



HAL
open science

Cancer du sein triple négatif: étude des mécanismes d'échappement et de récurrence liés au traitement de chimiothérapie

Marie Winter

► **To cite this version:**

Marie Winter. Cancer du sein triple négatif: étude des mécanismes d'échappement et de récurrence liés au traitement de chimiothérapie. Cancer. Université de Lille, 2022. Français. NNT : 2022ULILS102 . tel-04379282

HAL Id: tel-04379282

<https://theses.hal.science/tel-04379282>

Submitted on 8 Jan 2024

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.

UNIVERSITE DE LILLE
LABORATOIRE CANTHER UMR9020 CNRS – UMR1277 INSERM

THESE de doctorat

Pour l'obtention du titre de
Docteur de l'université de Lille
Ecole doctorale biologie-santé de Lille (ED-446)
Aspect moléculaire et cellulaire de la biologie

**Cancer du sein triple négatif : étude des mécanismes
d'échappement et de récurrence liés au traitement de
chimiothérapie**

Présenté et soutenue publiquement par
Marie Winter
Le 10 juin 2022

Jury

Présidente : Pr. Corinne Abbadie (Université de Lille)

Rapporteurs : Dr. Catherine Guette (Université d'Angers)
Pr. Hubert Hondermarck (Université de Newcastle)

Examineurs : Dr. Caroline Mysiorek (Université de Lens)
Dr. Jérôme Kluza (Université de Lille)

Directrice de thèse : Pr. Xuefen Le Bourhis (Université de Lille)

Remerciements

Je remercie l'INSERM et la région Hauts de France pour le financement de mes trois années de thèse ainsi que la fondation ARC pour le financement de la quatrième année.

Je remercie le **Professeur Corinne Abbadie**, le **Professeur Hubert Hondermarck**, le **Docteur Catherine Guette**, le **Docteur Jérôme Kluz**, le **Docteur Caroline Mysiorek** d'avoir accepté de relire et d'évaluer mes travaux de thèse. Egalement, je remercie le Professeur Hubert Hondermarck et le Docteur Jérôme Kluz pour leurs précieux conseils durant mes comités de suivi individuel. Un merci particulier au Docteur Jérôme Kluz, pour m'avoir encadrée et aidée sur le projet métabolisme.

Je remercie le **Professeur Xuefen Le Bourhis** pour son encadrement tout au long de ma thèse. Je vous remercie pour votre investissement durant mes 4 années de thèse et aussi pour m'avoir fait confiance dans l'avancée du projet. Nos échanges scientifiques, toujours très instructifs, m'ont beaucoup apporté. Vous m'avez transmis votre rigueur et votre sens du détail qui m'ont poussée à toujours aller plus loin dans l'amélioration de la forme et du fond.

Un grand merci à l'ensemble des membres de l'équipe : **Dr. Valérie Chopin** pour m'avoir encadrée durant mon master 2 recherche et donné l'opportunité de poursuivre en thèse ; **Pr. Eric Adriaenssens** et le **Dr. Roland Bourette** pour votre investissement durant l'expérimentation animaux sur les souris ; **Pr. Robert-Alain Toillon** pour vos conseils et pour m'avoir permis d'aborder l'enseignement ; **Dr. Chann Lagadec** pour vos conseils sur les cellules souches mais surtout pour votre bonne humeur ; **Pr. Pierre-Olivier Angand** et **Pamela Völkel** pour vos conseils et votre accompagnement dans la réalisation de l'expérimentation sur le modèle du poisson zèbre ; **Dr. Mohamed Elati** et **Dr. Dimitra Gkika** pour vos conseils durant les réunions hebdomadaires. Merci à **Valérie Cendré** pour votre patience dans les commandes et votre rire communicatif. Merci à **Isabelle** pour ton aide indispensable pour faire tourner rond le laboratoire et **Véronique** pour ta bonne humeur et ta gentillesse.

Merci au membre de l'équipe de l'IRCL, **Dr. Samuel Meignan**, **Dr. Alessandro Furlan**, **Nicole**, **Christine**, **Mélanie**, **Andria** et **Lisa** pour votre accueil, votre bonne humeur et votre aide dans les différentes expérimentations que j'ai pu mener grâce à vous. Je remercie aussi le **Dr. Samuel Meignan** pour votre aide durant la préparation au concours de thèse. Merci aux membres de l'équipe du Dr. Jérôme Kluz, spécialement **William** et **Quentin**, pour votre accueil chaleureux, votre bonne humeur et votre aide pour l'avancée du projet. Merci à **Nathalie Jouy** et **Emilie Floquet** pour votre aide dans les analyses de cytométrie en flux.

Mes remerciements vont aussi aux étudiants du laboratoire : **Sarah** tu m'accompagnes depuis la première année de master avec ta bonne humeur et ton sourire. Nos conversations, qu'elles concernent ou non la science, ont toujours été très fructueuses avec de grands

moments de rire (surtout le week-end). Je te remercie surtout pour ton soutien et je te souhaite le meilleur pour tes projets futurs auréolés de nombreux succès (n'en doute jamais petit caliméro). La douce **Amina** merci pour ton soutien, ton écoute et ta gentillesse. Reste positive, tout finit un jour par donner quelque chose. Je te souhaite le meilleur pour tes projets futurs. **Marie D** et **Ludivine**, merci pour votre dynamisme et la cohésion au sein du labo. **Mathilde, Evodie, Julien, Mayar, Alexandre, Thomas et Geoffrey** merci pour votre bonne humeur et votre enthousiasme au laboratoire. Je vous souhaite à tous une belle réussite autant personnelle que professionnelle. Bon courage aux étudiants de master 2 **Anaïs, Flavie, Eloïse, Joséphine, Mariette, Kékély**, je vous souhaite bon courage pour la poursuite du master 2 et, je l'espère, la thèse.

Cette folle aventure de thèse n'aurait pas été possible sans le soutien de mes amis et ma famille. Merci à **Caroline** de m'accompagner dans tous les moments de la vie (depuis le berceau je crois qu'on peut dire ça...). Ton dynamisme, nos fous rires et ton soutien m'ont permis de passer au-dessus de beaucoup d'épreuves. Merci à **Perrine** pour m'avoir fait sortir de ma coquille, nos parties de rigolade et nos grandes conversations de tout et (surtout) de rien. Sans vous deux beaucoup de choses n'auraient pas été ce qu'elles sont aujourd'hui.

Merci à **ma belle-famille**, pour m'avoir intégré à leur tribu et leur joie de vivre. Merci à **ma famille** d'avoir toujours été là pour moi. Merci à mes grand parents, **Bernadette, Claude, Raymonde, Geneviève et Michel** d'avoir toujours cru en moi, m'avoir soutenue et d'avoir écouté mes grandes digressions pour expliquer un tout petit truc. Merci à ma **Marraine** pour m'avoir accompagnée et soutenue dans mes projets, à mes cousins et cousines pour avoir rendu la vie plus joyeuse et mouvementée surtout **Gauthier** a coup de surnoms débiles et d'enquiquinage en règle.

Merci à toi **Maman** pour m'accompagner dans tous les grands événements de la vie ainsi que dans ma construction personnelle. Merci à **Hélène** pour ta très précieuse aide, ton écoute, ton goût du voyage et de la nature qui m'ont permis de m'évader. Merci de permettre la cohésion dans notre famille de globetrotters. Merci à **Clément** pour ton approche zen des choses cela m'a appris à prendre le recul nécessaire pour trouver la solution. Merci à toi **Papa** pour m'avoir poussée et cru en moi depuis toujours. Ta présence m'a permis d'atteindre mes objectifs et de surmonter beaucoup d'épreuves.

Et surtout merci à la personne sans qui je n'aurais pu mener mon projet au bout. Merci **mon Alexis**. Merci pour ton rire si communicatif qu'il met de la joie partout (et me fait rire depuis la pièce d'à côté), ton écoute. Merci de croire en moi et de rendre ma vie meilleure. Merci de faire de mon futur un monde de possibles.

Résumé

Le cancer du sein triple négatif (TNBC) est caractérisé par l'absence d'expression des récepteurs aux hormones (œstrogènes et progestérones) ainsi que l'absence de surexpression d'HER2. Le traitement standard de chimiothérapie utilise des anthracyclines et un taxane. A ce jour, il est la meilleure solution thérapeutique pour le TNBC. Pourtant, 50 % des patientes sont en rechute en moyenne 2 ans après le traitement. Dans la littérature, l'échec thérapeutique s'explique par l'existence de la plasticité cellulaire qui opère à différents niveaux (phénotypique, métabolique et moléculaire).

Mon projet de thèse avait comme objectif d'étudier le rôle de la plasticité cellulaire chimio-induite dans l'échappement thérapeutique du TNBC. Pour cela, nous avons généré deux types de lignées persistantes à partir des cellules natives MDA-MB-231 et SUM159-PT. Ces cellules ont été exposées à une combinaison d'agents cytotoxiques (anthracycline et taxane) administrés de façon séquentielle reproduisant le protocole utilisé en clinique. Le premier modèle est dit de court terme avec un traitement de 96 heures suivies de 96 heures de repos avant l'analyse. Les cellules persistantes à ce traitement montrent un phénotype agressif avec l'augmentation du potentiel invasif et du caractère souche. Ces changements sont associés à la surexpression de la vimentine et de marqueurs du caractère souche (nanog, CD49f). Dans ces cellules, l'inhibition de la vimentine diminue le caractère agressif et augmente la sensibilité aux agents de chimiothérapie. Ces données montrent que la vimentine pourrait être une piste thérapeutique intéressante dans le TNBC. Le second modèle reproduit le traitement administré aux patientes en traitant les cellules durant 18 semaines. Les cellules persistantes issues de ce traitement montrent un phénotype agressif *in vitro* et *in vivo*. Nous avons observé que les cellules MDA-MB-231 persistantes avaient une augmentation de la respiration mitochondriale (OXPHOS) associée à une diminution de la sensibilité aux drogues. De façon surprenante, l'OXPHOS et la sensibilité aux drogues des cellules SUM159-PT persistantes sont semblables aux cellules contrôles. La caractérisation des cellules persistantes a été complétée par des approches de protéomique et métabolomique. Les fonctions des protéines identifiées comme augmentées dans les cellules persistantes sont associées avec la croissance et l'invasion cellulaire. L'analyse métabolomique des cellules MDA-MB-231, révèle l'augmentation des produits de la glycolyse et du cycle de Krebs. Ces résultats suggèrent que l'OXPHOS pourrait jouer un rôle dans l'échappement thérapeutique et l'agressivité tumorale. De façon intéressante, la réduction de l'activité de l'OXPHOS à l'aide d'inhibiteur direct (tigécycline, inhibiteur de la traduction des protéines mitochondriales) ou indirect (UK-5099, empêchant l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie) augmente la sensibilité aux drogues et diminue le potentiel invasif aussi bien des cellules persistantes que contrôles.

En conclusion, par une approche originale nous avons démontré que les cellules persistantes au traitement de chimiothérapie augmentent leur potentiel invasif et prolifératif. Cependant, les mécanismes moléculaires diffèrent en fonction de la durée d'exposition aux drogues. Il serait donc intéressant d'approfondir ce travail afin de mieux comprendre la dynamique des événements moléculaires menant à la l'échappement thérapeutique.

Abstract

Triple negative breast cancer (TNBC) is characterized by the lack of hormone receptors (estrogen and progesterone) as well as the absence of HER2 protein. Standard chemotherapy treatment uses anthracyclines and a taxane. To date, it is the best therapeutic solution for TNBC. However, 50% of patients relapse on average 2 years after this treatment. In the literature, therapeutic failure is explained by the existence of cellular plasticity which operates at different levels (phenotypic, metabolic and molecular).

My thesis project aimed to study the role of chemo-induced cellular plasticity in the therapeutic escape of TNBC. For this, we generated two persistent cell lines MDA-MB-231 and SUM159-PT cells, which were exposed to a combination of cytotoxic agents (anthracyclines and taxane) administered sequentially, reproducing the protocol used in the clinic.

The first “short-term” model is established with 96 hours of treatment followed by 96 hours of rest before analysis. Cells persisting to this treatment show an aggressive phenotype with increased invasive potential and stem characters. These changes are associated with the overexpression of vimentin and stemness markers (nanog, CD49f). In these cells, vimentin inhibition decreases aggressiveness and increases sensibility to chemotherapy agents. These data suggest vimentin could be an therapeutic target in TNBC.

The second model reproduces the treatment administered to patients by treating the cells for 18 weeks. The cells that persist from this treatment show an aggressive phenotype *in vitro* and *in vivo*. Moreover, persistent MDA-MB-231 cells exhibit increased mitochondrial respiration (OXPHOS) associated with decreased drug sensitivity. By contrast, OXPHOS and drug sensitivity of persistent SUM159-PT cells are similar to control cells. The characterization of persistent cells was completed by proteomics and metabolomics. Proteins identified as increased in persistent cells are associated with cell growth and invasion. The metabolomic analysis of MDA-MB-231 cells reveals an increase in products of glycolysis and the Krebs cycle. These results suggest that OXPHOS could play a role in therapeutic escape and tumor aggressiveness. Interestingly, the reduction of the OXPHOS activity by using a direct inhibitor (tigecycline, mitochondrial protein translation inhibitor) or indirect (UK-5099, preventing the entry of pyruvate into the mitochondria) increases drug sensitivity and decreases the invasive potential of both persistent and control cells.

In conclusion, by an original approach we have demonstrated that TNBC cells that persist to chemotherapy treatment exhibit enhanced invasive and proliferative potential. However, the underlying molecular mechanisms differ depending on the duration of drug exposure. It would be interesting to deepen this work in order to better understand the molecular events leading to therapeutic escape.

Sommaire

Remerciements	3
Résumé	5
Abstract	6
Sommaire	7
Sommaire des figures	11
Sommaire des tableaux	13
Sommaire des annexes	13
Abréviations et acronymes	15
Introduction	19
A. Le cancer du sein	20
1. La glande mammaire	20
2. Généralités sur le cancer du sein	21
3. Classification moléculaire du cancer du sein	22
4. Pronostic clinique du cancer du sein triple négatif	24
5. Le traitement de chimiothérapie dans le cancer du sein triple négatif	25
B. Les mécanismes cellulaire et moléculaire impliqués dans la rechute du cancer du sein triple négatif suite au traitement de chimiothérapie	26
1. Le rôle de la dormance cellulaire dans la récurrence tumorale	26
2. Le rôle de la plasticité cellulaire dans la récurrence tumorale	28
i. Les transitions épithélio-mésenchymateuse et mésenchymo-épithéliale dans la rechute post-traitement	28
ii. Le statut hybride dans la récurrence tumorale	30
iii. Les cellules souches dans la rechute tumorale	31
3. Régulation moléculaire de la plasticité cellulaire	33
i. Les facteurs pro-inflammatoires et les vésicules extracellulaires	33
ii. Les voies de signalisation majeures	35
iii. Les facteurs de transcription c-MYC, HIF et NANOG en tant que régulateurs de la plasticité cellulaire	40

C.	La reprogrammation métabolique impliqué dans la rechute du cancer du sein triple négatif suite au traitement de chimiothérapie	43
1.	Description générale des voies métaboliques énergétiques	43
2.	La reprogrammation métabolique dans le TNBC	45
3.	La reprogrammation métabolique favorise la récurrence dans le TNBC	47
i.	La reprogrammation métabolique durant le processus métastatique	47
ii.	La reprogrammation métabolique dans les CSC	49
iii.	Le métabolisme énergétique hybride	50
4.	La reprogrammation métabolique favorise l'échappement au traitement de chimiothérapie dans le TNBC	50
	Problématique et objectifs de la thèse	52
	Matériels et méthodes	55
A.	Culture cellulaire	56
B.	Protocoles de traitement de chimiothérapie pour l'obtention des cellules persistantes au traitement de court ou de long terme	56
1.	Détermination de l'IC50 des drogues de chimiothérapie	56
2.	Évaluation de la dose IC50 par test de viabilité au cristal violet	57
3.	Protocole de court terme	57
4.	Protocole de long terme	58
C.	Caractérisation phénotypique des cellules persistantes	59
1.	Mesure de la croissance des cellules persistantes et contrôles au traitement de court terme	59
2.	Test de clonogénicité	59
3.	Croissance en matrice 3D (Matrigel®)	59
4.	Évaluation du cycle cellulaire	60
5.	Évaluation de la résistance à l'anoikis des cellules persistantes et contrôles issues du traitement de long terme	60
6.	Mesure du potentiel invasif <i>in vitro</i> en transwell	60
7.	Test de formation de sphères	61
D.	Etudes <i>in vivo</i>	61
1.	Le modèle du poisson zèbre, test d'invasion	61
2.	Le modèle de la souris SCID, test de tumorigenèse	62
3.	Remise en culture des cellules MDA-MB-231 persistantes et contrôles dissociées de la tumeur primaire	62
E.	Étude du métabolisme énergétique des cellules persistantes au traitement de long terme	63
1.	Mesure de l'OXPPOS et de la glycolyse	63
2.	Étude de la masse mitochondriale par cytométrie de flux	65

3.	Étude du potentiel de membrane mitochondriale	66
4.	Établissement de l'IC50 des inhibiteurs ciblant le métabolisme oxydatif de la mitochondrie	66
5.	Co-traitement des drogues de chimiothérapie épirubicine et paclitaxel avec les inhibiteurs du métabolisme oxydatif mitochondrial	66
F.	Analyse transcriptionnelle, extraction des ARN, rétrotranscription et PCR en temps réel (qPCR)	67
1.	Extraction des ARN à partir des lignées cellulaires de cancer du sein.....	67
2.	Rétrotranscription des ARN	67
3.	PCR en temps réel ou qPCR	67
4.	Modulation de l'expression de la vimentine dans les cellules MDA-MB-231	68
G.	Analyse de l'expression protéique	69
1.	Western blot	69
2.	Phénotypage par cytométrie de flux	69
H.	Analyse par spectrométrie de masse	71
1.	Métabolomique	71
2.	Protéomique	72
3.	Analyse bio-informatique dans les bases de données publique	73
I.	Analyse statistique	73
	Résultats	74
A.	Caractérisation phénotypique et moléculaire des cellules persistantes au traitement de court terme	75
I.	Caractérisation phénotypique des cellules TNBC persistantes au traitement de chimiothérapie	75
II.	Caractérisation moléculaire des cellules TNBC persistantes au traitement de chimiothérapie	79
III.	Rôle de la vimentine dans l'agressivité tumorale et de la réponse au traitement de chimiothérapie	83
B.	Caractérisation phénotypique et moléculaire des cellules persistantes au traitement de long terme	87
I.	Adaptation phénotypique des cellules persistantes au traitement de chimiothérapie	87
II.	Les changements moléculaires observés dans les cellules persistantes	97
III.	Les modifications du métabolisme énergétique acquis par les cellules persistantes	107
IV.	Le rôle du métabolisme énergétique dans l'agressivité tumorale et la réponse aux drogues de chimiothérapie	117

V. Le métabolisme énergétique et son influence dans la réponse au traitement de chimiothérapie des cellules natives MCF-7 et MDA-MB-468	127
Discussion et perspectives	133
A. Le rôle de la vimentine dans l'agressivité tumorale	135
B. L'implication de l'OXPPOS dans l'invasion cellulaire et la réponse au traitement de chimiothérapie	138
C. Les changements d'expression protéique des cellules persistantes au traitement de chimiothérapie	142
D. Inconvénient et apport de notre modèle d'étude de la persistance au traitement	145
Bibliographie	149
Annexes	175

Sommaire des figures

Figure 1 : Les différents compartiments cellulaires du canal mammaire.	20
Figure 2 : Classification moléculaire et histologique du cancer du sein.	23
Figure 3 : Illustration des changements cellulaires chimio-induits.	32
Figure 4 : Les facteurs pro-inflammatoires et vésicules extracellulaires régulateurs de la plasticité cellulaire.	35
Figure 5 : Illustration des voies de signalisation majeures régulatrices de la plasticité cellulaire.	39
Figure 6 : Illustration des gènes cibles des facteurs de transcription c-MYC, HIF et NANOG dans la régulation de la plasticité cellulaire	42
Figure 7 : Illustration du métabolisme énergétique	44
Figure 8 : Les changements du métabolisme énergétique dans le cancer du sein triple négatif.	47
Figure 9 : Schéma du protocole d'établissement du modèle de cellules persistantes de court terme.	57
Figure 10 : Schéma du protocole d'établissement du modèle de cellules persistantes de long terme.	58
Figure 11 : Schéma des paramètres métabolique analysés au Seahorse.	65
Figure 12 : Caractérisation phénotypique des cellules TNBC persistantes.	76
Figure 13 : Mesure de l'invasion des cellules MDA-MB-231 persistantes <i>in vivo</i>	77
Figure 14 : Expression des marqueurs de cellules souches de cancer du sein.	79
Figure 15 : Expression des marqueurs de la TEM dans les cellules TNBC.	81
Figure 16 : Effets de l'inhibition de la vimentine dans les cellules MDA-MB-231 persistantes.	83
Figure 17 : Effets de la surexpression de la vimentine dans les cellules MDA-MB-231 natives.	85
Figure 18 : Etude de la croissance des cellules persistantes.....	88
Figure 19 : Etude de la sensibilité aux drogues de chimiothérapie des cellules persistantes.	90
Figure 20 : Evaluation du potentiel métastatique des cellules persistantes <i>in vitro</i>	92
Figure 21 : Etude du caractère souche des cellules persistantes.	93
Figure 22 : Suivi de la croissance tumorale et détection des cellules métastatiques dans un modèle de xénogreffe en souris SCID.	95
Figure 23 : Histogramme représentant le pourcentage de patientes de la cohorte CPTAC 2020, ayant une expression augmentée pour la cible identifiée dans les cellules persistantes. ...	98
Figure 24 : <i>COL1A1</i> , <i>MRPL41</i> , <i>NQO1</i> , <i>SNTB2</i> , <i>SPR</i> et <i>TSTA3</i> sont associés à un risque élevé de rechute et/ou de formation de métastase dans le cancer du sein triple négatif.	101
Figure 25 : Le niveau de transcrite de <i>TSTA3</i> est associé à un mauvais pronostic clinique dans le cancer du sein.	103

Figure 26 : Le haut niveau d'ARNm <i>TSTA3</i> est associé à la rechute et à l'absence de réponse au traitement de chimiothérapie dans le cancer du sein triple négatif.	104
Figure 27 : Recherche des protéines interagissant avec <i>TSTA3 in silico</i>	105
Figure 28 : Etude de l'expression et de la valeur pronostique de <i>GMPS</i> , <i>RCN1</i> et <i>GLRX3</i> dans le cancer du sein triple négatif.	106
Figure 29 : Caractérisation du métabolisme énergétique des cellules persistantes <i>in vitro</i> et <i>ex vivo</i>	108
Figure 30 : Organisation énergétique des cellules persistantes et contrôles.	109
Figure 31 : Mesure de la masse mitochondriale et du potentiel de membrane mitochondrial.	110
Figure 32 : Etude moléculaire des changements métaboliques observés dans les cellules MDA-MB-231 persistantes.	114
Figure 33 : Etude fonctionnelle du rôle du pyruvate et de la glutamine dans le maintien de l'OXPPOS des cellules MDA-MB-231 persistantes et contrôles.	115
Figure 34 : Evaluation de l'effet des inhibiteurs de l'OXPPOS sur la prolifération des cellules persistantes et contrôles.	118
Figure 35 : Concentration de tigécycline suffisante pour diminuer l'OXPPOS sans impacter la croissance cellulaire des cellules persistantes et contrôles.	119
Figure 36 : Concentration d'UK-5099 suffisante pour diminuer l'OXPPOS sans impacter la croissance cellulaire des cellules persistantes et contrôles.	120
Figure 37 : La réduction de l'OXPPOS diminue le potentiel invasif des cellules persistantes et contrôles.	121
Figure 38 : Effet de la tigécycline sur la sensibilité des cellules persistantes ou contrôles à l'épirubicine et au paclitaxel.	122
Figure 39 : Effet de l'UK-5099 sur la sensibilité des cellules persistantes ou contrôles à l'épirubicine ou au paclitaxel.	124
Figure 40 : Effets de la tigécycline et de l'UK-5099 sur la sensibilité des cellules persistantes et contrôles au traitement combiné et séquentiel de chimiothérapie.	125
Figure 41 : Caractérisation métabolique des cellules MCF-7 et MDA-MB-468.	127
Figure 42 : Organisation énergétique des cellules MCF-7 et MDA-MB-468.	128
Figure 43 : Effets de la tigécycline et de l'UK-5099 sur la prolifération des cellules MCF-7 et MDA-MB-468.	129
Figure 44 : Effets de la tigécycline et de l'UK-5099 sur le potentiel invasif des cellules MCF-7 et MDA-MB-468.	129
Figure 45 : Mesure de la sensibilité aux agents de chimiothérapie des cellules MCF-7 et MDA-MB-468.	130
Figure 46 : Effets de la tigécycline et de l'UK-5099 sur la sensibilité des cellules MCF-7 et MDA-MB-468 à l'épirubicine mais pas au paclitaxel.	131
Figure 47 : Effets de la tigécycline et de l'UK-5099 sur la sensibilité des cellules MCF-7 et MDA-MB-468 au traitement combiné et séquentiel de chimiothérapie.	132

Sommaire des tableaux

Tableau 1 : Liste des séquences des amorces d'intérêt utilisées pour la qPCR.	68
Tableau 2 : Liste des anticorps utilisés dans l'analyse par Western blot.	69
Tableau 3 : Liste des anticorps utilisés dans l'analyse par cytométrie de flux.	71
Tableau 4 : Concentration en glucose et glutamine marqués ou non au Carbone ¹³ des milieux de culture utilisés pour l'analyse métabolomique.	72
Tableau 5 : Analyse des organes envahis par des cellules cancéreuses dans un modèle de xénogreffe en souris SCID.	96
Tableau 6 : Nombre de protéines dont l'expression est augmentée ou diminuée dans les cellules MDA-MB-231 ou SUM159-PT persistantes comparées à leur contrôle pour chaque condition de culture.	97
Tableau 7 : Protéines identifiées dans les cellules persistantes dont l'expression est vue comme augmentée dans au moins 20% des patientes de la cohorte « CPTAC, 2020 »(cbioportal, n=122).	99
Tableau 8 : Coefficient de corrélation de Pearson issu de l'étude de Mertins et collaborateurs.	102
Tableau 9 : Comparaison des niveaux de protéines du complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale entre les cellules persistantes et contrôles.	111

Sommaire des annexes

Annexe 1 : Liste des protéines dont l'expression est augmentée d'au moins 100% dans les MDA-MB-231 persistantes comparés aux cellules contrôles. Les cellules sont cultivées en présence de 2% de sérum	176
Annexe 2 : Liste des protéines dont l'expression est augmentée d'au moins 100% dans les MDA-MB-231 persistantes comparés aux cellules contrôles. Les cellules sont cultivées en présence en absence de sérum	178
Annexe 3 : Liste des protéines dont l'expression est augmentée d'au moins 100% dans les SUM159-PT persistantes comparés aux cellules contrôles. Les cellules sont cultivées en présence de 2% de sérum	179
Annexe 4 : Liste des protéines dont l'expression est augmentée d'au moins 100% dans les SUM159-PT persistantes comparés aux cellules contrôles. Les cellules sont cultivées en présence en absence de sérum	182
Annexe 5 : Fonctions moléculaires, processus biologiques et voies de signalisation majeures enrichies dans les cellules MDA-MB-231 persistantes. Les cellules sont cultivées en présence de 2% de sérum	184
Annexe 6 : Fonctions moléculaires, processus biologiques et voies de signalisation majeures enrichies dans les cellules MDA-MB-231 persistantes. Les cellules sont cultivées en présence en absence de sérum	186
Annexe 7 : Fonctions moléculaires, processus biologiques et voies de signalisation majeures enrichies dans les cellules SUM159-PT persistantes. Les cellules sont cultivées en présence de 2% de sérum	188

Annexe 8 : Fonctions moléculaires, processus biologiques et voies de signalisation majeures enrichies dans les cellules MDA-MB-231 persistantes. Les cellules sont cultivées en présence en absence de sérum	190
Annexe 9 : Analyse de réseau d'interactions protéiques. L'analyse est réalisée à l'aide des algorithmes IPCA et ClusterOne de la suite Cytocluster du logiciel cytoscape. ...	192
Annexe 10 : Liste des métabolites identifiés dans les cellules MDA-MB-231 persistantes et contrôles.	193

Abréviations et acronymes

A

ABAT : γ -aminobutyrate aminotransferase
ABC : ATP-binding cassette
ABCB1 : ATP Binding cassette subfamily B member 1
Acetyl-CoA : acetyl co-enzyme A
ADN : acide désoxyribonucléique
AG : acide gras
Akt : RAC-alpha serine/threonine-protein kinase
AKR1B1 : aldo keto reductase 1 member B1
ALDH : Aldehyde dehydrogenase 1 family member
ANNOVA : analysis of variance
AR : androgen receptor
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ASNS : asparagine synthetase
ATG : autophagy-related genes
ATM : ataxia telengectasia mutated
ATP : adenosine tri-phosphate

B

BCA : Bicinchonnic acid
BCL2 : B-cel lymphoma 2
BCLXL : B-cell lymphoma extra large
bFGF : basic fibroblaste growth factor
BL : basal-like
BPTES : Bis-2(5-phenylacetamido-1,3,4-thialdiazol-2-yl)ethyl
BRAF : B-Raf proto oncogene, serine/threonine kinase
BRCA -1/-2 : breast cancer -1/-2
BSA : bovine serum albumin

C

C¹³ : carbone 13
C¹² : carbone 12
CAF : cancer associated fibroblaste
CCL : C-C motif chemokine ligand
CCT : cellules circulantes tumorales

CD : cluster of differentiation
CD49f : integrin α 6
CDH1 : cadherin 1
CDK : cycline dependent kinase
CK : cytokeratin
CO₂ : dioxyde de carbone
COASY : Coenzyme A synthase
COL1A1 : collagen type 1 alpha 1 chain
CPT : carnitine palmitoyltransferase
CPTAC : clinical proteomic tumor analysis consortium
CSC : cellules souche cancéreuses
CTL : contrôle
CXCL : C-X-C motif chemokine ligand
CXCR : C-X-C motif chemokine receptor

D

2-DG : 2-désoxyglucose
3D : 3 dimensions
DMFS : disease metastasis free survival

E

E : épithéliale
E2F1 : E2F transcription factor 1
EBCTCG : Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group
ECAR : extracellular consumption acidification rate
ECP : Epiruribicine / Cyclophosphamide / Paclitaxel
EDTA : acide éthylènediaminetétra acétique
EFHD2 : EF-Hand domain family member D2
EGF : endothelial growth factor
EGRF : epidermal growth factor receptor
ER : œstrogen receptor
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase
EpCAM : Epithelial cell adhesion molecule
ETC : electron transporter chain

F

F1,6BP : fructose-1,6-bisphosphate
FADH₂ : reduced flavine adenine dinucleotide
FAK : focal adhesion kinase
FASN : fatty acid synthase
FBP : fructose-bisphosphatase
FCCP : mesoxalonitrile-4-trifluoromethoxyphenylhydrazone
FCS : foetal calf serum
FOXA1 : Forkhead box A1
FSC : forward scatter

G

3GP : 3-phosphoglyceric acid
G3P : glyceraldehyde-3-phosphate
G6P : Glucose-6-Phosphate
G6PD : Glucose-6-Phosphate dehydrogenase
GABA : γ -aminobutyrate aminotransferase
GAPDH : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GATA3 : GATA binding protein 3
Glc : glucose
Gln : glutamine
GLOBOCAN : Global cancer observatory
GLRX3 : glutaredoxin 3
GLUT : glucose transporter
GLS : glutaminase
GM-CSF : granulocyte colony stimulating factor
GMPS : guanine monophosphatase synthase
GSH : glutathione synthase
GSK3 β : glycogene synthase kinase 3 bêta

H

HDAC6 : histone deacetylase 6
HER2 : Human epidermal growth factor 2
HK2 : Hexokinase 2
HIF : Hypoxia inducible factors
HMGA2 : high mobility group AT-hook 2

HRP : horseradish peroxidase

I

IC50 : concentration inhibitrice médiane
IFN- γ : interferon gamma
IGF : insulin growth factor
IL : interleukine
IM : immune-modulatory
INCa : Institut national du cancer
IPCA : identifying protein complex algorithm

J

JAK : Janus kinase
JNK : c-Jun N-terminal kinase

K

α -KG : alpha ketoglutarate
KLF4 : Kruppel like factor 4

L

LAR : luminal androgen receptor
LDH : lactate déshydrogénase
LSR -3D : large-scale single-cells resolution 3D

M

M : mesenchymal/mésenchymateux
MAML1 : mastermind like transcriptional coactivator 1
MAP2K4 : mitogen activated protein kinase kinase 2
MAPK : mitogen-activated protein kinase
MB : membrane basale
MCL1 : Myeloid cell leukemia sequence 1
MCT : monocarboxylase transporter
ME1 : Malic enzyme 1
miRNA : microARN
MKP : MAPK phosphatase
MMP : matrix metallopeptidase

MPC : Mitochondrial Pyruvate Carrier
MRPL41 : mitochondrial ribosomal protein
L41
MSL : mesenchymal stem like
mTOR : mammalian Target Of Rapamycin
c-MYC : Myelocytomatosis oncogene

N

NADH : nicotinamide adenine dinucleotide
hydrogen
NADPH : nicotinamide adenine
dinucleotide phosphate
NCID : Notch intracellular domain
NF1 : Neurofibromin 1
NF- κ B : nuclear factor-kappa B
NQO1 : NADPH quinone dehydrogenase 1

O

OAA : oxaloacetic acid
OAG : β -oxydation des acides gras
OCT4 : octamer binding transcription factor
4
OCR : oxygen consumption rate
OIS : oncogene-induced senescence
ONECUT2 : one cut homeobox 2
OVOL : Ovo like zinc finger
OXPHOS : oxidative phosphorylation

P

3-PHP : phosphohydroxypyruvate
PAF : paraformaldéhyde
PARP : poly(ADP-ribose) polymerase
PBS : phosphate buffer salin
pCR : patient complete response
PCR : polymérase chain reaction
PDC : Pyruvate Dehydrogenase Complexe
PDH : Pyruvate DeHydrogenase
PDK : pyruvate dehydrogenase kinase
PDL-1 : Programmed cell death ligand 1
PDX : Patient Derived Xenograft
PEP : phosphoenolpyruvic acid
PFK : phosphofructokinase

PFKFB : 6-phosphofructo-2-
kinase/fructose-2,6-bisphosphatase
PGC1- α : peroxisome proliferator activated
receptor gamma coactivator 1 alpha
PHGDH : phosphoglycerate dehydrogenase
PI3K : PhosphoInositide 3 Kinase
PIK3CA : phosphatidylinositol-4,5-
biphosphate 3-kinase catalytic subunit
PIP3 : phosphoinositide 3-phosphate
PKM2 : Pyruvate Kinase 2
Poly-hema : Poly(hydroxyethyl
methacrylate
PPP : pentose phosphate pathway
PR : progesterone receptor
PTEN : Phosphatase and tensin homolog
PSAT1 : phosphoserine aminotransferase 1
Pyk2 : protein tyrosine kinase 2
Pyr : pyruvate

Q

qPCR : quantitative polymerase chain
reaction

R

RAF : raf proto oncogene, serine/threonine
kinase
RAS : RAS proto-oncogene, GTPase
RB1 : RB transcriptional corepressor 1
RCN1 : reticulocalbin 1
RD : residual disease
RH : récepteurs aux hormones
RFS : recurrence free survival
ROS : reactive oxygen species
RPLP0 : ribosomal protein lateral stalk
subunit 0
RTK : receptor tyrosine kinase

S

SASP : senescence-associated secretome
phenotype
SCID : severe combined immunodeficient
SFU : sphere forming unit

SHP2 : Src Homology Phosphotyrosine Phosphatase 2
SLC : solute carrier family
SLUG : Snail family transcriptional repressor 2
SMAD : SMAD family member
SNAIL : Snail family transcriptional repressor 1
SNTB2 : syntrophin beta 2
SOX2 : SRY-box transcription factor 2
SPR : sepiapterin reductase
SRC : proto-oncogene tyrosine kinase Src
SSEA4 : stage-specific embryonic antigen 4
STAT : Signal Transducer and Activators of Transcription
STK11 : sérine/thréonine kinase 11
SVF : sérum de veau foetal

I

TAM : tumor associated macrophage
TBS : tris buffer salin
Tcl1a : T cell leukemia/lymphoma 1A
TEM : transition épithélio-mésenchymateuse
TGF- β : transforming growth factor bêta
TILs : tumor infiltrating lymphocytes
TIS : therapy-induced senescence
TME : transition mésenchymo-épithéliale
TNBC : triple-negative breast cancer
TNF- α : tumor necrosis factor
TNM : Tumor / Nodes / Metastasis

TP53 : tumor protein p53
TSTA3 : tissue specific transplantation antigen p53B
TWIST : twist family BHLH transcription factor 1

U

UK-5099 : PF-1005023,2-Cyano-3(1-phenyl-1Hindol-3-Yl)-2-propenoic

V

VE : vésicule extracellulaire
VEGF : Vascular endothelial growth factor
VEGFR : Vascular endothelial growth factor receptor
VIMOE : surexpression de la vimentine

W

Wnt : Wingless-type MMTV integration site
WT : wild type

Z

ZEB : Zinc finger E-box binding homeobox

Introduction

A. Le cancer du sein

1. La glande mammaire

Le sein est une glande exocrine qui suit un développement continu tout au long de la vie de la femme (Charafe-Jauffret E. *et al*, 2007). Dans la glande mammaire on retrouve 2 compartiments cellulaires (Fig. 1) :

- Le compartiment mésenchymateux composé des cellules du stroma comme les vaisseaux sanguins et les nerfs.
- Le compartiment épithélial contenant un réseau de canaux galactophores et des lobules renfermant les alvéoles. C'est aussi dans ce compartiment qu'on retrouve les cellules souches mammaires.

