110] J. Liu, X. Geng, J. Hou, et G. Wu, « New insights into M1/M2 macrophages: key modulators in cancer progression », *Cancer Cell International*, vol. 21, n° 1, p. 389, juill. 2021, doi: 10.1186/s12935-021-02089-2.
- [111] W. H. Fridman, L. Zitvogel, C. Sautès-Fridman, et G. Kroemer, « The immune contexture in cancer prognosis and treatment », *Nat Rev Clin Oncol*, vol. 14, n° 12, p. 717-734, déc. 2017, doi: 10.1038/nrclinonc.2017.101.
- [112] Y. Ohue et H. Nishikawa, « Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? », *Cancer Sci*, vol. 110, n° 7, p. 2080-2089, juill. 2019, doi: 10.1111/cas.14069.
- [113] F. Petitprez *et al.*, « B cells are associated with survival and immunotherapy response in sarcoma », *Nature*, vol. 577, n° 7791, Art. n° 7791, janv. 2020, doi: 10.1038/s41586-019-1906-8.
- [114] A. Zingoni, C. Fionda, C. Borrelli, M. Cippitelli, A. Santoni, et A. Soriani, « Natural Killer Cell Response to Chemotherapy-Stressed Cancer Cells: Role in Tumor Immunosurveillance », *Front Immunol*, vol. 8, p. 1194, sept. 2017, doi: 10.3389/fimmu.2017.01194.
- [115] B. Wylie, C. Macri, J. D. Mintern, et J. Waithman, « Dendritic Cells and Cancer: From Biology to Therapeutic Intervention », *Cancers (Basel)*, vol. 11, n° 4, p. 521, avr. 2019, doi: 10.3390/cancers11040521.

- [116] S. Xiong, L. Dong, et L. Cheng, « Neutrophils in cancer carcinogenesis and metastasis », *Journal of Hematology & Oncology*, vol. 14, n° 1, p. 173, oct. 2021, doi: 10.1186/s13045-021-01187-y.
- [117] E. Sahai *et al.*, « A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts », *Nat Rev Cancer*, vol. 20, n° 3, Art. n° 3, mars 2020, doi: 10.1038/s41568-019-0238-1.
- [118] « Macrophage-secreted granulins supports pancreatic cancer metastasis by inducing liver fibrosis - PubMed ». <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27088855/?dopt=Abstract> (consulté le 23 juillet 2022).
- [119] R. Kalluri, « The biology and function of fibroblasts in cancer », *Nat Rev Cancer*, vol. 16, n° 9, p. 582-598, août 2016, doi: 10.1038/nrc.2016.73.
- [120] Y. Kojima *et al.*, « Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 107, n° 46, p. 20009-20014, nov. 2010, doi: 10.1073/pnas.1013805107.
- [121] B. C. Özdemiir *et al.*, « Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival », *Cancer Cell*, vol. 25, n° 6, p. 719-734, juin 2014, doi: 10.1016/j.ccr.2014.04.005.
- [122] T. R. Cox et J. T. Erler, « Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer », *Dis Model Mech*, vol. 4, n° 2, p. 165-178, mars 2011, doi: 10.1242/dmm.004077.
- [123] J. M. Chang *et al.*, « Stiffness of tumours measured by shear-wave elastography correlated with subtypes of breast cancer », *Eur Radiol*, vol. 23, n° 9, p. 2450-2458, sept. 2013, doi: 10.1007/s00330-013-2866-2.
- [124] F. Calvo *et al.*, « Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts », *Nat Cell Biol*, vol. 15, n° 6, p. 637-646, juin 2013, doi: 10.1038/ncb2756.
- [125] Y. Zhao *et al.*, « Extracellular Matrix: Emerging Roles and Potential Therapeutic Targets for Breast Cancer », *Frontiers in Oncology*, vol. 11, 2021, Consulté le: 23 juillet 2022. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2021.650453>
- [126] T. Hoshiba et M. Tanaka, « Decellularized matrices as in vitro models of extracellular matrix in tumor tissues at different malignant levels: Mechanism of 5-fluorouracil resistance in colorectal tumor cells », *Biochim Biophys Acta*, vol. 1863, n° 11, p. 2749-2757, nov. 2016, doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.08.009.
- [127] K. K. Brodaczewska *et al.*, « Metastatic renal cell carcinoma cells growing in 3D on poly-D-lysine or laminin present a stem-like phenotype and drug resistance », *Oncol Rep*, vol. 42, n° 5, p. 1878-1892, nov. 2019, doi: 10.3892/or.2019.7321.

- [128] T. Sethi *et al.*, « Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo », *Nat Med*, vol. 5, n° 6, p. 662-668, juin 1999, doi: 10.1038/9511.
- [129] N. Cordes, M. A. Blaese, L. Plasswilm, H. P. Rodemann, et D. Van Beuningen, « Fibronectin and laminin increase resistance to ionizing radiation and the cytotoxic drug Ukrain in human tumour and normal cells in vitro », *Int J Radiat Biol*, vol. 79, n° 9, p. 709-720, sept. 2003, doi: 10.1080/09553000310001610240.
- [130] Z. Guo *et al.*, « Fabrication of hydrogel with cell adhesive micropatterns for mimicking the oriented tumor-associated extracellular matrix », *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 6, n° 14, p. 10963-10968, juill. 2014, doi: 10.1021/am5023946.
- [131] B. Dirat *et al.*, « Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion », *Cancer Research*, vol. 71, n° 7, p. 2455-2465, 2011, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3323.
- [132] L. Delort *et al.*, « The Adipose Microenvironment Dysregulates the Mammary Myoepithelial Cells and Could Participate to the Progression of Breast Cancer », *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 8, 2021, Consulté le: 25 juillet 2022. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2020.571948>
- [133] S. Balaban *et al.*, « Adipocyte lipolysis links obesity to breast cancer growth: adipocyte-derived fatty acids drive breast cancer cell proliferation and migration », *Cancer Metab*, vol. 5, p. 1, 2017, doi: 10.1186/s40170-016-0163-7.
- [134] Q. Wu, B. Li, Z. Li, J. Li, S. Sun, et S. Sun, « Cancer-associated adipocytes: key players in breast cancer progression », *Journal of Hematology & Oncology*, vol. 12, n° 1, p. 95, sept. 2019, doi: 10.1186/s13045-019-0778-6.
- [135] M. Zaoui *et al.*, « Breast-Associated Adipocytes Secretome Induce Fatty Acid Uptake and Invasiveness in Breast Cancer Cells via CD36 Independently of Body Mass Index, Menopausal Status and Mammary Density », *Cancers*, vol. 11, déc. 2019, doi: 10.3390/cancers11122012.
- [136] J. J. Bernard et E. A. Wellberg, « The Tumor Promotional Role of Adipocytes in the Breast Cancer Microenvironment and Macroenvironment », *The American Journal of Pathology*, vol. 191, n° 8, p. 1342-1352, août 2021, doi: 10.1016/j.ajpath.2021.02.006.
- [137] S. Sadegh-Nejadi *et al.*, « Influence of plasma circulating exosomes obtained from obese women on tumorigenesis and tamoxifen resistance in MCF-7 cells », *IUBMB Life*, vol. 72, n° 9, p. 1930-1940, sept. 2020, doi: 10.1002/iub.2305.
- [138] J. Folkman, « Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications », *New England Journal of Medicine*, vol. 285, n° 21, p. 1182-1186, nov. 1971, doi: 10.1056/NEJM197111182852108.
- [139] H. F. Galley et N. R. Webster, « Physiology of the endothelium », *British Journal of Anaesthesia*, vol. 93, n° 1, p. 105-113, juill. 2004, doi: 10.1093/bja/aeh163.

- [140] K. Chen, R. N. Pittman, et A. S. Popel, « Nitric Oxide in the Vasculature: Where Does It Come From and Where Does It Go? A Quantitative Perspective », *Antioxid Redox Signal*, vol. 10, n° 7, p. 1185-1198, juill. 2008, doi: 10.1089/ars.2007.1959.
- [141] L. C. Goldie, M. K. Nix, et K. K. Hirschi, « Embryonic vasculogenesis and hematopoietic specification », *Organogenesis*, vol. 4, n° 4, p. 257-263, 2008.
- [142] W. Risau et I. Flamme, « Vasculogenesis », *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 11, n° 1, p. 73-91, nov. 1995, doi: 10.1146/annurev.cb.11.110195.000445.
- [143] C. J. Drake, A. LaRue, N. Ferrara, et C. D. Little, « VEGF regulates cell behavior during vasculogenesis », *Dev Biol*, vol. 224, n° 2, p. 178-188, août 2000, doi: 10.1006/dbio.2000.9744.
- [144] L. Pardanaud, D. Moyon, et A. Eichmann, « L'embryologie des vaisseaux. », *Med Sci (Paris)*, vol. 17, n° 5, p. 543, 2001, doi: 10.4267/10608/1966.
- [145] J. Chagraoui et G. Uzan, « Les progéniteurs endothéliaux circulants : réalités et promesses pour de nouvelles thérapies de l'angiogenèse », *Hématologie*, vol. 7, n° 1, p. 68-77, mars 2001.
- [146] T. H. Adair et J.-P. Montani, *Overview of Angiogenesis*. Morgan & Claypool Life Sciences, 2010. Consulté le: 17 mai 2022. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53238/>
- [147] H. Gerhardt, « VEGF and endothelial guidance in angiogenic sprouting », *Organogenesis*, vol. 4, n° 4, p. 241-246, oct. 2008, doi: 10.4161/org.4.4.7414.
- [148] J. H. Caduff, L. C. Fischer, et P. H. Burri, « Scanning electron microscope study of the developing microvasculature in the postnatal rat lung », *The Anatomical Record*, vol. 216, n° 2, p. 154-164, 1986, doi: 10.1002/ar.1092160207.
- [149] M. Shibuya, « Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis », *Genes Cancer*, vol. 2, n° 12, p. 1097-1105, déc. 2011, doi: 10.1177/1947601911423031.
- [150] A. Sawano, T. Takahashi, S. Yamaguchi, et M. Shibuya, « The phosphorylated 1169-tyrosine containing region of flt-1 kinase (VEGFR-1) is a major binding site for PLCgamma », *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 238, n° 2, p. 487-491, sept. 1997, doi: 10.1006/bbrc.1997.7327.
- [151] S. Nicolas, S. Abdellatif, M. A. Haddad, I. Fakhoury, et M. El-Sibai, « Hypoxia and EGF Stimulation Regulate VEGF Expression in Human Glioblastoma Multiforme (GBM) Cells by Differential Regulation of the PI3K/Rho-GTPase and MAPK Pathways », *Cells*, vol. 8, n° 11, p. 1397, nov. 2019, doi: 10.3390/cells8111397.
- [152] J. Sawada, F. Li, et M. Komatsu, « R-Ras Inhibits VEGF-Induced p38MAPK Activation and HSP27 Phosphorylation in Endothelial Cells », *JVR*, vol. 52, n° 5, p. 347-359, 2015, doi: 10.1159/000444526.