Ils sont séparés par une membrane basale composée de collagène et de laminine. L'épithélium mammaire est constitué de cellules différenciées divisées en deux catégories :

- **Les cellules luminales** qui bordent la lumière des canaux et des lobules. Elles expriment des marqueurs tels que les récepteurs hormonaux (œstrogène et progestérone), les CK 8 et 18 (*cytokeratin*) et des facteurs de transcription comme FOXA1 (*forkhead box A1*) et GATA3 (*GATA binding protein 3*).
- **Les cellules myoépithéliales** entourent les cellules luminales et sont au contact avec la lame basale et le stroma. Elles sont identifiées par la présence de la CK 14 et, dans un état de différenciation élevé, des marqueurs de muscle lisse comme l' α -actine.

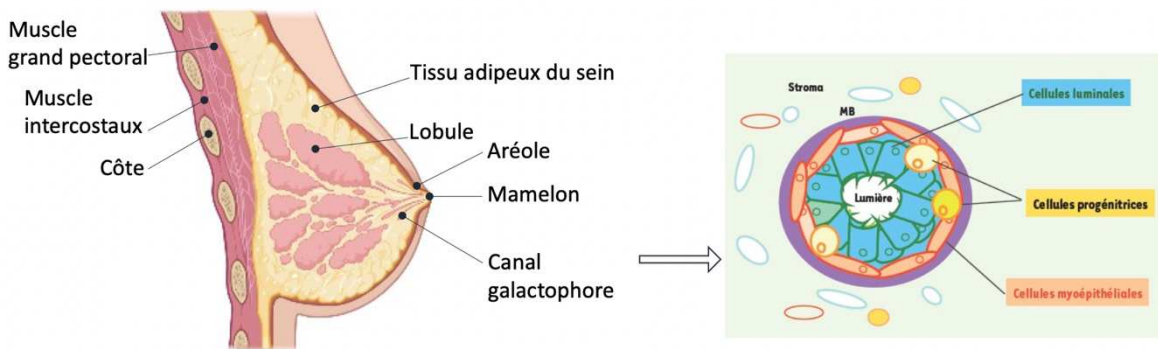


Figure 1. Les différents compartiments cellulaires du canal mammaire. L'illustration de gauche représente une coupe transversale de la glande mammaire. Le schéma de droite représente une coupe transversale du canal mammaire avec les différents types cellulaires le composant. La lumière est bordée des cellules luminales (bleu) elles-mêmes entourées par les cellules myoépithéliales (orange). L'ensemble contenu par la membrane basale (MB, en violet). Au sein du canal il est retrouvé des cellules progénitrices (jaune) à l'origine des différents types cellulaires composant le canal mammaire. Illustration adaptée de Charafe-Jauffret E. *et al*, 2007 et réalisée à l'aide de biorender (<https://biorender.com>).

2. Généralités sur le cancer du sein

Chaque année 18,1 millions de cancers sont diagnostiqués dans le monde et tuent 9,6 millions de personnes (GLOBOCAN, *Global cancer observatory*, 2018). Tout sexe confondu, le cancer du poumon est le cancer le plus diagnostiqué (18,4% des cas) ensuite on retrouve le cancer du sein (11,6%), le cancer de la prostate (7,1%) et le cancer colorectal (6,1%). Chez les femmes, les cancers du sein représentent 30% des diagnostics annuels et il est la seconde cause de mortalité par cancer (Siegel R. *et al*, 2020). En France, le cancer du sein est le premier cancer féminin en termes d'incidence et de décès. Il représente 8% des décès par cancer tous sexes confondus et 14% des décès par cancer chez la femme. Malgré une augmentation constante de 1,1% du nombre de cas depuis 1990 le taux de mortalité est en baisse de 1,6% par an entre 2010 et 2018 (INCa, Institut national du cancer, 2018).

Le cancer du sein est une maladie hétérogène répertoriant de nombreux sous-types. Différents critères sont utilisés permettant la classification histologique ou encore moléculaire, la première est celle de l'organisation mondiale de la santé qui utilise des informations anatomiques. Cette classification, nommée TNM, prend en compte le volume tumoral (T), l'envahissement ganglionnaire (N) et la présence de métastase (M) permettant de déterminer le stade de la tumeur entre 0 et IV (INCa, 2018). Le stade 0 correspond à une tumeur *in situ* de petite taille alors que le stade IV se rapporte à une tumeur invasive de volume important associée à un envahissement ganglionnaire et à la présence de métastases (ElAmrani A. *et al*, 2013). Le plus souvent ce sont des tumeurs de type adénocarcinomes dont l'origine provient des cellules canalaire ou lobulaire de l'épithélium glandulaire. Dans le cancer du sein, les adénocarcinomes peuvent être de 3 types :

- **In situ** : la tumeur se développe dans les canaux galactophores avec les cellules tumorales qui prolifèrent dans la lumière du canal. C'est un stade précoce de la maladie qui est divisée en 2 catégories en fonction de son origine qui peut être canalaire, on parle alors de carcinome canalaire *in situ*, ou des *acini* situés au sein des lobules nommés néoplasie lobulaire *in situ*. Ils ne représentent que 2 à 3% des cas de cancer du sein dû à un faible envahissement du tissu conjonctif et la conservation de l'intégrité de la membrane basale. Ils sont de bon pronostic et rattachés à un stade TNM 0.
- **Invasif** : c'est la majorité des tumeurs mammaires avec un envahissement du tissu conjonctif et la perte de l'intégrité de la membrane basale. Le plus souvent il est d'origine canalaire (75% des cas) mais aussi d'origine lobulaire (11% des cas). Il est retrouvé dans les stades TNM 1 à 2 en fonction du degré d'envahissement tissulaire.
- **Métastatique** : ce stade tumoral arrive lorsque les cellules malignes envahissent le tissu mammaire et quitte la glande mammaire *via* la circulation sanguine ou lymphatique. Les cellules tumorales disséminées peuvent tout d'abord atteindre les ganglions lymphatiques puis dans un second temps les organes vitaux pour former la métastase. Dans le cancer du sein les métastases sont principalement retrouvées dans les os, les poumons et le cerveau. Ces tumeurs mammaires sont répertoriées dans les stades 3 et 4 de la classification TNM.

La biopsie mammaire permet de compléter le diagnostic anatomique par la recherche de l'expression des récepteurs hormonaux (œstrogènes et progestérone) ainsi que de la protéine HER2 (*Human epidermal growth factor 2*) par marquage histologique. Cela permet d'orienter le traitement et de classer les tumeurs mammaires en 3 grands sous-types : hormono-dépendant, il exprime les récepteurs aux hormones (RH) et correspond à 75% des cas de cancer du sein ; HER2 positif, il surexprime la protéine HER2 avec ou sans expression des RH et représente 10 à 15% des cas ; le sous-type triple négatif (TNBC), il ne montre pas d'amplification de HER2 et une expression des RH inférieure à 1%, il correspond à 12% des cas. La plupart du temps ce sont des tumeurs invasives avec un stade TNM élevé (3 et 4) (Almansour N., 2022).

Les facteurs de risque dans le cancer du sein sont multiples et incluent l'âge, la consommation d'alcool et de tabac, le surpoids ainsi que certains traitements hormonaux (INCa, 2018). Par exemple, la prise de contraception orale durant au moins une année qui en augmente l'incidence de 2,5% pour le TNBC (Almansour N., 2022). Le TNBC est aussi plus présent chez les femmes jeunes avec une incidence de 25% avant 40 ans contre 10% après 44 ans (Cortet M. *et al*, 2018). De même, certaines mutations génétiques favorisent son développement comme la mutation BRCA1 (*Breast cancer 1*) qui est significativement associée avec le sous-type TNBC alors que la mutation BRCA2 (*Breast cancer 2*) est corrélée avec des tumeurs de type Luminal B. D'autres mutations sur les gènes *TP53* (*Tumor protein 53*), *CDH1* (*cadherin 1*), *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*) et *STK11* (*serine/threonine kinase 11*) favorisent aussi le développement d'un TNBC (Almansour N., 2022).

3. Classification moléculaire du cancer du sein

La première classification moléculaire a été réalisée par Perou et collaborateurs dans les années 2000 divisant en 4 grand sous-types le cancer du sein résumé dans la figure 2 (Perou C. *et al*, 2000). Brièvement, le sous-type histologique hormono-dépendant est divisé en 2 groupes : luminal A (RH positif/HER2 négatif) et luminal B (RH positif/HER2 positif), le sous-type HER2 positif (RH négatif /HER2 positif) et le sous-type TNBC (RH négatif/HER2 négatif), ce dernier est tout d'abord nommé « basal-like » avec une mutation p53 lui conférant un mauvais pronostic clinique (tumeur de haut grade, prolifération élevée) (Perou C. *et al*, 2000).

Par la suite, à partir des années 2010, plusieurs études ont permis d'identifier des sous-types moléculaires au sein du sous-type histologique TNBC avec des pronostics cliniques différents (Fig. 2) (Lehmann B. *et al*, 2011 ; Burstein M. *et al*, 2015 ; Prado-Vasquez G. *et al*, 2019). Le sous-type « basal-like » (BL) est divisé en deux : BL1 avec un haut niveau d'expression des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et le BL2 avec une augmentation des gènes de la réponse aux dommages à l'ADN. Cependant, toutes les tumeurs de sous-type BL ne sont pas TNBC, où il est possible de le retrouver dans d'autres sous-types de cancer du sein. Le sous-type « immuno-modulatory » (IM) montre une infiltration importante de cellules immunitaires dans la tumeur. Le sous-type « mesenchymal » (M) est

associé à une signature moléculaire liée au processus de transition épithélio-mésenchymateuse et du caractère souche. Le dernier sous-type est le « luminal androgen receptor » (LAR) avec une expression élevée des récepteurs aux androgènes et des cytokératines. Plus récemment, Lehmann et collaborateurs ont complété leur première analyse des sous-types du TNBC (Lehmann B. *et al*, 2021). En effet, le sous-type M est quant à lui relié à un phénotype myoépithélial/basal avec une hypo-méthylation de l'ADN indiquant une faible différenciation cellulaire. Dans les sous-types BL1 et M on observe un nombre de mutations plus important que dans les autres sous-types TNBC leur conférant une plus forte instabilité génomique. Ces classifications montrent une importante hétérogénéité entre les sous-types TNBC avec des origines cellulaires différentes et un état de différenciation variable, influençant ainsi la sensibilité aux agents de chimiothérapie (Lehmann B. *et al*, 2021).

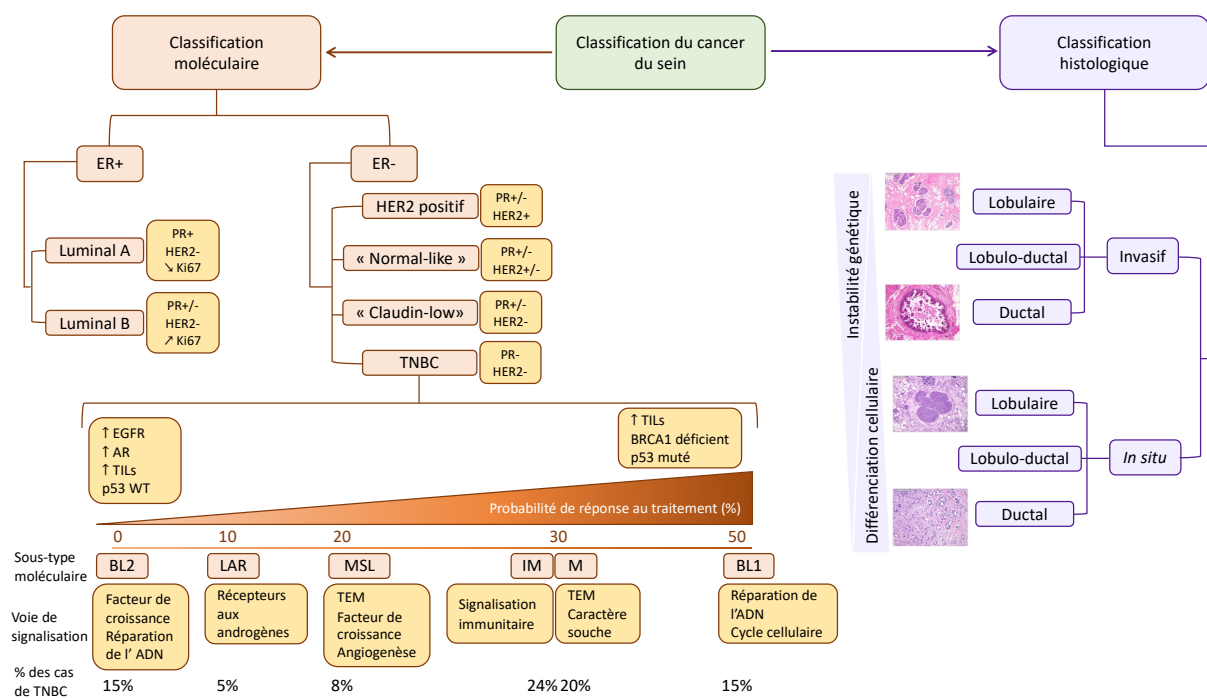


Figure 2. Classification moléculaire et histologique du cancer du sein. La partie de gauche décrit les différents types moléculaires du cancer du sein. + : positif ; - : négatif ; ER : « oestrogen receptor » ; PR : « progesterone receptor » ; TNBC : « triple negative breast cancer » ; EGFR : « epidermal growth factor receptor » ; AR : « androgen receptor » ; TILs : « tumor infiltrating lymphocytes » ; WT : « wild type », BRCA1 : « breast cancer 1 » ; BL2 : « basal-like 2 » ; LAR « luminal androgen receptor » ; MSL : « mesenchymal stem like » ; IM « immuno-modulatory » ; M : « mesenchymal » ; BL1 : « basal-like 1 ». La partie de droite décrit les différents sous-types histologiques du cancer du sein. Les coupes histologiques sont issues du site webpathology (<https://www.webpathology.com>). Adapté de Sher G. *et al*, 2020 et Omarini C. *et al*, 2018.

Gong et collaborateurs (Gong Y. *et al*, 2021) ont récemment classé les tumeurs TNBC en fonction des voies métaboliques énergétiques. Dans ce contexte, le TNBC peut être divisé en 3 sous-groupes avec :

- **métabolisme lipidique important.** Au niveau génétique on observe fréquemment des mutations dans les voies de signalisation PI3K (*phosphoinositide 3 kinase*) et RTK/RAS (*receptors tyrosine kinase/RAS proto-oncogene, GTPase*). On retrouve les sous-types LAR et BL2 avec un bon pronostic clinique malgré une atteinte ganglionnaire (survie sans rechute à 3 ans dans 91% des cas),
- **métabolisme glycolytique élevé** avec l'augmentation du métabolisme des carbohydrates et des nucléotides. Au niveau génétique on observe une déficience de la réparation des dommages à l'ADN accompagnée d'une altération importante du nombre de copies de gène, Les sous-types BL1 et M y sont majoritairement représentés. Ils sont associés avec des tumeurs de haut grade et un risque de rechute plus élevé comparé aux 2 autres sous-types,
- **dérégulation partielle des voies métaboliques.** Ici, tous les sous-types moléculaires du TNBC sont représentés de façon équivalente. Il est de bon pronostic avec une survie sans rechute à 3 ans de 91%.

4. Pronostic clinique du cancer du sein triple négatif

Le TNBC est le sous-type de cancer du sein avec le plus mauvais pronostic clinique. Cela s'explique par la forte instabilité génétique, des tumeurs de volume important (supérieur à 2 cm³) associées à des bordures tumorales larges et une atteinte ganglionnaire dans la moitié des cas (Marotti J. *et al*, 2017).

Au niveau de la survie globale, les patientes avec un TNBC ont un risque plus élevé de mortalité à 5 ans après le diagnostic (70%) comparé aux autres sous-types (44%) avec une médiane de survie dans le TNBC de 4,2 ans contre environ 6 ans dans les sous-types HER2 positif et hormono-dépendant (Chintalapani S. *et al*, 2019). De même, le taux de récurrence à distance dans le TNBC est de 33,9%, contre 20,4% dans les autres sous-types, avec une incidence médiane de 2,6 ans contre 5 ans dans les autres sous-types de cancer du sein. Dans le TNBC l'incidence de la métastase est de 46% avec une survie médiane de 13 mois (Yin L. *et al*, 2020). De façon générale, l'incidence de la métastase pulmonaire est de 31%, de 19% dans les os et de 11% dans le cerveau (Lehmann B. D. *et al*, 2016). Entre les différents sous-types de TNBC on observe une différence du site métastatique. Le sous-type M tend à avoir une fréquence plus élevée pour la métastase pulmonaire comparé aux autres sous-types (46% contre 25%). De même, les sous-types M et LAR ont tendance à plus métastaser au niveau cérébral comparé au sous-type BL (respectivement 17% et 27% contre environ 6%). La métastase osseuse est elle significativement plus élevée dans le sous-type LAR (46%) par rapport aux autres sous-types (16%) (Lehmann B. *et al*, 2016).

L'ensemble de ces données montrent donc une forte hétérogénéité moléculaire et métabolique du TNBC.

5. Le traitement de chimiothérapie dans le cancer du sein triple négatif

Depuis quelques années, les thérapies ciblées ont été développées pour le TNBC. Ces thérapies, incluant l'inhibition de PARP (*poly(ADP-ribose) polymerase*) et de PDL-1 (*Programmed cell death ligand 1*) ainsi que le ciblage des récepteurs (ex. EGFR et les récepteurs aux androgènes), montrent une efficacité limitée et ne concernent qu'un nombre restreint de patientes. En attendant l'établissement de thérapie ciblées plus efficace la chimiothérapie reste encore la meilleure solution thérapeutique pour le TNBC (Fitzpatrick A. and Tutt A., 2019 ; An J. *et al*, 2021). La chimiothérapie consiste en l'administration d'une combinaison de molécules administrées individuellement ou associées entre elles de façon séquentielle (An J. *et al*, 2021). Ces agents vont cibler des fonctions cellulaires différentes (mitose, dommage à l'ADN, production de métabolites).

Les différentes classes d'agents de chimiothérapie montrent des efficacités variables en fonction du sous-type moléculaire de TNBC (Yin L. *et al*, 2020). Les 2 classes les plus utilisées sont les taxanes et les anthracyclines. Les taxanes ciblent les cellules en mitose en la stoppant en pro-métaphase inhibant ainsi la division cellulaire. Le sous-type BL, étant caractérisé par une expression élevée de gènes associés à la prolifération cellulaire, est le sous-type de TNBC le plus sensible à l'utilisation des taxanes seul avec une réponse au traitement (pCR, *patient Complete Response*) 4 fois plus élevé comparé aux sous-types M et LAR (Yin L. *et al*, 2020). Les anthracyclines ont une action cytotoxique en agissant sur l'ADN (inhibition de la topoisomérase II, génération de radicaux libre, intercalation dans l'ADN) (Yin L. *et al*, 2020). La plupart du temps il est utilisé en combinaison avec un taxane permettant une augmentation de 20 à 38% de la survie globale chez les patientes avec un cancer du sein, tous sous-types histologiques confondus (EBCTCG, 2005). Dans le TNBC, le pCR varie entre les sous-types moléculaires où le BL1 montre un pCR 52% contre respectivement 0%, 10% et 23% dans les sous-types BL2, LAR et M (Yin L. *et al*, 2020).

Plus récemment il a été rajouté à l'arsenal thérapeutique des drogues de la classe des sels de platine comme le cisplatine et le carboplatine. Ces agents induisent la formation de dommages à l'ADN et montrent une efficacité importante dans le cas des tumeurs mutées BRCA1 tel que le BL1 (Diana A. *et al*, 2020). De plus, dans le cas des TNBC métastatique, l'ajout de sel de platine aux traitements combinant les anthracyclines aux taxanes rallonge le temps de survie des patientes notamment dans le sous-type BL (Zhang J. *et al*, 2015).

Parmi les sous-types de TNBC, ce sont les BL1 et 2 qui montrent la meilleure réponse au traitement avec anthracycline et taxane avec environ 45% de pCR contre 40% pCR pour le M et le IM, 33% pour le MSL et 14% dans le LAR (Santonja A. *et al*, 2018). Paradoxalement, comme il a été décrit dans la partie précédente, le TNBC montre une plus forte incidence pour la rechute locale ou à distance comparé aux autres sous-types. Il y a donc besoin de trouver des solutions thérapeutiques plus efficaces pour son traitement (Carey L. A. *et al*, 2007).

Bien que la chimiothérapie reste à ce jour la meilleure solution thérapeutique pour le TNBC, l'efficacité thérapeutique doit être optimisée. Cela passe par une meilleure compréhension des mécanismes de récurrence liées aux thérapies actuelles.

B. Les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la rechute du cancer du sein triple négatif suite au traitement de chimiothérapie

Depuis plusieurs décennies la littérature scientifique a permis de pointer certains mécanismes participant à l'échappement thérapeutique. Au niveau des cellules cancéreuses, la dormance cellulaire et la plasticité cellulaire ont été démontrées comme étant impliquées dans la tolérance aux drogues de chimiothérapie et la formation de métastases.

1. Le rôle de la dormance cellulaire dans la récurrence tumorale

A la suite de l'arrêt du traitement de chimiothérapie et avant la récurrence tumorale, il existe une période de latence où les cellules ayant persisté aux agents cytotoxiques entrent dans un état de dormance (De Angelis M. *et al*, 2019). Cet état cellulaire est sous influence du microenvironnement. Par exemple, l'angiogenèse régule la dynamique d'entrée et de sortie de dormance *via* la sécrétion des facteurs proangiogéniques (ex. VEGF, TGF- β 1) ou anti-angiogénique (ex. angiostatine, thrombospondin-1) (Ghajar C. *et al*, 2013). De même, les cellules immunitaires par la sécrétion de cytokines et d'interférons (ex. TGF- β 2, IFN- γ) maintiennent l'état de dormance cellulaire (Chernosky N. et Tamagno I., 2021). Dans la tumeur primaire, la population de cellules dormantes représente environ 0,2 à 5% de la population parentale. Au niveau cellulaire, Rupert Willis et collaborateurs en 1934 décrivent la dormance cellulaire comme un état de quiescence où les cellules sont arrêtées dans la progression du cycle cellulaire en phase G0/G1 (Willis R. A., 1934). Cet arrêt de la prolifération permet aux cellules persistantes de survivre en s'adaptant aux changements d'expression de gènes induits par le traitement de chimiothérapie et favorise la survie cellulaire (De Angelis M. *et al*, 2019). Cependant, l'état de quiescence est réversible où les cellules dormantes peuvent de nouveau proliférer menant à la récurrence tumorale et/ou la colonisation métastatique (Saleh T. *et al*, 2019). L'état de dormance fait intervenir différents processus cellulaires que sont l'autophagie et la sénescence, mais aussi l'acquisition du caractère souche.

L'autophagie favorise la survie cellulaire en éliminant les organites et macromolécules endommagés ou mal conformés (An J. *et al*, 2021). Elle est régulée par les gènes de la famille ATG (*autophagy-related genes*) qui initient la formation de deux complexes conduisant à la production de PIP3 (*phosphoinositide 3-phosphate*) et la formation du phagophore puis de l'autophagosome pour l'élimination du ou des substrat(s) cible(s) dans le lysosome (Galluzi L. *et al*, 2019). L'enclenchement du processus d'autophagie s'oppose à la sénescence en augmentant la dégradation de p53 et la survie cellulaire par une dormance pro-autophagique (Garcia-Prat L. *et al*, 2016). Dans ce contexte, les cellules dormantes ont une diminution du nombre de mitochondries induisant des changements métaboliques en faveur de la survie cellulaire par la diminution de l'apoptose (Dökümcü K. *et al*, 2019). L'autophagie participe

aussi à la tolérance aux drogues en diminuant la capacité des cellules à endocyter les composants extracellulaires tels que les agents cytotoxiques, réduisant leur concentration intracellulaire (Dökümcü K. *et al*, 2019). De même, elle active les voies de réparation des dommages à l'ADN diminuant l'effet des agents de chimiothérapie sur l'ADN et l'activation de l'apoptose (An J. *et al*, 2021).

La sénescence est un état cellulaire où les cellules sont métaboliquement actives mais présentent un arrêt dans la progression du cycle et ne répondent plus aux facteurs de croissance (Fitsiou E. *et al*, 2021). L'élévation de l'expression de p16^{INK4a} et l'activation de la voie p53/p21^{WAF1/Cip1} sont caractéristiques de l'acquisition de l'état de sénescence (Fitsiou E. *et al*, 2021). Elle est induite par des phénomènes intracellulaires comme la présence de dommages à l'ADN, des modifications épigénétiques, des dysfonctionnements mitochondriaux et l'activation d'oncogènes. Dans ce dernier cas, on la nomme OIS (*oncogene-induced senescence*), elle est due à l'activation de oncoprotéines comme BRAF (*B-raf protooncogene, serine/threonine kinase*), RAS, Akt (*RAC-alpha serine/threonine-protein kinase*) et E2F1 (*E2F transcription factor 1*) et/ou à l'inactivation de facteurs suppresseurs de tumeur tels que la cycline E, PTEN et NF1 (*neurofibromin 1*) (Chakrabarty A. *et al*, 2021). Les cellules sénescents sont caractérisées par la sécrétion de protéines tels que des enzymes de modification de la matrice, des cytokines et des facteurs de croissance ainsi que la sécrétion de vésicules extracellulaires permettant la communication cellules-cellules mais aussi la propagation de l'état de sénescence (Chakrabarty A. *et al*, 2021). Le sécrétome des cellules sénescents, appelé aussi SASP (*senescence-associated secretome phenotype*) exerce une action protumorale en agissant à la fois sur les cellules stromales et la matrice extracellulaire (Wang B. *et al*, 2020).

La sénescence peut être induite par les agents de chimiothérapie (Fitsiou E. *et al*, 2021). Poele et collaborateur montrent que à la suite du traitement de chimiothérapie néo-adjuvant, c'est-à-dire le traitement des tumeurs par chimiothérapie avant la résection chirurgicale, 41% des tumeurs seront positives pour le marquage de la sénescence. Ceci est valable uniquement dans le tissu tumoral, le tissu périphérique est lui négatif pour ce marquage (Poele R. *et al*, 2002). Ainsi, les thérapies anticancéreuses sont des inducteurs de la sénescence nommée TIS (*therapy-induced senescence*). Dans le TNBC, de nombreux agents cytotoxiques tels que la doxorubicine, l'étoposide, l'irinotécan, le paclitaxel et le cisplatine sont connus pour induire la TIS (Chakrabarty A. *et al*, 2021). Ce caractère génère une population de cellules qui sont moins sensibles aux agents cytotoxiques (Achuthan S. *et al*, 2011). Cela a été décrit par Milanovic et collaborateur dans un modèle murin de lymphome à cellules B. Dans cette étude les auteurs montrent que les cellules sénescents à la suite du traitement de chimiothérapie progressent vers un phénotype plus agressif avec l'activation de la signalisation Wnt (*wingless-type MMTV integration site*) et l'acquisition d'un caractère « souche-like » (Milanovic M. *et al*, 2018). Dans le TNBC il existe actuellement peu d'études évaluant la transition entre les caractères sénescents et souche. Achuthan et collaborateur, sur un modèle pré-clinique TNBC, montrent qu'il existe un lien entre la TIS et la formation d'une population de cellules au caractère souche et non répondeur aux agents cytotoxiques

(Achuthan S. *et al*, 2011). Une seconde étude, utilisant des biopsies de tumeurs TNBC, montre la présence de cellules polyploïdes associées au caractère sénescence/souche. Dans ce cas les patients montrent une mauvaise réponse au traitement de chimiothérapie (Chakrabarty A. *et al*, 2021). Ces études relient donc l'échappement à la sénescence avec la réponse au traitement de chimiothérapie et le risque de rechute.

L'induction de la dormance cellulaire permet aux cellules tumorales d'échapper aux effets cytotoxiques des agents de chimiothérapie qui ciblent principalement les cellules en cycle (Damen M. *et al*, 2020). Les thérapies anti-cancéreuses induisent une élévation de la production de ROS (*reactive oxygen species*), provoquant l'induction de la dormance tumorale (Gomatou G. *et al*, 2021).

De façon générale, les cellules dormantes ont une meilleure capacité de résister aux stress induits par le microenvironnement et/ou les drogues de chimiothérapie (Gooding A. and Schiemann W., 2020). Elles peuvent rester durant une longue période dans un état de quiescence prolongeant leur survie (Gooding A. and Schiemann W., 2020). **Ainsi, les cellules dormantes sont à la croisée de plusieurs processus cellulaires favorisant la survie et l'échappement aux agents cytotoxiques. Il est donc nécessaire de mieux comprendre ces mécanismes pour améliorer la réponse au traitement anti-cancéreux afin d'éviter la récurrence tumorale.**

2. Le rôle de la plasticité cellulaire dans la récurrence tumorale

i. Les transitions épithélio-mésenchymateuse et mésenchymo-épithéliale dans la rechute post-traitement

L'un des principaux mécanismes contribuant à la plasticité tumorale est la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) qui peut être réversée par la transition mésenchymo-épithéliale (TME). De façon physiologique, ces processus participent au développement embryonnaire et à l'homéostasie tissulaire. Dans le cancer, l'activation aberrante de la TEM mène à l'acquisition d'un caractère agressif des cellules tumorales par l'augmentation de la métastase, du caractère souche et de l'échappement au traitement de chimiothérapie (Ye X. *et al*, 2015).

Le processus de TEM consiste en la perte des caractères épithéliaux (E) correspondant à la polarité apico-basale, la présence de jonction cellulaire ainsi que l'attachement à la membrane basale et à l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux (M) associé à une morphologie « fibroblaste-like » et un haut potentiel invasif (Lambert A. *et al*, 2016). L'activation de ce processus permet la dissémination des cellules tumorales depuis la tumeur primaire vers la circulation sanguine suivie par l'intravasation dans un second site tumoral (Lambert A. *et al*, 2016).

Lorsque le processus est total cela mène à l'acquisition du phénotype M associé à la répression des marqueurs E (ex. E-cadhérine, zona occludens 1) et à l'expression de protéines comme la N-cadhérine, la fibronectine et la vimentine (Gooding A. and Schiemann W., 2020).

Cela confère aux cellules des propriétés invasive et migratoire permettant la dissémination systémique dans la circulation sanguine et/ou lymphatique (Gooding A. and Schiemann W., 2020). Le processus de TEM est indissociable de l'élévation du niveau d'expression de la vimentine. Elle permet l'acquisition de la morphologie M et interagit avec les microtubules ainsi que les protéines motrices promouvant la motilité cellulaire (Danielsson F. *et al*, 2018). La vimentine est aussi une protéine charnière dans l'activation de voies de signalisation et de facteurs de transcription participant au processus de TEM (ex. TGF- β , SLUG, Ras, 14-3-3, Erk, Akt) (Cheng F. *et al*, 2016). Son expression est associée avec des tumeurs de haut grade et un mauvais pronostic notamment une incidence élevée de métastase (Chen Z. *et al*, 2021). Les tumeurs TNBC de sous-type M et/ou MSL ont une incidence élevée pour la maladie résiduelle associée à un taux plus élevé de vimentine comparé aux autres sous-types de cancer du sein reliant le sous-type TNBC avec la TEM (Gooding A. and Schiemann W., 2020 ; Chen Z. *et al*, 2021).

L'activation du programme génique de TEM mène à un conglomérat d'état cellulaire permettant d'augmenter la tolérance aux agents cytotoxiques (Gooding A. and Schiemann W., 2020). Saxena et collaborateurs montrent que l'induction de la TEM augmente l'expression des transporteurs d'efflux ABC (*ATP-binding cassette*) diminuant la réponse aux drogues de type taxane. La réversion de la TEM, dans les cellules invasives, diminue le niveau d'expression des transporteurs ABC augmentant la réponse au taxane (Saxena M. *et al*, 2011). Une seconde étude, dans un modèle de cellules cancéreuses de sein résistantes au docetaxel, montre que l'expression de la vimentine augmente à mesure que la sensibilité au docetaxel diminue (Iseri O., 2012).

De même, L'enclenchement du processus de TEM permet l'échappement à l'apoptose induite par les agents de chimiothérapie. Ce phénomène, appelé anastase, s'observe lorsque les cellules en apoptose tardive acquièrent un phénotype de TEM leur permettant de retourner à un état cellulaire « normal » après le retrait des agents pro-apoptotique (Sun G. and Montell D., 2017). Ce procédé est enclenché à la suite de l'interaction de la vimentine avec PARP-1 favorisant la survie cellulaire par l'activation des voies de réparation de l'ADN menant à une tolérance plus élevée aux agents cytotoxiques (Usman S. *et al*, 2021). Réciproquement, les cellules apoptotiques montrent une dépendance à la protéolyse de la vimentine où le fragment amino-terminal de la vimentine participe à l'induction de l'apoptose (Danielsson F. *et al*, 2018).

Au sein du site métastatique, sous influence du microenvironnement, les cellules tumorales peuvent enclencher le processus inverse, la TME, permettant la colonisation métastatique (Kvokacková B. *et al*, 2021). Ainsi, il a été décrit dans un modèle de xénogreffe en souris immunodéficientes où l'injection dans la glande mammaire de cellules MDA-MB-231, dont l'expression de la E-cadhérine est réprimée par méthylation de son promoteur, mène à la formation de lésions métastatiques exprimant de nouveau la E-cadhérine (Kvokacková B. *et al*, 2021).