- [153] Y. Zhang, C. D. Kontos, B. H. Annex, et A. S. Popel, « Angiopoietin-Tie Signaling Pathway in Endothelial Cells: A Computational Model », *iScience*, vol. 20, p. 497-511, oct. 2019, doi: 10.1016/j.isci.2019.10.006.
- [154] L. Eklund et P. Saharinen, « Angiopoietin signaling in the vasculature », *Experimental Cell Research*, vol. 319, n° 9, p. 1271-1280, mai 2013, doi: 10.1016/j.yexcr.2013.03.011.
- [155] M. Presta, P. Dell’Era, S. Mitola, E. Moroni, R. Ronca, et M. Rusnati, « Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis », *Cytokine & Growth Factor Reviews*, vol. 16, n° 2, p. 159-178, avr. 2005, doi: 10.1016/j.cytogfr.2005.01.004.
- [156] M.-J. Goumans, Z. Liu, et P. ten Dijke, « TGF- β signaling in vascular biology and dysfunction », *Cell Res*, vol. 19, n° 1, Art. n° 1, janv. 2009, doi: 10.1038/cr.2008.326.
- [157] R. Batlle *et al.*, « Regulation of tumor angiogenesis and mesenchymal–endothelial transition by p38 α through TGF- β and JNK signaling », *Nat Commun*, vol. 10, n° 1, Art. n° 1, juill. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-10946-y.
- [158] M. B. Sporn et A. B. Roberts, « Transforming Growth Factor— β : Multiple Actions and Potential Clinical Applications », *JAMA*, vol. 262, n° 7, p. 938-941, août 1989, doi: 10.1001/jama.1989.03430070086036.
- [159] R. C. A. Sainson *et al.*, « TNF primes endothelial cells for angiogenic sprouting by inducing a tip cell phenotype », *Blood*, vol. 111, n° 10, p. 4997-5007, mai 2008, doi: 10.1182/blood-2007-08-108597.
- [160] C. Patterson, M. A. Perrella, W. O. Endege, M. Yoshizumi, M. E. Lee, et E. Haber, « Downregulation of vascular endothelial growth factor receptors by tumor necrosis factor- α in cultured human vascular endothelial cells. », *J Clin Invest*, vol. 98, n° 2, p. 490-496, juill. 1996.
- [161] J. Folkman et D. Hanahan, « Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis », *Princess Takamatsu Symp*, vol. 22, p. 339-347, 1991.
- [162] J. Folkman, « Tumor angiogenesis », *Adv Cancer Res*, vol. 43, p. 175-203, 1985, doi: 10.1016/s0065-230x(08)60946-x.
- [163] J. Folkman et M. Klagsbrun, « Angiogenic factors », *Science*, vol. 235, n° 4787, p. 442-447, janv. 1987, doi: 10.1126/science.2432664.
- [164] D. Hanahan, « Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes », *Nature*, vol. 315, n° 6015, p. 115-122, mai 1985, doi: 10.1038/315115a0.
- [165] B. Muz, P. de la Puente, F. Azab, et A. K. Azab, « The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy », *Hypoxia (Auckl)*, vol. 3, p. 83-92, déc. 2015, doi: 10.2147/HP.S93413.

- [166] B. P. Schneider et K. D. Miller, « Angiogenesis of Breast Cancer », *JCO*, vol. 23, n° 8, p. 1782-1790, mars 2005, doi: 10.1200/JCO.2005.12.017.
- [167] J.-P. Dales *et al.*, « Overexpression of hypoxia-inducible factor HIF-1alpha predicts early relapse in breast cancer: retrospective study in a series of 745 patients », *Int J Cancer*, vol. 116, n° 5, p. 734-739, sept. 2005, doi: 10.1002/ijc.20984.
- [168] Y. Yamamoto *et al.*, « Hypoxia-inducible factor 1alpha is closely linked to an aggressive phenotype in breast cancer », *Breast Cancer Res Treat*, vol. 110, n° 3, p. 465-475, août 2008, doi: 10.1007/s10549-007-9742-1.
- [169] D. Liao, C. Corle, T. N. Seagroves, et R. S. Johnson, « Hypoxia-inducible factor-1alpha is a key regulator of metastasis in a transgenic model of cancer initiation and progression », *Cancer Res*, vol. 67, n° 2, p. 563-572, janv. 2007, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2701.
- [170] G. L. Semenza, « Defining the Role of Hypoxia-Inducible Factor 1 in Cancer Biology and Therapeutics », *Oncogene*, vol. 29, n° 5, p. 625-634, févr. 2010, doi: 10.1038/onc.2009.441.
- [171] B. L. Krock, N. Skuli, et M. C. Simon, « Hypoxia-Induced Angiogenesis », *Genes Cancer*, vol. 2, n° 12, p. 1117-1133, déc. 2011, doi: 10.1177/1947601911423654.
- [172] A. J. Maniotis *et al.*, « Vascular Channel Formation by Human Melanoma Cells in Vivo and in Vitro: Vasculogenic Mimicry », *Am J Pathol*, vol. 155, n° 3, p. 739-752, sept. 1999.
- [173] K. Angara, T. F. Borin, et A. S. Arbab, « Vascular Mimicry: A Novel Neovascularization Mechanism Driving Anti-Angiogenic Therapy (AAT) Resistance in Glioblastoma », *Translational Oncology*, vol. 10, n° 4, p. 650-660, août 2017, doi: 10.1016/j.tranon.2017.04.007.
- [174] K. Shirakawa *et al.*, « Absence of Endothelial Cells, Central Necrosis, and Fibrosis Are Associated with Aggressive Inflammatory Breast Cancer », *Cancer Res*, vol. 61, n° 2, p. 445-451, janv. 2001.
- [175] M. A. Nisar *et al.*, « IL-1 β Promotes Vasculogenic Mimicry of Breast Cancer Cells Through p38/MAPK and PI3K/Akt Signaling Pathways », *Frontiers in Oncology*, vol. 11, 2021, Consulté le: 1 juin 2022. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2021.618839>
- [176] R. A. Bartolomé *et al.*, « VE-cadherin RGD motifs promote metastasis and constitute a potential therapeutic target in melanoma and breast cancers », *Oncotarget*, vol. 8, n° 1, p. 215-227, janv. 2017, doi: 10.18632/oncotarget.13832.
- [177] M. J. C. Hendrix *et al.*, « Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma cells: Role in vasculogenic mimicry », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 98, n° 14, p. 8018-8023, juill. 2001, doi: 10.1073/pnas.131209798.
- [178] D. Delgado-Bellido *et al.*, « VE-cadherin promotes vasculogenic mimicry by modulating kaiso-dependent gene expression », *Cell Death Differ*, vol. 26, n° 2, Art. n° 2, févr. 2019, doi: 10.1038/s41418-018-0125-4.

- [179] A. R. Hess, E. A. Seftor, L. M. Gruman, M. S. Kinch, R. E. B. Seftor, et M. J. C. Hendrix, « VE-cadherin regulates EphA2 in aggressive melanoma cells through a novel signaling pathway: implications for vasculogenic mimicry », *Cancer Biol Ther*, vol. 5, n° 2, p. 228-233, févr. 2006, doi: 10.4161/cbt.5.2.2510.
- [180] A. R. Hess *et al.*, « Focal adhesion kinase promotes the aggressive melanoma phenotype », *Cancer Res*, vol. 65, n° 21, p. 9851-9860, nov. 2005, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2172.
- [181] J. Du *et al.*, « Hypoxia promotes vasculogenic mimicry formation by inducing epithelial–mesenchymal transition in ovarian carcinoma », *Gynecologic Oncology*, vol. 133, n° 3, p. 575-583, juin 2014, doi: 10.1016/j.ygyno.2014.02.034.
- [182] N.-N. Tang *et al.*, « HIF-1 α induces VE-cadherin expression and modulates vasculogenic mimicry in esophageal carcinoma cells », *World Journal of Gastroenterology*, vol. 20, n° 47, p. 17894-17904, déc. 2014, doi: 10.3748/wjg.v20.i47.17894.
- [183] F. Spinella *et al.*, « Endothelin-1 induces the transactivation of vascular endothelial growth factor receptor-3 and modulates cell migration and vasculogenic mimicry in melanoma cells », *J Mol Med*, vol. 91, n° 3, p. 395-405, mars 2013, doi: 10.1007/s00109-012-0956-2.
- [184] L. Yang *et al.*, « Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy », *Sig Transduct Target Ther*, vol. 5, n° 1, Art. n° 1, févr. 2020, doi: 10.1038/s41392-020-0110-5.
- [185] A. Emami Nejad *et al.*, « The role of hypoxia in the tumor microenvironment and development of cancer stem cell: a novel approach to developing treatment », *Cancer Cell Int*, vol. 21, n° 1, p. 62, déc. 2021, doi: 10.1186/s12935-020-01719-5.
- [186] H. Sun *et al.*, « Cancer stem-like cells directly participate in vasculogenic mimicry channels in triple-negative breast cancer », *Cancer Biol Med*, vol. 16, n° 2, p. 299-311, mai 2019, doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0209.
- [187] Y. Izawa *et al.*, « Stem-like Human Breast Cancer Cells Initiate Vasculogenic Mimicry on Matrigel », *Acta Histochemica et Cytochemica*, vol. 51, n° 6, p. 173-183, déc. 2018, doi: 10.1267/ahc.18041.
- [188] T. J. Liu *et al.*, « CD133+ cells with cancer stem cell characteristics associates with vasculogenic mimicry in triple-negative breast cancer », *Oncogene*, vol. 32, n° 5, Art. n° 5, janv. 2013, doi: 10.1038/onc.2012.85.
- [189] W. Liang, S. Song, Y. Xu, H. Li, et H. Liu, « Knockdown of ZEB1 suppressed the formation of vasculogenic mimicry and epithelial-mesenchymal transition in the human breast cancer cell line MDA-MB-231 », *Mol Med Rep*, vol. 17, n° 5, p. 6711-6716, mai 2018, doi: 10.3892/mmr.2018.8677.
- [190] T. Sun *et al.*, « Promotion of tumor cell metastasis and vasculogenic mimicry by way of transcription coactivation by Bcl-2 and Twist1: a study of hepatocellular carcinoma », *Hepatology*, vol. 54, n° 5, p. 1690-1706, nov. 2011, doi: 10.1002/hep.24543.

- [191] Y. W. J. Paulis, P. M. M. B. Soetekouw, H. M. W. Verheul, V. C. G. Tjan-Heijnen, et A. W. Griffioen, « Signalling pathways in vasculogenic mimicry », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, vol. 1806, n° 1, p. 18-28, août 2010, doi: 10.1016/j.bbcan.2010.01.001.
- [192] A. Vartanian *et al.*, « The involvement of Notch signaling in melanoma vasculogenic mimicry », *Clin Exp Med*, vol. 13, n° 3, p. 201-209, août 2013, doi: 10.1007/s10238-012-0190-9.
- [193] K. M. Hardy *et al.*, « Regulation of the Embryonic Morphogen Nodal by Notch4 Facilitates Manifestation of the Aggressive Melanoma Phenotype », *Cancer Res*, vol. 70, n° 24, p. 10340-10350, déc. 2010, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0705.
- [194] « Vessel Cooption, Regression, and Growth in Tumors Mediated by Angiopoietins and VEGF ». <https://www.science.org/doi/10.1126/science.284.5422.1994> (consulté le 3 juin 2022).
- [195] D. Ribatti et F. Pezzella, « Overview on the Different Patterns of Tumor Vascularization », *Cells*, vol. 10, n° 3, p. 639, mars 2021, doi: 10.3390/cells10030639.
- [196] T. Donnem *et al.*, « Vessel co-option in primary human tumors and metastases: an obstacle to effective anti-angiogenic treatment? », *Cancer Med*, vol. 2, n° 4, p. 427-436, août 2013, doi: 10.1002/cam4.105.
- [197] N. Ferrara, K. J. Hillan, H.-P. Gerber, et W. Novotny, « Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer », *Nat Rev Drug Discov*, vol. 3, n° 5, Art. n° 5, mai 2004, doi: 10.1038/nrd1381.
- [198] J. Garcia *et al.*, « Bevacizumab (Avastin®) in cancer treatment: A review of 15 years of clinical experience and future outlook », *Cancer Treatment Reviews*, vol. 86, juin 2020, doi: 10.1016/j.ctrv.2020.102017.
- [199] D. W. Miles *et al.*, « Phase III Study of Bevacizumab Plus Docetaxel Compared With Placebo Plus Docetaxel for the First-Line Treatment of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Negative Metastatic Breast Cancer », *JCO*, vol. 28, n° 20, p. 3239-3247, juill. 2010, doi: 10.1200/JCO.2008.21.6457.
- [200] A. M. Brufsky *et al.*, « RIBBON-2: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase III Trial Evaluating the Efficacy and Safety of Bevacizumab in Combination With Chemotherapy for Second-Line Treatment of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Negative Metastatic Breast Cancer », *JCO*, vol. 29, n° 32, p. 4286-4293, nov. 2011, doi: 10.1200/JCO.2010.34.1255.
- [201] N. J. Robert *et al.*, « RIBBON-1: Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase III Trial of Chemotherapy With or Without Bevacizumab for First-Line Treatment of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Negative, Locally Recurrent or Metastatic Breast Cancer », *JCO*, vol. 29, n° 10, p. 1252-1260, avr. 2011, doi: 10.1200/JCO.2010.28.0982.

- [202] K. K. Ciombor, J. Berlin, et E. Chan, « Aflibercept », *Clin Cancer Res*, vol. 19, n° 8, p. 1920-1925, avr. 2013, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2911.
- [203] E. Van Cutsem *et al.*, « Addition of Aflibercept to Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan Improves Survival in a Phase III Randomized Trial in Patients With Metastatic Colorectal Cancer Previously Treated With an Oxaliplatin-Based Regimen », *JCO*, vol. 30, n° 28, p. 3499-3506, oct. 2012, doi: 10.1200/JCO.2012.42.8201.
- [204] S. J. Casak *et al.*, « FDA Approval Summary: Ramucirumab for Gastric Cancer », *Clinical Cancer Research*, vol. 21, n° 15, p. 3372-3376, août 2015, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0600.
- [205] S. M. A. Effing et B. Gyawali, « Assessing the risk-benefit profile of ramucirumab in patients with advanced solid tumors: A meta-analysis of randomized controlled trials », *EClinicalMedicine*, vol. 25, p. 100458, août 2020, doi: 10.1016/j.eclinm.2020.100458.
- [206] J. R. Mackey *et al.*, « Primary Results of ROSE/TRIO-12, a Randomized Placebo-Controlled Phase III Trial Evaluating the Addition of Ramucirumab to First-Line Docetaxel Chemotherapy in Metastatic Breast Cancer », *JCO*, vol. 33, n° 2, p. 141-148, janv. 2015, doi: 10.1200/JCO.2014.57.1513.
- [207] V. Comunanza et F. Bussolino, « Therapy for Cancer: Strategy of Combining Anti-Angiogenic and Target Therapies », *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 5, 2017, Consulté le: 5 juin 2022. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2017.00101>
- [208] A. B. Mousa, « Sorafenib in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma », *Saudi Journal of Gastroenterology*, vol. 14, n° 1, p. 40, janv. 2008, doi: 10.4103/1319-3767.37808.
- [209] F. Pitoia et F. Jerkovich, « Selective use of sorafenib in the treatment of thyroid cancer », *Drug Des Devel Ther*, vol. 10, p. 1119-1131, 2016, doi: 10.2147/DDDT.S82972.
- [210] J. Baselga *et al.*, « Sorafenib in Combination With Capecitabine: An Oral Regimen for Patients With HER2-Negative Locally Advanced or Metastatic Breast Cancer », *JCO*, vol. 30, n° 13, p. 1484-1491, mai 2012, doi: 10.1200/JCO.2011.36.7771.
- [211] J. Baselga *et al.*, « RESILIENCE: Phase III Randomized, Double-Blind Trial Comparing Sorafenib With Capecitabine Versus Placebo With Capecitabine in Locally Advanced or Metastatic HER2-Negative Breast Cancer », *Clin Breast Cancer*, vol. 17, n° 8, p. 585-594.e4, déc. 2017, doi: 10.1016/j.clbc.2017.05.006.
- [212] L. T. C, R. E, et F. S, « Sunitinib: a novel tyrosine kinase inhibitor. A brief review of its therapeutic potential in the treatment of renal carcinoma and gastrointestinal stromal tumors (GIST) », *Therapeutics and clinical risk management*, vol. 3, n° 2, juin 2007, doi: 10.2147/tcrm.2007.3.2.341.

- [213] D. A. Yardley *et al.*, « Phase II open-label study of sunitinib in patients with advanced breast cancer », *Breast Cancer Res Treat*, vol. 136, n° 3, p. 759-767, déc. 2012, doi: 10.1007/s10549-012-2285-0.
- [214] L.-C. Fan *et al.*, « Regorafenib (Stivarga) pharmacologically targets epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer », *Oncotarget*, vol. 7, n° 39, p. 64136-64147, août 2016, doi: 10.18632/oncotarget.11636.
- [215] K. J. Gotink et H. M. W. Verheul, « Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action? », *Angiogenesis*, vol. 13, n° 1, p. 1-14, 2010, doi: 10.1007/s10456-009-9160-6.
- [216] N. Dey, P. De, et L.-J. Brian, « Evading anti-angiogenic therapy: resistance to anti-angiogenic therapy in solid tumors », *Am J Transl Res*, vol. 7, n° 10, p. 1675-1698, oct. 2015.
- [217] H. Sun *et al.*, « Anti-angiogenic treatment promotes triple-negative breast cancer invasion via vasculogenic mimicry », *Cancer Biology & Therapy*, vol. 18, n° 4, p. 205-213, avr. 2017, doi: 10.1080/15384047.2017.1294288.
- [218] M. P. Pinto, P. Sotomayor, G. Carrasco-Avino, A. H. Corvalan, et G. I. Owen, « Escaping Antiangiogenic Therapy: Strategies Employed by Cancer Cells », *Int J Mol Sci*, vol. 17, n° 9, p. E1489, sept. 2016, doi: 10.3390/ijms17091489.
- [219] W. S. Ramadan, D. M. Zaher, A. M. Altaie, I. M. Talaat, et A. Elmoselhi, « Potential Therapeutic Strategies for Lung and Breast Cancers through Understanding the Anti-Angiogenesis Resistance Mechanisms », *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, n° 2, Art. n° 2, janv. 2020, doi: 10.3390/ijms21020565.
- [220] F. Maione *et al.*, « Semaphorin 3A overcomes cancer hypoxia and metastatic dissemination induced by antiangiogenic treatment in mice », *J Clin Invest*, vol. 122, n° 5, p. 1832-1848, mai 2012, doi: 10.1172/JCI58976.
- [221] « Loss of corepressor PER2 under hypoxia up-regulates OCT1-mediated EMT gene expression and enhances tumor malignancy | PNAS ». <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1222684110> (consulté le 6 juin 2022).
- [222] G. Bocci, A. Di Paolo, et R. Danesi, « The pharmacological bases of the antiangiogenic activity of paclitaxel », *Angiogenesis*, vol. 16, n° 3, p. 481-492, juill. 2013, doi: 10.1007/s10456-013-9334-0.
- [223] T. Cascone *et al.*, « Upregulated stromal EGFR and vascular remodeling in mouse xenograft models of angiogenesis inhibitor-resistant human lung adenocarcinoma », *J Clin Invest*, vol. 121, n° 4, p. 1313-1328, avr. 2011, doi: 10.1172/JCI42405.
- [224] R. Mazziere *et al.*, « Targeting the ANG2/TIE2 Axis Inhibits Tumor Growth and Metastasis by Impairing Angiogenesis and Disabling Rebounds of Proangiogenic Myeloid Cells », *Cancer Cell*, vol. 19, n° 4, p. 512-526, avr. 2011, doi: 10.1016/j.ccr.2011.02.005.