La E-cadhérine est une protéine transmembranaire localisée dans les jonctions adhérentes au niveau baso-latéral, c'est aussi le marqueur majeur du caractère E (Yao D. *et al*,

2011). Une étude *in vitro* montre que l'expression ectopique de E-cadhérine dans la lignée de cellules TNBC MDA-MB-231 est suffisante pour l'acquisition de la morphologie et des fonctions du caractère E (Yao D. *et al*, 2011). Lors de la colonisation métastatique les cellules disséminées s'associent avec les cellules parenchymales de l'organe hôte *via* des jonctions cellulaires composées de E-cadhérine (Yao D. *et al*, 2011). Ces jonctions cellulaires favorisent la survie des cellules métastatiques par la diminution de l'anoikis et de la sensibilité aux agents cytotoxiques en limitant la formation de ROS (Padmanaban V. *et al*, 2019). Ces résultats montrent que la E-cadhérine, en plus d'être un marqueur E, est aussi un facteur essentiel de la TME, de la survie et de la colonisation métastatique.

ii. Le statut hybride dans la récurrence tumorale

Bien que les caractères E et M soient décrits comme deux états cellulaires opposés, il existe aussi un état intermédiaire dans lequel les cellules ne sont pas dans un état pleinement E ni complètement M (Jolly M. *et al*, 2015). Cet état intermédiaire, appelé statut hybride ou de TEM partiel, montre un potentiel métastatique important (Jolly M. *et al*, 2015). Ces cellules présentent à la fois des marqueurs de cellules E (ex. EpCAM, E-cadhérine) et M (ex. vimentine) (Yang J. *et al*, 2020). Des études *in vitro* ont permis de mettre en évidence des changements épigénétique et l'expression de certains facteurs dits « stabilisateurs » de cet état. Parmi eux on retrouve la famille de protéines OVOL (*ovo like zinc finger*) (Jolly M. *et al*, 2015) dont le niveau d'expression permet de maintenir le statut hybride ou d'induire la TEM totale, lorsqu'il est inhibé, ou la TME complète, lorsqu'il est surexprimé (Jolly M. *et al*, 2015). Les 3 états cellulaires E, M et hybride E/M peuvent coexister au sein d'une même tumeur formant l'hétérogénéité tumorale (Jolly M. *et al*, 2019).

Dans le cancer du sein, ce sont les sous-types TNBC et BL qui montrent la plus forte proportion de cellules hybrides (Jolly M. *et al*, 2015). Une analyse de la tumeur primaire de patientes atteintes de cancer du sein par imagerie LSR-3D (*large-scale single-cells resolution 3D*) a permis d'identifier une sous-population présentant une délétion des gènes *PTEN* et *TP53* présentant à la fois un caractère E et/ou M. Cette étude montre l'existence dans la tumeur primaire TNBC de cellules au statut hybride E/M qui seraient originaires d'une sous-population clonale et pourraient s'épandre indépendamment de l'enclenchement du processus de TEM (Rios A. *et al*, 2019).

Les cellules circulantes tumorales (CCT) représentent une faible population cellulaire. Elles sont caractérisées par l'expression de marqueurs E et M leur conférant un statut hybride (Polioudaki H. *et al*, 2015). Dans le TNBC la présence de CCT est associée à un mauvais pronostic clinique (Gwark S. *et al*, 2020).

Lors de la dissémination métastatique, les CCT peuvent migrer en groupe par la conservation des contacts cellule-cellule. Au sein de ce groupe, il existe une hétérogénéité phénotypique importante où les cellules du front de migration montrent un caractère hybride alors que les cellules au centre ont un caractère E avec le maintien de la polarité et des jonctions intercellulaires (Liao T. and Yang M., 2020). Cette configuration confère un haut potentiel métastatique aux CCT où les cellules du front de migration tractent les cellules du

centre. Lors de la migration individuelle, les CCT montrent un caractère pleinement M (Liao T. and Yang M., 2020). De façon intéressante, les CCT migrant en groupe ne correspondent qu'à 3% de la population totale de CCT mais elle représente 50% des foci métastatiques (Aceto N. *et al*, 2014). Ce résultat suggère un lien entre le caractère hybride des CCT et le potentiel métastatique. Expérimentalement cela est décrit dans un modèle de PDX (*patient derived xenograft*) TNBC où il est observé que les CCT avec un caractère hybride auront un potentiel métastatique plus élevé comparé au CCT E (E-CCT) ou M (M-CCT) (Ramani V. *et al*, 2019). Il est aussi montré par Grosse-Wilde et collaborateurs que la co-expression des marqueurs E et M dans une même cellule augmente le potentiel de formation de sphères et le caractère souche quel que soit le sous-type de cancer du sein. Cette étude relie le caractère hybride à l'enrichissement du caractère souche plus qu'à l'acquisition complète du statut E ou M (Grosse-Wilde A. *et al*, 2015). Une autre étude confirme cette première observation où dans le cancer du sein métastatique 75% des CCT co-expriment des marqueurs E (ex. cytokératine) et M (ex. vimentine) ainsi que des marqueurs de CSC (cellule souche cancéreuses) (Jolly M. *et al*, 2015). Lors du traitement de chimiothérapie les patients répondeurs montrent une diminution de la population globale de CCT avec une proportion plus importante de E-CCT. A l'inverse, les non répondeurs montreront un enrichissement en CCT notamment de phénotype M-CCT. De même, des patients dans un premier temps répondeurs verront la proportion de M-CCT décroître pour de nouveau augmenter lors de la récurrence (Jolly M. *et al*, 2015). De plus, dans le cancer du sein l'exposition au taxane augmente la proportion de cellules hybrides avec une tolérance plus élevée au traitement de chimiothérapie (Goldman A. *et al*, 2015).

iii. Les cellules souches dans la rechute tumorale

Les cellules souches cancéreuses (CSC) ont été mises en évidence par Al-Hajj et collaborateurs au début des années 2000 par l'expression de marqueurs membranaires que sont : CD49f (*integrin $\alpha 6$*), EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*), CD10, SSEA4 (*stage-specific embryonic antigen 4*), CD44, CK12⁺/CK19⁺ (Al-Hajj *et al*, 2003) ainsi qu'une expression élevée de ALDH1 (*aldehyde dehydrogenase family member 1*) (Ginestier C. *et al*, 2007). Les CSC ont des capacités d'initiation tumorale et de résistance aux thérapies (Kong D. *et al*, 2020). Le sous-type TNBC présente un taux élevé de CSC comparé aux autres sous-types de cancer du sein favorisant l'agressivité tumorale et l'échappement au traitement de chimiothérapie (He L. *et al*, 2021).

Durant le traitement de chimiothérapie il est observé l'augmentation de la proportion de CSC avec une expression élevée de vimentine. Ces CSC seraient issues du processus de TEM (Thankamony A. *et al*, 2020). Cependant, avec l'activation de la TME, les CSC sont capables de se différencier en cellules non-souches. La plasticité cellulaire permet la dynamique de transition entre l'état souche et non-souche favorisant ainsi la métastase (Shibue T. and Weinberg R., 2017). Cela est appuyé par le fait que l'ensemble des CSC ne montrent pas le même statut de TEM (Liu S. *et al*, 2014). Il existe deux types de CSC : (i) M caractérisées par le marquage CD44⁺/CD24⁻ accompagnées d'un état de quiescence et (ii) E caractérisées par le

marquage ALDH⁺ et dans un état prolifératif (Liu S. *et al*, 2014). Les CSC-M montrent une plasticité cellulaire moindre comparée aux E-CSC (Liu S. *et al*, 2014). De nombreuses études relient l'expression des marqueurs de CSC CD44, CD24 et ALDH1 avec la survie et l'incidence de la métastase dans le cancer du sein (He L. *et al*, 2021). Les différents types de CSC coexistent donc dans la tumeur primaire augmentant son hétérogénéité (Liu S. *et al*, 2014).

A la suite de cycles répétés de traitement de chimiothérapie, la sous-population de CSC quiescentes peut être détectée dans la tumeur résiduelle et les lésions métastatiques de patients TNBC (Kabraji S. *et al*, 2017). Les CSC favorisent la survie cellulaire par l'augmentation de l'activation des voies de réparation de l'ADN s'opposant aux effets délétères des agents anti-cancéreux sur l'ADN et à l'induction de l'apoptose (Lee K-L. *et al*, 2019) La diminution de la progression du cycle cellulaire leur permet d'échapper aux drogues qui ciblent majoritairement les cellules tumorales proliférantes (Phi L. *et al*, 2018). Les CSC mammaires possèdent un niveau d'expression élevé des transporteurs ABC et des p-glycoprotéines protégeant les cellules des agents cytotoxiques en diminuant leur concentration intracellulaire (Kong D. *et al*, 2020). Le phénotype quiescent des CSC leur permet d'échapper aux agents cytotoxiques grâce à l'activité proliférative et métabolique faible (Gooding A. and Schiemann W., 2020).

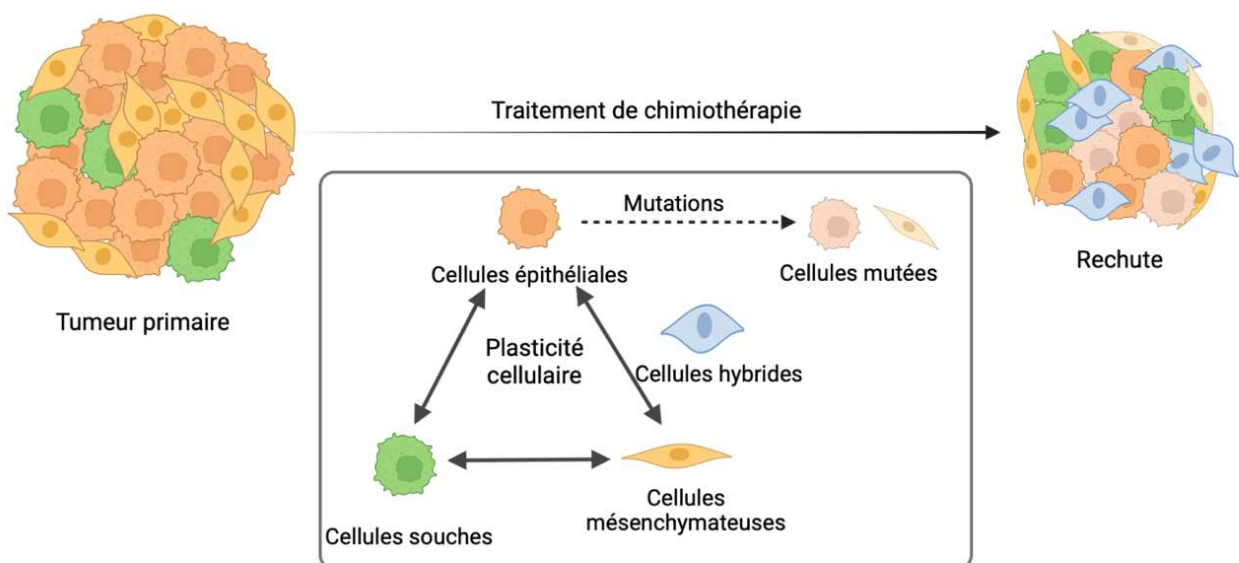


Figure 3. Illustration des changements cellulaires chimio-induits. La tumeur primaire (à gauche) est composée de cellules épithéliales, mésenchymateuses et de cellules souches. L'encadré symbolise les changements phénotypiques induits par le traitement de chimiothérapie (flèche). La plasticité cellulaire permet l'acquisition du caractère souche par les cellules épithéliales/mésenchymales et la différenciation des cellules souches en cellules épithéliales/mésenchymateuses. De même, les cellules épithéliales au travers des processus de TEM et de TME peuvent passer du statut épithélial au statut mésenchymal et inversement. Certaines cellules peuvent acquérir un état intermédiaire entre ces 2 caractères, c'est le statut hybride. Durant le traitement, certaines cellules peuvent acquérir des mutations augmentant l'activité de voies de signalisation et la survie cellulaire (flèche en pointillés). La partie de droite symbolise la tumeur dans le contexte de la rechute post-traitement (rechute). Adaptée de Qin S. *et al*, 2020 et réalisée à l'aide de biorender (<https://biorender.com>).

3. Régulation moléculaire de la plasticité cellulaire

Les différents phénotypes discutés précédemment sont sous influences des facteurs du microenvironnement permettant l'activation de voies de signalisation et de facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la plasticité cellulaire.

i. Les facteurs pro-inflammatoires et les vésicules extracellulaires

Parmi les facteurs du microenvironnement, les facteurs pro-inflammatoires et les vésicules extracellulaires font l'objet d'intense étude ces dernières années. Les facteurs pro-inflammatoires telles que les cytokines et les chimiokines, sécrétées par les cellules immunitaires et/ou non-immunitaires, stimulent des voies de signalisation et des facteurs de transcription favorisant l'adaptabilité cellulaire (Shenoy S., 2020). Par exemple, le traitement avec du TNF α (*tumor necrosis factor*) augmente la sous-population de cellules souches (CD44⁺/CD24^{-LOW}) et l'expression des facteurs de la TEM ZEB1 (*zinc finger E-box binding homeobox*), SLUG (*snail family transcriptional repressor 2*), TWIST1 (*twist family BHLH transcription factor 1*) (Baram T. *et al*, 2021). L'exposition prolongée des cellules cancéreuses de sein au TNF α augmente le niveau d'expression des transporteurs d'efflux ABC participant à la diminution des effets cytotoxiques des drogues (Baram T. *et al*, 2021). L'IL-6 (*interleukine 6*) induit le caractère souche par l'activation de la signalisation JAK/STAT3 (*janus kinase/signal transducer and activators of transcription*) ou de Notch. De plus, l'activation de STAT3 par l'IL-6 diminue la sensibilité à la doxorubicine dans le TNBC (Baram T. *et al*, 2021). L'IL-6 participe au maintien des caractères hybride et souche des cellules cancéreuses en activant la voie de Notch (Bocci F. *et al*, 2019). Une analyse récente montre que les cellules tolérantes aux anthracyclines développent une résistance au taxane grâce à l'activation de NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*) par les cytokines GM-CSF (*granulocyte colony stimulating factor*), IL-23 et IFN γ (*interferon- γ*). Ceci mène à des changements métaboliques augmentant la tolérance aux drogues (Goldman A. *et al*, 2019). Le TGF- β (*transforming growth factor bêta*) induit la TEM à travers l'activation des facteurs de transcription SMAD 2, 3 et 4 (*SMAD family member*) ainsi que l'activation de la signalisation PI3K/Akt (Hao Y. *et al*, 2019). Le traitement prolongé avec du TGF- β confère des propriétés de CSC aux cellules cancéreuses (Shibue T. and Weinberg R., 2017). Dans le site métastatique, le TGF- β , l'IL-6 et l'IGF-1 (*insulin growth factor 1*), sécrétés par les cellules nerveuses (ex. astrocytes, neurones et cellules gliales) favorisent la survie des cellules cancéreuses et la colonisation métastatique (Gong X. *et al*, 2019). L'exposition au paclitaxel augmente l'activation autocrine des signalisations TGF- β et IL-8 causant l'enrichissement en CSC et le risque de rechute (Bhola N. E. *et al*, 2013).

Certaines chimiokines, comme CXCL8 (*C-X-C motif chemokine ligand*), régulent l'induction du caractère souche et le processus de TEM de façon auto- et/ou para-crine dans le cancer du sein (Baram T. *et al*, 2021). L'enrichissement en cellules souches médié par l'axe CXCL8-CXCR1/2 (*C-X-C motif chemokine receptor*) passe par l'activation de Src (*proto-oncogene tyrosine kinase Src*) et du récepteur de L'EGF (Baram T. *et al*, 2021). CXCL8 en

agissant sur CXCR2 active la signalisation PI3K/Akt diminuant la sensibilité au taxane dans le cancer du sein (Xu H. *et al*, 2018). Les chimiokines CCL11 (*C-C motif chemokine ligand*) et CXCL14 issues des cellules stromales (ex. les fibroblaste cancéreux) activent l'axe p38-MAPK/STAT1 (*mitogen-activated protein kinase*) et diminuent la sensibilité des cellules tumorales au paclitaxel (Liu Y. *et al*, 2017). De nombreuses études font état d'un rôle pro-prolifératif des cytokines et chimiokines dans le cancer du sein (Morein D. *et al*, 2020). Par exemple, la sécrétion de CXCL5 par les cellules osseuses est augmentée dans un système de co-culture avec des cellules cancéreuses mammaires. L'activation de CXCR2 par CXCL5 mène à la sortie de l'état de dormance des cellules cancéreuses et à la colonisation du milieu environnant (Baram T. *et al*, 2021).

Les vésicules extracellulaires (VE) sont un ensemble de vésicules membranaires relarguées par les cellules cancéreuses et les cellules stromales permettant l'échange d'un grand nombre de facteurs (ARN, protéines, lipides). Cela participe à la progression tumorale, et à l'échappement thérapeutique (Dong X. *et al*, 2020). Les VE jouent un rôle important dans l'induction de la TEM où elles permettent l'augmentation de l'expression de facteurs de la TEM (Dong X. *et al*, 2020). Par exemple, les VE enrichies en TGF- β 2 induisent la TEM dans les cellules cancéreuses mammaires (Dong X. *et al*, 2020). Durant le traitement de chimiothérapie, le contenu des VE sécrétées par les cellules tumorales change. Shen et collaborateurs montrent que le traitement de chimiothérapie augmente la production de VE contenant les miRNA miR-9-5p, miR-195-5p et miR-203a-3p. Ces miRNA ont pour cible le facteur de transcription ONECUT2 (*one cut homeobox 2*) activateur de la transcription de gènes du caractère souche (*NOTCH1*, *SOX9*, *NANOG*, *OCT4* et *SOX2*) (Shen M. *et al*, 2019). Les VE chimio-induites sont enrichies en transporteur d'efflux de la famille ABC augmentant leur expression dans les cellules tumorales (Dong X. *et al*, 2020). De même, la captation par les cellules cancéreuses de VE enrichie en long ARN non codant H19 diminue la sensibilité des cellules à la doxorubicine (Wang X. *et al*, 2020). Une autre façon pour les cellules de diminuer les effets cytotoxiques des drogues est l'expulsion des molécules cytotoxiques de la cellule par les VE (Dong X. *et al*, 2020). Les VE chimio-induites favorisent la survie cellulaire. Par exemple, les cellules MDA-MB-231 traitées avec du paclitaxel augmentent la sécrétion de VE enrichies en survivine (inhibiteur de l'apoptose). Le traitement de cellules SK-BR-3 sensibles au paclitaxel avec les VE de ces MDA-MB-231 diminue la sensibilité des SK-BR-3 au paclitaxel en augmentant la résistance à l'apoptose (Kreger B. *et al*, 2016).

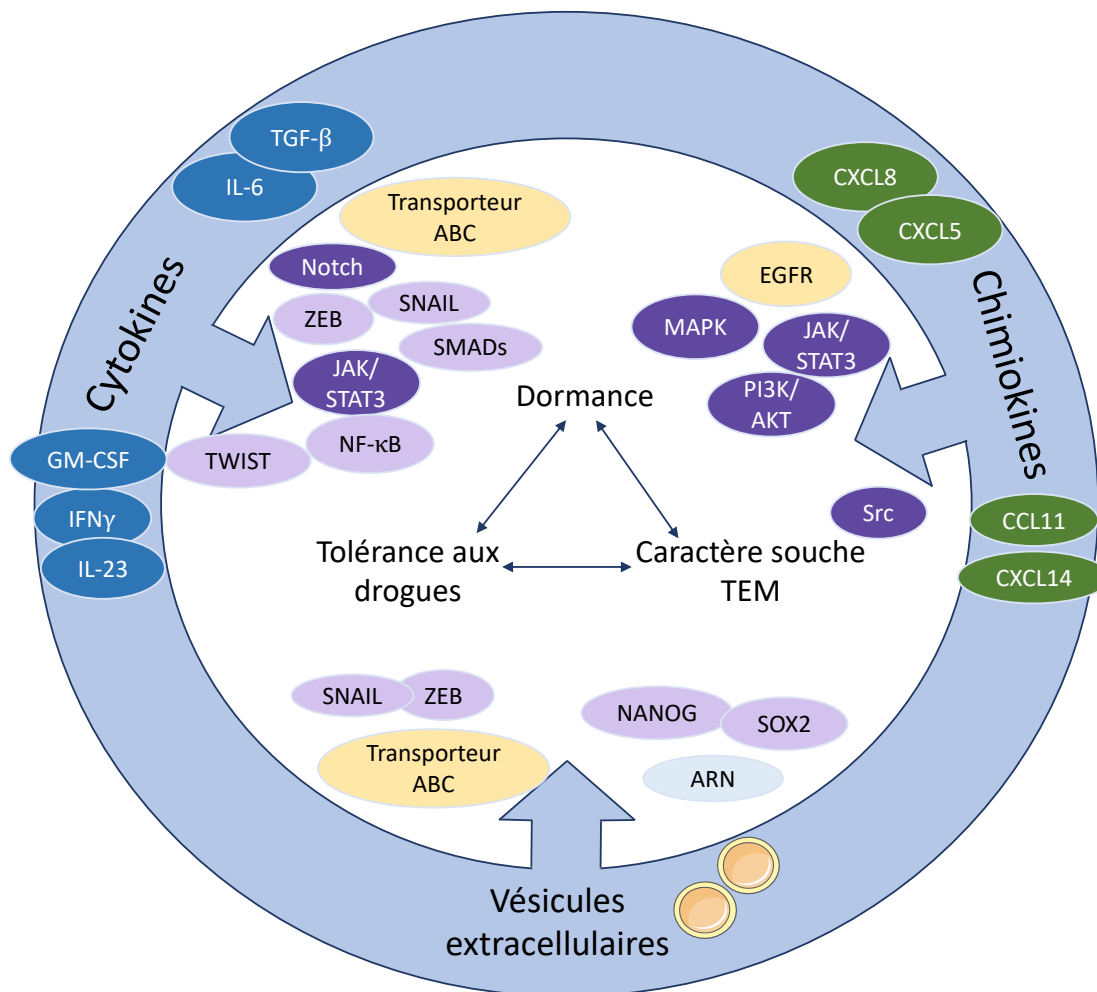


Figure 4. Les facteurs pro-inflammatoires et vésicules extracellulaires régulateurs de la plasticité cellulaire. La figure décrit le rôle de 3 types de facteurs extracellulaires (cytokines, chimiokines et vésicules extracellulaires) dans les aspects clés de la plasticité cellulaire : la dormance, le caractère souche/TEM et la tolérance aux drogues. Les cytokines INF- γ , IL-23, GM-CSF, IL-6 et TGF- β (en bleu, cercle extérieur) activent les signalisations STAT3 et Notch (violet foncé) et les facteurs de transcription TWIST, ZEB, SNAIL, SMADs et NF- κ B (rose). Elles permettent d'augmenter l'expression des pompes d'efflux des drogues de la famille ABC (jaune pâle) à la membrane plasmique. Les chimiokines CXCL8 et CXCL5 (en vert, cercle extérieur) en interagissant avec les récepteurs CXCR1/2 activent les voies de signalisation STAT3, Src et PI3K/Akt (violet foncé). Ils permettent d'augmenter l'expression du récepteur de l'EGFR (jaune pâle, « epidermal growth factor receptor », jaune pâle) à la membrane plasmique. Les chimiokines CCL11 et CXCL14 permettent l'activation de la voie MAPK (violet). Les vésicules extracellulaires, dans le contexte de la plasticité cellulaire, peuvent contenir des ARN (rose pâle), des facteurs de transcription comme SNAIL, ZEB, NANOG, SOX2 (rose) et des pompes d'efflux des drogues de la famille ABC (jaune). Adaptée de Baram T. *et al*, 2021.

ii. Les voies de signalisation majeures

La signalisation PI3K/Akt/mTOR (*mammalian target of rapamycin*) est activée par les récepteurs à activité tyrosine kinase. Elle joue un rôle dans la survie et la plasticité cellulaire, la régulation du processus métastatique ainsi que le métabolisme énergétique (Hinz N. and Jücker M., 2019). La voie PI3K/Akt est négativement régulée par PTEN qui est un suppresseur de tumeur. Dans de nombreux cancers l'expression de PTEN est diminuée menant à une

activation continue de la signalisation PI3K/Akt/mTOR favorisant l'agressivité tumorale et la tolérance au traitement de chimiothérapie (Cao J. *et al*, 2021). Dans le cancer du sein, l'élévation de l'expression et de la phosphorylation de Akt est associée à une survie globale courte et à des tumeurs de haut grade (Hinz N. and Jücker M., 2019).

Le statut d'activation de la voie PI3K/Akt module l'induction des processus de TEM et de TME. L'isoforme Akt1 participe au déclenchement de la TEM par l'augmentation de l'expression et de la stabilité de la vimentine en la phosphorylant (Hinz N. and Jücker M., 2019). L'activation de PI3K/Akt permet le remodelage de la matrice extracellulaire en augmentant l'expression et la sécrétion de MMP9 (*matrix metalloprotease*) (Xu W. *et al*, 2015). Akt et la vimentine interagissent ensemble dans le maintien du processus de TEM et de la motilité cellulaire (Danielsson F. *et al*, 2018). De même, il existe une boucle d'autorégulation entre la voie PI3K/Akt et TWIST. L'isoforme Akt2 phosphoryle TWIST permettant l'activation de la TEM. Réciproquement, TWIST phosphoryle Akt2 permettant le maintien de la TEM, la survie et l'invasion cellulaire (Xu W. *et al*, 2015). Dans les tumeurs mammaires, l'expression concomitante de TWIST et SLUG est associée avec des tumeurs de haut grade et à une survie courte (Gooding A. et Schiemann W., 2020). L'inactivation de Akt déclenche la TME avec la diminution de l'expression de la vimentine et l'augmentation de la E-cadhérine (Yao D. *et al*, 2011). L'activation de PI3K/Akt participe à l'échappement thérapeutique en augmentant l'expression des facteurs anti-apoptotiques ainsi que l'activité des transporteurs d'efflux ABC (Zhang L. *et al*, 2020 ; Phi *et al*, 2018).

La signalisation JAK/STAT est activée à la suite de stimuli extracellulaires par les cytokines et les facteurs de croissance. Les STAT sont des facteurs de transcription impliqués dans la prolifération, la TEM et le phénotype CSC (Cao J. *et al*, 2021). L'activation de JAK/STAT3 par l'IL-6 augmente l'adhésion et la motilité cellulaire par l'induction de l'expression de facteurs de la TEM TWIST, SNAIL (*snail family ranscriptional repressor 1*), SLUG et de la vimentine, de MMP ainsi que des kinases FAK (*focal adhesion kinase*) (Ma J. *et al*, 2020).

L'activation de STAT3 participe à la conversion de cellules non-souches en cellules souches, diminuant ainsi la sensibilité des tumeurs TNBC à la doxorubicine (He L. *et al*, 2021). Dans les tumeurs mammaires, on observe que CD44 peut s'associer avec la forme acétylée de STAT3 permettant sa translocation dans le noyau pour l'activation et le maintien du caractère souche (Yu H. *et al*, 2014). L'augmentation de la forme phosphorylée de STAT3 participe au maintien de l'état de dormance à la suite du traitement de chimiothérapie dans le TNBC (Basu S. *et al*, 2022). De plus, STAT 3 et 5 induisent la transcription d'anti-apoptotique (ex. c-MYC, BCL2) favorisant la survie cellulaire durant le traitement (Ma J. *et al*, 2020).

MAPK est une famille de protéines impliquées dans la transmission des signaux extracellulaires provenant des récepteurs à activité tyrosine kinase vers leurs cibles intracellulaires (Braicu C. *et al*, 2019). La voie MAPK induit l'activation des voies de survie, migration, différenciation, du métabolisme énergétique et de la réponse au stress. Il existe 4 voies de signalisation induites par les MAPK : ERK 1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*

1/2), JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*), p38 MAPK et ERK5. MAPK est un régulateur clé de la progression tumorale activé de façon constitutive dans 30% des tumeurs solides (Braicu C. *et al*, 2019).

La signalisation MAPK participe au processus métastatique par la régulation de la balance entre les processus de TEM et de TME. Au niveau cellulaire, cela passe par l'activation de l'axe RAS/MAPK/ERK1/2 diminuant l'expression des desmoplakines, protéines des jonctions adhérentes (desmosome) (Braicu C. *et al*, 2019). De plus, l'activation des MAPK augmente l'expression des protéases MMP par les cellules tumorales menant à la dégradation de la matrice et à l'invasion cellulaire (Guo Y. *et al*, 2020). Le facteur de la TEM SNAIL induit l'expression de la vimentine qui s'associe ensuite avec ERK permettant le recrutement et la phosphorylation de SLUG pour la progression de la TEM (Virtakoivu R. *et al*, 2015). De plus, SNAIL induit la phosphorylation de ERK pérennisant le processus de TEM (Usman S. *et al*, 2021). La vimentine permet le maintien de l'activation de la signalisation MAPK en empêchant la dégradation de Raf (*raf proto oncogene, serine/threonine kinase*) par la protéine 14-3-3, ce qui favorise la prolifération et la survie cellulaire (Usman S. *et al*, 2021). Le rôle des MAPK dans l'induction du processus de TME vient de l'inhibition de l'axe ERK/PI3K/Akt par la répression de SHP2 (*Src homology phosphotyrosine phosphatase 2*). Elle mène à l'acquisition par les cellules M d'un caractère E avec l'augmentation de la E-cadhérine et la diminution de la vimentine (Yao D. *et al*, 2011).

Dans le TNBC, la coopération entre la voie RAS/MAPK et l'oncoprotéine c-MYC (*myelocytomatosis oncogene*) augmente le risque de rechute à la suite du traitement de chimiothérapie (Balko J. *et al*, 2014). La signalisation MAPK participe à l'enrichissement en CSC et à l'état de dormance permettant l'échappement au traitement de chimiothérapie. Son action dans le caractère souche passe par son activation *via* l'EGFR menant à l'expansion de la population de CSC CD44⁺/CD24⁻ (Wise R. and Zolkiewska A., 2017). Son rôle dans la dormance passe par l'activation de l'axe p38/MAPK et la diminution de l'activité de ERK ; cela induit la transcription de nombreux gènes inducteurs d'un arrêt de la prolifération menant à l'état de dormance et à la diminution de la sensibilité aux drogues de chimiothérapie (Jahanban-Esfahlan R. *et al*, 2019). L'activation de MAPK/ERK augmente l'expression des transporteurs d'efflux des drogues, comme ABCB1 (*ATP Binding cassette subfamily B member 1*) et les P-glycoprotéines, diminuant la concentration intracellulaire des drogues telles que la doxorubicine (Liu S. *et al*, 2017).

La voie canonique de Notch est activée par l'interaction cellule-cellule permettant l'association des ligands transmembranaires Jagged ou Delta avec le récepteur Notch. Cela induit le clivage de la partie intracellulaire de Notch qui peut être transloquée au niveau nucléaire pour s'associer avec MAML1 (*mastermind like transcriptional coactivator 1*) et l'histone acétyl transférase p300 et former un complexe de facteurs de transcription (Krishna B. *et al*, 2019).

Il existe 4 isoformes de Notch, l'isoforme Notch1 induit la TEM en augmentant la transcription de SNAIL et SLUG et la diminution de la E-cadhérine (Kar R. *et al*, 2019). En

coopération avec la signalisation PI3K/Akt, il augmente l'activité transcriptionnelle de NF- κ B menant à la transcription de gènes codant pour les MMP 2 et 9, le VEGF (*vascular endothelial growth factor*), la survivine, BCLXL (*B-cell lymphoma extra large*) et la cycline D1 qui sont des régulateurs clés de la survie et de l'invasion tumorale (Kar R. *et al*, 2019).

Lorsque Jagged1 est sécrété et/ou présent dans les cellules stromales, il active Notch exprimé par les cellules cancéreuses et permet le maintien de l'état hybride avec l'enrichissement en CSC et la colonisation métastatique (Li D. *et al*, 2014). Cette interaction est favorisée entre les cellules présentant un niveau d'expression de Jagged et de Notch équivalent et permet l'acquisition du même phénotype par les deux types de cellules (Jolly M. *et al*, 2015). L'isoforme Notch 4 peut être activé en absence de ligand menant à son activation continue ainsi que l'enrichissement en CSC, l'augmentation de la prolifération et de l'invasion cellulaire (Krishna B. *et al*, 2019). Son rôle dans l'auto-renouvellement des CSC passe par l'activation de la cycline D1 (Edward A. et Brennan K., 2021). Notch4 est surexprimé dans le TNBC comparé aux cancers hormono-dépendants (Edward A. et Brennan K., 2021). Ainsi, l'activation de Notch diminue la sensibilité au paclitaxel par l'augmentation de l'auto-renouvellement des CSC et l'activation des facteurs de la TEM SNAIL et SLUG (Gooding A. and Schiemann W., 2020).

La signalisation de Wnt/ β -caténine consiste en l'activation des récepteurs de surface frizzled qui à leur tour activent les protéines de la famille disheveled inhibant la dégradation de la protéine β -caténine. Cette dernière, transloquée dans le noyau, pour permettre la transcription de gènes cibles impliqués dans les processus d'invasion/migration et de différenciation cellulaire (Cao J. *et al*, 2021). L'expression de Wnt est inversement corrélée avec l'expression des récepteurs aux hormones l'associant au sous-type TNBC (He L. *et al*, 2021). Dans le BL, on observe que la moitié des tumeurs présentent des mutations activatrices pour Wnt menant à son activation autocrine et à l'augmentation de la forme stable de la β -caténine (Feng Y. *et al*, 2018).

L'activation de Wnt augmente l'expression de facteurs de transcription clés de la TEM comme SNAIL, SLUG, TWIST1 et ZEB1. Réciproquement, le facteur ZEB2 est activateur de Wnt permettant le maintien de la TEM (Xu X. *et al*, 2020). De même, la répression de la E-cadhérine libère la β -caténine de la membrane plasmique lui permettant d'activer l'expression de ces cibles impliquées dans la TEM (Xu X. *et al*, 2020). L'augmentation de la forme stable de la β -caténine favorise la survie des CCT lors de la dissémination par l'augmentation de la résistance à l'anoïkis (Kong D. *et al*, 2020). L'activation de la voie PI3K/Akt permet la dégradation de GSK3 β (*glycogene synthase kinase 3 bêta*) et induit la translocation nucléaire de la β -caténine permettant la transcription des facteurs de la TEM et la réduction de la sensibilité aux drogues (Xu W. *et al*, 2015 ; Ortega M. *et al*, 2020). La signalisation Wnt induit l'expression de HMGA2 (*high mobility group AT-hook 2*) qui est associé dans le cancer du sein avec un risque élevé de rechute (He L. *et al*, 2021). La signalisation Wnt est un régulateur de l'auto-renouvellement et du maintien des CSC (Kong D. *et al*, 2020 ; Martin-Orozco E. *et al*, 2019). L'activation de la β -caténine augmente l'expression des transporteurs d'efflux des drogues ABCB1 et des

protéines anti-apoptotiques reliant la signalisation Wnt à la diminution de la sensibilité aux drogues de chimiothérapie (Martin-Orozco E. *et al*, 2019). L'activation de Wnt/ β -caténine protège les cellules tumorales en s'opposant à l'action anti-tumorale du système immunitaire. Cela passe par l'augmentation de l'expression de CD24 et CD47 à la membrane plasmique des cellules cancéreuses mammaires empêchant leur phagocytose par les macrophages (Wang B. *et al*, 2018 ; Xu X. *et al*, 2020).