- [225] S. J. Priceman *et al.*, « Targeting distinct tumor-infiltrating myeloid cells by inhibiting CSF-1 receptor: combating tumor evasion of antiangiogenic therapy », *Blood*, vol. 115, n° 7, p. 1461-1471, févr. 2010, doi: 10.1182/blood-2009-08-237412.
- [226] A. Mitsuhashi *et al.*, « Fibrocyte-like cells mediate acquired resistance to anti-angiogenic therapy with bevacizumab », *Nat Commun*, vol. 6, n° 1, Art. n° 1, déc. 2015, doi: 10.1038/ncomms9792.
- [227] N. N. Rahbari *et al.*, « Anti-VEGF therapy induces ECM remodeling and mechanical barriers to therapy in colorectal cancer liver metastases », *Science Translational Medicine*, vol. 8, n° 360, p. 360ra135-360ra135, oct. 2016, doi: 10.1126/scitranslmed.aaf5219.
- [228] K. Hida, N. Ohga, K. Akiyama, N. Maishi, et Y. Hida, « Heterogeneity of tumor endothelial cells », *Cancer Science*, vol. 104, n° 11, p. 1391-1395, 2013, doi: 10.1111/cas.12251.
- [229] B. Bussolati, B. Assenzio, M. C. Deregibus, et G. Camussi, « The proangiogenic phenotype of human tumor-derived endothelial cells depends on thrombospondin-1 downregulation via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway », *J Mol Med (Berl)*, vol. 84, n° 10, p. 852-863, oct. 2006, doi: 10.1007/s00109-006-0075-z.
- [230] K. Hida, N. Maishi, Y. Sakurai, Y. Hida, et H. Harashima, « Heterogeneity of tumor endothelial cells and drug delivery », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 99, p. 140-147, avr. 2016, doi: 10.1016/j.addr.2015.11.008.
- [231] C. Grange, B. Bussolati, S. Bruno, V. Fonsato, A. Sapino, et G. Camussi, « Isolation and characterization of human breast tumor-derived endothelial cells », *Oncology Reports*, vol. 15, n° 2, p. 381-386, févr. 2006, doi: 10.3892/or.15.2.381.
- [232] R. M *et al.*, « Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis », *Cancer research*, vol. 57, n° 5, janv. 1997, Consulté le: 6 juin 2022. [En ligne]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9041202/>
- [233] P. F *et al.*, « Vascular damage and anti-angiogenic effects of tumor vessel-targeted liposomal chemotherapy », *Cancer research*, vol. 63, n° 21, janv. 2003, Consulté le: 6 juin 2022. [En ligne]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14612539/>
- [234] R. Pasqualini *et al.*, « Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis », *Cancer Res*, vol. 60, n° 3, p. 722-727, févr. 2000.
- [235] P. M. LoRusso, S. A. Boerner, et S. Hunsberger, « Clinical Development of Vascular Disrupting Agents: What Lessons Can We Learn From ASA404? », *JCO*, vol. 29, n° 22, p. 2952-2955, août 2011, doi: 10.1200/JCO.2011.36.1311.
- [236] J. H. Gill, K. L. Rockley, C. De Santis, et A. K. Mohamed, « Vascular Disrupting Agents in cancer treatment: Cardiovascular toxicity and implications for co-administration with other

cancer chemotherapeutics », *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 202, p. 18-31, oct. 2019, doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.06.001.

[237] J. Incio *et al.*, « Obesity promotes resistance to anti-VEGF therapy in breast cancer by up-regulating IL-6 and potentially FGF-2 », *Science Translational Medicine*, vol. 10, n° 432, p. eaag0945, mars 2018, doi: 10.1126/scitranslmed.aag0945.

[238] F. Shojaei *et al.*, « Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b+Gr1+ myeloid cells », *Nat Biotechnol*, vol. 25, n° 8, Art. n° 8, août 2007, doi: 10.1038/nbt1323.

[239] D. Fukumura et R. K. Jain, « Tumor microvasculature and microenvironment: Targets for anti-angiogenesis and normalization », *Microvascular Research*, vol. 74, n° 2, p. 72-84, sept. 2007, doi: 10.1016/j.mvr.2007.05.003.

[240] K. Rohlenova, K. Veys, I. Miranda-Santos, K. D. Bock, et P. Carmeliet, « Endothelial Cell Metabolism in Health and Disease », *Trends in Cell Biology*, vol. 28, n° 3, p. 224-236, mars 2018, doi: 10.1016/j.tcb.2017.10.010.

[241] N. M. Ayoub, S. K. Jaradat, K. M. Al-Shami, et A. E. Alkhalifa, « Targeting Angiogenesis in Breast Cancer: Current Evidence and Future Perspectives of Novel Anti-Angiogenic Approaches », *Frontiers in Pharmacology*, vol. 13, 2022, Consulté le: 5 juin 2022. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2022.838133>

[242] D. Keskin *et al.*, « Targeting Vascular Pericytes in Hypoxic Tumors Increases Lung Metastasis via Angiopoietin-2 », *Cell Reports*, vol. 10, n° 7, p. 1066-1081, févr. 2015, doi: 10.1016/j.celrep.2015.01.035.

[243] K. Zirlik et J. Duyster, « Anti-Angiogenics: Current Situation and Future Perspectives », *ORT*, vol. 41, n° 4, p. 166-171, 2018, doi: 10.1159/000488087.

[244] H. Liang *et al.*, « miR-153 inhibits the migration and the tube formation of endothelial cells by blocking the paracrine of angiopoietin 1 in breast cancer cells », *Angiogenesis*, vol. 21, n° 4, p. 849-860, nov. 2018, doi: 10.1007/s10456-018-9630-9.

[245] Y. Li *et al.*, « MiRNA-29b suppresses tumor growth through simultaneously inhibiting angiogenesis and tumorigenesis by targeting Akt3 », *Cancer Letters*, vol. 397, p. 111-119, juill. 2017, doi: 10.1016/j.canlet.2017.03.032.

[246] Y. Lu *et al.*, « Correction: MicroRNA-140-5p inhibits invasion and angiogenesis through targeting VEGF-A in breast cancer », *Cancer Gene Ther*, vol. 27, n° 10, Art. n° 10, nov. 2020, doi: 10.1038/s41417-020-00240-1.

[247] P. Vaupel et G. Multhoff, « Accomplices of the Hypoxic Tumor Microenvironment Compromising Antitumor Immunity: Adenosine, Lactate, Acidosis, Vascular Endothelial Growth Factor, Potassium Ions, and Phosphatidylserine », *Frontiers in Immunology*, vol. 8, 2017, Consulté le: 7 juin 2022. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.01887>

- [248] K. Taguchi, T. Onoe, T. Yoshida, Y. Yamashita, Y. Tanaka, et H. Ohdan, « Tumor Endothelial Cell–Mediated Antigen-Specific T-cell Suppression via the PD-1/PD-L1 Pathway », *Molecular Cancer Research*, vol. 18, n° 9, p. 1427-1440, sept. 2020, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-19-0897.
- [249] J. Kloepper *et al.*, « Ang-2/VEGF bispecific antibody reprograms macrophages and resident microglia to anti-tumor phenotype and prolongs glioblastoma survival », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 113, n° 16, p. 4476-4481, avr. 2016, doi: 10.1073/pnas.1525360113.
- [250] M. D. Palma et R. K. Jain, « CD4+ T Cell Activation and Vascular Normalization: Two Sides of the Same Coin? », *Immunity*, vol. 46, n° 5, p. 773-775, mai 2017, doi: 10.1016/j.immuni.2017.04.015.
- [251] X. Zheng *et al.*, « Increased vessel perfusion predicts the efficacy of immune checkpoint blockade », *J Clin Invest*, vol. 128, n° 5, p. 2104-2115, mai 2018, doi: 10.1172/JCI96582.
- [252] X. Zheng *et al.*, « CTLA4 blockade promotes vessel normalization in breast tumors via the accumulation of eosinophils », *International Journal of Cancer*, vol. 146, n° 6, p. 1730-1740, 2020, doi: 10.1002/ijc.32829.
- [253] L. Tian *et al.*, « Mutual regulation of tumour vessel normalization and immunostimulatory reprogramming », *Nature*, vol. 544, n° 7649, Art. n° 7649, avr. 2017, doi: 10.1038/nature21724.
- [254] E. Allen *et al.*, « Combined antiangiogenic and anti–PD-L1 therapy stimulates tumor immunity through HEV formation », *Science Translational Medicine*, vol. 9, n° 385, p. eaak9679, avr. 2017, doi: 10.1126/scitranslmed.aak9679.
- [255] J. Liu *et al.*, « Efficacy and safety of camrelizumab combined with apatinib in advanced triple-negative breast cancer: an open-label phase II trial », *J Immunother Cancer*, vol. 8, n° 1, p. e000696, mai 2020, doi: 10.1136/jitc-2020-000696.
- [256] S. Frentzas *et al.*, « Vessel co-option mediates resistance to anti-angiogenic therapy in liver metastases », *Nat Med*, vol. 22, n° 11, Art. n° 11, nov. 2016, doi: 10.1038/nm.4197.
- [257] E. A. Kuczynski et A. R. Reynolds, « Vessel co-option and resistance to anti-angiogenic therapy », *Angiogenesis*, vol. 23, n° 1, p. 55-74, févr. 2020, doi: 10.1007/s10456-019-09698-6.
- [258] S. Zhang *et al.*, « Thalidomide influences growth and vasculogenic mimicry channel formation in melanoma », *J Exp Clin Cancer Res*, vol. 27, p. 60, nov. 2008, doi: 10.1186/1756-9966-27-60.
- [259] M. Huang *et al.*, « Mammalian target of rapamycin signaling is involved in the vasculogenic mimicry of glioma via hypoxia-inducible factor-1 α », *Oncology Reports*, vol. 32, n° 5, p. 1973-1980, nov. 2014, doi: 10.3892/or.2014.3454.
- [260] R. E. B. Seftor, E. A. Seftor, D. A. Kirschmann, et M. J. C. Hendrix, « Targeting the tumor microenvironment with chemically modified tetracyclines: inhibition of laminin 5

gamma2 chain promigratory fragments and vasculogenic mimicry », *Mol Cancer Ther*, vol. 1, n° 13, p. 1173-1179, nov. 2002.

[261] Y. Liang *et al.*, « Curcumin inhibits vasculogenic mimicry through the downregulation of erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma-A2, phosphoinositide 3-kinase and matrix metalloproteinase-2 », *Oncol Lett*, vol. 8, n° 4, p. 1849-1855, oct. 2014, doi: 10.3892/ol.2014.2401.

[262] K. Chiablaem, K. Lirdprapamongkol, S. Keeratichamroen, R. Surarit, et J. Svasti, « Curcumin Suppresses Vasculogenic Mimicry Capacity of Hepatocellular Carcinoma Cells through STAT3 and PI3K/AKT Inhibition », *Anticancer Research*, vol. 34, n° 4, p. 1857-1864, avr. 2014.

[263] C. W. Menke-van der Houven van Oordt *et al.*, « First-in-human phase I clinical trial of RG7356, an anti-CD44 humanized antibody, in patients with advanced, CD44-expressing solid tumors », *Oncotarget*, vol. 7, n° 48, p. 80046-80058, nov. 2016, doi: 10.18632/oncotarget.11098.