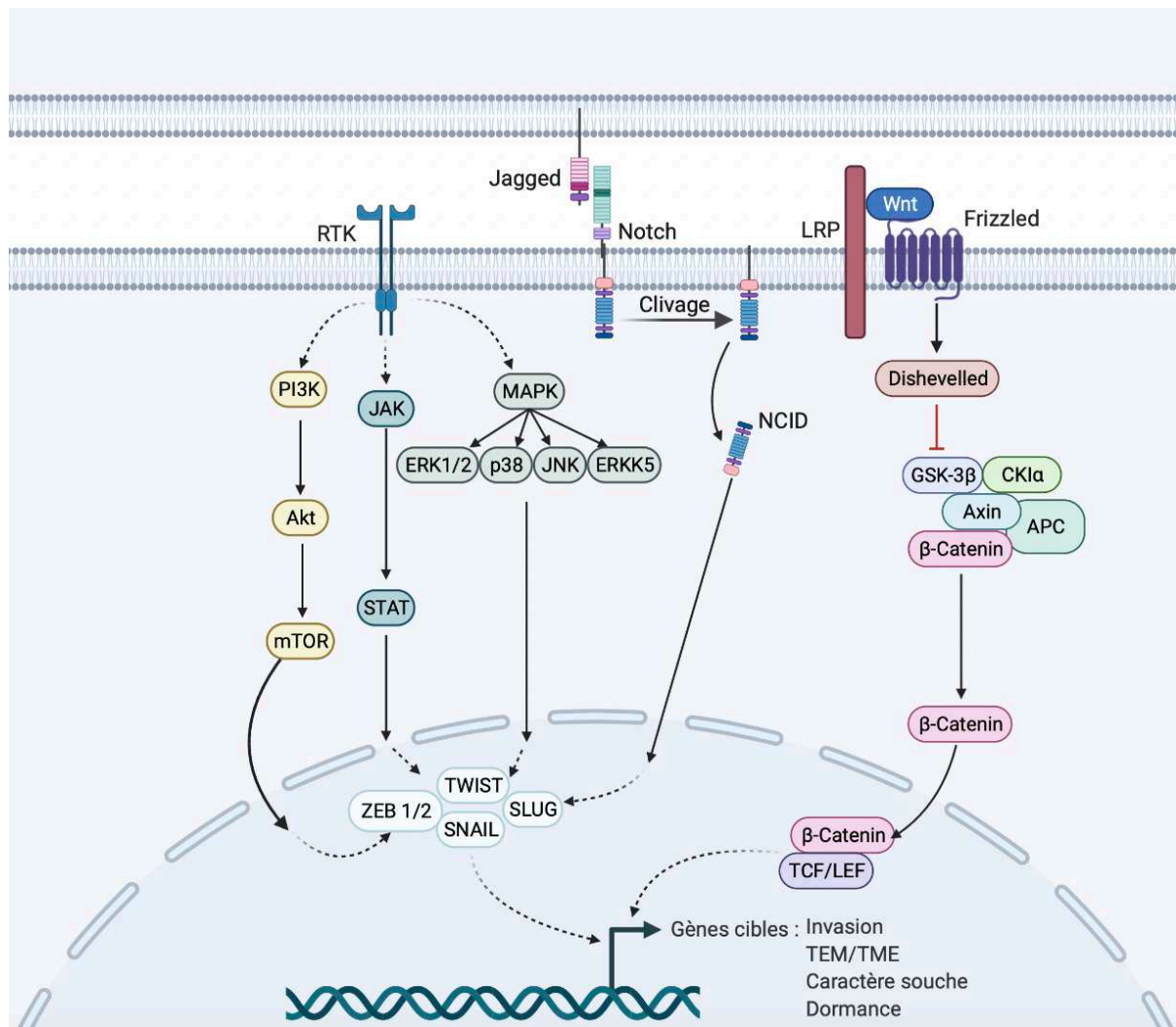


Figure 5. Illustration des voies de signalisation majeures régulatrices de la plasticité cellulaire. Les voies PI3K/Akt, JAK/STAT et MAPK sont activées par les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK, flèche en pointillé). Chacune de ces voies active les facteurs de transcription de la TEM comme ZEB, TWIST, SLUG et SNAIL. L'interaction entre Jagged et Notch induit le clivage du récepteur Notch (flèche noire « clivage »), libérant la partie NCID (« Notch intracellular domain ») qui est transloquée dans le noyau pour agir comme co-facteur de transcription. L'activation du récepteur Frizzled par Wnt mène à l'inhibition de GSK-3 β empêchant la dégradation de la β -caténine par le protéasome. La β -caténine est alors transloquée dans le noyau pour exercer son activité transcriptionnelle. L'activation de ces différentes voies mène à la transcription de gènes impliqués dans l'invasion, la TEM/TME, le caractère souche et la dormance cellulaire. La figure est réalisée à l'aide du site biorender (<https://biorender.com>).

iii. Les facteurs de transcription c-MYC, HIF et NANOG en tant que régulateurs de la plasticité cellulaire

c-MYC est un facteur de transcription impliqué dans la prolifération, la différenciation, l'angiogenèse, l'apoptose, le métabolisme, la TEM et l'invasion cellulaire (Dang C. 2012). Dans le cancer du sein, l'élévation du niveau de c-MYC est associée avec des tumeurs de haut grade, le sous-type TNBC, une survie globale courte et un risque élevé de rechute (Qu J. *et al*, 2017). Son rôle dans l'invasion implique la déacétylation de la α -tubuline par la HDAC6 (*histone deacetylase 6*) menant à la réorganisation du réseau de vimentine permettant la migration cellulaire (Usman S. *et al*, 2021). L'activation de c-MYC par l'axe IL-6/STAT3 induit l'expression de PIM1 pour enclencher le processus de TEM et l'acquisition du phénotype souche (Gao X. *et al*, 2019). c-MYC favorise la colonisation métastatique dans le cerveau notamment en favorisant la formation des jonctions cellulaires entre les astrocytes et les cellules tumorales (Lee H. Y. *et al*, 2019). Vis-à-vis du caractère souche, c-MYC est un régulateur transcriptionnel des marqueurs de CSC (CD44, CD133, CD29, ALDH et EpCAM) (Liu Y. *et al*, 2021). De plus, c-MYC à travers son interaction avec MCL1 (*myeloid cell leukemia sequence 1*) permet l'acquisition par les CSC mammaires d'un profil métabolique oxydatif stimulant la signalisation HIF-1 α (*hypoxia inducible factor*) et l'augmentation de la production de ROS (Lee K. *et al*, 2017). Dans 83% de TNBC, le traitement de chimiothérapie cause l'activation de l'axe c-MYC/MCL1 participant à l'enrichissement en CSC et à la récurrence tumorale (Lee K. *et al*, 2017). c-MYC favorise aussi la prolifération cellulaire et la glycolyse en augmentant la transcription des transporteurs du glucose GLUT (*glucose transporter*) (Wu Z. *et al*, 2020).

HIF1 est composé de deux sous-unités, la sous-unité α et de la sous-unité β (Zhang Y. *et al*, 2021). En condition normoxique, HIF-1 α est dégradé par le protéasome alors qu'en condition hypoxique il est stabilisé et transloqué dans le noyau pour former un hétérodimère avec HIF-1 β . L'hétérodimère de HIF1 induit alors l'expression de nombreux gènes impliqués dans le processus de la progression tumorale en favorisant la croissance tumorale, l'angiogenèse et la métastase (Zhang Y. *et al*, 2021). Dans le processus métastatique, HIF-1 induit l'expression de SNAIL, ZEB1 et TWIST déclenchant le processus de TEM. De plus, HIF1 induit la transcription des MMP2 et 9 ainsi que de la lysyl oxydase permettant le remodelage de la matrice et l'invasion cellulaire (Zhang Y. *et al*, 2021). HIF1 participe au maintien du caractère souche en augmentant l'expression des facteurs de la pluripotence NANOG, OCT4 (*octamer binding transcription factor*), SOX2 (*sry-box transcription factor 2*) et KLF4 (*kruppel like factor 4*) (Zhang Y. *et al*, 2021). HIF participe à la survie cellulaire en favorisant l'activité de la glycolyse au détriment du métabolisme oxydatif en réduisant le flux de pyruvate dans le cycle de Krebs par la diminution de l'expression de la PDH (*pyruvate dehydrogenase*) (Kim J.W. *et al*, 2006 ; Altomus M. *et al*, 2019). De plus, il augmente l'expression du glutathion et de l'anti-apoptotique BCL2 (*B-cell lymphoma 2*) diminuant la production de ROS et l'apoptose (Xiang L. and Semenza G., 2019).

Une étude de Godet et collaborateurs relie l'activation de HIF avec la sensibilité aux drogues. Lors du traitement des TNBC avec de la doxorubicine ou du paclitaxel, HIF est activé

ce qui conduit à la diminution de la sensibilité à ces agents et favorisant l'apparition de métastase (Godet I. *et al*, 2021). L'activation de HIF par la signalisation MAPK, indépendamment de l'hypoxie, mène à l'expression de gènes inducteurs de l'arrêt du cycle cellulaire, modérateur de la production de ROS et d'anti-apoptotique favorisant la survie cellulaire face aux agents cytotoxiques (Sang N. *et al*, 2003 ; Nomura A. *et al*, 2016).

NANOG est un facteur de transcription principalement exprimé durant le développement embryonnaire. En interagissant avec OCT4, SOX2 et KLF4 il régule la pluripotence cellulaire et le maintien du caractère souche (Jeter C. *et al*, 2015). Dans le cancer du sein, son expression est associée avec un mauvais pronostic de survie globale et à la sensibilité aux thérapies anti-cancéreuses (Nagata T. *et al*, 2014).

NANOG est associé au caractère souche par son expression concomitante avec des marqueurs de ce phénotype tels que CD133⁺, CD44⁺, ALDH⁺ (Jeter C. *et al*, 2011). Almozyan et collaborateur, montrent que l'activation de Akt induit l'expression de NANOG et OCT4 permettant le maintien du caractère souche (Almozyan S. *et al*, 2017). Le rôle de NANOG dans le processus de TEM passe par l'induction de la transcription de gènes du caractère M (ex. SLUG, SNAIL) (Jeter C. *et al*, 2015).

Dans le cancer du sein, il est observé que l'inhibition de NANOG augmente la sensibilité aux drogues de chimiothérapie et diminue la prolifération cellulaire, le potentiel de formation de sphères et la migration *in vitro* (Jeter C. *et al*, 2015). NANOG participe à l'échappement thérapeutique avec l'augmentation de l'expression de transporteurs d'efflux ABCB1 et empêche l'activation de l'apoptose induite par p53 en réponse aux dommages à l'ADN causés par les drogues (Wang M. *et al*, 2013). Le rôle de NANOG dans la survie cellulaire passe aussi par l'augmentation de la transcription de Tcl1a (*T cell leukemia/lymphoma 1A*) qui active Akt pour s'opposer à l'apoptose et à l'échappement de la surveillance immunitaire (Noh K. *et al*, 2012).

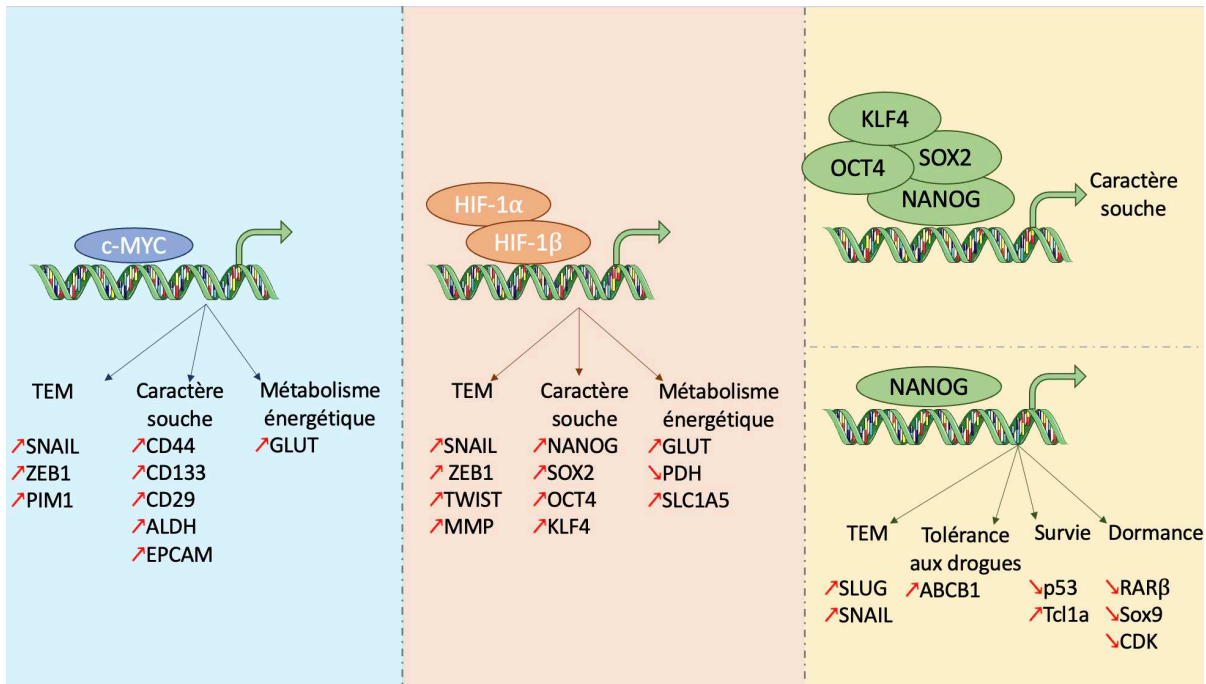


Figure 6. Illustration des gènes cibles des facteurs de transcription c-MYC, HIF et NANOG dans la régulation de la plasticité cellulaire. c-MYC permet la transcription de gènes impliqués dans le processus de TEM, la régulation du caractère souche et du métabolisme énergétique. Les facteurs de transcription HIF en se fixant permettent la transcription de gènes en lien avec le processus de TEM, la régulation du caractère souche et du métabolisme énergétique. NANOG par son interaction avec les facteurs de la pluripotence KLF4, OCT4 et SOX2 active la transcription de gènes permettant le maintien du caractère souche (panel du haut de la partie droite). NANOG seule régule la transcription de gènes impliqués dans le processus de TEM, permettant la tolérance aux drogues, la survie cellulaire et la dormance (panel du bas de la partie droite). Flèche oblique rouge vers le haut : augmentation de la transcription ; flèche oblique rouge vers le bas : diminution de la transcription ; TEM : transition épithélio-mésenchymateuse ; CD : « cluster of differentiation » ; MMP : « matrix metalloprotease » ; GLUT : « glucose transporter » ; PDH : « pyruvate dehydrogenase » ; ABCB1 : « ATP binding cassette subfamily B member 1 » ; CDK : « cycline dependent kinase ».

C. La reprogrammation métabolique impliqué dans la rechute du cancer du sein triple négatif suite au traitement de chimiothérapie

Le métabolisme énergétique est un processus central dans la survie et l'adaptation des cellules au stress environnemental. Sa dérégulation dans le cancer joue un rôle important dans la formation de la tumeur primaire ainsi que le processus métastatique.

1. Description générale des voies métaboliques énergétiques

La phosphorylation oxydative (OXPHOS) est une voie métabolique par laquelle les produits de la glycolyse, du cycle de Krebs et de la β -oxydation des acides gras que sont intermédiaires NADH (*nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen*) et FADH₂ (*reduced flavine adenine dinucleotide*) seront réduits par oxydation dans la chaîne de transport d'électrons (ETC) (Mullen A. *et al*, 2012). La ETC est composée de 4 complexes nommés de I à IV localisés sur la membrane mitochondriale. La réduction du NADH et du FADH₂ permet la circulation des électrons dans la ETC dont l'accepteur final est le dioxygène réduit en molécule d'eau. Durant ce processus, les protons présents dans l'espace inter-membranaire sont transportés dans la matrice mitochondriale interne au travers du complexe V, ou ATP-synthase, permettant la formation d'ATP (*adenosine tri-phosphate*). Il existe trois nutriments permettant d'alimenter l'OXPHOS :

- **Le pyruvate**, produit par la glycolyse, est importé dans la mitochondrie grâce au MPC (*mitochondrial pyruvate carrier*) puis pris en charge par la PDH pour être converti en acétyl-CoA (*acetyl-coenzyme A*) et être intégré dans le cycle de Krebs (Varghese E. *et al*, 2020).
- **Les acides gras** à longues chaînes sont convertis dans la mitochondrie par la réaction de β -oxydation (OAG) en molécules de acétyl-CoA pour entrer dans le cycle de Krebs (Sun X. *et al*, *Front. Oncol.*, 2020).
- **Les acides aminés** comme la glutamine, la sérine et la glycine. La glutamine est la plus abondante et, par la glutaminolyse, elle est convertie en glutamate lui-même métabolisé en α -kétoglutarate pour être intégré au cycle de Krebs. Le glutamate est aussi un précurseur du glutathion régulateur de l'homéostasie d'oxydoréduction (Lampa M. *et al*, 2017).

La glycolyse a pour fonction principale la production d'énergie sous forme d'ATP ainsi que d'intermédiaires, comme le NADH, utilisés par le cycle de Krebs. Le glucose entre dans la cellule grâce aux transporteurs de la famille GLUT. Le glucose dans le cytoplasme est transformé en G6P (*glucose-6-phosphate*) par la HK2 (*hexokinase 2*) qui est la première enzyme de la cascade glycolytique. Le G6P, dans la glycolyse, est pris en charge par les différentes glucokinases et isomérases pour mener à la formation du pyruvate et à la production de ATP. Le pyruvate peut être converti en lactate *via* la LDHA (*lactate*

deshydrogenase A) permettant la production de NADH. Le lactate peut aussi être importé depuis le milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire *via* les transporteurs membranaires de la famille MCT (*monocarboxylase transporter*). Ainsi, il peut être converti en pyruvate par la LDHB et contribue au fonctionnement du cycle de Krebs où 50% de ces intermédiaires dérivent du lactate (Desbats M. *et al*, 2020). Le G6P peut aussi entrer dans la voie des pentoses phosphates (PPP) et être converti en 6-phosphoglucolactone par la glucose-6-phosphate déshydrogénase. Durant ces réactions enzymatiques il y aura la formation de NADPH (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphatase*), de ribose phosphate et fructose-6-phosphate pour subvenir au besoin anabolique des cellules cancéreuses en condition de stress énergétique (Wang L. *et al*, 2021). La voie des PPP permet de diminuer la quantité de ROS intracellulaire pour favoriser la survie et la prolifération cellulaire.

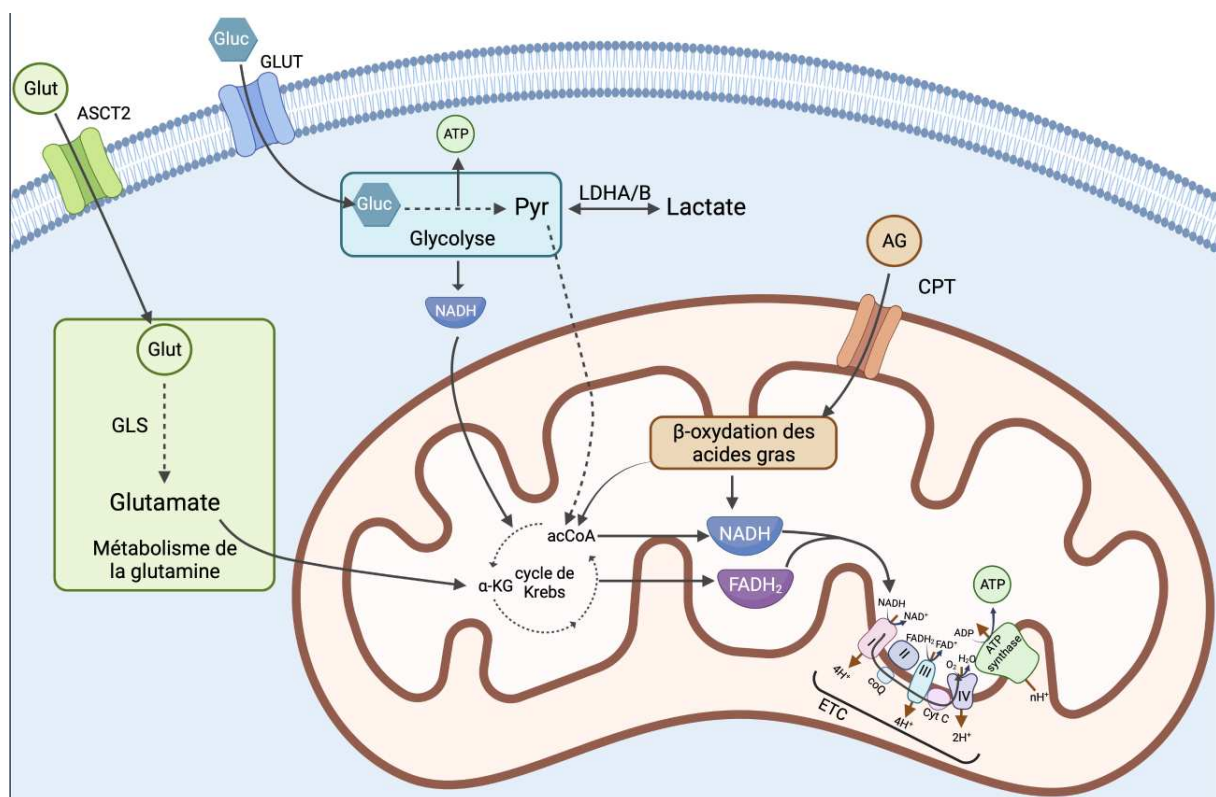


Figure 7. Illustration du métabolisme énergétique. La glutamine est importée depuis le milieu extracellulaire *via* les transporteurs membranaires ASCT2 (voie en vert). Dans le cytoplasme, la glutamine est métabolisée par l'enzyme GLS (« glutaminase », flèche en pointillé) en glutamate pour être intégrée dans le cycle de Krebs grâce à sa transformation en α-KG (α-kétoglutarate). Le glucose est capté depuis le milieu extracellulaire par les transporteurs GLUT (*glucose transporter*) pour former du pyruvate (Pyr) à la fin de la glycolyse (flèche en pointillé, voie bleue). Au cours de la glycolyse il est produit de l'ATP et du NADH (*nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen*). Le pyruvate par l'action de l'enzyme LDHA forme du lactate, ce dernier par l'action de l'enzyme LDHB forme du pyruvate (double flèche). Le pyruvate peut être transporté dans la mitochondrie (flèche en pointillé courbée) pour former de l'acétyl-Coenzyme A (acCoA) et être intégré dans le cycle de Krebs. Les acides gras (AG) peuvent entrer dans la mitochondrie *via* les transporteurs CPT (*carnitine palmitoyltransferase*, voie orange). Une fois dans la matrice mitochondriale, les acides gras subissent le β-oxydation permettant la formation d'acétyl-Coenzyme A et leur intégration dans le cycle de Krebs. Durant la réaction de β-oxydation du NADH est produit. Lors du fonctionnement du cycle de Krebs (flèche en pointillé formant un rond) il est produit du NADH et du FADH₂ (*reduced flavine*

adenine dinucleotide) permettant l'activité de la ETC (chaîne de transport des électrons) menant à la formation d'ATP. Dans la ETC, les flèches marrons montrent le trajet des protons et la flèche noire le trajet des électrons. H⁺ : proton ; n : nombre de proton ; coQ : coenzyme Q ; Cyt C : Cytochrome C ; I : complexe 1 ; II : complexe 2 ; III : complexe 3 ; IV : complexe 4 ; O₂ : dioxygène ; H₂O : molécule d'eau. La figure est réalisée à l'aide du site biorender (<https://biorender.com>).

2. La reprogrammation métabolique dans le TNBC

Le métabolisme énergétique est l'un des moyens que possède la cellule pour s'adapter et survivre en fonction du microenvironnement tumoral. Sous influence des voies de signalisation et des facteurs de transcription discutés précédemment, les cellules cancéreuses modulent l'activité des voies métaboliques énergétiques favorisant la progression tumorale. En 1924 Otto Warburg montre que les cellules cancéreuses utilisent préférentiellement la glycolyse, même en condition aérobie, pour permettre l'approvisionnement en ATP, nucléotide, lipide et acide aminés nécessaires à la croissance cellulaire (Warburg O., 1930). Ce phénomène est nommé effet Warburg et permet de palier le mauvais fonctionnement des mitochondries ainsi que de limiter la production de ROS due à l'O₂PHOS (Machida K. *et al*, 2018). Cependant, les cellules TNBC montrent un phénotype métabolique double pouvant utiliser les métabolismes glycolytiques et d'O₂PHOS en condition aérobie (Wang L. *et al*, 2021).

Dans le TNBC, la glycolyse est accrue due à l'augmentation de l'expression des enzymes de cette voie (Shen L. *et al*, 2015). Ainsi, l'activation d'Akt diminue l'endocytose des transporteurs GLUT favorisant la captation du glucose et la glycolyse (Avanzato D. *et al*, 2018). La signalisation de l'EGF est fortement activée dans le TNBC ; son activation induit la stabilisation de GLUT1, l'augmentation de l'expression de la HK2 et la diminution de la phosphorylation de PKM2 (*pyruvate kinase 2*; enzyme régulatrice du devenir du pyruvate) (Wang Z. *et al*, 2020). Réciproquement, les enzymes de la glycolyse peuvent augmenter l'activité de l'EGFR favorisant la prolifération et le maintien de l'activité glycolytique (Lim S. *et al*, 2016). Les transporteurs du lactate (MCT) sont fortement exprimés dans le TNBC, leur présence est associée à l'augmentation de la prolifération et de la migration cellulaire (Sun X. *et al*, *Front. Oncol.*, 2020). Dans le cancer du sein, l'expression élevée de certaines enzymes de la PPP telles que la glucose-6-phosphate déshydrogénase et la transkétolase, est associée à une survie courte et un risque de rechute élevé (Wang L. *et al*, 2021).

L'O₂PHOS en fonction du contexte cellulaire peut être augmenté ou diminué dans TNBC. La faible activité de l'O₂PHOS est la conséquence de l'accumulation de mutations sur l'ADN mitochondrial causant la diminution de la transcription des complexes I à V de la chaîne respiratoire mitochondriale (Sun X. *et al*, *Front. Oncol.*, 2020). L'augmentation de l'O₂PHOS est en relation avec la répression de RB1 (*RB transcriptional corepressor 1*, protéine régulatrice du cycle cellulaire) et d'un flux glycolytique important. L'inhibition de RB1 lève son action répressive sur la transcription des gènes impliqués dans la traduction des protéines mitochondriales favorisant la traduction des protéines mitochondriales participant à l'O₂PHOS (Jones R. *et al*, 2016). De façon surprenante, l'inhibition de la voie PI3K/Akt diminue

la prolifération mais promeut l'invasion cellulaire par l'augmentation de l'OXPPOS et la relocalisation des mitochondries vers le cytosquelette (Wang L. *et al*, 2021).

Dans la mitochondrie, la OAG est une source indispensable de ATP, NADH et NADPH conférant un avantage prolifératif et d'invasion aux cellules cancéreuses (Sun X. *et al*, Front. Oncol., 2020). L'augmentation de l'activité des protéines de la ETC est en lien avec la présence de Src dans la mitochondrie dont elles sont les cibles. Ainsi, dans le TNBC, la OAG induit la phosphorylation activatrice de Src (tyrosine 419) qui à son tour phosphoryle les protéines des complexes de la ETC augmentant son fonctionnement et la production d'énergie pour soutenir le processus métastatique (Sun X. *et al*, Front. Oncol., 2020). De plus, Src en phosphorylant les CPT (*carnitine palmitoyltransferase*), favorise l'import des acides gras à longues chaînes dans la mitochondrie et par conséquent la OAG (Sun X. *et al*, Front. Oncol., 2020).

La captation et le métabolisme des acides aminés, notamment de la glutamine, sont augmentés dans le TNBC lui conférant un avantage de survie (Lampa M. *et al*, 2017). L'activation de c-MYC augmente la captation des acides aminés (sérine, glutamine, glycine et tryptophane) menant à l'élévation du fonctionnement du cycle de Krebs et de la synthèse des molécules mono-carbonées (Wang L. *et al*, 2021). La conversion de la glutamine en glutamate est nécessaire à la survie des cellules TNBC ; elle se fait par la famille d'enzymes mitochondriales GLS (*glutaminase*). Son inhibition diminue la croissance cellulaire *in vitro* et *in vivo* uniquement dans le TNBC plus particulièrement dans le sous-type BL. Cela suggère une dépendance au métabolisme de la glutamine dans le TNBC pour la prolifération et la survie (Lampa M. *et al*, 2017). Le glutamate, permet aussi la formation de GABA (*γ-aminobutyric acid*) un neurotransmetteur qui est ensuite catabolisé par l'enzyme ABAT (*γ-aminobutyrate aminotransferase*) en succinic semialdéhyde. Lors de la TEM, dans le BL l'expression de ABAT est réprimée par SNAIL menant à l'accumulation de GABA et à l'activation autocrine de sa signalisation favorisant la métastase (Wang Z. *et al*, 2020).

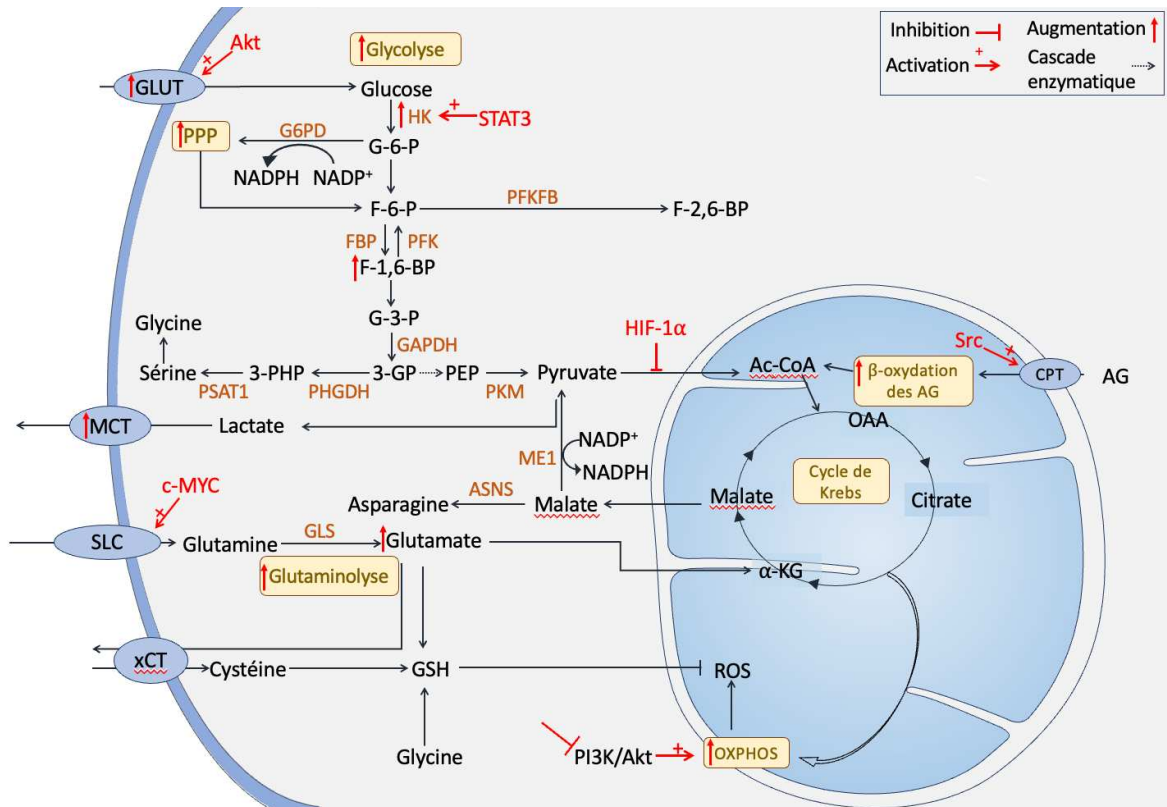


Figure 8. Les changements du métabolisme énergétique dans le cancer du sein triple négatif. Dans le cancer du sein triple négatif la glycolyse, la PPP (*pentose phosphate pathway*), la glutaminolyse, la β-oxydation des acides gras et l’OXPHOS sont augmentées sous l’influence des voies de signalisation PI3K/Akt, STAT3 et Src ainsi que l’activation de facteurs de transcription c-MYC et HIF (en rouge). En orange, les enzymes régulatrices des différentes voies métaboliques. GLUT: « glucose transporter »; HK: « hexokinase »; G-6-P: « glucose-6-phosphate »; G6PD: « glucose-6-phosphate dehydrogenase »; FBP: « fructose-bisphosphatase »; PFK: « phosphofructokinase »; F1,6BP: « fructose-1,6-bisphosphate »; G-3-P: « glyceraldehyde-3-phosphate »; GAPDH: « glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase »; 3-GP: « 3-phosphoglyceric acid »; PHGDH: « phosphoglycerate dehydrogenase »; 3-PHP: « phosphohydroxypyruvate »; PSAT1: « phosphoserine aminotransferase 1 »; PEP: « phosphoenolpyruvic acid »; Ac-CoA: « acetyl-coenzymeA »; PKM: « pyruvate kinase »; NADPH: « Nicotinamide Adénine Dinucléotide phosphate »; ME1: « Malic enzyme 1 »; ASNS: « asparagine synthetase »; GLS: « glutaminase »; GSH: « glutathione synthase »; « SLC: « solute carrier family ». Adaptée de Wang Z. *et al*, 2020.

3. La reprogrammation métabolique favorise la récurrence dans le TNBC

i. La reprogrammation métabolique durant le processus métastatique

Au niveau de la tumeur primaire, la forte activité glycolytique induit l’acidification du microenvironnement par l’augmentation de la sécrétion de lactate. Cela promeut l’évasion des cellules tumorales depuis la tumeur primaire. Dans le TNBC l’expression accrue de GLUT1 augmente le potentiel invasif (Sun X. *et al*, *Front. Oncol.*, 2020). Lors de la dissémination métastatique, les CCT présentent une augmentation de la voie PPP pour augmenter la

production des antioxydants NADPH et GSH (*glutathione synthase*) les protégeant du stress oxydatif (Wang L. *et al*, 2020).

Dans le cancer du sein, durant le processus métastatique il est observé une activité accrue de la ETC préservant les fonctions mitochondriales en augmentant le fonctionnement du cycle de Krebs (Porporato P. *et al*, 2014). Ce phénomène s'accompagne de l'activation de la signalisation de Src et de kinases d'adhésion focale tel que Pyk2 (*protein tyrosine kinase 2*) induisant la métastase de façon dépendante de l'OXPPOS (Porporato P. *et al*, 2014). Dans le cancer du sein l'augmentation de la OAG est en lien avec l'augmentation de PGC1- α (*peroxisome proliferator-activated receptor-Gamma coactivator 1 alpha*) permettant la conservation de l'homéostasie énergétique et la viabilité cellulaire (Wang Z. *et al*, 2020). De plus, son activation favorise l'enclenchement de la TEM dans la tumeur primaire et augmente l'agressivité tumorale (Sun X. *et al*, *Front. Oncol.*, 2020). L'élévation du niveau de ROS mène à l'activation du facteur de la TEM SNAIL induisant son activation et le maintien du caractère souche (Xiong G. *et al*, 2018). Durant la TEM, l'activation de TWIST augmente la transcription de AKR1B1 (*aldo-keto reductase 1 member B1*, enzyme NADPH dépendante du métabolisme des acides aminés et des lipides) qui, à son tour, active NF- κ B augmentant ainsi l'expression de TWIST. Cela crée une boucle d'autorégulation dépendante de l'expression de AKR1B1 pour le maintien de l'induction de la TEM et du caractère CSC (Sun X. *et al*, *Front. Cell. Dev. Biol.*, 2020). De plus, l'augmentation de l'expression de FASN (*fatty acid synthase*), enzyme de la synthèse des lipides, est associée à un risque élevé de récurrence dans le TNBC (Wang L. *et al*, 2020).