[264] Y. Xia *et al.*, « Rho Kinase Inhibitor Fasudil Suppresses the Vasculogenic Mimicry of B16 Mouse Melanoma Cells Both In Vitro and In Vivo », *Mol Cancer Ther*, vol. 14, n° 7, p. 1582-1590, juill. 2015, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0523.

[265] O. Itzhaki *et al.*, « Nicotinamide Inhibits Vasculogenic Mimicry, an Alternative Vascularization Pathway Observed in Highly Aggressive Melanoma », *PLOS ONE*, vol. 8, n° 2, p. e57160, févr. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0057160.

[266] J. Rj *et al.*, « Liposomes, modified with PTD(HIV-1) peptide, containing epirubicin and celecoxib, to target vasculogenic mimicry channels in invasive breast cancer », *Biomaterials*, vol. 35, n° 26, août 2014, doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.05.040.

[267] Y. Song *et al.*, « MicroRNA-9 inhibits vasculogenic mimicry of glioma cell lines by suppressing Stathmin expression », *J Neurooncol*, vol. 115, n° 3, p. 381-390, déc. 2013, doi: 10.1007/s11060-013-1245-9.

[268] « Treatment of Triple-negative Breast Cancer | Treatment of TNBC ». <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/treatment-of-triple-negative.html> (consulté le 8 juin 2022).

[269] « Breast Cancer Treatment (Adult) (PDQ®)–Health Professional Version - NCI », 27 mai 2022. <https://www.cancer.gov/types/breast/hp/breast-treatment-pdq> (consulté le 8 juin 2022).

[270] A. G. Waks et E. P. Winer, « Breast Cancer Treatment: A Review », *JAMA*, vol. 321, n° 3, p. 288, janv. 2019, doi: 10.1001/jama.2018.19323.

[271] X. Ba et N. J. Garg, « Signaling Mechanism of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1) in Inflammatory Diseases », *Am J Pathol*, vol. 178, n° 3, p. 946-955, mars 2011, doi: 10.1016/j.ajpath.2010.12.004.

- [272] S. Vyas, M. Chesarone-Cataldo, T. Todorova, Y.-H. Huang, et P. Chang, « A systematic analysis of the PARP protein family identifies new functions critical for cell physiology », *Nat Commun*, vol. 4, n° 1, Art. n° 1, août 2013, doi: 10.1038/ncomms3240.
- [273] M. Rouleau, A. Patel, M. J. Hendzel, S. H. Kaufmann, et G. G. Poirier, « PARP inhibition: PARP1 and beyond », *Nat Rev Cancer*, vol. 10, n° 4, p. 293-301, avr. 2010, doi: 10.1038/nrc2812.
- [274] V. Schreiber, F. Dantzer, J.-C. Ame, et G. de Murcia, « Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule », *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 7, n° 7, p. 517-528, juill. 2006, doi: 10.1038/nrm1963.
- [275] E. Prokhorova *et al.*, « Unrestrained poly-ADP-ribosylation provides insights into chromatin regulation and human disease », *Molecular Cell*, vol. 81, n° 12, p. 2640-2655.e8, juin 2021, doi: 10.1016/j.molcel.2021.04.028.
- [276] N. Chatterjee et G. C. Walker, « Mechanisms of DNA damage, repair and mutagenesis », *Environ Mol Mutagen*, vol. 58, n° 5, p. 235-263, juin 2017, doi: 10.1002/em.22087.
- [277] S. Wolters et B. Schumacher, « Genome maintenance and transcription integrity in aging and disease », *Front Genet*, vol. 4, p. 19, févr. 2013, doi: 10.3389/fgene.2013.00019.
- [278] L. Wang, K. Chen, et Z. Chen, « Structural basis of ALC1/CHD1L autoinhibition and the mechanism of activation by the nucleosome », *Nat Commun*, vol. 12, n° 1, Art. n° 1, juill. 2021, doi: 10.1038/s41467-021-24320-4.
- [279] K. W. Caldecott, C. K. McKeown, J. D. Tucker, S. Ljungquist, et L. H. Thompson, « An interaction between the mammalian DNA repair protein XRCC1 and DNA ligase III. », *Mol Cell Biol*, vol. 14, n° 1, p. 68-76, janv. 1994.
- [280] « Single-strand break repair and genetic disease - PubMed ». <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18626472/> (consulté le 15 juin 2022).
- [281] J. A. Marteijn, H. Lans, W. Vermeulen, et J. H. J. Hoeijmakers, « Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing », *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 15, n° 7, p. 465-481, juill. 2014, doi: 10.1038/nrm3822.
- [282] A. Pines *et al.*, « PARP1 promotes nucleotide excision repair through DDB2 stabilization and recruitment of ALC1 », *J Cell Biol*, vol. 199, n° 2, p. 235-249, oct. 2012, doi: 10.1083/jcb.201112132.
- [283] J.-F. Haince *et al.*, « PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites », *J Biol Chem*, vol. 283, n° 2, p. 1197-1208, janv. 2008, doi: 10.1074/jbc.M706734200.
- [284] M. Li et X. Yu, « Function of BRCA1 in the DNA damage response is mediated by ADP-ribosylation », *Cancer Cell*, vol. 23, n° 5, p. 693-704, mai 2013, doi: 10.1016/j.ccr.2013.03.025.

- [285] C. Beck, I. Robert, B. Reina-San-Martin, V. Schreiber, et F. Dantzer, « Poly(ADP-ribose) polymerases in double-strand break repair: Focus on PARP1, PARP2 and PARP3 », *Experimental Cell Research*, vol. 329, n° 1, p. 18-25, nov. 2014, doi: 10.1016/j.yexcr.2014.07.003.
- [286] K. Zaniolo, S. Desnoyers, S. Leclerc, et S. L. Guérin, « Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) gene expression through the post-translational modification of Sp1: a nuclear target protein of PARP-1 », *BMC Mol Biol*, vol. 8, p. 96, oct. 2007, doi: 10.1186/1471-2199-8-96.
- [287] M. Zerfaoui *et al.*, « POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASE-1 IS A DETERMINING FACTOR IN CRM1-MEDIATED NUCLEAR EXPORT AND RETENTION OF P65 NF- κ B UPON TLR4 STIMULATION », *J Immunol*, vol. 185, n° 3, p. 1894-1902, août 2010, doi: 10.4049/jimmunol.1000646.
- [288] M. Kanai *et al.*, « Inhibition of Crm1-p53 interaction and nuclear export of p53 by poly(ADP-ribosylation) », *Nat Cell Biol*, vol. 9, n° 10, p. 1175-1183, oct. 2007, doi: 10.1038/ncb1638.
- [289] T. Kamaletdinova, Z. Fanaei-Kahrani, et Z.-Q. Wang, « The Enigmatic Function of PARP1: From PARylation Activity to PAR Readers », *Cells*, vol. 8, n° 12, p. 1625, déc. 2019, doi: 10.3390/cells8121625.
- [290] F. d'Adda di Fagagna, M. P. Hande, W.-M. Tong, P. M. Lansdorp, Z.-Q. Wang, et S. P. Jackson, « Functions of poly(ADP-ribose) polymerase in controlling telomere length and chromosomal stability », *Nat Genet*, vol. 23, n° 1, Art. n° 1, sept. 1999, doi: 10.1038/12680.
- [291] A. Mangerich et A. Bürkle, « Pleiotropic Cellular Functions of PARP1 in Longevity and Aging: Genome Maintenance Meets Inflammation », *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2012, p. e321653, sept. 2012, doi: 10.1155/2012/321653.
- [292] J. Holtlund, T. Kristensen, A.-C. Østvold, et S. G. Laland, « On the presence of poly(ADP-ribose) polymerase activity in metaphase chromosomes from HeLa S3 cells », *FEBS Letters*, vol. 116, n° 1, p. 11-13, juill. 1980, doi: 10.1016/0014-5793(80)80517-5.
- [293] M. Kanai, W.-M. Tong, E. Sugihara, Z.-Q. Wang, K. Fukasawa, et M. Miwa, « Involvement of Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 and Poly(ADP-Ribosylation) in Regulation of Centrosome Function », *Molecular and Cellular Biology*, vol. 23, n° 7, p. 2451-2462, avr. 2003, doi: 10.1128/MCB.23.7.2451-2462.2003.
- [294] H. C. Ha et S. H. Snyder, « Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 96, n° 24, p. 13978-13982, nov. 1999, doi: 10.1073/pnas.96.24.13978.
- [295] A. A. Fatokun, V. L. Dawson, et T. M. Dawson, « Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities », *Br J Pharmacol*, vol. 171, n° 8, p. 2000-2016, avr. 2014, doi: 10.1111/bph.12416.

- [296] M. Stilmann, M. Hinz, S. C. Arslan, A. Zimmer, V. Schreiber, et C. Scheidereit, « A nuclear poly(ADP-ribose)-dependent signalosome confers DNA damage-induced I κ B kinase activation », *Mol Cell*, vol. 36, n^o 3, p. 365-378, nov. 2009, doi: 10.1016/j.molcel.2009.09.032.
- [297] P. O. Hassa, C. Buerki, C. Lombardi, R. Imhof, et M. O. Hottiger, « Transcriptional coactivation of nuclear factor-kappaB-dependent gene expression by p300 is regulated by poly(ADP)-ribose polymerase-1 », *J Biol Chem*, vol. 278, n^o 46, p. 45145-45153, nov. 2003, doi: 10.1074/jbc.M307957200.
- [298] « Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF- κ B activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice », *The EMBO Journal*, vol. 18, n^o 16, p. 4446-4454, août 1999, doi: 10.1093/emboj/18.16.4446.
- [299] A. V. Bhat, S. Hora, A. Pal, S. Jha, et R. Taneja, « Stressing the (Epi)Genome: Dealing with Reactive Oxygen Species in Cancer », *Antioxid Redox Signal*, vol. 29, n^o 13, p. 1273-1292, nov. 2018, doi: 10.1089/ars.2017.7158.
- [300] K. A. Krukenberg, S. Kim, E. S. Tan, Z. Maliga, et T. J. Mitchison, « Extracellular poly(ADP-ribose) is a pro-inflammatory signal for macrophages », *Chem Biol*, vol. 22, n^o 4, p. 446-452, avr. 2015, doi: 10.1016/j.chembiol.2015.03.007.
- [301] K. Davis, S. Banerjee, A. Friggeri, C. Bell, E. Abraham, et M. Zerfaoui, « Poly(ADP-Ribosylation) of High Mobility Group Box 1 (HMGB1) Protein Enhances Inhibition of Efferocytosis », *Mol Med*, vol. 18, n^o 1, p. 359-369, déc. 2011, doi: 10.2119/molmed.2011.00203.
- [302] E. Mocchegiani *et al.*, « The variations during the circadian cycle of liver CD1d-unrestricted NK1.1+TCR gamma/delta+ cells lead to successful ageing. Role of metallothionein/IL-6/gp130/PARP-1 interplay in very old mice », *Exp Gerontol*, vol. 39, n^o 5, p. 775-788, mai 2004, doi: 10.1016/j.exger.2004.01.014.
- [303] H. Zhao *et al.*, « PARP1- and CTCF-Mediated Interactions between Active and Repressed Chromatin at the Lamina Promote Oscillating Transcription », *Mol Cell*, vol. 59, n^o 6, p. 984-997, sept. 2015, doi: 10.1016/j.molcel.2015.07.019.
- [304] J. Márton *et al.*, « Poly(ADP-ribose) polymerase-2 is a lipid-modulated modulator of muscular lipid homeostasis », *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, vol. 1863, n^o 11, p. 1399-1412, nov. 2018, doi: 10.1016/j.bbalip.2018.07.013.
- [305] T.-Y. J. Yeh *et al.*, « Hypermetabolism, hyperphagia, and reduced adiposity in tankyrase-deficient mice », *Diabetes*, vol. 58, n^o 11, p. 2476-2485, nov. 2009, doi: 10.2337/db08-1781.
- [306] M. Lehmann *et al.*, « ARTD1-induced poly-ADP-ribose formation enhances PPAR γ ligand binding and co-factor exchange », *Nucleic Acids Res*, vol. 43, n^o 1, p. 129-142, janv. 2015, doi: 10.1093/nar/gku1260.