Une étude analysant le métabolisme des cellules normales et cancéreuses mammaires montre une augmentation significative du ratio glutamate/glutamine dans les cellules cancéreuses. La même observation est obtenue en comparant des cellules fortement invasives aux cellules faiblement invasives suggérant que le métabolisme de la glutamine est relié à la progression tumorale et au potentiel invasif (Desbats M. *et al*, 2020).

Le métabolisme glucidique, tout comme le stress oxydatif, jouent un rôle crucial dans la régulation du processus de TEM. En effet, les cellules cancéreuses favorisent la glycolyse aérobie pour la production rapide d'énergie et d'intermédiaires nécessaires à l'augmentation du potentiel invasif et métastatique des cellules cancéreuses (Sun X. *et al*, *Front. Cell. Dev. Biol.*, 2020). Les cellules à haut potentiel métastatique sont capables de changer de sources énergétiques, d'adopter la glycolyse ou l'OXPPOS, lors du processus métastatique permettant aux cellules de s'adapter à leur environnement (Dupuy F. *et al*, 2015 ; Gandhi N. and Das G., 2019). Les cellules métastasantes au foie augmentent l'expression de HIF-1 α et de la PDK1 (*pyruvate dehydrogenase kinase 1*) favorisant la glycolyse. Ainsi, le pyruvate est principalement converti en lactate au détriment de l'OXPPOS pour favoriser la colonisation métastatique dans le foie (Dupuy F. *et al*, 2015). Cela est permis par la coopération gluconéogénique (la conversion du lactate en glucose ainsi que d'autres métabolites) entre les cellules hépatiques et les cellules cancéreuses, assurant ainsi la survie et l'expansion des cellules cancéreuses. A l'inverse, dans le poumon et les os, les cellules métastatiques favorisent l'OXPPOS et la biogenèse mitochondriale en augmentant la

transcription de PGC1- α (Dupuy F. *et al*, 2015). Dans le TNBC l'activation de la OAG favorise l'invasion ganglionnaire où son activation est plus importante dans les lésions métastatiques comparées à la tumeur primaire (Sun X. *et al*, Front. Oncol., 2020). La OAG limite le stress oxydatif tout en maintenant l'activité de l'OXPPOS pour la production d'énergie nécessaire à la métastase (Sun X. *et al*, Front. Oncol., 2020). Son effet facilitateur de l'OXPPOS dans le TNBC passe aussi par l'augmentation de PGC1- α (Camarda R. *et al*, 2016). Lors de la métastase cérébrale, il est observé l'augmentation des deux voies métaboliques glycolyse/PPP et l'OXPPOS (Chen J. *et al*, 2015). Avec l'OXPPOS les cellules métastatiques voient le métabolisme des acides aminés augmenté. Ainsi, l'adaptation métabolique des cellules tumorales se traduit par l'acquisition de leur capacité à cataboliser le GABA, formé à partir du glutamate, pour produire du NADPH tout comme les cellules neurales. Cela leur confère un avantage prolifératif et de survie dans le cerveau (Wang L. *et al*, 2021). L'ensemble de ces études montre que les changements métaboliques permettent l'adaptation et la survie des cellules métastatiques au nouvel environnement.

ii. La reprogrammation métabolique dans les CSC

Durant la glycolyse aérobie, l'augmentation de la PDK permet l'enrichissement en CSC (Peng F. *et al*, 2018). De plus, quel que soit le sous-type de cancer du sein, l'élévation du niveau de PDK est associée à une mauvaise réponse au traitement anti-cancéreux (Peng F. *et al*, 2018). Dans plusieurs types de cancers le caractère souche est associé à une augmentation de la masse mitochondriale, du potentiel de membrane et de l'OXPPOS créant une dépendance des cellules souches au métabolisme mitochondrial (De Luca A. *et al*, 2015). L'augmentation de l'OXPPOS et du niveau de ROS participe au maintien des propriétés souches dans le cancer du sein (Lee K. *et al*, 2017). Il est observé *in vitro* que les cellules souches dérivant des lignées TNBC MDA-MB-231 et SUM159-PT ont un profil métabolique d'OXPPOS caractérisé par une augmentation de la consommation de glucose et de la production d'ATP sans changement de la production de lactate (Vlashi E. *et al*, 2014). Cela est due à l'élévation du couple c-MYC/MCL1 et de l'activation de HIF-1 α (Lee K. *et al*, 2017). L'enrichissement en CSC dans le TNBC est aussi en relation avec l'activation de HIF et de l'oxydation de ATM (*ataxia telangiectasia mutated*). En effet, l'activation de HIF augmente la captation du glucose et l'oxydation de ATM redirige le flux glycolytique vers la mitochondrie pour la conversion du pyruvate et du citrate en acétyl-CoA. Ceci augmente le fonctionnement du cycle de Krebs et de l'OXPPOS pérennisant le caractère souche (Yang D. *et al*, 2020). De façon intéressante, bien que les CSC soient fortement hétérogènes en termes de glycolyse et de l'OXPPOS, elles seront toutes affectées de la même façon par les inhibiteurs mitochondriaux puisque l'augmentation de l'OXPPOS et l'élévation de ROS permettent de maintenir le caractère souche (Vlashi E. *et al*, 2014 ; Lee K. *et al*, 2017).

iii. Le métabolisme énergétique hybride

Dans le TNBC, les cellules montrent un phénotype métabolique actif avec l'utilisation à la fois de l'OXPPOS et de la glycolyse (Wang L. *et al*, 2020). En effet, il est observé dans la tumeur primaire de sein que les cellules glycolytiques du stroma soutiennent la prolifération et la survie des cellules tumorales. Cela est dû à l'échange entre les cellules stromales et tumorales de métabolites issues de la glycolyse créant une « symbiose » métabolique entre elles (Wang L. *et al*, 2020 ; Lyssiotis C. and Kimmelman A., 2017). D'autres cellules montrent une activité de l'OXPPOS supérieure à celle de la glycolyse (Wilde L. *et al*, 2017). Une troisième catégorie de cellules montre un métabolisme hybride glycolyse/OXPPOS. Dans ce dernier cas, les cellules utilisent la glycolyse pour la production d'ATP et les produits de la glycolyse seront redirigés vers la mitochondrie pour être utilisée *via* l'OXPPOS pour la production de l'ATP (Jia D. *et al*, 2018). Ces cellules avec un métabolisme hybride montrent un haut potentiel de prolifération comparées aux cellules n'utilisant que la glycolyse ou que l'OXPPOS (Jia D. *et al*, 2019). De même, le phénotype hybride métabolique permet de maintenir un niveau de ROS bas stimulant l'agressivité tumorale, la métastase et l'échappement thérapeutique (Desbats M. *et al*, 2020). Récemment, Ren et collaborateurs ont montrés que les cellules avec un métabolisme hybride expriment des marqueurs des phénotypes E et M associées à des propriétés souches et de TEM (Ren Z. *et al*, 2022). Cette plasticité métabolique participe au maintien de l'équilibre entre l'état M et E des CSC par la régulation du niveau de ROS et de l'activité des systèmes anti-oxydants (Luo M. *et al*, 2018). Ainsi, le caractère métabolique hybride augmente la propagation des cellules cancéreuses et participe à l'enrichissement en CSC grâce à la possibilité pour les cellules d'alterner rapidement entre la glycolyse et l'OXPPOS (Jia D. *et al*, 2019).

4. La reprogrammation métabolique favorise l'échappement au traitement de chimiothérapie dans le TNBC

Les cellules persistantes au traitement de chimiothérapie montrent différents types de métabolisme, certaines seront dépendantes à l'OXPPOS (Echeverria G. *et al*, 2019) et d'autres montreront un métabolisme glycolytique élevé (Doyen J. *et al*, 2014). L'existence de ces deux types de métabolisme pourrait être la conséquence de la plasticité métabolique en réponse aux agents cytotoxiques. En effet, Jia et collaborateurs montrent que les cellules cancéreuses de sein sont capables de passer d'un métabolisme d'OXPPOS à la glycolyse et inversement afin de contourner l'inhibition de l'un de ces processus (Jia D. *et al*, 2019). Cette évolution métabolique, au cours du traitement, permet l'adaptation et la survie des cellules cancéreuses (De Angelis M. *et al*, 2019).

Les voies énergétiques de la glycolyse et de l'OXPPOS participent donc à différents niveaux à l'échappement thérapeutique. A la suite du traitement de chimiothérapie, certaines cellules persistantes TNBC montrent une augmentation de la captation du glucose et de la fermentation lactique (Zhou M. *et al*, 2010). Le traitement avec du paclitaxel augmente

l'expression de la LDHA favorisant la conversion du pyruvate en lactate. L'inhibition de la LDHA en simultané avec un traitement au paclitaxel augmente l'apoptose des cellules cancéreuses (Zhou M. *et al*, 2010). Cette première observation est appuyée par la relation entre les pompes d'efflux et la glycolyse (Nakano A. *et al*, 2011). Cela est décrit dans le neuroblastome où l'utilisation d'un inhibiteur de la glycolyse, le 3-BrPy, impacte la viabilité cellulaire par la diminution de production d'ATP et de lactate. Son utilisation combinée avec des drogues de chimiothérapie induit l'augmentation de la concentration intracellulaire des drogues et la diminution du flux glycolytique. Ceci est dû au fait que l'inhibition de la glycolyse conduit à une diminution de la production d'ATP, et par conséquent à une réduction de l'activité des pompes d'efflux dépendantes de l'ATP (Bean J. F. *et al*, 2014).

Les cellules TNBC persistantes au traitement de chimiothérapie montrent une dépendance à l'OXPPOS pour la prolifération et la survie (Echeverria G. *et al*, 2019 ; Evans K. *et al*, 2021). Son augmentation participe aussi à l'échappement thérapeutique en augmentant la proportion de CSC *via* l'activation de HIF1- α (Lee K. *et al*, 2017). Dans le cancer du sein, l'augmentation du métabolisme lipidique favorise l'état de dormance cellulaire et la rechute à la suite du traitement de chimiothérapie à base de taxane (Havas K. *et al*, 2017 ; Wang T. *et al*, 2018). De plus, l'augmentation de l'expression de c-MYC à la suite du traitement de chimiothérapie active la OAG permettant un changement du profil métabolique en réponse aux drogues de chimiothérapie (Desbats M. *et al*, 2020). L'activation constitutive de PI3K/Akt augmente le fonctionnement du système antioxydant diminuant la sensibilité au stress oxydatif (Zaal E. and Berkers C., 2018).

Le métabolisme des acides aminés, notamment la concentration en glutamate, est relié au pronostic clinique dans le cancer du sein (Desbats M. *et al*, 2020). Dans le TNBC un tiers des tumeurs montrent une expression élevée de xCT (antiport cystéine/glutamate) qui est nécessaire pour la synthèse d'antioxydant GSH et le maintien du caractère CSC (Timmerman L. *et al*, 2013). Son expression est augmentée par le traitement de chimiothérapie favorisant la survie cellulaire (Lu H. *et al*, 2015 ; Jeon Y. *et al*, 2015). Le traitement avec de la doxorubicine induit une augmentation de la synthèse de sérine, permettant ainsi le maintien de la production de NADPH en s'opposant à l'élévation de la concentration de ROS dues aux drogues de chimiothérapie. Ce changement métabolique favorise l'enrichissement en CSC, la métastase pulmonaire et l'échappement thérapeutique dans le TNBC (Samanta D. *et al*, 2016).

Problématique et objectifs de la thèse

Le cancer du sein triple négatif est un cancer particulièrement agressif avec un risque élevé de rechute local ou à distance 2 ans après le traitement. Actuellement, le traitement de chimiothérapie reste la meilleure solution thérapeutique. Cependant, moins de la moitié des patients répondent à ce traitement. Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant certaines voies de signalisation ou le microenvironnement a permis d'améliorer la réponse au traitement et le pronostic clinique. Mais, ces solutions thérapeutiques ne sont applicables qu'à un faible nombre de patients qui ne répondront pas tous au traitement.

Récemment, la plasticité cellulaire s'est révélée comme un processus à l'origine de l'hétérogénéité tumorale et de l'échappement thérapeutique. Elle permet l'acquisition du caractère souche, mais aussi d'un état transitoire, ou hybride, entre les caractères épithéliaux et mésenchymaux. Ceci augmente le potentiel adaptatif des cellules au stress environnemental. De nombreuses études ont mis en évidence l'existence de régulateurs de la plasticité cellulaire tels que le microenvironnement tumoral et les facteurs de transcription mais aussi les traitements de chimiothérapie.

Cependant, la plupart des études *in vitro* s'intéressant aux effets des agents de chimiothérapie sur les cellules cancéreuses, sont réalisées à la suite d'une exposition courte (24 à 72 heures) à un seul agent cytotoxique. Il est aussi utilisé des modèles de résistance générés à la suite du traitement des cellules avec des doses croissantes d'une seule drogue dépassant de beaucoup les doses utilisées en clinique. Ces modèles contrastent fortement avec ce qui est réalisé en clinique où les patients sont exposés de façon répétée et durant un temps long à plusieurs agents de chimiothérapie administrés, aux mêmes concentrations, de façon combinée et séquentielle. Peu d'études *in vitro* sont réalisées en suivant le protocole clinique. Deux études menées par Naik et collaborateurs en 2018 puis par Al-Zeheimi et collaborateurs en 2020 ont été réalisées avec les cellules de cancer du sein. Ces études ont mis en évidence des modifications moléculaires (ex. activation de la voie PI3K/Akt) et phénotypiques (ex. augmentation de la migration cellulaire) caractérisant les cellules persistantes au traitement (Naik A. *et al*, 2018 ; Al-Zeheimi N. *et al*, 2020).

Il est donc nécessaire de ré-évaluer la plasticité cellulaire en tenant compte de la pratique clinique. C'est dans ce contexte que s'insère mon projet de thèse qui a pour objectif de mieux comprendre les mécanismes de plasticité cellulaire et leur lien avec la récurrence tumorale et l'échappement thérapeutique dans le cancer du sein triple négatif.

Pour cela, nous avons mis au point deux types de traitement :

- **un traitement combiné et séquentiel dit de court terme** permettant de modéliser *in vitro* la plasticité cellulaire à la suite d'une première exposition aux drogues,

- **un traitement combiné et séquentiel de long terme** mimant le protocole utilisé en clinique actuellement pour appréhender les mécanismes de persistance.

Ces deux modèles nous ont permis d'obtenir des cellules persistantes aux drogues de chimiothérapie qui ont été caractérisées aux niveaux phénotypiques et métaboliques. Cela a été complétée par une analyse moléculaire ciblée puis sans a priori afin d'identifier les mécanismes moléculaires accompagnant ces changements. Ainsi, la première partie de ma thèse a été consacrée à la caractérisation des cellules persistantes au traitement de court terme. Cela a permis de mettre en évidence le rôle de la vimentine dans l'augmentation de l'agressivité tumorale et la diminution de la réponse au traitement avec les drogues de chimiothérapie. La seconde partie a été consacrée à la recherche des changements phénotypiques et moléculaires des cellules persistantes au traitement de long terme. Cette partie du travail montre un lien entre le métabolisme énergétique et la sensibilité aux drogues ainsi que l'invasion cellulaire. L'analyse protéomique sans a priori a mis en avant des cibles reliées à un mauvais pronostic clinique pouvant jouer un rôle dans l'agressivité tumorale.

Matériels et méthodes

A. Culture cellulaire

La lignée cellulaire MDA-MB-231 provient de chez ATCC. Elle est cultivée dans un milieu MEM (Invitrogen), supplémenté de 10% de SVF (sérum de veau foetal ; Lonza), de Zell shield (Cliniscience) et d'acides aminés non essentiels (Gibco). Cette lignée a été isolée à partir d'une effusion pleurale et est rattachée au sous-type triple négatif. Les MDA-MB-231 sont caractérisées par un aspect mésenchymal et possèdent des mutations de CDKN2A, BRAF, KRAS et TP53.

La lignée de cellule SUM159-PT provient de Asterand. Elle est cultivée dans un milieu F-12 (Invitrogen), supplémenté de 5% de SVF, de Zell shield, d'insuline (5 µg/mL ; Sigma), d'hydrocortisone (1 µg/mL ; Sigma) et de HEPES à 1 mM (Gibco). Cette lignée a été isolée d'une tumeur primaire de sous-type triple négatif. Elle montre un aspect mésenchymal avec des mutations sur HRAS, PIK3CA et TP53.

La lignée cellulaire MCF-7 provient de chez ATCC. Elle est cultivée dans un milieu MEM, supplémenté de 10% de SVF, de Zell shield, d'insuline (10 µg/mL) et d'acides aminés non essentiels (Gibco). Cette lignée a été isolée depuis une effusion pleurale et est rattachée au sous-type luminal A. Elle montre un aspect épithélial avec des mutations GATA3, CDKN2A, PIK3CA et TP53.

La lignée de cellule MDA-MB-468 provient de chez ATCC. Elle est cultivée dans du milieu RPMI-1640 (Invitrogen), supplémenté de 10% de SVF et de Zell shield. Cette lignée est issue d'une effusion pleurale de tumeur mammaire rattachée au sous-type triple négatif. Elle possède un aspect épithélial avec des mutations sur PTEN, RB1 et TP53.

L'ensemble des lignées cellulaires est maintenu sous atmosphère humide, à 37°C et 5% de CO₂ (dioxyde de carbone).

B. Protocoles de traitement de chimiothérapie pour l'obtention des cellules persistantes au traitement de court ou de long terme

1. Détermination de l'IC₅₀ des drogues de chimiothérapie

Pour établir la dose des drogues permettant de diminuer la prolifération cellulaire de 50% (IC₅₀) les cellules natives MDA-MB-231 ou SUM159-PT sontensemencées en plaque 96 puits avec 3 300 cellules/cm² la veille du traitement. Dans un premier temps les cellules sont traitées avec une gamme de doses combinant l'épirubicine et le cyclophosphamide avec un ratio 1:5 pour 48 heures dans un milieu contenant 1% de SVF. En parallèle, une seconde plaque de cellules est traitée avec une gamme de doses de paclitaxel dans du milieu contenant 1% de SVF pour 48 heures. Dans le but de définir l'IC₅₀ du traitement séquentiel, 4 doses de chaque gamme diminuant la prolifération cellulaire entre 60 et 70 % sont conservées. Les cellules sont ensuite traitées avec les doses d'épirubicine/cyclophosphamide durant 48 heures puis rincées et traitées avec les doses de paclitaxel pour de nouveau 48 heures. La combinaison de doses

permettant de diminuer de 50% la prolifération cellulaire comparée au contrôle est conservée pour la suite des études.

2. Évaluation de la dose IC50 par test de viabilité au cristal violet

Le cristal violet permet de marquer l'ADN des cellules présentes sur le fond de boîte. Pour la détermination de l'IC50 les cellules, à la fin du traitement, sont fixées au PAF 4% (paraformaldéhyde) durant 10 minutes à l'obscurité et à température ambiante. Ensuite, elles sont rincées au PBS avant d'être incubées dans une solution de cristal violet à 1% durant 30 minutes sous agitation à température ambiante. Les puits sont ensuite rincés à l'eau distillée puis laissés sous la hotte afin de permettre l'évaporation de l'excédent de liquide. Ensuite, les cellules sont lysées dans une solution de PBS contenant 0,5% de Tryton X100 sous agitation à température ambiante durant 1h30. La prolifération cellulaire est alors évaluée par la lecture de la densité optique du cristal violet à une longueur d'onde de 560 nm à l'aide du spectrophotomètre Multiskan™Go (Thermofisher™).

3. Protocole de court terme

Les cellules MDA-MB-231 et SUM159-PT sontensemencées en monocouche la veille du traitement. Elles sont dans un premier temps traitées avec de l'épirubicine (Selleckem) associée au cyclophosphamide (Selleckem) avec un ratio de 1:5 durant 48 heures. Ensuite les cellules sont traitées avec du paclitaxel pour 48 heures supplémentaires. Durant l'ensemble du traitement, les cellules sont maintenues dans leur milieu contenant 1% de SVF. Les MDA-MB-231 sont alors traitées avec 8 nM d'épirubicine combinée à 40 nM de cyclophosphamide durant 48 heures puis avec 1 nM de paclitaxel durant de nouveau 48 heures. Les SUM159-PT sont tout d'abord traitées avec 40 nM d'épirubicine associée avec 200 nM de cyclophosphamide durant 48 heures, ensuite les cellules sont traitées pour 48 heures supplémentaires avec 2 nM de paclitaxel. À la suite du traitement combiné et séquentiel, les cellules sont maintenues dans du milieu de culture sans drogues contenant 1% de SVF durant 96 heures avant d'être analysées.

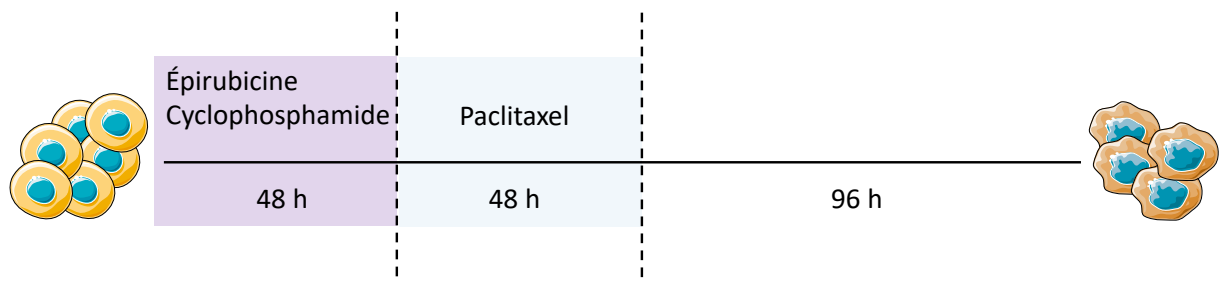


Figure 9. Schéma du protocole d'établissement du modèle de cellules persistantes de court terme. Les cellules sont d'abord traitées avec l'épirubicine et du cyclophosphamide durant 48 heures avec la dose IC50 des 2 drogues (ratio 1:5). Ensuite les cellules sont traitées avec du paclitaxel pour de nouveau 48 heures avec la dose IC50. A la fin du traitement, les cellules sont maintenues dans du milieu sans drogue durant 96 heures.

4. Protocole de long terme

Dans le but de mimer *in vitro* le protocole de traitement de chimiothérapie néoadjuvant réalisé en clinique *in vitro*, les cellules MDA-MB-231 et SUM159-PT natives sont traitées avec l'épirubicine associée au cyclophosphamide puis avec du paclitaxel en suivant le même protocole que celui appliqué en clinique. Tout d'abord, les cellules sont traitées avec de l'épirubicine et du cyclophosphamide en suivant 3 cycles de 3 semaines. Les cycles de traitement se déroulent en 2 parties : (i) le traitement des cellules durant 48 heures puis (ii) les cellules sont maintenues dans du milieu sans drogue pour le reste des 3 semaines. Ensuite, les cellules sont traitées avec du paclitaxel avec 9 cycles de 1 semaine. Les cycles de traitement se déroulent de la façon suivante : (i) les cellules sont traitées durant 48 heures avec le paclitaxel puis (ii) les cellules sont maintenues dans du milieu sans drogues le reste de la semaine. Les doses utilisées ici sont les mêmes que dans le traitement de court terme, les cellules sont maintenues durant l'ensemble du traitement dans un milieu contenant 2% de SVF. Les cellules obtenues à la fin des 18 semaines de traitement sont dites persistantes et sont maintenues en culture dans leur milieu contenant 2% de SVF. En parallèle, les cellules contrôles sont maintenues dans un milieu contenant 2% de SVF sans drogues durant 18 semaines. À la fin du traitement, les cellules persistantes et contrôles sont amplifiées puis cryoconservées pour être analysées sur les 20 premiers passages. Les cellules persistantes et contrôles ainsi obtenues sont maintenues en culture dans leur milieu supplémenté de 2% de SVF.

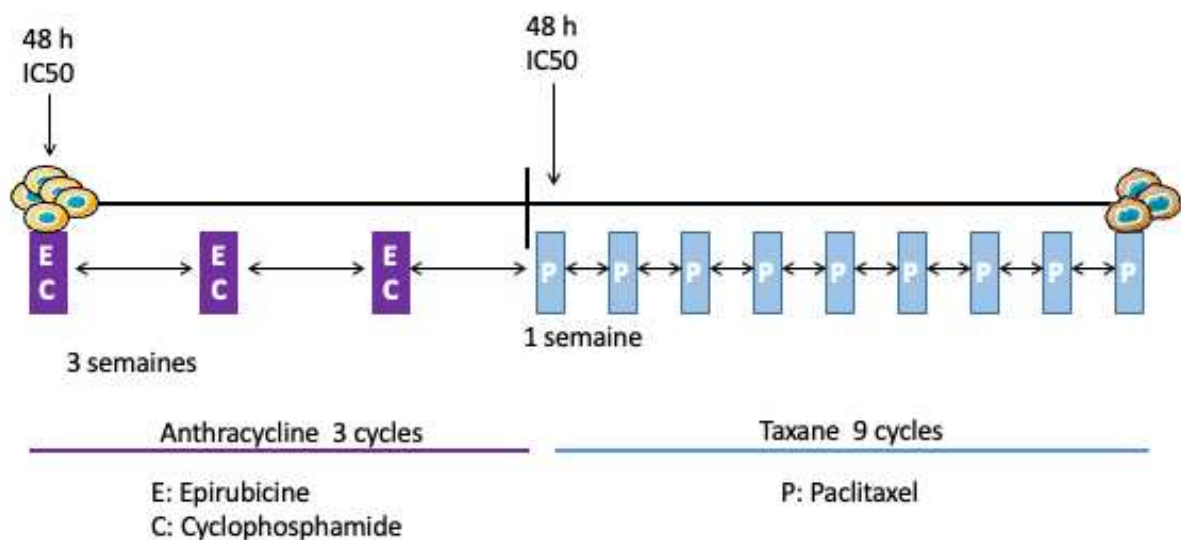


Figure 10. Schéma du protocole d'établissement du modèle de cellules persistantes de long terme. Les cellules sont d'abord traitées avec l'épirubicine (E) et le cyclophosphamide (C) en 3 cycles de 3 semaines. Pour chaque cycle, un traitement de 48 heures avec la dose IC50 des 2 drogues (ratio 1:5) est suivi de 3 semaines sans drogues. Les cellules sont ensuite traitées avec le paclitaxel en 9 cycles de 1 semaine. Pour chaque cycle, un traitement de 48 heures avec la dose IC50 est suivi de 5 jours sans drogue. A la fin des 18 semaines de traitement, les cellules sont amplifiées et congelées pour être analysées.

Les analyses réalisées avec les cellules issues du traitement de court terme sont effectuées 96 heures après le traitement. Dans le cas des cellules persistantes de long terme, les analyses sont effectuées sur les 20 premiers passages suivant le traitement.

C. Caractérisation phénotypique des cellules persistantes

1. Mesure de la croissance des cellules persistantes et contrôles au traitement de court terme

Après la période de repos de 96 heures suivant le traitement de court terme, les cellules persistantes et contrôles sont dénombrées à la lame de Malassez pour évaluer la croissance après le retrait des drogues.

2. Test de clonogénicité

Les cellules sontensemencées dans une plaque 6 puits (Falcon) à une densité de 104 cellules/cm² dans un milieu contenant 10% de SVF (pour les MDA-MB-231) et 5% de SVF (pour les SUM159-PT). Le nombre de colonies formées dans chaque condition est évalué par coloration au cristal violet 7 jours après le début de l'expérience. Pour le marquage au cristal violet, les cellules sont fixées au PAF 4% durant 10 minutes à l'obscurité et à température ambiante. Ensuite, elles sont rincées au PBS avant d'être colorées avec une solution de cristal violet à 1% durant 30 minutes sous agitation à température ambiante. L'image de chaque puits est analysée par ImageJ (version 1.51). Une colonie est comptabilisée à partir d'une aire d'environ 30 cm².

3. Croissance en matrice 3D (Matrigel®)

Les cellules sont resuspendues dans une goutte de Matrigel® (Corning, entre 9 et 8 mg/mL) diluée au demi avec du milieu de culture contenant 1% de SVF à une densité de 100 cellules/100 µL. La goutte de Matrigel® contenant les cellules est ensuite déposée au centre du puits d'une plaque 6 puits (Falcon) et placée 30 minutes dans l'incubateur à 37°C, 5% CO₂ pour permettre à la goutte de solidifier. Ensuite, 1 mL de milieu de culture contenant 10% de SVF (pour les MDA-MB-231) ou 5% de SVF (pour les SUM159-PT) est ajouté autour de la goutte puis replacés dans l'incubateur à 37°C, 5% CO₂. Dix jours après l'ensemencement, la goutte de Matrigel® est dissociée par traitement à la dispase 1U/mL (Stem cell technologie) durant 30 minutes dans l'incubateur à 37°C, 5% CO₂. Une fois la dissociation terminée, l'excédent de Matrigel® est retiré par centrifugation (5 minutes, 500 g). Le culot de cellules est ensuite resuspendu dans 500 µL de milieu de culture et le nombre de cellules est dénombré à la lame de Malassez pour chaque condition. En parallèle, chaque colonie est prise en photo et la taille ainsi que la morphologie de chaque colonie est analysée par ImageJ (version 1.51). Chaque condition est réalisée en triplicat.

4. Évaluation du cycle cellulaire

Pour permettre l'analyse du cycle cellulaire, les cellules sont fixées et perméabilisées à l'éthanol 70% glacé (-20°C) durant 24 heures. Avant le marquage à l'iodure de propidium, les cellules sont rincées au PBS puis traitées durant 15 minutes à température ambiante avec de la RNase A (1 mg/mL, Sigma) avant d'être incubées durant 2 heures à température ambiante dans une solution contenant 20 µg d'iodure de propidium (Sigma). Le cycle cellulaire est analysé par cytométrie de flux sur 10 000 événements acquis grâce au CytoFLEX S (Beckman Coulter). Les données sont ensuite analysées avec le logiciel FlowJo (Version 10, Bioscience).

5. Évaluation de la résistance à l'anoikis des cellules persistantes et contrôles issues du traitement de long terme

Les cellules sont décollées puis comptées pour réaliser une suspension cellulaire de 5 000 cellules/100 µL dans un milieu dépourvu de sérum. Les cellules sontensemencées en triplicat dans des plaques 96 puits prétraitées avec une solution de poly-hema à 1,2% (*Poly(hydroxyethyl methacrylate)* ; Sigma). Les cellules sont ensuite placées dans l'incubateur à 37°C, 5% CO₂. La croissance cellulaire est évaluée tous les 2 jours durant 8 jours. Pour cela, les cellules sous forme d'agrégat, sont récupérées pour être centrifugées (5 minutes, 100 g) puis dissociées par un traitement à la trypsine durant 5 minutes à température ambiante. Ensuite, les cellules sont de nouveau centrifugées pour être resuspendues dans du milieu de culture. Pour l'évaluation de la viabilité cellulaire, les cellules sont incubées durant 3 minutes dans une solution 1:1 de bleu trypan et de milieu de culture. Les cellules vivantes et mortes sont dénombrées à la lame de Malassez.

6. Mesure du potentiel invasif *in vitro* en transwell

L'ensemble des tests d'invasion sont réalisés en transwell. Les cellules sont d'abord décollées puis comptées afin d'obtenir une suspension cellulaire contenant 50 000 cellules/300 µL de milieu 1% de SVF dans chaque condition. En parallèle, des inserts comportant des pores de 0,8 µm (BD Biosciences) sont disposés dans une plaque 12 puits (Falcon) et traités avec une solution de Matrigel® à 3 mg/mL puis placés dans l'incubateur à 37°C pour sa solidification. Une fois le Matrigel® solidifié, les cellules sontensemencées dans la partie supérieure. Dans la partie inférieure du puits il est ajouté du milieu de culture contenant 10% de SVF. Le système est ensuite placé dans l'incubateur à 37°C, 5% CO₂ durant 24 heures. À la fin de l'expérience, les cellules sont rincées au PBS puis fixées avec de l'éthanol 70% glacé (-20°C) puis placées à -20°C durant 1 heure. Avant le marquage des cellules ayant traversé la couche de Matrigel® la partie supérieure de l'insert est grattée à l'aide d'un coton-tige pour retirer l'excédent de Matrigel® et de cellules. La partie inférieure de l'insert est marquée au Hoestch 33258 1 mM (Sigma) durant 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante. En dernier lieu, les membranes sont découpées des inserts pour être montées entre lame et lamelle avec du liquide de montage Glycergel® (Dako) pour permettre l'acquisition des images au microscope à fluorescence (Nikon, x10). Dix images sont acquises par lamelle

de façon aléatoire pour compter le nombre de cellules ayant traversées la couche de Matrigel®.

7. Test de formation de sphères

Dans le but d'étudier le caractère souche des cellules persistantes, nous évaluons leur capacité de formation de sphères *in vitro*. Pour cela il est utilisé une plaque 96 puits prétraités pour empêcher l'adhésion (Greiner). Les cellules sontensemencées dans ces plaques en dilution limite de 1 à 1 024 cellules dans un milieu DMEM-F12 sans rouge de phénol (Invitrogen) supplémenté de 0,4% de BSA (bovine sérum albumine ; Sigma), d'insuline (5 µg/mL ; Sigma), d'additif B27 (10 mL par bouteille de 500 mL de milieu ; Invitrogen). Pour favoriser la croissance et le maintien du phénotype souche, il est rajouté dans ce milieu les facteurs de croissance bFGF (*basic fibroblaste growth factor* 20 ng/mL ; Sigma) permettant le maintien du caractère souche et du EGF (*endothelial growth factor*, 20 ng/mL ; Sigma) favorisant l'auto-renouvellement des cellules souches et progénitrices. Les cellules sont maintenues dans ce système durant 7 jours avant d'être dénombrées au microscope à contraste de phase.

D. Études *in vivo*

1. Le modèle du poisson zèbre, test d'invasion

À la fin de la période de repos suivant le traitement de court terme, les cellules MDA-MB-231 persistantes ou contrôles sont incubées dans du milieu de culture contenant un marqueur lipophile à une concentration de 2,5 mg/mL (Vybrant Dil, colorant en bleu les cellules persistantes, Vybrant DiD, colorant en rouge les cellules contrôles ; Invitrogen). À la suite d'une incubation de 20 minutes à 37°C, les cellules sont décollées à la trypsine pour être comptées. Pour l'injection dans les poissons zèbre, une suspension cellulaire de 2×10^6 cellules contenant un mixte (ratio 1:1) de cellules contrôles et persistantes dans une solution de PBS/EDTA à 5 mM. Les cellules sont conservées sur glace jusqu'au moment de l'injection.