- [307] P. Bai et C. Cantó, « The role of PARP-1 and PARP-2 enzymes in metabolic regulation and disease », *Cell Metab*, vol. 16, n° 3, p. 290-295, sept. 2012, doi: 10.1016/j.cmet.2012.06.016.
- [308] M. Szántó et P. Bai, « The role of ADP-ribose metabolism in metabolic regulation, adipose tissue differentiation, and metabolism », *Genes Dev*, vol. 34, n° 5-6, p. 321-340, mars 2020, doi: 10.1101/gad.334284.119.
- [309] F. Rojo *et al.*, « Nuclear PARP-1 protein overexpression is associated with poor overall survival in early breast cancer », *Ann Oncol*, vol. 23, n° 5, p. 1156-1164, mai 2012, doi: 10.1093/annonc/mdr361.
- [310] Y. Liu, Y. Zhang, Y. Zhao, D. Gao, J. Xing, et H. Liu, « High PARP-1 expression is associated with tumor invasion and poor prognosis in gastric cancer », *Oncol Lett*, vol. 12, n° 5, p. 3825-3835, nov. 2016, doi: 10.3892/ol.2016.5169.
- [311] V. Ossovskaya, I. C. Koo, E. P. Kaldjian, C. Alvares, et B. M. Sherman, « Upregulation of Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP1) in Triple-Negative Breast Cancer and Other Primary Human Tumor Types », *Genes Cancer*, vol. 1, n° 8, p. 812-821, août 2010, doi: 10.1177/1947601910383418.
- [312] P. Domagala, T. Huzarski, J. Lubinski, K. Gugala, et W. Domagala, « PARP-1 expression in breast cancer including BRCA1-associated, triple negative and basal-like tumors: possible implications for PARP-1 inhibitor therapy », *Breast Cancer Res Treat*, vol. 127, n° 3, p. 861-869, juin 2011, doi: 10.1007/s10549-011-1441-2.
- [313] T. S. Piskunova *et al.*, « Deficiency in Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 (PARP-1) Accelerates Aging and Spontaneous Carcinogenesis in Mice », *Curr Gerontol Geriatr Res*, vol. 2008, p. 754190, 2008, doi: 10.1155/2008/754190.
- [314] W.-M. Tong, H. Ohgaki, H. Huang, C. Granier, P. Kleihues, et Z.-Q. Wang, « Null Mutation of DNA Strand Break-Binding Molecule Poly(ADP-ribose) Polymerase Causes Medulloblastomas in p53^{-/-} Mice », *Am J Pathol*, vol. 162, n° 1, p. 343-352, janv. 2003.
- [315] C. M. Whitacre, H. Hashimoto, M. L. Tsai, S. Chatterjee, S. J. Berger, et N. A. Berger, « Involvement of NAD-poly(ADP-ribose) metabolism in p53 regulation and its consequences », *Cancer Res*, vol. 55, n° 17, p. 3697-3701, sept. 1995.
- [316] W. M. Tong, U. Cortes, et Z. Q. Wang, « Poly(ADP-ribose) polymerase: a guardian angel protecting the genome and suppressing tumorigenesis », *Biochim Biophys Acta*, vol. 1552, n° 1, p. 27-37, nov. 2001, doi: 10.1016/s0304-419x(01)00035-x.
- [317] D. Martín-Oliva *et al.*, « Crosstalk between PARP-1 and NF-kappaB modulates the promotion of skin neoplasia », *Oncogene*, vol. 23, n° 31, p. 5275-5283, juill. 2004, doi: 10.1038/sj.onc.1207696.

- [318] B. Dörsam *et al.*, « PARP-1 protects against colorectal tumor induction, but promotes inflammation-driven colorectal tumor progression », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 115, n° 17, p. E4061-E4070, avr. 2018, doi: 10.1073/pnas.1712345115.
- [319] S. Pazzaglia et C. Pioli, « Multifaceted Role of PARP-1 in DNA Repair and Inflammation: Pathological and Therapeutic Implications in Cancer and Non-Cancer Diseases », *Cells*, vol. 9, n° 1, p. 41, déc. 2019, doi: 10.3390/cells9010041.
- [320] E. V. Efimova *et al.*, « Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor induces accelerated senescence in irradiated breast cancer cells and tumors », *Cancer Res*, vol. 70, n° 15, p. 6277-6282, août 2010, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4224.
- [321] K. Zaniolo, A. Rufiange, S. Leclerc, S. Desnoyers, et S. L. Guérin, « Regulation of the poly(ADP-ribose) polymerase-1 gene expression by the transcription factors Sp1 and Sp3 is under the influence of cell density in primary cultured cells », *Biochem J*, vol. 389, n° Pt 2, p. 423-433, juill. 2005, doi: 10.1042/BJ20041718.
- [322] F. Xu *et al.*, « Cytoplasmic PARP-1 promotes pancreatic cancer tumorigenesis and resistance », *Int J Cancer*, vol. 145, n° 2, p. 474-483, juill. 2019, doi: 10.1002/ijc.32108.
- [323] M. Gomez *et al.*, « PARP1 Is a TRF2-associated Poly(ADP-Ribose)Polymerase and Protects Eroded Telomeres », *Mol Biol Cell*, vol. 17, n° 4, p. 1686-1696, avr. 2006, doi: 10.1091/mbc.E05-07-0672.
- [324] « Rapid regulation of telomere length is mediated by poly(ADP-ribose) polymerase-1 - PubMed ». <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18835851/> (consulté le 17 juin 2022).
- [325] K. Huang *et al.*, « PARP1-mediated PPAR α poly(ADP-ribosyl)ation suppresses fatty acid oxidation in non-alcoholic fatty liver disease », *J Hepatol*, vol. 66, n° 5, p. 962-977, mai 2017, doi: 10.1016/j.jhep.2016.11.020.
- [326] L. Tentori *et al.*, « Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibition or PARP-1 gene deletion reduces angiogenesis », *Eur J Cancer*, vol. 43, n° 14, p. 2124-2133, sept. 2007, doi: 10.1016/j.ejca.2007.07.010.
- [327] L. Tentori *et al.*, « Stable depletion of poly (ADP-ribose) polymerase-1 reduces in vivo melanoma growth and increases chemosensitivity », *Eur J Cancer*, vol. 44, n° 9, p. 1302-1314, juin 2008, doi: 10.1016/j.ejca.2008.03.019.
- [328] J. M. Martí *et al.*, « Selective modulation by PARP-1 of HIF-1 α -recruitment to chromatin during hypoxia is required for tumor adaptation to hypoxic conditions », *Redox Biol*, vol. 41, p. 101885, févr. 2021, doi: 10.1016/j.redox.2021.101885.
- [329] M. Rajesh *et al.*, « Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition decreases angiogenesis », *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 350, n° 4, p. 1056-1062, déc. 2006, doi: 10.1016/j.bbrc.2006.09.160.

- [330] M. I. Rodríguez *et al.*, « PARP-1 Regulates Metastatic Melanoma through Modulation of Vimentin-induced Malignant Transformation », *PLoS Genet*, vol. 9, n° 6, juin 2013, doi: 10.1371/journal.pgen.1003531.
- [331] X. Wu *et al.*, « HOXB7, a homeodomain protein, is overexpressed in breast cancer and confers epithelial-mesenchymal transition », *Cancer Res*, vol. 66, n° 19, p. 9527-9534, oct. 2006, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4470.
- [332] X. Wu *et al.*, « ADP Ribosylation by PARP-1 Suppresses HOXB7 Transcriptional Activity », *PLoS One*, vol. 7, n° 7, p. e40644, juill. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0040644.
- [333] A. Ghorai, A. Sarma, P. Chowdhury, et U. Ghosh, « PARP-1 depletion in combination with carbon ion exposure significantly reduces MMPs activity and overall increases TIMPs expression in cultured HeLa cells », *Radiat Oncol*, vol. 11, p. 126, sept. 2016, doi: 10.1186/s13014-016-0703-x.
- [334] P. Dutta, K. Paico, G. Gomez, Y. Wu, et J. V. Vadgama, « Transcriptional Regulation of CCL2 by PARP1 Is a Driver for Invasiveness in Breast Cancer », *Cancers (Basel)*, vol. 12, n° 5, p. 1317, mai 2020, doi: 10.3390/cancers12051317.
- [335] F. Nasta, F. Laudisi, M. Sambucci, M. M. Rosado, et C. Pioli, « Increased Foxp3+ regulatory T cells in poly(ADP-Ribose) polymerase-1 deficiency », *J Immunol*, vol. 184, n° 7, p. 3470-3477, avr. 2010, doi: 10.4049/jimmunol.0901568.
- [336] J. Navarro *et al.*, « PARP-1/PARP-2 double deficiency in mouse T cells results in faulty immune responses and T lymphomas », *Sci Rep*, vol. 7, p. 41962, févr. 2017, doi: 10.1038/srep41962.
- [337] M. A. Galindo-Campos *et al.*, « Coordinated signals from the DNA repair enzymes PARP-1 and PARP-2 promotes B-cell development and function », *Cell Death Differ*, vol. 26, n° 12, p. 2667-2681, déc. 2019, doi: 10.1038/s41418-019-0326-5.
- [338] « Innate immune cells in motion - PubMed ». <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21962580/> (consulté le 20 juin 2022).
- [339] H. Farmer *et al.*, « Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy », *Nature*, vol. 434, n° 7035, p. 917-921, avr. 2005, doi: 10.1038/nature03445.
- [340] P. C. Fong *et al.*, « Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers », *N Engl J Med*, vol. 361, n° 2, p. 123-134, juill. 2009, doi: 10.1056/NEJMoa0900212.
- [341] D.-S. Kim, C. V. Camacho, et W. L. Kraus, « Alternate therapeutic pathways for PARP inhibitors and potential mechanisms of resistance », *Exp Mol Med*, vol. 53, n° 1, Art. n° 1, janv. 2021, doi: 10.1038/s12276-021-00557-3.