Les embryons de poisson zèbre transgénique (fli1:GFP) depuis la ponte et jusqu'à l'âge de 48 heures post-fécondation sont placés dans une solution de phénylthiourée (Sigma). Le jour de l'injection, les embryons sont anesthésiés avec de la tricaine (MS-222 ; Sigma) puis 100 µL de suspension cellulaire est injectée dans le sac vitellin des embryons à l'aide d'un stéréomicroscope (M125 ; Leica) et d'un micro-injecteur (FemtoJET, Eppendorf). Ensuite, les embryons sont placés dans une solution de phénylthiourée supplémentée avec de la pénicilline-streptomycine renouvelée tous les 2 jours à 28°C et à l'obscurité. Pendant le temps de l'expérience, les embryons de poisson sont placés dans une eau à une température de 30°C durant 24 heures puis à 32°C jusque-là fin de l'expérience pour permettre à la fois le développement des cellules et le bien-être des embryons de poisson. Soixante-douze heures après l'injection, les embryons sont fixés avec une solution de PAF 4% puis placés dans une boîte de Pétri à fond de verre pour permettre l'analyse au microscope confocal à fluorescence

(LSM 880 ; ZEISS). L'acquisition des données se fait de façon automatisée grâce au logiciel ZEISS. Pour chaque embryon de poisson une image est acquise tous les 5 µm dans l'axe Z dans les 2 canaux de fluorescence (DiI 550 nm excitation/570 nm émission ; DiD excitation 648 nm/660 nm émission). Les images sont ensuite analysées individuellement dans chaque canal à l'aide du logiciel ImageJ pour permettre le comptage des cellules ayant colonisé la circulation sanguine de la partie postérieure des embryons, c'est-à-dire à partir du sac vitellin jusqu'au bout de la queue. Cette expérience a été réalisée en duplicat et en alternant la coloration des cellules persistantes et contrôles, 15 embryons de poisson zèbre sont analysés dans chaque expérience.

2. Le modèle de la souris SCID, test de tumorigénèse

Les souris SCID (*severe combined immunodeficient*) sont issues de l'Institut Pasteur de Lille et conservées dans un environnement stérile. Les MDA-MB-231 et les SUM159-PT persistantes ou contrôles issues du traitement de long terme sont mises dans une solution de PBS à une densité de 10^6 cellules/200 µL pour être injectées dans le flanc de la souris. À partir du moment où la tumeur est palpable, le volume tumoral est mesuré tous les 3 jours avec l'évaluation de la longueur (l) et de la largeur (L) correspondant à la plus petite des 2 mesures. Le volume est ensuite calculé avec la formule suivante :

$$(\pi \times l \times L)/6$$

Lorsque le volume tumoral est en moyenne de 1,5 cm³, les souris sont sacrifiées pour récupérer les organes vitaux : foie, poumon et cerveau. Une fois extraits, ils sont plongés dans de l'azote liquide puis conservés à -80°C avant l'extraction des ARN. Pour les MDA-MB-231 persistantes et contrôles, la tumeur primaire est extraite puis conservée dans du milieu RPMI à 4°C toute la nuit pour être dissociée et remise en culture.

Dans le cas des MDA-MB-231 long terme, 7 souris sont injectées avec des cellules persistantes et 10 souris le sont avec des cellules contrôles. Pour les SUM159-PT long terme, 10 souris sont injectées avec des cellules persistantes et 10 le sont avec des cellules contrôles.

3. Remise en culture des cellules MDA-MB-231 persistantes et contrôles dissociées de la tumeur primaire

La tumeur est coupée en fragments d'environ 1 mm puis dissociée par action enzymatique et mécanique à l'aide du kit « Tumor dissociation kit » (Miltenyi 130-095-929) et action mécanique (gentle MACS Dissociator) en suivant le protocole de dissociation des tumeurs moyennes. Les cellules dissociées sont ensuite remises en culture dans du milieu MEM contenant 2% de sérum pour la mesure de la respiration mitochondriale au Seahorse (Agilent).

E. Étude du métabolisme énergétique des cellules persistantes au traitement de long terme

Dans cette partie, il est utilisé des cellules MDA-MB-231 et SUM159-PT persistantes ou contrôles issues du traitement de long terme durant les 20 passages suivant l'arrêt du traitement. Afin de compléter les résultats obtenus de l'analyse fonctionnelle du métabolisme énergétique des cellules MDA-MB-468 et MCF-7 natives sont utilisées.

1. Mesure de l'OXPPOS et de la glycolyse

Pour la mesure de l'OXPPOS et de la glycolyse, il est utilisé la technique d'oxygraphie avec la machine de Seahorse (Agilent Technologie). Le seahorse est constitué de micro-chambres hermétiques permettant la mesure de la consommation d'oxygène, un indicateur de l'OXPPOS, et de l'acidification du milieu extracellulaire lors de la production de lactate reliée à la glycolyse. Cette technique permet de mesurer le métabolisme énergétique des lignées cellulaires dans différentes conditions.

Dans les expériences de mesures de l'OXPPOS et de la glycolyse, quelle que soit la lignée cellulaire, 100 000 cellules par puits (300 000 cellules/cm²) sontensemencées dans le milieu adéquat.

Pour l'étude de l'OXPPOS, la consommation d'oxygène ou OCR (*oxygen consumption rate*) est mesurée en condition basale puis à la suite d'injection d'oligomycine (15,3 µM, Sigma) inhibiteur du complexe V ou ATP-synthase pour évaluer la part d'OCR dédiée à la production d'ATP. Ensuite, 2 doses successives de FCCP (1,096 puis 2,316 µM, *Mesoxalonitrile 4-trifluoromethoxyphenylhydrazone* ; Sigma) sont injectées, le FCCP est un protonophore stimulant le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale à son maximum permettant d'évaluer la respiration maximale. En dernier, il est injecté de l'antimycine A (10,8 µM, Sigma) et de la roténone (10,8 µM, Sigma) respectivement des inhibiteurs des complexes III et I empêchant complètement le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. La mesure qui découle de cette dernière étape reflète la respiration cellulaire non due à la mitochondrie. Pour réaliser cette expérience, les cellules sont rincées plusieurs fois avec un milieu DMEM contenant du glucose (20%, Sigma), du pyruvate (1 mM, Gibco) et de la glutamine (1 mM, Gibco) avec un pH ajusté à 7,35. Elles sont ensuite laissées durant 30 minutes à l'étuve (37°C, sans CO₂) avant l'analyse au seahorse.

Dans le cas de l'expérience de flexibilité métabolique, la mesure de l'OXPPOS est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. Avant l'analyse, les cellules sont mises en présence d'un inhibiteur ciblant l'un des 2 substrats du cycle de Krebs de façon individuelle. Ainsi, avant la mesure de l'OXPPOS les cellules sont rincées plusieurs fois avec le milieu OXPPOS puis incubées durant 30 minutes avec :

- du BPTES (3 μM , Bis-2(5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide ; Sigma) inhibiteur de la glutaminase synthase empêchant la transformation de la glutamine en glutamate pour son entrée dans le cycle de Krebs,
- de l'UK-5099 (10 μM , acide PF-1005023,2-Cyano-3(1-phenyl-1H-indol-3-yl)-2-propenoic ; Sigma) inhibiteur des MPC empêchant son transporteur vers la mitochondrie.

Cette expérience permet d'évaluer la part de chaque substrat dans le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Pour l'étude de la glycolyse, l'acidification extracellulaire induite par la sécrétion de lactate produit lors de la glycolyse ou ECAR (*extracellular consumption acidification rate*) est tout d'abord mesurée en condition basale puis il est injecté du glucose (100 mM) permettant de mesurer l'activité glycolytique des cellules. Ensuite, il est injecté de l'oligomycine (7,42 μM) inhibant la production d'ATP par l'OXPPOS forçant ainsi l'utilisation de la glycolyse pour la production d'énergie. Ceci permet d'évaluer la capacité glycolytique maximale des cellules. Ensuite, il est injecté du 2-DG (1 M, 2-Déoxyglucose ; Sigma) inhibiteur de l'hexokinase 2 empêchant le fonctionnement de la glycolyse. En dernier, il est injecté de l'antimycine A (10,3 μM , Sigma) et de la roténone (10,3 μM , Sigma). Pour la réalisation de cette expérience, les cellules sont rincées plusieurs fois avec un milieu DMEM contenant de la glutamine (1 mM) et du NaCl (31,65 μM , Sigma) pour permettre de conserver l'osmolarité cellulaire avec un pH ajusté à 7,35. Les cellules sont laissées durant 30 minutes à l'étuve (37°C, sans CO₂) dans ce milieu avant l'analyse au Seahorse.

Pour la normalisation des données acquises avec l'appareil de Seahorse lors de l'injection de antimycine et roténone du Hoestch 33258 (43,6 μM , Invitrogen) est co-injecté. Les cellules sont ensuite incubées durant 10 minutes à 37°C à l'obscurité avant d'être dénombrées au Cytation (fluorescence DAPI, excitation de 357 nm/ émission 460 ; Biotek). La normalisation et l'analyse des données sont ensuite réalisées avec le logiciel Wave (Agilent).



Analyse du métabolisme Seahorse

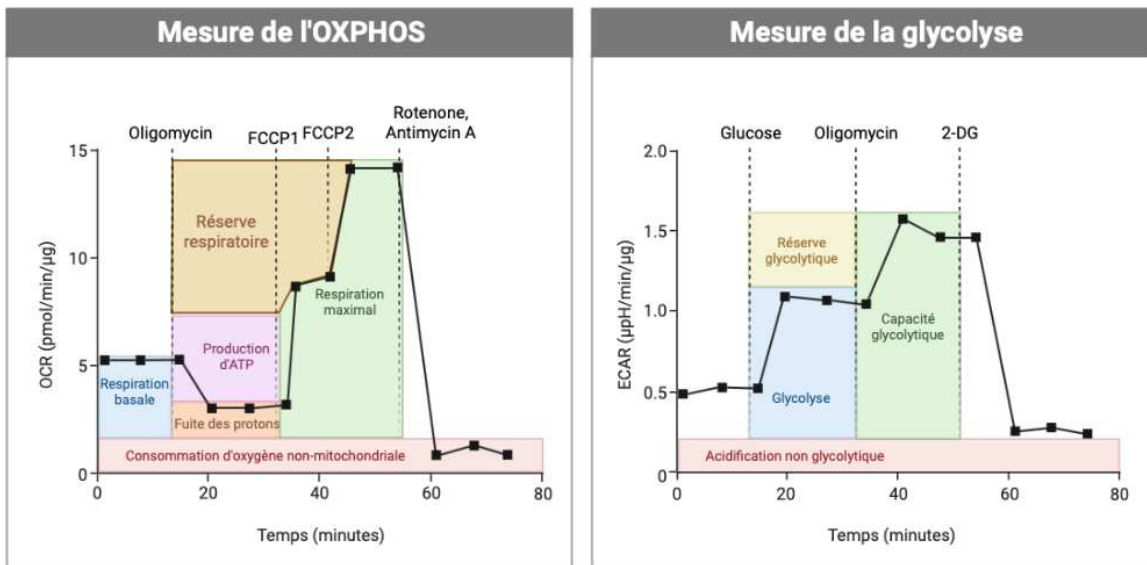


Figure 11. Schéma des paramètres métaboliques analysés au Seahorse. L'évaluation de l'OXPPOS (partie de gauche) se fait par la mesure de la consommation d'oxygène (OCR) sous influence de différentes drogues. La production d'ATP (rose) se mesure à la suite de l'injection d'oligomycine (inhibiteur de l'ATP synthase). Les deux injections de FCCP (protonophore) successives permettent de mesurer la respiration maximale (vert) ainsi que la réserve respiratoire qui correspond au ratio entre le niveau d'OCR maximal et basal (marron). L'injection de roténone et d'antimycine A (inhibiteur respectivement des complexes III et I de la chaîne respiratoire mitochondriale) permet de mesurer la consommation d'oxygène non-mitochondriale (rouge). La différence entre la consommation d'oxygène non-mitochondriale et la production d'ATP évalue la respiration mitochondriale due à la fuite des protons (orange). L'évaluation de la glycolyse (partie de droite) se fait par la mesure de l'acidification extracellulaire (ECAR). L'injection de glucose permet de mesurer l'activité glycolytique basale (bleu). L'injection d'oligomycine (inhibiteur de l'ATP synthase) favorise l'activité glycolytique permettant d'évaluer la capacité glycolytique (vert). Le ratio entre la capacité glycolytique et la glycolyse indique la réserve glycolytique (jaune). L'injection de 2-DG (inhibiteur de l'hexokinase 2) bloque l'activité glycolytique, permettant d'évaluer l'acidification non glycolytique. Réalisée avec biorender (<https://app.biorender.com>).

2. Étude de la masse mitochondriale par cytométrie de flux

La mesure de la masse mitochondriale des cellules persistantes et contrôles est effectuée par cytométrie de flux à l'aide du MitoTracker Green (Life Technologie). Cette sonde s'accumule dans la matrice mitochondriale et marque les protéines présentes en se groupant avec une cystéine. Avant le marquage, les cellules sont décollées puis comptées afin de réaliser une suspension cellulaire de 200 000 cellules/400 µL dans un milieu contenant 2% de SVF auquel est ajoutée la sonde MitoTracker Green à une concentration de 125 nM. Les cellules, dans cette solution, sont incubées durant 30 minutes à 37°C et à l'obscurité avant d'être centrifugées durant 5 minutes à 460 g et resuspendues dans 300 µL de PBS à 1% de SVF pour l'analyse en cytométrie. Les données sont analysées au cytomètre de flux LSR Fortessa (Becton Dickinson) dans le canal FITC (excitation 498 nm/512 nm émission). La moyenne de la

fluorescence est analysée sur 10 000 événements acquis à l'aide du logiciel FlowJo (Version 10, Bioscience).

3. Étude du potentiel de membrane mitochondriale

La mesure du potentiel de membrane des cellules persistantes et contrôles est réalisée par imageur cellulaire Celigo (Nexcelom) avec le MitoTracker Red (Life Technologie). L'accumulation de cette sonde dans la mitochondrie dépend du potentiel de membrane. La veille du marquage, 100 000 cellules sont ensemencées en plaque 96 puits. Les cellules sont ensuite rincées avec du milieu de culture sans sérum puis incubées durant 40 minutes avec une solution de milieu de culture sans sérum contenant le MitoTracker Red à une concentration de 300 nM. Les cellules sont ensuite rincées puis laissées dans du milieu de culture sans sérum pour l'acquisition des images au Celigo dans le canal « Red » (excitation 554 nm/émission de 585 nm) puis les images sont analysées par ImageJ pour comparer la moyenne de la fluorescence dans chaque condition.

4. Établissement de l'IC50 des inhibiteurs ciblant le métabolisme oxydatif de la mitochondrie

Les cellules sont ensemencées dans une plaque 96 puits 24 heures avant le traitement (3 300 cellules/cm² pour les MDA-MB-231, les SUM159-PT et les MCF-7 ; 10 000 cellules/cm² pour les MDA-MB-468). Les cellules sont ensuite traitées avec une gamme de concentrations de tigécycline (6 – 800 µM) ou de UK-5099 (10 – 100 µM) durant 96 heures. À la fin du traitement, les cellules sont fixées avec de l'éthanol 70% glacé puis placées 1 heure à -20°C. Elles sont ensuite rincées au PBS puis marquées avec du Hoestch 33258 1 mM (Sigma) durant 30 minutes à température ambiante. En dernier, les cellules sont rincées au PBS avant d'être comptées au Celigo (Nexcelom) dans le canal « blue » (excitation de 357 nm/ émission 460 nm).

5. Co-traitement des drogues de chimiothérapie épirubicine et paclitaxel avec les inhibiteurs du métabolisme oxydatif mitochondrial

Les cellules sont ensemencées à la même densité que précédemment puis traitées avec de la tigécycline (3 µM) ou de l'UK-5099 (10 µM) combinées avec :

- une gamme de concentrations d'épirubicine (8 nM – 1 µM) ou de paclitaxel (1 – 125 nM) durant 96 heures,
- au traitement séquentiel de court terme (épirubicine et cyclophosphamide 48 heures puis 48 heures de paclitaxel) où il est utilisé la dose IC50 des drogues pour chaque type cellulaire.

À la fin du traitement, les cellules sont marquées au Hoestch 33258 1 mM et dénombrées au Celigo de la même façon que précédemment.

F. Analyse transcriptionnelle, extraction des ARN, rétrotranscription et PCR en temps réel (qPCR)

1. Extraction des ARN à partir des lignées cellulaires de cancer du sein

L'extraction à partir des cellules cancéreuses est réalisée à l'aide du kit RNeasy (Qiagen). Les cellules sont tout d'abord détachées de la boîte de Pétri par un traitement à la trypsine pour être centrifugées puis lysées à l'aide du tampon de lyse du kit supplémenté de β -mercaptoéthanol (Sigma). Les ARN sont ensuite extraits par une série de centrifugations et de lavages à l'aide des différents composants du kit. Une étape d'élimination de l'ADN génomique est réalisée par un traitement à la DNase à température ambiante. En dernier lieu, l'ARN est précipité avec de l'eau « RNase free » puis dosé à l'aide du ratio d'absorbance A280/A260 à l'aide du microdrop (Thermofisher).

L'extraction des ARN à partir des organes de souris SCID xénogreffées est réalisé à l'aide de TRIzol (Invitrogen). Pour cela, les organes (foie, cerveau et poumon) sont mis dans une solution de TRIzol (Invitrogen) puis broyés dans les tubes Precellys CK14 dans l'azote liquide (Cryolys) avec le protocole suivant : 2 cycles de 45 secondes à 1800 g entrecoupés d'une pause de 25 secondes entre chaque cycle. Au broyat de l'organe, il est ajouté du chloroforme avant d'être centrifugé afin de récupérer la phase aqueuse contenant les ARN. La purification et la précipitation sont réalisées comme précédemment avec les cellules cancéreuses de sein.

2. Rétrotranscription des ARN

Un microgramme d'ARN est rétrotranscrit à l'aide du kit Sensifast cDNA Synthesis Kit (Biolin). La rétrotranscription se réalise en trois étapes (i) hybridation des amorces à 25°C durant 10 minutes puis (ii) les ARN sont rétrotranscrits à 42°C durant 15 minutes et en dernier (iii) l'enzyme est inactivée à 85°C durant 5 minutes. Durant le processus de rétrotranscription, des tubes témoins négatifs (ne contenant pas l'enzyme) subissent les mêmes étapes.

3. PCR en temps réel ou qPCR

La qPCR est réalisée avec du Sybgreen issu du kit ONEGreen FAST qPCR Premix (Ozyme) à l'aide du thermocycleur QuantStudio3 (Thermofisher). Dans chaque expérience, les conditions sont analysées en triplicat. Les amorces des gènes cibles, synthétisées par Eurogentech, sont répertoriées dans le tableau 1. Pour analyser la différence de niveau de transcription entre les conditions il est utilisé la méthode des $\Delta\Delta Ct$. Le Ct des gènes dans chaque condition est obtenu par régression linéaire à l'aide du logiciel QuantStudio3 (Thermofisher). Le ΔCt de chaque gène pour chaque condition est rapporté à celui du gène de référence *RPLP0* (*ribosomal protein lateral stalk subunit P0*). Ensuite le ΔCt de chaque condition est soustrait à celui de la condition

contrôle pour obtenir le $\Delta\Delta Ct$. La différence de niveau de transcription est exprimée en « fold change » correspondant à $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Nom du gène	Amorce	Séquence
<i>β2-microglobuline humaine</i>	Sens	5'TCG-CGC-TAC-TCT-CTC-TT3'
	Antisens	5'CAA-GTC-TGA-ATG-CTC-CAC-TT3'
<i>β2-microglobuline murine</i>	Sens	5'GTC-TTT-CTG-GTG-CTT-GTC-TC3'
	Antisens	5'TCA-GTG-TGA-GCC-AGG-ATA-TAG3'
<i>Nanog humain</i>	Sens	5'GTC-ATT-TGT-GGG-GAA-GA3'
	Antisens	5'ACA-CAG-CTG-GGT-GA3'
<i>Oct4 humain</i>	Sens	5'GAA-GGA-TGT-GGT-CCG-AGT-GT3'
	Antisens	5'GTG-AAG-TGA-GGG-CTC-CCA-TA3'
<i>Rplp0 humain</i>	Sens	5'GCG-ACC-TGG-AAG-TCC-AAC-TA3'
	Antisens	5'TGT-CTG-CTC-CCA-TGA-AG3'
<i>Sox2 humain</i>	Sens	5'AAC-CCC-AAG-ATG-CAC-AAC-TC3'
	Antisens	5'CGG-GGC-CGG-TAT-TTA-TAA-TC3'
<i>Vimentine humain</i>	Sens	5'TCT-AGG-AGG-AGA-TGC-GC3'
	Antisens	5'GGT-CAA-GAC-GTG-GAG-AC3'

Tableau 1. Liste des séquences des amorces d'intérêt utilisées pour la qPCR.

4. Modulation de l'expression de la vimentine dans les cellules MDA-MB-231

Inhibition de l'expression de la vimentine dans les cellules MDA-MB-231 persistantes.

Les cellules sontensemencées en plaque 6 puits à une densité de 5 200 cellules/cm² 24 heures avant la transfection avec un siRNA ciblant la vimentine (siVIM5, S100302197 ; siVIM13, S104201890 ; Qiagen) ou contrôle (siCTL, S103650325 ; Qiagen). La transfection est réalisée à l'aide du kit INTERFERinTM (Polyplus Transfection®) en suivant les consignes du kit. Les expériences sont réalisées 72 heures après la transfection.

Surexpression de la vimentine dans les cellules MDA-MB-231 natives. Les cellules sontensemencées dans une plaque 6 puits à une densité de 10 400 cellules/cm² 24 heures avant la transfection d'un plasmide surexprimant la vimentine (pVimentin-PSmOrange-N1 ; 31922, Addgene) ou contrôle (PS-mOrange-N1 ; 31898, Addgene) à une concentration de 1 µg/mL. La transfection est réalisée à l'aide du kit jetOPTIMUSTM (Polyplus transfection®) en suivant les instructions du kit. L'intégration du plasmide par les cellules est vérifiée grâce à la fluorescence du vecteur pPSmOrange au microscope à fluorescence (Nikon, 10x). Les expériences sont réalisées 24 heures après la transfection.

G. Analyse de l'expression protéique

1. Western blot

L'analyse protéique est réalisée à la suite de la lyse des cellules à l'aide d'un tampon RIPA constitué d'inhibiteurs de phosphatases et de protéases (phosphatase inhibitor cocktail 2 P5726 ; protease inhibitor P8340, Sigma). Les cellules sont lysées sur fond de boîte de Pétri avec une incubation de 24 heures à -80°C. Le lysa cellulaire est récupéré puis centrifugé à 20 000 g durant 10 minutes à 4°C. Le surnageant contenant les protéines est récupéré puis dosé par la méthode de BCA (*bicinchonic acid*, Sigma). Pour l'analyse de Western blot il est utilisé une solution à 1 µg/µL de protéine dans un tampon de Laemmli contenant du β-mercaptoéthanol. Les protéines sont dénaturées par chauffe à 75°C sous agitation durant 10 minutes. La séparation des protéines est réalisée sur gel d'acrylamide à 12,5%. Le transfert est effectué sur membrane de nitrocellulose (MF-Milipore™). Les membranes sont ensuite saturées avec une solution de 5% de BSA (*bovine serum albumin*, Sigma) diluée dans une solution de TBS (*tris buffer salin*) contenant 0,5% de Tween20 (Sigma) durant 2 heures sous agitation à température ambiante. L'anticorps primaire de la cible d'intérêt ou du témoin de charge (actine) est dilué dans la solution de saturation, les membranes sont incubées toute une nuit à 4°C sous-agitation dans cette solution. La liste de l'ensemble des anticorps utilisé est présentée dans le tableau 2. Ensuite, la membrane est rincée sous-agitation avec un tampon de TBS contenant 0,5% de Tween20 puis incubée durant 2 heures à température ambiante sous-agitation avec l'anticorps secondaire adéquat couplé à la HRP (*horseradish peroxidase*). La membrane est de nouveau rincée avec la solution de TBS contenant 0,5% de Tween20 puis révélée par chimiluminescence (Pico, thermofisher) grâce à l'appareil de révélation Fusion FX spectra (Vilbert). Le signal des bandes est rapporté au signal du témoin de charge (actine) à l'aide du logiciel ImageJ.

Cible	Référence	Dilution
Actine	Sigma, A-2066	1/10 000 ^{ème}
pan-Akt	Cell signaling, 46691	1/1 000 ^{ème}
phospho-Akt	Cell signaling, 9271	1/1 000 ^{ème}
Vimentine	Cell signaling, 5741	1/1 000 ^{ème}

Tableau 2. Liste des anticorps utilisés dans l'analyse par Western blot.

2. Phénotypage par cytométrie de flux

L'expression des marqueurs du caractère souche ainsi que de la TEM est mesurée par immunomarquage en cytométrie de flux. Les différentes cibles étudiées et leur anticorps sont répertoriés dans le tableau 3.

Pour le marquage des protéines de surface, les cellules sont incubées à 37°C durant 5 minutes dans une solution de PBS contenant 5 mM d'EDTA pour être détachées du fond de boîte. Les cellules sont ensuite récupérées et centrifugées durant 5 minutes à 100 *g*. Le culot cellulaire est repris dans une solution de PBS contenant 5% de BSA puis les cellules sont comptées afin d'obtenir une solution à 10⁵ cellules/100 µL. Pour chaque condition, il est ajouté l'anticorps cible ou son isotype contrôle à la suspension cellulaire pour être incubé sur glace durant 1 heure. En dernier lieu, les cellules sont centrifugées puis resuspendues dans 300 µL PBS à 1% de BSA afin d'être analysées au cytomètre de flux.

Pour le marquage des protéines intracellulaires, les cellules sont décollées à la trypsine puis centrifugées et fixées avec du PAF 4% durant 15 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite rincées au PBS puis perméabilisées avec une solution de PBS contenant 0,1% de Triton X-100 (Sigma) pendant 15 minutes à température ambiante. Les cellules sont centrifugées et resuspendues dans du PBS à 1% de BSA pour obtenir une solution contenant 10⁶ cellules dans 200 µL. La suspension cellulaire est incubée avec l'anticorps d'intérêt ou son isotype pour être incubé durant 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité. Les cellules sont ensuite rincées et resuspendues dans 300 µL de PBS à 1% de BSA.

Dans les deux cas, l'immunomarquage est analysé au cytomètre de flux LSR Fortessa (Becton Dickinson) où sont acquis 10 000 événements ensuite analysés à l'aide du logiciel FlowJo (Version 10, Bioscience).

Anticorps ou Isotypes	Référence	Dilution ou Concentration	Excitation/Émission
CD24-PE	BD Pharmingen™, 5556655	1/100	566 nm/575 nm
Isotype-PE IgG2a	BD Pharmingen™, 554648	1/100	566 nm/575 nm
CD49f-FITC	BD Pharmingen™, 555735	1/100	498 nm/512 nm
Isotype FITC IgG2a	BD Pharmingen™, 555843	1/100	498 nm/512 nm
NANOG-AF647	Biolegend, BLE400135	2,5 µg/mL	650 nm/670 nm
Isotype AF647	Biolegend, BLE4010	2,5 µg/mL	650 nm/670 nm
OCT4-AF488	Biolgend, BLE400329	1,25 µg/mL	499 nm/520 nm
Isotype igG2b- AF488	Biolegend, BLE653706	1,25 µg/mL	499 nm/520 nm
SOX2-pacific blue	Biolegend, BLE400131	10 µg/mL	403 nm/455 nm
Isotype IgG1- pacific blue	Biolegend, BLE56112	10 µg/mL	403 nm/455 nm
Vimentin AF647	Abcam, ab194719	1/200	650 nm/670 nm
Isotype Alexafluor 647 Rabbit IgG	Abcam, ab199093	1/200	650 nm/670 nm

Tableau 3. Liste des anticorps utilisés dans l'analyse par cytométrie de flux.

H. Analyse par spectrométrie de masse

1. Métabolomique

L'analyse est réalisée sur les cellules MDA-MB-231 persistantes ou contrôles issues du traitement de long terme. La quantification des métabolites par spectrométrie de masse est réalisée en collaboration avec l'Université de Luewen (Belgique <https://vib.be/labs/vib->

[metabolomics-core-leuven](#)). Pour suivre l'utilisation du glucose ou de la glutamine dans les 2 conditions, on prépare un milieu de culture DMEM contenant soit du glucose marqué au C¹³ (Carbone¹³) ou de la glutamine marquée au C¹³ avec 2% de SVF. La composition détaillée est présentée dans le tableau 4. La veille, les cellules sontensemencées à une densité de 25 000 cellules/cm² en plaque 6 puits. Elles sont ensuite incubées durant 24 heures avec le milieu contenant du glucose C¹³ ou celui contenant de la glutamine C¹³ dans l'incubateur à 37°C, 5% CO₂. Ensuite, les cellules sont rincées avec une solution d'eau distillée contenant 0,9% de NaCl froid (4°C). La lyse est réalisée avec une solution de 80% de méthanol contenant 2 µM d'acide myristique d27. Les lysats cellulaires sont ensuite centrifugés à 20 000 g durant 15 minutes à 4°C. Le surnageant récupéré est stocké à -80°C jusque l'analyse. Pour la normalisation des données, on réalise un dosage protéique sur les culots obtenus après la lyse des cellules. Pour le dosage, il est ajouté 200 µL de solution NaOH à 200 mM sur le culot de protéines qui est ensuite chauffé à 95°C durant 20 minutes. La solution protéique est ensuite diluée au 1/10 puis dosée avec la méthode BCA. La solution de NaOH nous sert de blanc d'expérimentation. Les résultats obtenus sont normalisés par le dosage puis analysés à l'aide du site Métaboanalyst (<https://www.metaboanalyst.ca>).

Milieu	Constituant	Concentration finale
Glucose C ¹³	Glucose C ¹³	5 mM
	Glutamine C ¹²	2 mM
Glutamine C ¹³	Glucose C ¹²	5 mM
	Glutamine C ¹³	2 mM
Milieu contrôle	Glucose C ¹²	5 mM
	Glutamine C ¹²	2 mM

Tableau 4. Concentration en glucose et glutamine marqués ou non au Carbone¹³ des milieux de culture utilisés pour l'analyse métabolomique. C¹³ : carbone 13 marqué ; C¹² : carbone 12 non marqué.

2. Protéomique

Pour l'analyse par spectrométrie de masse 10⁶ cellules MDA-MB-231 ou SUM159-PT persistantes et contrôles sontensemencées en boîte de Pétri. Elles sont cultivées durant 24 heures avec du milieu contenant 2% de SVF ou sans sérum. Les cellules sont incubées à 37°C durant 5 minutes dans une solution de PBS contenant 5 mM d'EDTA pour être détachées du fond de boîte. Elles sont ensuite centrifugées (5 minutes, 300 g) puis stockées en culot sec à -80°C jusque l'analyse. L'analyse par spectrométrie de masse a été réalisée par la plateforme d'analyse protéomique de l'Unité d'Oncoprotéomique de l'ICO, INSERM U-1307. Les données de spectrométrie de masse ont été analysées avec le logiciel Spectronaut™ (Biogenesys). La différence d'expression des protéines identifiées est issue de la comparaison entre les cellules persistantes et contrôles d'une même lignée. Les protéines dont l'expression est augmentée d'au moins 100% sont recherchées dans une cohorte de patientes (CPTAC, *clinical proteomic tumor analysis consortium*, 2020 ; cbioportal) pour la sélection des cibles les plus pertinentes.

3. Analyse bio-informatique dans les bases de données publiques

Les listes de protéines obtenues sont annotées pour les fonctions moléculaires et les processus biologiques dans lesquels elles sont impliquées à l'aide du module ToppFun du site internet Toppgene (<https://toppgene.cchmc.org>). Le site GEPIA2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>) nous a permis de comparer l'expression des cibles entre les tissus normaux et cancéreux de différents tissus ainsi que leur expression entre les différents sous-types de cancer du sein. Les analyses de survie clinique ont été réalisées à l'aide des sites cbioportal (<https://www.cbioportal.org>) et bcGenExminer (<http://bcgenex.ico.unicancer.fr/BC-GEM/GEM-Accueil.php?js=1>). Ces sites répertorient des études réalisées à partir de données transcriptionnelles et nous ont permis d'évaluer l'intérêt d'analyser les cibles identifiées. Les jeux de données cliniques de cancer du sein utilisés pour les corrélations avec la métastase et la réponse au traitement de chimiothérapie ont été obtenus à partir du site GEO du NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). La recherche d'interaction protéine-protéine a été réalisée à l'aide de la base de données Genemania (<https://genemania.org>) disponible dans le logiciel Cytoscape (<https://cytoscape.org>).

I. Analyse statistique

L'ensemble des résultats obtenus *in vitro* sont issus de 3 à 4 réplicats biologiques. Pour les expériences *in vivo*, le test d'invasion dans les embryons de poisson zèbres et réalisé sur deux lots différents de cellules MDA-MB-231. Le test de tumorigenèse en souris SCID est réalisé avec un seul lot de cellules long terme issues des lignées MDA-MB-231 et SUM159-PT. Le nombre d'expériences indépendantes réalisées pour chaque expérience est spécifié dans la légende. Les tests de statistiques (t-test de student, test d'ANOVA, *analysis of variance*) sont réalisés à l'aide du logiciel Graphpad Prism (version 9). Dans le cas de l'analyse par spectrométrie de masse, le test statistique est réalisé à l'aide du logiciel Spectronaut™ (Biognosys). Pour les analyses de bio-informatique sur les cohortes de patientes, afin de comparer la distribution de deux groupes de données avec des moyennes proches, le test statistique de Wilcoxon a été utilisé. Les kaplan meier du risque de rechute établis à partir des données de la cohorte METABRIC (cbioportal) sont réalisés avec Graphprism (version 9) et le test statistique Gehan-Breslow-Wilcoxon. Pour chaque expérience, le test statistique utilisé est spécifié dans la légende et le résultat est considéré comme significatif lorsque la valeur p est inférieure à 0,05. Les barres d'erreur affichées sur la majorité des figures correspondent à la déviation standard. Pour le suivi de la croissance des tumeurs primaire dans l'expérience de xénogreffe en souris SCID, les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard rapportée à la moyenne.

Résultats

A. Caractérisation phénotypique et moléculaire des cellules persistantes au traitement de court terme

Cette partie du projet a pour objectif de caractériser les changements phénotypiques et moléculaires due à une première exposition au traitement combiné et séquentiel de drogues de chimiothérapie. Pour cela, nous avons mimé le traitement clinique en traitant les cellules MDA-MB-231 et SUM159-PT avec de l'épirubicine et du cyclophosphamide durant 48 heures puis durant 48 heures avec du paclitaxel. Après le traitement les cellules sont laissées dans un milieu sans drogues durant 96 heures afin d'étudier la population de cellules ayant persisté à ce traitement.

I. Caractérisation phénotypique des cellules TNBC persistantes au traitement de chimiothérapie

Les cellules persistantes montrent une diminution de la croissance *in vitro* dans des modèles de culture en monocouche (Fig. 12A-B). Cependant, la croissance des cellules persistantes se voit augmentée de 40 à 50% lorsqu'elles sont placées dans du Matrigel® (Fig. 12C). De plus, dans ces conditions, les cellules persistantes forment des colonies plus dispersées suggérant un caractère plus invasif (Fig. 12D). Pour confirmer cette observation, nous avons réalisé un test d'invasion en transwell pré-traité avec du Matrigel®. Les résultats montrent une augmentation du potentiel invasif des cellules persistantes d'au moins 50% (Fig. 12E). Ensuite nous avons évalué l'enrichissement en CSC dans la population de cellules persistantes par un test de formation de sphère *in vitro* (Fig. 12F). Les cellules persistantes forment plus de sphères par rapport aux cellules contrôles, suggérant l'augmentation de la proportion de CSC dans ces cellules.