- [342] J. Murai *et al.*, « Differential trapping of PARP1 and PARP2 by clinical PARP inhibitors », *Cancer Res*, vol. 72, n° 21, p. 5588-5599, nov. 2012, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2753.
- [343] J. Murai *et al.*, « Stereospecific PARP trapping by BMN 673 and comparison with olaparib and rucaparib », *Mol Cancer Ther*, vol. 13, n° 2, p. 433-443, févr. 2014, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0803.
- [344] T. A. Hopkins *et al.*, « Mechanistic Dissection of PARP1 Trapping and the Impact on In Vivo Tolerability and Efficacy of PARP Inhibitors », *Mol Cancer Res*, vol. 13, n° 11, p. 1465-1477, nov. 2015, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-15-0191-T.
- [345] B. B. Das *et al.*, « PARP1–TDP1 coupling for the repair of topoisomerase I–induced DNA damage », *Nucleic Acids Res*, vol. 42, n° 7, p. 4435-4449, avr. 2014, doi: 10.1093/nar/gku088.
- [346] I. Faraoni et G. Graziani, « Role of BRCA Mutations in Cancer Treatment with Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) Inhibitors », *Cancers (Basel)*, vol. 10, n° 12, p. 487, déc. 2018, doi: 10.3390/cancers10120487.
- [347] D. Criscuolo, F. Morra, R. Giannella, A. Cerrato, et A. Celetti, « Identification of Novel Biomarkers of Homologous Recombination Defect in DNA Repair to Predict Sensitivity of Prostate Cancer Cells to PARP-Inhibitors », *Int J Mol Sci*, vol. 20, n° 12, p. 3100, juin 2019, doi: 10.3390/ijms20123100.
- [348] D. R. Hodgson *et al.*, « Candidate biomarkers of PARP inhibitor sensitivity in ovarian cancer beyond the BRCA genes », *Br J Cancer*, vol. 119, n° 11, p. 1401-1409, nov. 2018, doi: 10.1038/s41416-018-0274-8.
- [349] K. M. Timms *et al.*, « Association of BRCA1/2 defects with genomic scores predictive of DNA damage repair deficiency among breast cancer subtypes », *Breast Cancer Res*, vol. 16, p. 475, 2014, doi: 10.1186/s13058-014-0475-x.
- [350] R. M. Hurley *et al.*, « 53BP1 as a Potential Predictor of Response in PARP Inhibitor-Treated Homologous Recombination-Deficient Ovarian Cancer », *Gynecol Oncol*, vol. 153, n° 1, p. 127-134, avr. 2019, doi: 10.1016/j.ygyno.2019.01.015.
- [351] M. R. Mirza *et al.*, « Niraparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer », *N Engl J Med*, vol. 375, n° 22, p. 2154-2164, déc. 2016, doi: 10.1056/NEJMoa1611310.
- [352] M. Oshi *et al.*, « Establishment of a novel BRCAness score that predicts response to PARP inhibitors. », *JCO*, vol. 40, n° 16_suppl, p. 549-549, juin 2022, doi: 10.1200/JCO.2022.40.16_suppl.549.
- [353] T. M. Severson *et al.*, « The BRCA1ness signature is associated significantly with response to PARP inhibitor treatment versus control in the I-SPY 2 randomized neoadjuvant

setting », *Breast Cancer Res*, vol. 19, n° 1, Art. n° 1, déc. 2017, doi: 10.1186/s13058-017-0861-2.

[354] L. Cortesi, H. S. Rugo, et C. Jackisch, « An Overview of PARP Inhibitors for the Treatment of Breast Cancer », *Target Oncol*, vol. 16, n° 3, p. 255-282, mai 2021, doi: 10.1007/s11523-021-00796-4.

[355] M. Robson *et al.*, « Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation », *New England Journal of Medicine*, vol. 377, n° 6, p. 523-533, août 2017, doi: 10.1056/NEJMoa1706450.

[356] J. K. Litton *et al.*, « Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline BRCA Mutation », *New England Journal of Medicine*, vol. 379, n° 8, p. 753-763, août 2018, doi: 10.1056/NEJMoa1802905.

[357] C. McCrea et R. Hettle, « Indirect treatment comparison of the efficacy and safety of olaparib 300 mg tablets BID and talazoparib 1 mg once daily in the treatment of patients with germline BRCA-mutated (gBRCA) HER2-negative metastatic breast cancer. », *JCO*, vol. 37, n° 15_suppl, p. e12570-e12570, mai 2019, doi: 10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.e12570.

[358] J. Murai *et al.*, « Rationale for Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) Inhibitors in Combination Therapy with Camptothecins or Temozolomide Based on PARP Trapping versus Catalytic Inhibition », *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 349, n° 3, p. 408-416, juin 2014, doi: 10.1124/jpet.113.210146.

[359] J.-M. Lee *et al.*, « Safety and Clinical Activity of the Programmed Death-Ligand 1 Inhibitor Durvalumab in Combination With Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibitor Olaparib or Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1-3 Inhibitor Cediranib in Women's Cancers: A Dose-Escalation, Phase I Study », *JCO*, vol. 35, n° 19, p. 2193-2202, juill. 2017, doi: 10.1200/JCO.2016.72.1340.

[360] S. Domchek *et al.*, « Abstract PD5-04: An open-label, phase II basket study of olaparib and durvalumab (MEDIOLA): Updated results in patients with germline *BRCA* -mutated (g *BRCA* m) metastatic breast cancer (MBC) », *Cancer Research*, vol. 79, n° 4_Supplement, p. PD5-04-PD5-04, févr. 2019, doi: 10.1158/1538-7445.SABCS18-PD5-04.

[361] S. Vinayak *et al.*, « TOPACIO/Keynote-162: Niraparib + pembrolizumab in patients (pts) with metastatic triple-negative breast cancer (TNBC), a phase 2 trial. », *JCO*, vol. 36, n° 15_suppl, p. 1011-1011, mai 2018, doi: 10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.1011.

[362] S. Jiao *et al.*, « PARP inhibitor upregulates PD-L1 expression and enhances cancer-associated immunosuppression », *Clin Cancer Res*, vol. 23, n° 14, p. 3711-3720, juill. 2017, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-3215.

[363] A. Alvarez Secord, D. M. O'Malley, A. K. Sood, S. N. Westin, et J. F. Liu, « Rationale for combination PARP inhibitor and antiangiogenic treatment in advanced epithelial ovarian cancer: A review », *Gynecologic Oncology*, vol. 162, n° 2, p. 482-495, août 2021, doi: 10.1016/j.ygyno.2021.05.018.

- [364] H. Li *et al.*, « A phase 1 trial of the PARP inhibitor fuzuloparib in combination with the anti-angiogenic apatinib in recurrent ovarian or triple-negative breast cancer. », *JCO*, vol. 40, n° 16_suppl, p. 5539-5539, juin 2022, doi: 10.1200/JCO.2022.40.16_suppl.5539.
- [365] B. Weigelt *et al.*, « Diverse BRCA1 and BRCA2 Reversion Mutations in Circulating Cell-Free DNA of Therapy-Resistant Breast or Ovarian Cancer », *Clin Cancer Res*, vol. 23, n° 21, p. 6708-6720, nov. 2017, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0544.
- [366] P. Bouwman *et al.*, « 53BP1 loss rescues BRCA1 deficiency and is associated with triple-negative and BRCA-mutated breast cancers », *Nat Struct Mol Biol*, vol. 17, n° 6, p. 688-695, juin 2010, doi: 10.1038/nsmb.1831.
- [367] Y. E. Choi *et al.*, « Platinum and PARP inhibitor resistance due to over-expression of microRNA-622 in BRCA1-mutant ovarian cancer », *Cell Rep*, vol. 14, n° 3, p. 429-439, janv. 2016, doi: 10.1016/j.celrep.2015.12.046.
- [368] S. Rottenberg *et al.*, « High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 105, n° 44, p. 17079-17084, nov. 2008, doi: 10.1073/pnas.0806092105.
- [369] A. Vaidyanathan *et al.*, « ABCB1 (MDR1) induction defines a common resistance mechanism in paclitaxel- and olaparib-resistant ovarian cancer cells », *Br J Cancer*, vol. 115, n° 4, p. 431-441, août 2016, doi: 10.1038/bjc.2016.203.
- [370] B. Rondinelli *et al.*, « EZH2 promotes degradation of stalled replication forks by recruiting MUS81 through histone H3 trimethylation », *Nat Cell Biol*, vol. 19, n° 11, p. 1371-1378, nov. 2017, doi: 10.1038/ncb3626.
- [371] A. Ray Chaudhuri *et al.*, « Replication fork stability confers chemoresistance in BRCA-deficient cells », *Nature*, vol. 535, n° 7612, p. 382-387, juill. 2016, doi: 10.1038/nature18325.
- [372] A. Taglialatela *et al.*, « Restoration of Replication Fork Stability in BRCA1- and BRCA2-Deficient Cells by Inactivation of SNF2-Family Fork Remodelers », *Mol Cell*, vol. 68, n° 2, p. 414-430.e8, oct. 2017, doi: 10.1016/j.molcel.2017.09.036.
- [373] S. J. Pettitt *et al.*, « Genome-wide and high-density CRISPR-Cas9 screens identify point mutations in PARP1 causing PARP inhibitor resistance », *Nat Commun*, vol. 9, n° 1, p. 1849, mai 2018, doi: 10.1038/s41467-018-03917-2.
- [374] E. Gogola *et al.*, « Selective Loss of PARG Restores PARylation and Counteracts PARP Inhibitor-Mediated Synthetic Lethality », *Cancer Cell*, vol. 33, n° 6, p. 1078-1093.e12, juin 2018, doi: 10.1016/j.ccell.2018.05.008.
- [375] Y. Du *et al.*, « Blocking c-Met-mediated PARP1 phosphorylation enhances anti-tumor effects of PARP inhibitors », *Nat Med*, vol. 22, n° 2, p. 194-201, févr. 2016, doi: 10.1038/nm.4032.