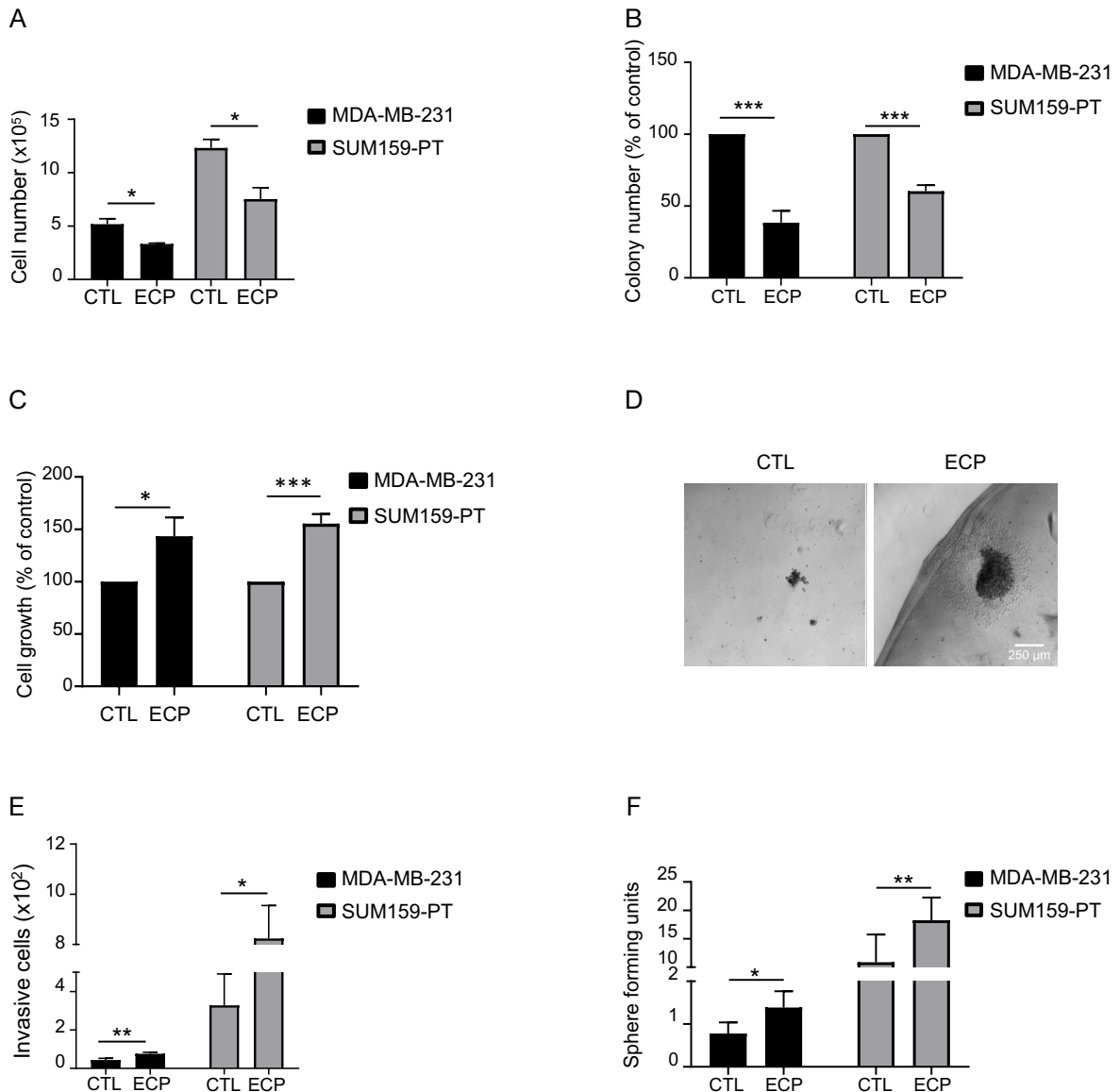


Figure 12. Caractérisation phénotypique des cellules TNBC persistantes. Les cellules MDA-MB-231 sont traitées avec 8 nM d'épirubicine (E) et 40 nM de cyclophosphamide (C) durant 48 h puis avec 1 nM de paclitaxel (P) pour de nouveau 48 h. Les cellules SUM159-PT sont traitées avec 40 nM d'épirubicine et 200 nM de cyclophosphamide durant 48 h puis avec 2 nM de paclitaxel pour de nouveau 48 h. A la suite du traitement (ECP), les cellules sont maintenues durant 96 h dans un milieu sans drogues pour mimer la persistance. (A) comptage cellulaire à la fin de la période de repos à la lame de Malassez. (B) test de clonogénicité. Quatre-vingt-seize heures après le traitement ECP, les cellules sontensemencées à faible densité cellulaire dans un milieu contenant 10% de sérum. Après 7 jours de culture, les colonies sont colorées au cristal violet pour être dénombrées. (C,D) croissance cellulaire en Matrigel[®]. A la fin de période de repos, les cellules sontensemencées dans une goutte de Matrigel[®] et de milieu de culture contenant 1% de sérum (v:v, 1:1). Les cellules sont ensuite maintenues dans ce système durant 10 jours. A la fin de l'expérience, les cellules sont extraites du Matrigel[®] pour être comptées. (C) quantification de la croissance cellulaire et (D) illustration des colonies formées dans le Matrigel[®]. La barre d'échelle correspond à 250 μ m. (E) potentiel invasif des cellules persistantes. Quatre-vingt-seize heures après le traitement ECP, les cellules MDA-MB-231 et SUM159-PT persistantes ou contrôles sontensemencées dans la partie supérieure du panier de transwell pré-traité avec du Matrigel[®]. Le nombre de cellules invasives est comptées après 24 h de culture dans ce système. (F) capacité de formation de sphères des cellules persistantes. Les cellules après la période de repos sont iciensemencées dans une plaque empêchant l'adhérence en dilution limite de 1

024 à 1 cellule. Le nombre de sphères formées est évalué 7 jours après l'ensemencement. L'ensemble des graphiques quantitatifs et des illustrations correspondent à 3 expériences indépendantes. Test de statistique « unpaired student *t*-test », *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

L'analyse de l'invasion *in vitro* est complétée avec la lignée MDA-MB-231 *in vivo* à l'aide du modèle du poisson zèbre. La figure 13 montre que le nombre de cellules MDA-MB-231 persistantes ayant envahi la partie postérieure du poisson zèbre est supérieur à celui des contrôles (Fig. 13B-C). Ces résultats confirment la capacité invasive accrue des cellules persistantes.

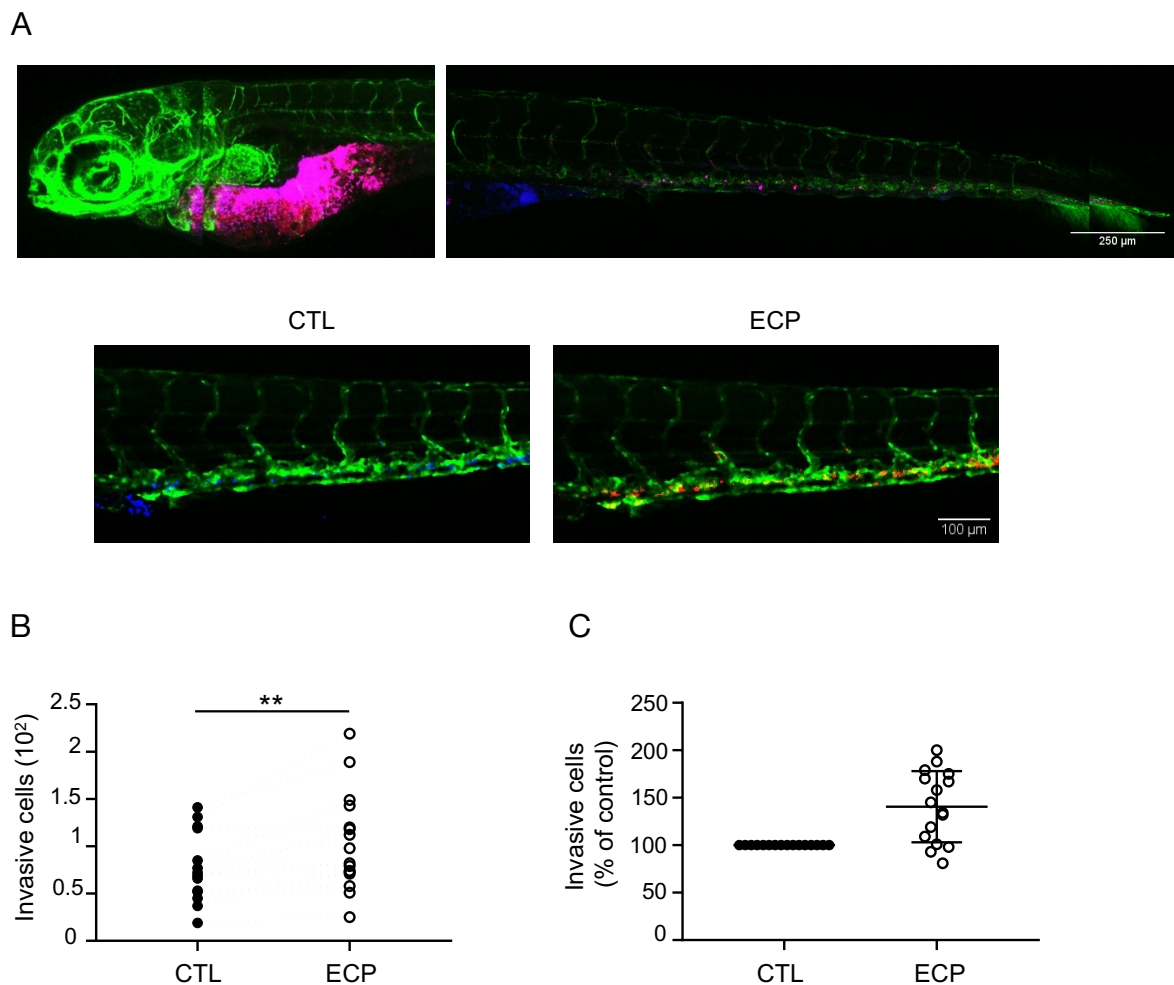


Figure 13. Mesure de l'invasion des cellules MDA-MB-231 persistantes *in vivo*. Un million de cellules contrôles ou persistantes sont mélangées et co-injectées dans le sac vitellin d'embryon de poisson zèbre. L'analyse au microscope confocal est réalisée 3 jours après l'injection décrit dans « matériels et méthodes ». (A) images d'un embryon de poisson zèbre à 3 jours post-injection. La partie supérieure montre les images fusionnées des vaisseaux sanguins (vert), des cellules contrôles (bleu) et des cellules persistantes (rouge). La partie inférieure montre les cellules contrôles (bleu, partie gauche) ou persistantes (rouge, partie droite) dans la circulation sanguine de la partie postérieure de l'embryon de poisson zèbre. Les images sont acquises au microscope à confocal (10x, ZEISS) (B) graphique du nombre de cellules invasives contrôles ou persistantes dans chaque embryon (n=16). (C) quantification relative de l'invasion. Le nombre de cellules persistantes ayant colonisé la partie postérieure du poisson zèbre est rapporté à celui des cellules contrôles

pour chaque embryon. Les résultats sont exprimés en pourcentage (n=16). Les illustrations et la quantification sont représentatives de 2 expériences indépendantes réalisées sur 16 embryons par expériences. Test de statistique « paired student *t*-test », **, $p < 0,01$.

L'ensemble de ces résultats montrent que les cellules persistantes au traitement de court terme acquièrent un phénotype agressif malgré un ralentissement de la croissance en culture en monocouche.

II. Caractérisation moléculaire des cellules TNBC persistantes au traitement de chimiothérapie

Par une stratégie d'étude ciblée, nous avons analysé l'expression des marqueurs du caractère souche (NANOG, SOX2, OCT4 et CD49f) et de la TEM avec l'expression de la vimentine.

Concernant les marqueurs du caractère souche, au niveau transcriptionnel, nous observons une augmentation de *NANOG* dans les 2 lignées persistantes. *SOX2* est lui augmenté uniquement dans les cellules SUM159-PT persistantes (Fig. 14A). Au niveau protéique, l'analyse en cytométrie de flux montre que l'expression de NANOG est vue comme augmentée dans les cellules MDA-MB-231 persistantes, avec une sous-population de cellules ayant une expression élevée de NANOG (NANOG^{HIGH}) (Fig. 14B). Le marqueur de surface CD49f est associé au caractère souche et/ou à la résistance au traitement de chimiothérapie (Goldman A. *et al*, 2015). Les cellules MDA-MB-231 persistantes montrent une augmentation du marquage de CD49f (Fig. 14C). L'ensemble de ces modifications n'est pas retrouvé dans les cellules SUM159-PT persistantes (données non montrées).

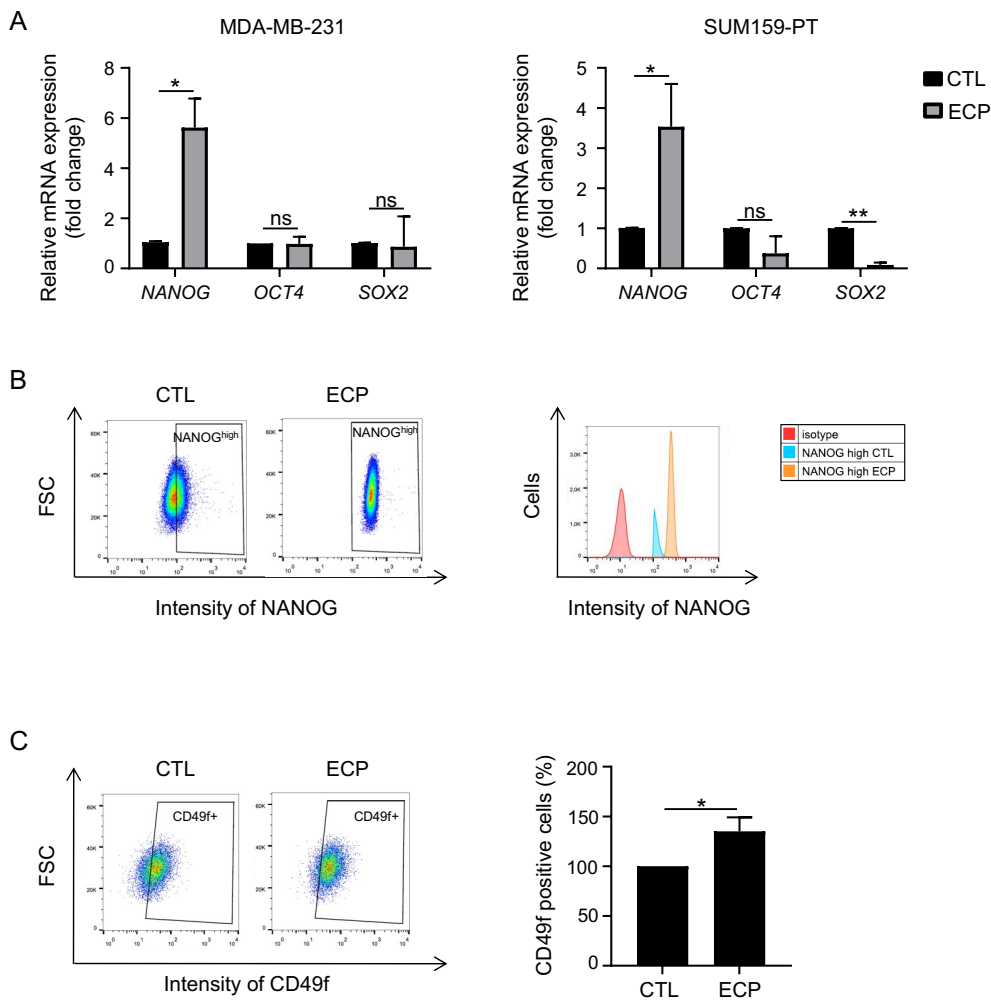


Figure 14. Expression des marqueurs de cellules souches de cancer du sein. Les analyses sont réalisées 96 h après le traitement ECP. (A) analyse transcriptionnelle des facteurs de la pluripotence *NANOG*, *OCT4*,

SOX2 dans les cellules MDA-MB-231 et SUM159-PT. La mesure est réalisée par qPCR avec comme gène de référence *RPLP0*. Le niveau d'ARNm des cellules contrôles est ramené à 1, l'expression relative des ARNm est exprimée en « fold change ». (B,C) analyse par cytométrie de flux de l'expression des marqueurs du caractère souche NANOG et CD49f dans les cellules MDA-MB-231. Les cellules sont incubées avec un anticorps spécifique de NANOG ou CD49f couplé respectivement avec la fluorescence FITC ou APC. Les anticorps isotypes sont utilisés comme contrôle. (B) quantification de la population NANOG^{HIGH} dans les cellules MDA-MB-231. Les cellules montrant une intensité de fluorescence $\geq \log 10^2$ sont considérées comme faisant partie de la population NANOG^{HIGH}. (C) quantification de la sous-population CD49f. FSC : « forward scatter ». Les graphiques quantitatifs correspondent à 3 expériences indépendantes. Les illustrations sont représentatives des 3 expériences indépendantes. Test de statistique « unpaired student *t*-test », ns, non significatif, *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

L'enclenchement du processus de TEM est recherché par le changement d'expression de la vimentine dans les cellules persistantes. Le niveau d'ARNm de la *vimentine* est augmenté dans les 2 lignées persistantes (Fig. 15A). Au niveau protéique, nous observons par analyse en Western blot l'augmentation de l'expression de la vimentine dans les 2 lignées de cellules persistantes (Fig. 15B). De plus, par analyse en cytométrie de flux, il est détecté une sous-population de cellules avec un haut niveau d'expression de la vimentine (vimentine^{HIGH}) au sein des cellules persistantes (Fig. 15C-D).

La signalisation Akt est connue pour être impliquée dans les caractères souches et invasifs (Hinz N. and Jücker M., 2019). Dans les cellules MDA-MB-231 persistantes, nous avons constaté l'augmentation de la phosphorylation d'Akt sur la sérine 473 suggérant une augmentation de l'activation de la signalisation PI3K/Akt dans ces cellules (Fig. 15E).

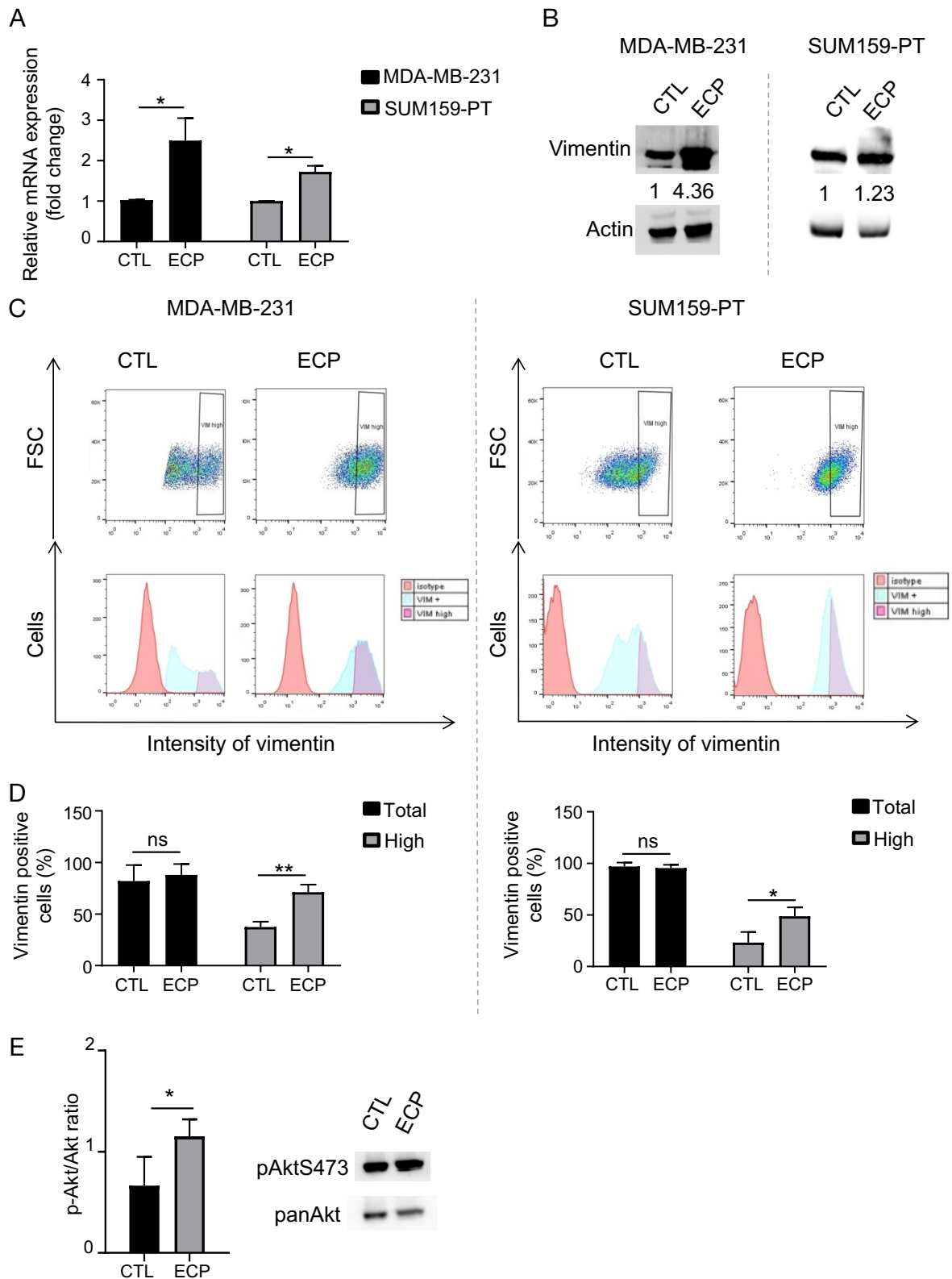


Figure 15. Expression des marqueurs de la TEM dans les cellules TNBC. Les analyses sont réalisées 96 h après le traitement ECP. (A) mesure par qPCR de l'ARNm de la *vimentine* dans les cellules MDA-MB-231 et SUM159-PT. *Rplp0* est utilisé comme gène de référence. Le niveau d'ARNm des cellules contrôles est ramené à 1, l'expression relative des ARNm est exprimée en « fold change ». (B) analyse de l'expression de la vimentine par western blot. L'expression de l'actine est utilisée comme référence. (C) quantification de

la sous-population de cellules vimentine^{HIGH}. Les cellules sont incubées avec un anticorps spécifique de la vimentine couplé à la fluorescence APC. L'anticorps isotype est utilisé comme contrôle. Les cellules avec une intensité de fluorescence $\geq \log 10^3$ sont considérées comme faisant partie de la sous-population vimentine^{HIGH}. (D) graphique quantitatif de la sous-population de cellules vimentine^{HIGH} dans les cellules MDA-MB-231 (panel de gauche) et dans les cellules SUM159-PT (panel de droite). (E) analyse par Western blot de la phosphorylation d'Akt sur la sérine 473 (pS473Akt) dans les cellules MDA-MB-231 persistantes ou contrôles. L'expression de l'actine est utilisée comme contrôle interne. Les graphiques quantitatifs correspondent à 3 expériences indépendantes. Les illustrations sont représentatives des 3 expériences indépendantes. Test de statistique « unpaired student *t*-test », ns, non significatif, *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

L'augmentation de la vimentine dans les deux types de cellules persistantes suggère un rôle important de cette protéine dans l'acquisition et/ou maintien phénotypique de ces cellules.

III. Rôle de la vimentine dans l'agressivité tumorale et de la réponse au traitement de chimiothérapie

Dans le but d'étudier le rôle de la vimentine dans les caractères souches et invasifs de des cellules MDA-MB-231 persistantes, son expression est inhibée par siRNA avec 2 séquences différentes (siVIM5, siVIM13) (Fig. 16A-B). L'inhibition de la vimentine cause la diminution de l'invasion et de la capacité de formation de sphères par les cellules MDA-MB-231 persistantes (Fig16. C-D). Dans la partie précédente, nous avons observé que la phosphorylation d'Akt est plus élevée dans les cellules MDA-MB-231 persistantes que dans les contrôles. Dans nos cellules MDA-MB-231 persistantes l'inhibition de la vimentine mène à la diminution de la phosphorylation d'Akt sur la sérine 473 (Fig. 16E).

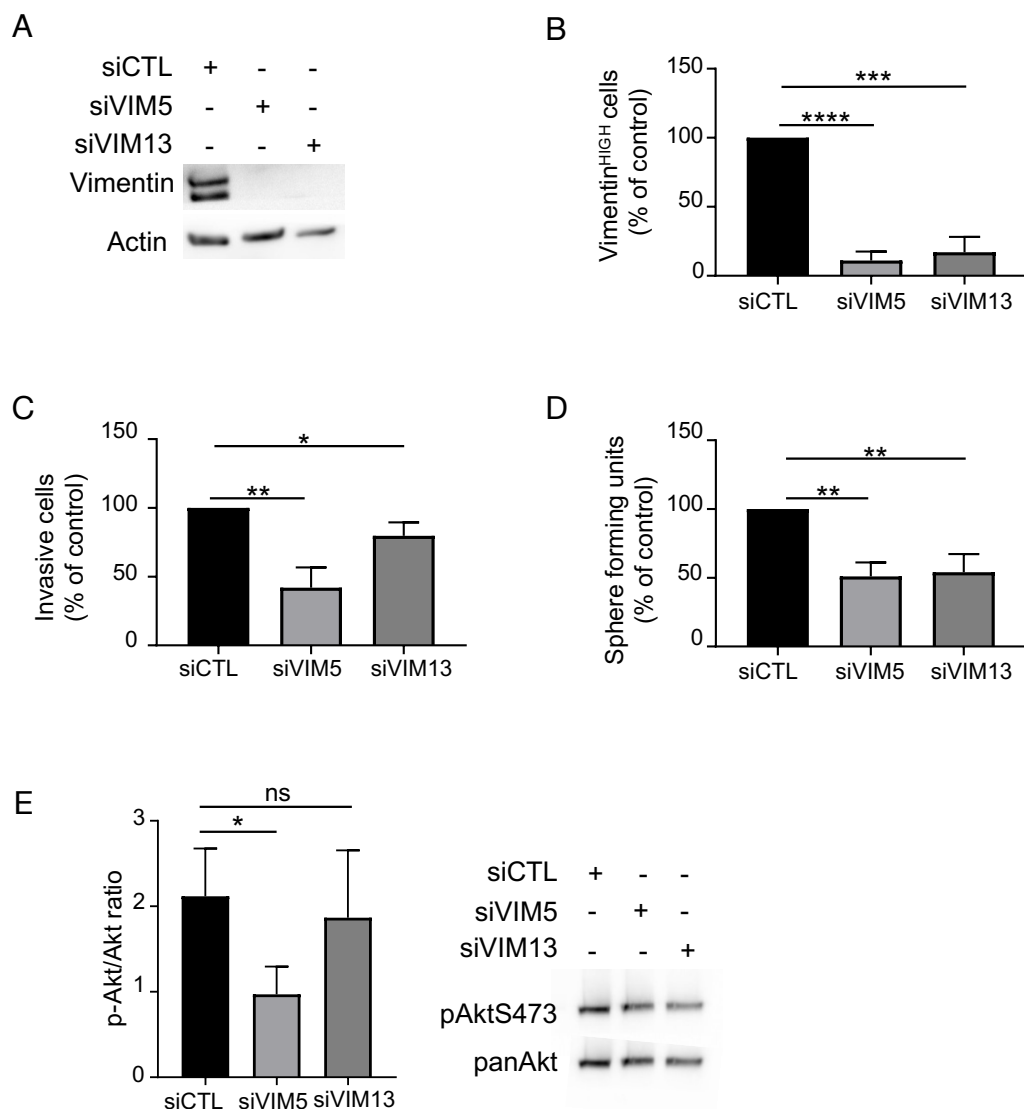


Figure 16. Effets de l'inhibition de la vimentine dans les cellules MDA-MB-231 persistantes. Quatre-vingt-seize heures après le traitement ECP les cellules MDA-MB-231 persistantes sontensemencées 24 h avant d'être transfectées avec une des 2 séquences siRNA ciblant la *vimentine* (siVIM5, siVIM13) ou une séquence contrôle (siCTL). Trois jours après la transfection, l'expression totale de la vimentine est mesurée par

Western blot (A) et par cytométrie de flux pour évaluer la proportion de cellules vimentine^{HIGH} (B). Les cellules avec une intensité de fluorescence $\geq \log 10^3$ sont considérées comme faisant partie de la sous-population vimentine^{HIGH}. (C) effet de l'inhibition de la vimentine sur l'invasion des cellules persistantes. Les cellules MDA-MB-231 persistantes inhibées pour l'expression de la vimentine sont ensemencées dans la partie supérieure du panier de transwell pré-traité avec du Matrigel®. Le nombre de cellules invasives est compté après 24 h de culture dans ce système. (D) effet de l'inhibition de la vimentine sur la capacité de formation de sphères des cellules persistantes. Les cellules MDA-MB-231 persistantes inhibées pour l'expression de la vimentine sont ici ensemencées dans une plaque empêchant l'adhérence en dilution limite de 1 024 à 1 cellule. Le nombre de sphères formées est évalué 7 jours après l'ensemencement. (E) mesure de la pS473Akt dans les cellules MDA-MB-231 persistantes inhibées pour la *vimentine*. La forme totale d'Akt (panAkt) est utilisée comme contrôle interne. Les graphiques quantitatifs correspondent à 3 expériences indépendantes. Les illustrations sont représentatives des 3 expériences indépendantes. Test de statistique « unpaired student t-test », ns, non significatif, *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$.

Ces résultats montrent que la vimentine pourrait être impliquée dans la régulation de l'invasion et du caractère souche. Cela pourrait être en lien avec l'activation d'Akt dans les cellules MDA-MB-231 persistantes. Dans le but de vérifier ces observations, nous avons induit la surexpression de la vimentine de façon transitoire dans la lignée MDA-MB-231 native (Fig. 17A). Comme la figure 17 le montre, la surexpression de la vimentine augmente le potentiel invasif et la capacité de formation de sphères (Fig. 17B-C). De même, sa surexpression augmente la phosphorylation d'Akt sur la sérine 473 (Fig. 17D).

L'ensemble de ces résultats montre le rôle de la vimentine dans la régulation des caractères souches et invasifs et suggère un lien entre le niveau d'expression de la vimentine et le degré d'activation d'Akt.

Enfin, nous avons voulu voir si le niveau d'expression de la vimentine pouvait influencer la sensibilité au traitement. Pour cela, les cellules MDA-MB-231 sous- ou sur-exprimant la vimentine sont traitées en suivant le protocole de court terme puis dénombrées à la fin du traitement. Les résultats montrent que la diminution de son expression augmente la sensibilité aux drogues alors que sa surexpression rend les cellules moins sensibles à cette combinaison d'agents cytotoxiques (Fig. 17E-F).

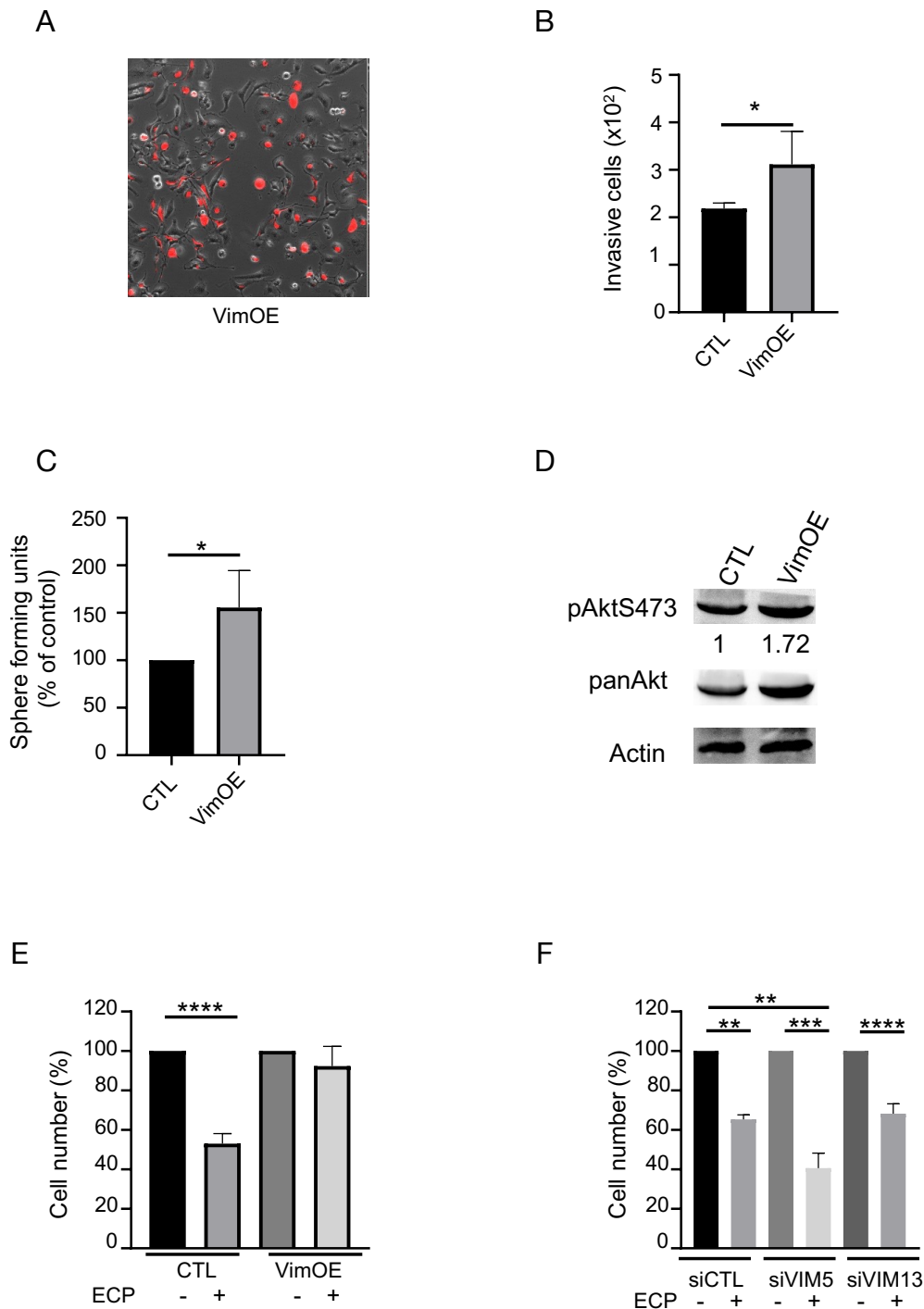


Figure 17. Effets de la surexpression de la vimentine dans les cellules MDA-MB-231 natives. Les cellules MDA-MB-231 natives sont ensemencées 24 h avant d'être transfectées avec un plasmide de surexpression de la vimentine (VimOE) ou contrôle (CTL). Le lendemain de la transfection, l'expression de la vimentine est vérifiée par microscopie à fluorescence par la fluorescence texas red en microscopie à fluorescence (A ; Nikon, 10x). L'ensemble des expériences est réalisé 24 h après la transfection. (B) effet de la surexpression de la vimentine sur l'invasion. Les cellules MDA-MB-231 persistantes inhibées pour l'expression de la vimentine sont ensemencées dans la partie supérieure du panier de transwell pré-traité avec du Matrigel®. Le nombre de cellules invasives est compté après 24 h de culture dans ce système. (C) effet de la surexpression de la vimentine sur la capacité de formation de sphères. Les cellules MDA-MB-231 persistantes inhibées pour l'expression de la vimentine sont ici ensemencées dans une plaque empêchant

l'adhérence en dilution limite de 1 024 à 1 cellule. Le nombre de sphères formées est évalué 7 jours après l'ensemencement. (D) analyse par Western blot de la pS473Akt dans les cellules MDA-MB-231 surexprimant la vimentine. L'expression de l'actine est utilisée comme contrôle interne. (E,F) sensibilité au traitement de chimiothérapie en fonction du niveau d'expression de la vimentine. Les cellules MDA-MB-231 natives sont ensemencées 24 h avant la transfection avec le plasmide surexprimant la vimentine (VimOE) ou contrôle (CTL) ou le siRNA ciblant la *vimentine* (siVIM5) ou contrôle (siCTL). Le lendemain de la transfection, les cellules sont traitées dans un milieu contenant 1% de sérum avec 8 nM d'épirubicine associé à 40 nM de cyclophosphamide puis avec 1 nM de paclitaxel. A la fin du traitement les cellules sont dénombrées à la lame de Malassez. (E) cellules MDA-MB-231 natives inhibées pour l'expression de la *vimentine* (siVIM5) ou le siRNA contrôle (siCTL). (F) cellules MDA-MB-231 natives surexprimant la vimentine (VimOE) ou exprimant le plasmide contrôles (CTL). Les graphiques quantitatifs correspondent à 3 expériences indépendantes. Test de statistique « unpaired student *t*-test », ns, non significatif, *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$.