- [376] A. Tapodi *et al.*, « Pivotal role of Akt activation in mitochondrial protection and cell survival by poly(ADP-ribose)polymerase-1 inhibition in oxidative stress », *J Biol Chem*, vol. 280, n° 42, p. 35767-35775, oct. 2005, doi: 10.1074/jbc.M507075200.
- [377] P. Teng *et al.*, « Pharmacologic inhibition of ATR and ATM offers clinically important distinctions to enhancing platinum or radiation response in ovarian, endometrial, and cervical cancer cells », *Gynecol Oncol*, vol. 136, n° 3, p. 554-561, mars 2015, doi: 10.1016/j.ygyno.2014.12.035.
- [378] S. A. Yazinski *et al.*, « ATR inhibition disrupts rewired homologous recombination and fork protection pathways in PARP inhibitor-resistant BRCA-deficient cancer cells », *Genes Dev*, vol. 31, n° 3, p. 318-332, févr. 2017, doi: 10.1101/gad.290957.116.
- [379] Y. Nakagawa *et al.*, « NF- κ B signaling mediates acquired resistance after PARP inhibition », *Oncotarget*, vol. 6, n° 6, p. 3825-3839, janv. 2015.
- [380] D. S. Vinay *et al.*, « Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies », *Seminars in Cancer Biology*, vol. 35, p. S185-S198, déc. 2015, doi: 10.1016/j.semcancer.2015.03.004.
- [381] E. A. Mittendorf *et al.*, « PD-L1 Expression in Triple-Negative Breast Cancer », *Cancer Immunol Res*, vol. 2, n° 4, p. 361-370, avr. 2014, doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0127.
- [382] M. Kossai, N. Radosevic-Robin, et F. Penault-Llorca, « Refining patient selection for breast cancer immunotherapy: beyond PD-L1 », *ESMO Open*, vol. 6, n° 5, oct. 2021, doi: 10.1016/j.esmoop.2021.100257.
- [383] G. Planes-Laine *et al.*, « PD-1/PD-L1 Targeting in Breast Cancer: The First Clinical Evidences are Emerging—A Literature Review », *Cancers (Basel)*, vol. 11, n° 7, p. 1033, juill. 2019, doi: 10.3390/cancers11071033.
- [384] S. Xue *et al.*, « Relationship between expression of PD-L1 and tumor angiogenesis, proliferation, and invasion in glioma », *Oncotarget*, vol. 8, n° 30, p. 49702-49712, juill. 2017, doi: 10.18632/oncotarget.17922.
- [385] S. P. Hack, A. X. Zhu, et Y. Wang, « Augmenting Anticancer Immunity Through Combined Targeting of Angiogenic and PD-1/PD-L1 Pathways: Challenges and Opportunities », *Frontiers in Immunology*, vol. 11, 2020, Consulté le: 24 juillet 2022. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.598877>
- [386] Y. Yang *et al.*, « Programmed death ligand-1 regulates angiogenesis and metastasis by participating in the c-JUN/VEGFR2 signaling axis in ovarian cancer », *Cancer Communications*, vol. 41, n° 6, p. 511-527, 2021, doi: 10.1002/cac2.12157.
- [387] « PD-L1 Expression Is Increased in a Subset of Basal Type Breast Cancer Cells | PLOS ONE ». <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0088557> (consulté le 27 juillet 2022).

- [388] Z. Wu *et al.*, « The Synergistic Effect of PARP Inhibitors and Immune Checkpoint Inhibitors », *Clin Med Insights Oncol*, vol. 15, p. 1179554921996288, janv. 2021, doi: 10.1177/1179554921996288.
- [389] G. Morales-Guadarrama, R. García-Becerra, E. A. Méndez-Pérez, J. García-Quiroz, E. Avila, et L. Díaz, « Vasculogenic Mimicry in Breast Cancer: Clinical Relevance and Drivers », *Cells*, vol. 10, n° 7, p. 1758, juill. 2021, doi: 10.3390/cells10071758.
- [390] P. S. Kedar, D. F. Stefanick, J. K. Horton, et S. H. Wilson, « Increased PARP-1 association with DNA in alkylation damaged, PARP-inhibited mouse fibroblasts », *Mol Cancer Res*, vol. 10, n° 3, p. 360-368, mars 2012, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0477.
- [391] J. Rudolph, K. Jung, et K. Luger, « Inhibitors of PARP: Number crunching and structure gazing », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 119, n° 11, p. e2121979119, mars 2022, doi: 10.1073/pnas.2121979119.
- [392] S. Teraoka *et al.*, « Association of BRCA Mutations and BRCAness Status With Anticancer Drug Sensitivities in Triple-Negative Breast Cancer Cell Lines », *Journal of Surgical Research*, vol. 250, p. 200-208, juin 2020, doi: 10.1016/j.jss.2019.12.040.
- [393] U. V. Wesley, P. Clark, I. Sutton, J. Kuo, et R. Dempsey, « Abstract 101: Pentraxin-3 exacerbates glioblastoma invasion and angiogenesis through IL8-VEGF signaling in tumor microenvironment: PTX3 is a potential target for GBM suppression », *Cancer Research*, vol. 79, n° 13_Supplement, p. 101, juill. 2019, doi: 10.1158/1538-7445.AM2019-101.
- [394] Y. Liu *et al.*, « The association between vascular endothelial growth factor expression in invasive breast cancer and survival varies with intrinsic subtypes and use of adjuvant systemic therapy: results from the Nurses' Health Study », *Breast Cancer Res Treat*, vol. 129, n° 1, p. 175-184, août 2011, doi: 10.1007/s10549-011-1432-3.
- [395] J. K. Singh, B. M. Simões, S. J. Howell, G. Farnie, et R. B. Clarke, « Recent advances reveal IL-8 signaling as a potential key to targeting breast cancer stem cells », *Breast Cancer Research*, vol. 15, n° 4, p. 210, août 2013, doi: 10.1186/bcr3436.
- [396] B. Choi *et al.*, « Elevated Pentraxin 3 in bone metastatic breast cancer is correlated with osteolytic function », *Oncotarget*, vol. 5, n° 2, p. 481-492, janv. 2014, doi: 10.18632/oncotarget.1664.
- [397] M. J. Duffy, P. M. McGowan, N. Harbeck, C. Thomssen, et M. Schmitt, « uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies », *Breast Cancer Research*, vol. 16, n° 4, p. 428, août 2014, doi: 10.1186/s13058-014-0428-4.
- [398] A. Shibata, T. Nagaya, T. Imai, H. Funahashi, A. Nakao, et H. Seo, « Inhibition of NF-kappaB activity decreases the VEGF mRNA expression in MDA-MB-231 breast cancer cells », *Breast Cancer Res Treat*, vol. 73, n° 3, p. 237-243, juin 2002, doi: 10.1023/a:1015872531675.
- [399] « NF-kB Target Genes » NF-kB Transcription Factors | Boston University ». <https://www.bu.edu/nf-kb/gene-resources/target-genes/> (consulté le 29 juillet 2022).

- [400] P. O. Hassa et M. O. Hottiger, « PARP-1 as Novel Coactivator of NF- κ B in Inflammatory Disorders », in *Poly(ADP-Ribosyl)ation*, A. Bürkle, Éd. Boston, MA: Springer US, 2006, p. 75-90. doi: 10.1007/0-387-36005-0_8.
- [401] X. Ba *et al.*, « 8-Oxoguanine DNA glycosylase-1 augments pro-inflammatory gene expression by facilitating the recruitment of site-specific transcription factors », *J Immunol*, vol. 192, n° 5, p. 2384-2394, mars 2014, doi: 10.4049/jimmunol.1302472.
- [402] Y. Zhao, G. Feng, Y. Wang, Y. Yue, et W. Zhao, « A key mediator, PTX3, of IKK/ κ B/NF- κ B exacerbates human umbilical vein endothelial cell injury and dysfunction », *Int J Clin Exp Pathol*, vol. 7, n° 11, p. 7699-7707, oct. 2014.
- [403] M. Rathore *et al.*, « Cancer cell-derived long pentraxin 3 (PTX3) promotes melanoma migration through a toll-like receptor 4 (TLR4)/NF- κ B signaling pathway », *Oncogene*, vol. 38, n° 30, p. 5873-5889, juin 2019, doi: 10.1038/s41388-019-0848-9.
- [404] N. Yamaguchi *et al.*, « Constitutive activation of nuclear factor- κ B is preferentially involved in the proliferation of basal-like subtype breast cancer cell lines », *Cancer Science*, vol. 100, n° 9, p. 1668-1674, 2009, doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01228.x.
- [405] Y. Shi, F. Zhou, F. Jiang, H. Lu, J. Wang, et C. Cheng, « PARP inhibitor reduces proliferation and increases apoptosis in breast cancer cells », *Chin J Cancer Res*, vol. 26, n° 2, p. 142-147, avr. 2014, doi: 10.3978/j.issn.1000-9604.2014.02.13.
- [406] X. Mao *et al.*, « Inhibitors of PARP-1 exert inhibitory effects on the biological characteristics of hepatocellular carcinoma cells in vitro », *Mol Med Rep*, vol. 16, n° 1, p. 208-214, juill. 2017, doi: 10.3892/mmr.2017.6568.
- [407] M. I. Rodríguez *et al.*, « PARP-1 Regulates Metastatic Melanoma through Modulation of Vimentin-induced Malignant Transformation », *PLoS Genet*, vol. 9, n° 6, p. e1003531, juin 2013, doi: 10.1371/journal.pgen.1003531.
- [408] M.-R. Xu *et al.*, « Brucine Suppresses Vasculogenic Mimicry in Human Triple-Negative Breast Cancer Cell Line MDA-MB-231 », *Biomed Res Int*, vol. 2019, p. 6543230, janv. 2019, doi: 10.1155/2019/6543230.
- [409] A. Serwe, K. Rudolph, T. Anke, et G. Erkel, « Inhibition of TGF- β signaling, vasculogenic mimicry and proinflammatory gene expression by isoxanthohumol », *Invest New Drugs*, vol. 30, n° 3, p. 898-915, juin 2012, doi: 10.1007/s10637-011-9643-3.