L'implication de la vimentine dans la régulation des caractères souches/invasifs et la sensibilité des cellules aux agents de chimiothérapie suggère un rôle important de la vimentine dans le développement tumoral et l'échappement thérapeutique. L'ensemble de ce travail a fait l'objet d'une publication dans le journal « Cells » en 2021 (Winter M., *et al*, 2021).

B. Caractérisation phénotypique et moléculaire des cellules persistantes au traitement de long terme

Dans cette partie, nous avons mis au point un modèle de persistance au traitement de long terme en utilisant les mêmes lignées cellulaires que précédemment. Pour cela les cellules ont été traitées en deux séquences :

- 3 cycles de 3 semaines d'épirubicine et de cyclophosphamide,
- 9 cycles de 1 semaine de paclitaxel.

Les cellules persistantes à ce traitement sont ensuite comparées à leur contrôle pour évaluer les changements phénotypiques, moléculaires et métaboliques chimio-induits.

I. Adaptation phénotypique des cellules persistantes au traitement de chimiothérapie

Dans un premier temps, nous avons analysé la croissance des cellules persistantes. La répartition dans le cycle cellulaire est inchangée entre les cellules persistantes et contrôles (données non montrées). Cependant, la prolifération des SUM159-PT persistantes est supérieure à celle des cellules contrôles (Fig. 18B). Dans des conditions de culture stressantes, c'est-à-dire sans sérum (Fig. 18C-D) ou une faible densité cellulaire (Fig. 18E-F), les cellules MDA-MB-231 et SUM159-PT persistantes prolifèrent plus par rapport aux contrôles.

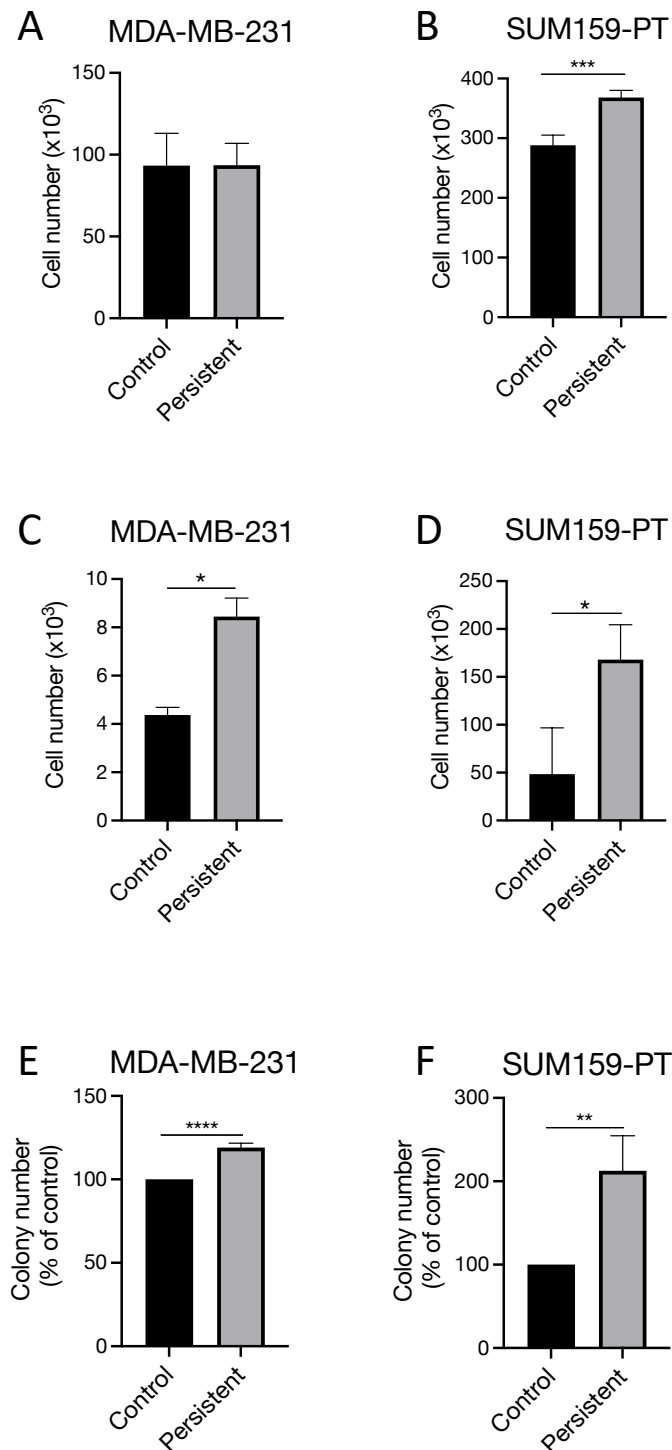


Figure 18. Etude de la croissance des cellules persistantes. (A-B) évaluation de la prolifération des cellules persistantes. La prolifération des cellules persistantes et contrôles issues des MDA-MB-231 (A) ou SUM159-PT (B) est mesurée par comptage à la lame de malassez. (C-D) évaluation de la croissance dans un milieu sans sérum. Les cellules persistantes et contrôles issues des MDA-MB-231 ou SUM159-PT sont cultivées durant 96 h dans un milieu sans sérum. A la fin de l'expérience, les cellules sont dénombrées à la lame de malassez. (E-F) mesure de la croissance par test de clonogénicité. Les cellules persistantes et contrôles issues des MDA-MB-231 ou SUM159-PT sont ensemencées dans des plaques 6 puits à faible densité comme décrit dans « matériels et méthodes ». Les graphiques quantitatifs correspondent à 3 expériences indépendantes. Test de statistique « unpaired student *t*-test », *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$.

Nous avons ensuite analysé la sensibilité des cellules persistantes aux agents cytotoxiques. Pour cela, les cellules ont de nouveau été traitées avec de l'épirubicine ou du paclitaxel en mono-traitement (Fig. 19A-D) ou de façon combinée et séquentielle en suivant le protocole de traitement de court terme (Fig. 19E-F). Les cellules MDA-MB-231 persistantes montrent une diminution de la sensibilité au traitement par de l'épirubicine ou du paclitaxel seul (Fig. 19A,C) ainsi que lors du traitement combinant les 3 agents (épirubicine, cyclophosphamide et paclitaxel) (Fig. 19E). Ceci laisse penser que les MDA-MB-231 persistantes sont devenues moins sensibles aux drogues sans devenir complètement résistantes au traitement. En effet, pour des concentrations élevées d'épirubicine (plus de 125 nM) ou de paclitaxel (plus de 8 nM) les cellules persistantes et contrôles montrent la même sensibilité à ces agents. Contrairement aux cellules MDA-MB-231, les cellules SUM159-PT persistantes conservent leur sensibilité aux agents de chimiothérapie, quelles que soient les modalités de traitement (Fig. 19B,D,F). Ainsi, nous avons obtenu 2 modèles de cellules persistantes montrant une croissance accrue en condition de stress et une sensibilité différente aux agents cytotoxiques.

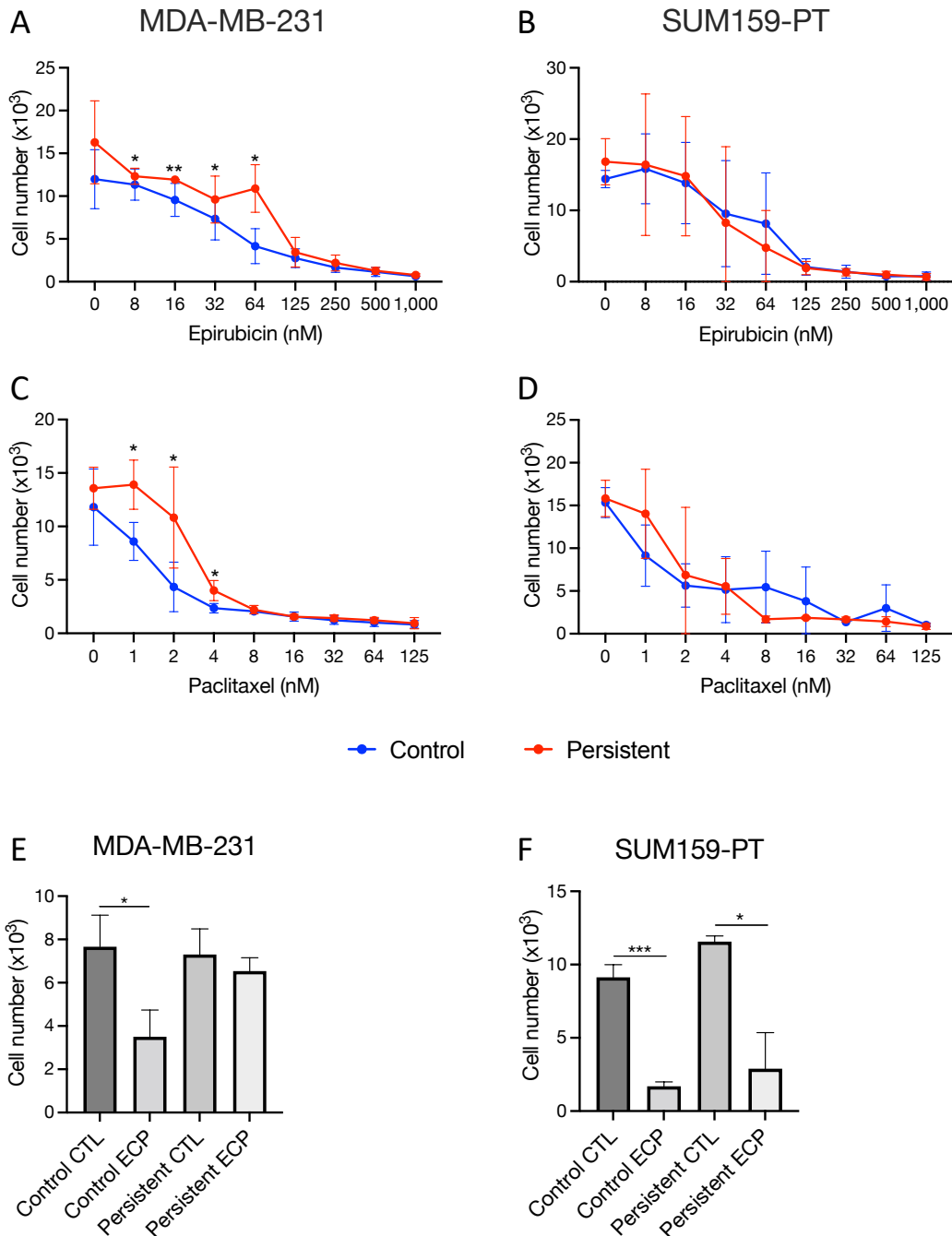


Figure 19. Etude de la sensibilité aux drogues de chimiothérapie des cellules persistantes. Les cellules MDA-MB-231 ou SUM159-PT persistantes et contrôles sont ensemencées la veille du traitement. (A-D) la sensibilité au mono-traitement avec de l'épirubicine ou du paclitaxel. Les cellules MDA-MB-231 (A,C) et SUM159-PT (B,D) persistantes ou contrôles sont traitées durant 96 h avec une gamme de doses d'épirubicine (8 nM -1 μ M ; A,C) ou une gamme de concentration de paclitaxel (1 – 125 nM ; B,D). Le nombre de cellules restant à la fin du traitement est mesuré à l'aide du Celigo. (E,F) sensibilité des cellules persistantes au traitement combiné et séquentiel de chimiothérapie. Les cellules MDA-MB-231 (E) et SUM159-PT (F) persistantes ou contrôles sont traitées tout d'abord avec de l'épirubicine et du cyclophosphamide (MDA-MB-231, 8:40 nM ; SUM159-PT, 40:200 nM) durant 48 h puis avec du paclitaxel (MDA-MB-231, 1 nM ; SUM159-PT, 2 nM) pour de nouveau 48 h. Le nombre de cellules restant à la fin du traitement ECP (Epirubicine, Cyclophosphamide, Paclitaxel) est évalué par comptage à la lame de malassez pour être comparé au contrôle (CTL). Les courbes et graphiques quantitatifs correspondent à 3 expériences indépendantes. Test de statistique « unpaired student *t*-test », *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$.

L'un des principaux traits de l'agressivité tumorale est le potentiel métastatique. A l'aide de transwell pré-traité avec du Matrigel® nous avons constaté que les cellules persistantes montrent un potentiel invasif augmenté comparé aux cellules contrôles (Fig. 20A-B). L'évaluation de la résistance à l'anoikis montre que les cellules persistantes ont une meilleure capacité de prolifération et de survie dans ces conditions (Fig. 20C-D). Ces expériences sont complétées par la mesure de la prolifération cellulaire dans du Matrigel® (Fig. 20E-F). Dans cette condition, les cellules persistantes montrent une meilleure capacité de croissance. De plus, les colonies formées par les cellules persistantes sont plus dispersées suggérant une augmentation du potentiel de colonisation métastatique. L'ensemble de ces résultats montrent que les cellules persistantes présentent un potentiel métastatique accru par l'augmentation de l'invasion, de la résistance à l'anoikis et de la prolifération en matrice 3D.

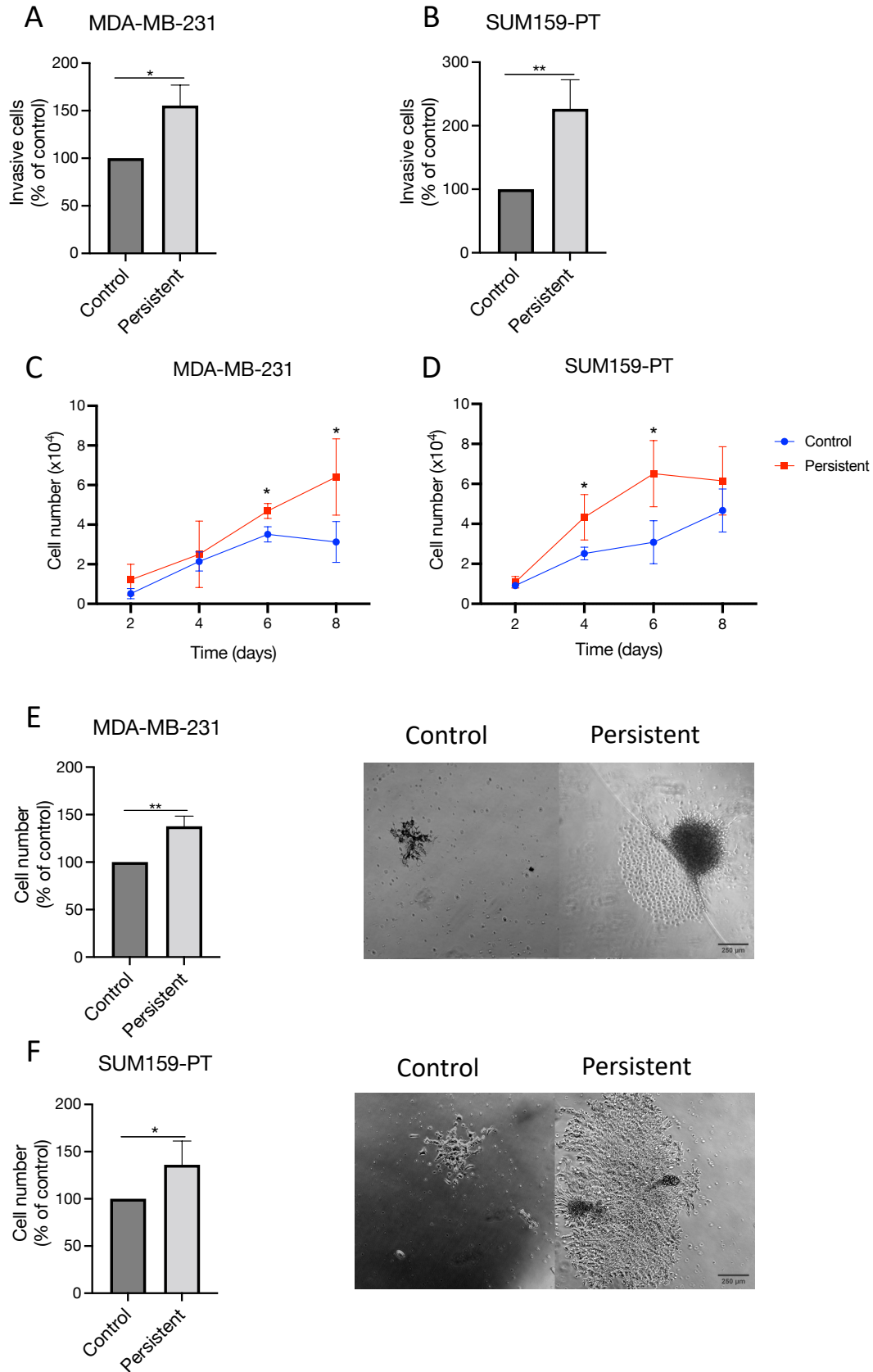


Figure 20. Evaluation du potentiel métastatique des cellules persistantes *in vitro*. (A-B) mesure de l'invasion dans un système de transwell pré-traité avec du Matrigel®. Les cellules persistantes ou contrôles MDA-MB-231 (A) et SUM159-PT (B) sont ensemencées dans la partie supérieure du transwell pour 24 h. Les

cellules ayant traversé la couche de Matrigel® sont marquées au Hoestch 33342 pour être dénombrées au microscope à fluorescence (Nikon, 10x). (C-D) mesure de la résistance à l'anoïkis. Les cellules persistantes ou contrôles issues des cellules MDA-MB-231 (C) et SUM159-PT (D) sont ensemencées dans des plaques s'opposant à l'adhérence des cellules comme décrit dans « matériels et méthodes ». Après 2, 4, 6 ou 8 jours de culture, les agrégats cellulaires sont dissociés puis les cellules dissociées sont comptées à la lame de malassez. La viabilité cellulaire est mesurée par marquage au bleu trypan. Les courbes représentent le nombre de cellules vivantes dans chaque condition pour chaque temps de culture. (E,F) mesure de la croissance des cellules persistante dans du Matrigel®. Les cellules MDA-MB-231 (E) et SUM159-PT (F) persistantes ou contrôles sont ensemencées dans une goutte de Matrigel® et de milieu de culture contenant 1% de sérum (v:v, 1:1). Les cellules sont ensuite maintenues dans ce système durant 10 jours. A la fin de l'expérience, les cellules sont extraites du Matrigel® pour être comptées. Les graphiques quantitatifs (panel de gauche) montrent le nombre de cellules pour chaque condition après 10 jours de culture. Les illustrations (panel de droite) montrent l'aspect des colonies persistantes ou contrôles de chaque lignée cellulaire à la fin des 10 jours de culture. Les courbes et graphiques quantitatifs correspondent à 3 expériences indépendantes. Les illustrations sont représentatives de 3 expériences indépendantes. Test de statistique « unpaired student *t*-test », *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

De nombreuses études ont montré un enrichissement en cellules au caractère souche à la suite du traitement de chimiothérapie (Phi L. *et al*, 2018). Pour évaluer la proportion de cellules avec ces propriétés dans notre population de cellules persistantes, il a été réalisé un test de formation de sphères (Fig. 21). Ce test est réalisé en dilution limite c'est-à-dire que les cellules sont ensemencées à des densités cellulaires allant de 1 024 à 1 cellule par puits dans un milieu favorisant la prolifération et l'auto-renouvellement des cellules au caractère souche et/ou progéniteur. Les cellules MDA-MB-231 persistantes montrent un meilleur potentiel de formation de sphères à une faible densité comparé aux cellules contrôles (Fig. 21A), tandis que les SUM159-PT persistantes forment plus de sphères quelle que soit la densité cellulaire (Fig. 21B).

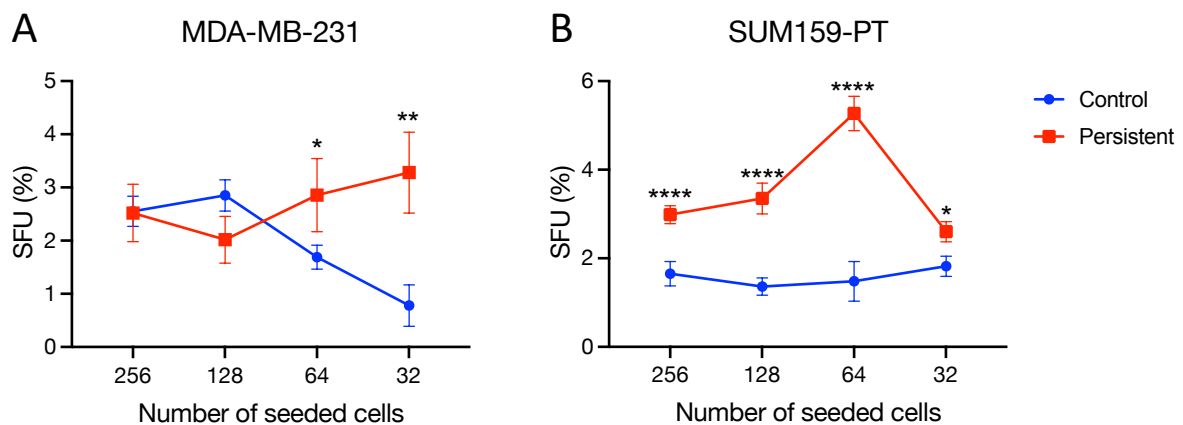


Figure 21. Etude du caractère souche des cellules persistantes. Les cellules persistantes ou contrôles issues des MDA-MB-231 (A) et SUM159-PT (B) sont ensemencées en dilution limite de 1 024 – 1 cellule dans des plaques empêchant l'adhérence. Les cellules sont maintenues dans ce système durant 7 jours avant d'être comptées. (A,B) Courbes montrant le nombre de sphères formées en fonction du nombre de cellules ensemencées au départ. SFU : *sphere forming unit*. Les courbes et graphiques quantitatifs correspondent à 3 expériences indépendantes. Test de statistique « unpaired student *t*-test », *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ****, $p < 0,0001$.

Les résultats *in vitro* montrent que les 2 lignées de cellules persistantes au traitement de chimiothérapie acquièrent un phénotype plus agressif avec l'augmentation de la survie, du potentiel métastatique et un enrichissement en cellules au caractère souche. De façon intéressante, les cellules MDA-MB-231 persistantes diminuent leur sensibilité aux agents cytotoxiques mais pas les cellules SUM159-PT persistantes.

Dans l'objectif de confirmer l'acquisition par les cellules persistantes d'un phénotype agressif, nous avons réalisé un test de tumorigenèse *in vivo* dans le modèle de souris SCID (Fig. 22). Pour cela il est injecté dans le flanc des souris en sous cutanée des cellules persistantes ou contrôles issues des lignées MDA-MB-231 et SUM159-PT. Le suivi de la tumeur primaire montre que la croissance des tumeurs formées par les cellules MDA-MB-231 persistantes progresse plus rapidement comparée aux contrôles (Fig. 22A). Il est à noter que dans nos conditions expérimentales, les cellules SUM159-PT contrôles ne forment pas de tumeurs détectables alors que les cellules SUM159-PT persistantes forment facilement des tumeurs (Fig. 22B). Ensuite, nous avons recherché la présence des cellules humaines dans les organes vitaux (foie, poumon et cerveau) des souris xénotransplantées. Pour cela ces organes sont récupérés au moment du sacrifice pour en extraire les ARNm. La recherche de la présence de cellules humaines est effectuée à l'aide de PCR quantitative sur la mesure de l'expression de la $\beta 2$ -Microglobuline humaine par rapport à l'expression de la $\beta 2$ -Microglobuline murine. La détection de $\beta 2$ -Microglobuline humaine signifie que des cellules cancéreuses humaines sont présentes dans l'organe étudié. Les résultats présentés sur la figure 22 montrent le pourcentage d'organes présentant des cellules humaines. Dans le cas des MDA-MB-231, les cellules persistantes sont retrouvées principalement dans le cerveau et le poumon (Fig. 22C). Dans une moindre mesure, elles sont retrouvées dans le foie. Les MDA-MB-231 contrôles sont détectées principalement dans le poumon puis dans le cerveau (Fig. 22D). Pour les SUM159-PT persistantes, dans la quasi-totalité des souris, il est retrouvé des cellules humaines dans les 3 organes analysés (Fig. 22E). Concernant les cellules SUM159-PT contrôles, l'ensemble des souris présente des métastases dans les poumons. Dans certaines, il est aussi détecté des cellules humaines dans le foie et le cerveau (Fig. 22F).

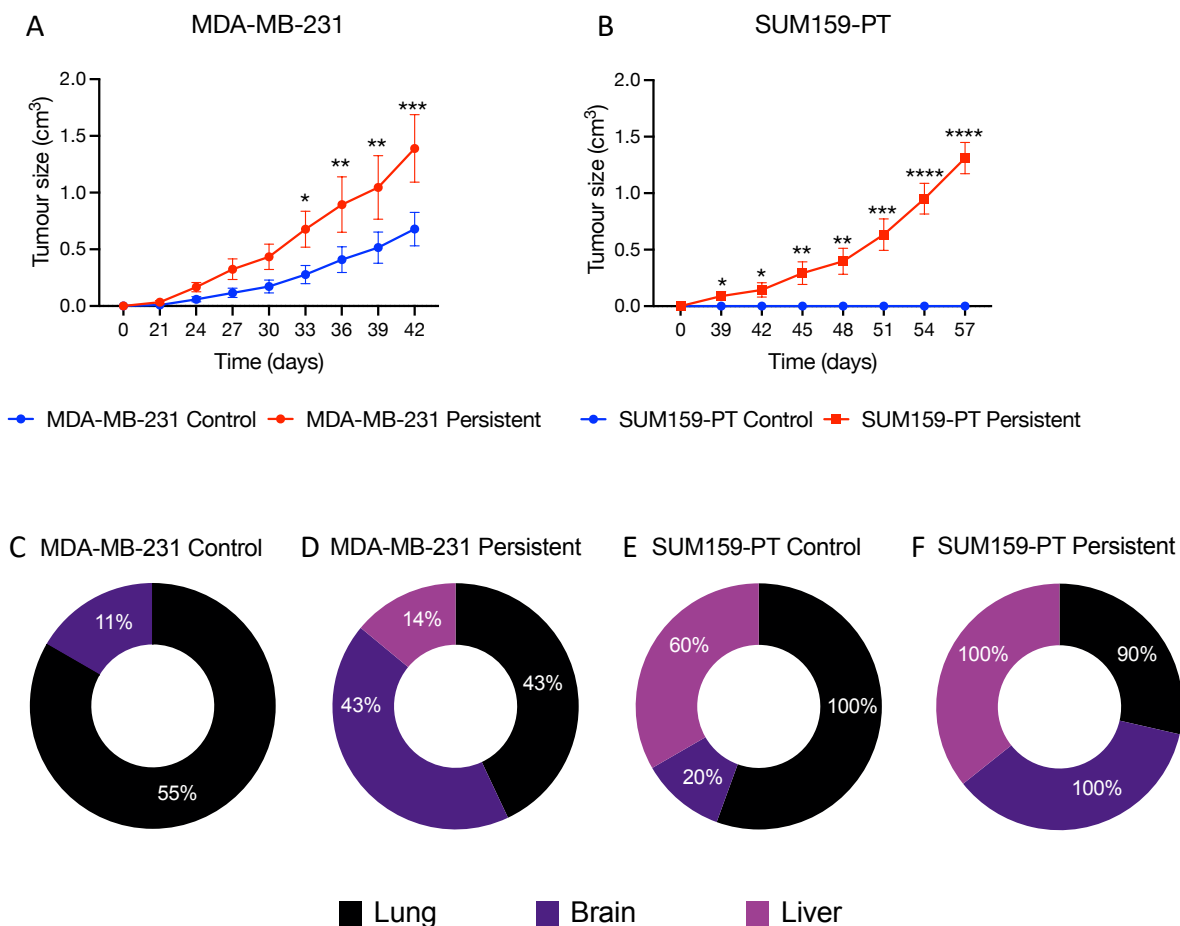


Figure 22. Suivi de la croissance tumorale et détection des cellules métastatiques dans un modèle de xénogreffe en souris SCID. (A-B) Les courbes montrent la croissance de la tumeur primaire des cellules MDA-MB-231 (A) et SUM159-PT (B) persistantes ou contrôles injectées en sous-cutanée dans des souris femelles SCID. Le volume de la tumeur primaire est mesuré tous les 3 jours. Les barres d'erreurs sont présentées sous forme d'écart à la moyenne (SEM). (C-F) potentiel invasif des cellules persistantes et contrôles dans les souris SCID. Lorsque la tumeur atteint un volume moyen de 1,5 cm³ les souris sont sacrifiées et les organes vitaux (poumon, cerveau, foie) sont récupérés pour y rechercher la présence de cellules persistantes ou contrôles. Pour les cellules SUM159-PT contrôles, qui n'ont pas formé de tumeur primaire, les organes vitaux ont été récupérés 3 mois après l'injection des cellules. La présence de cellules humaines est détectée par l'expression de la $\beta 2$ -microglobuline humaine mesurée par RT-qPCR. (C-F) diagrammes circulaires montrant le pourcentage de poumons (lung, noir), cerveaux (brain, violet) ou foies (liver, rose) positifs pour la présence de cellules persistantes (C,E) ou contrôles (D,F) pour la lignée MDA-MB-231 (C-D) et SUM159-PT (E-F). Test de statistique « unpaired student t-test », *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$

De façon intéressante, lorsqu'il est évalué le nombre total d'organes présentant des cellules humaines dans une même souris, il est observé que les cellules persistantes auront majoritairement 2 ou 3 organes positifs alors que les cellules contrôles n'en présentent que 1 ou 2 (tableau 5).

Conditions	1 organ (%)	2 organs (%)	3 organs (%)	Mice with distant metastases (%)
MDA-MB-231 Control (n=9)	5/9 (55%)	1/9 (11%)	0/9 (0%)	6/9 (66%)
MDA-MB-231 Persistent (n=7)	3/7 (43%)	3/7 (43%)	1/7 (14%)	7/7 (100%)
SUM159-PT Control (n=10)	4/10 (40%)	4/10 (40%)	2/10 (20%)	10/10 (100%)
SUM159-PT Persistent (n=10)	0/10 (0%)	1/10 (10%)	9/10 (90%)	10/10 (100%)

Tableau 5. Analyse des organes envahis par des cellules cancéreuses dans un modèle de xénogreffe en souris SCID. Le nombre d'organes positifs pour la $\beta 2$ -microglobuline humaine mesurée par RT-qPCR est résumé dans le tableau. Les organes de 9 et de 7 souris sont récupérés respectivement pour l'analyse du potentiel métastatique des MDA-MB-231 contrôles et persistantes. Pour l'analyse du potentiel métastatique des SUM159-PT contrôles et persistantes les organes de 10 souris sont récupérés pour chaque condition.

L'ensemble de ces données confirme les observations *in vitro* sur l'acquisition d'un caractère plus agressif par les cellules persistantes avec une élévation du potentiel métastatique.

II. Les changements moléculaires observés dans les cellules persistantes

Dans l'objectif d'identifier les mécanismes moléculaires reliés aux changements phénotypiques, une analyse protéomique par spectrométrie de masse a été réalisée en collaboration avec la plateforme d'Oncoprotéomique de l'ICO (INSERM U-1307). Cette analyse a été réalisée dans 2 conditions de cultures :

- **culture dans du milieu contenant 2% de sérum** durant 24 heures
- **culture « plus stringente » dans un milieu sans sérum** durant 24 heures

Dans chaque condition, plus de 2 000 protéines ont été identifiées. Le nombre de protéines dont l'expression est significativement dérégulée entre les cellules persistantes et contrôles dans les différentes conditions de culture est répertorié dans le tableau 6.

Lignée	Condition de culture	Nombre de protéines dérégulées ($p < 0,05$)	Nombre de protéines augmentées dans les cellules persistantes	Nombre de protéines diminuées dans les cellules persistantes
MDA-MB-231	2% de sérum	1 080	578	502
MDA-MB-231	Sans sérum	921	527	394
SUM159-PT	2% de sérum	1 275	775	500
SUM159-PT	Sans sérum	1 268	690	578

Tableau 6. Nombre de protéines dont l'expression est augmentée ou diminuée dans les cellules MDA-MB-231 ou SUM159-PT persistantes comparées à leur contrôle pour chaque condition de culture.

Dans un premier temps, nous avons recherché les fonctions moléculaires, processus biologique et voies de signalisation dans lesquelles ces protéines pourraient être impliquées. Cette analyse est effectuée à l'aide du site Toppgene (consulté le 17.03.22) pour permettre l'annotation fonctionnelle des protéines identifiées dans l'analyse. L'ensemble des résultats est présenté dans les annexes 5 à 8.

Globalement, il est principalement vu l'augmentation :

- **des fonctions moléculaires** rattachées à la modification de l'ARN, à l'activité enzymatique (ex. hydrolyse, oxydoréduction) et le métabolisme des protéines,
- **des processus biologiques** associés au métabolisme des macromolécules (ex. traduction protéique, protéolyse) au transport des protéines (ex. transport transmembranaire) ainsi qu'à la croissance (ex. cycle cellulaire, apoptose),
- **des voies de signalisation** VEGFA/VEGFR2, MAPK et Wnt.

Ces annotations fonctionnelles suggèrent que l'acquisition du phénotype plus agressif des cellules persistantes s'accompagne de multiples modifications fonctionnelles (annexes 5-8).

Pour poursuivre l'analyse, les protéines montrant une différence d'expression de minimum 100% entre la condition persistante et contrôle sont conservées (annexes 1 à 4). Cela exclut les protéines dont l'expression est diminuée dans les cellules persistantes puisque le changement d'expression dans les 2 lignées pour les 2 conditions de culture n'excède pas 70%.

Dans un premier temps, nous avons recherché les protéines dont l'expression est augmentée d'au moins 100% dans les cellules persistantes au sein d'une cohorte de 122 patientes atteintes d'un cancer du sein et analysées par spectrométrie de masse (CPTAC, 2020 ; référencé dans le site cbiportal). Vingt-six protéines ont été ainsi identifiées comme étant augmentées dans minimum 20% des patientes de la cohorte (Fig. 23). Leur niveau d'augmentation dans les cellules persistantes est détaillé dans le tableau 7.

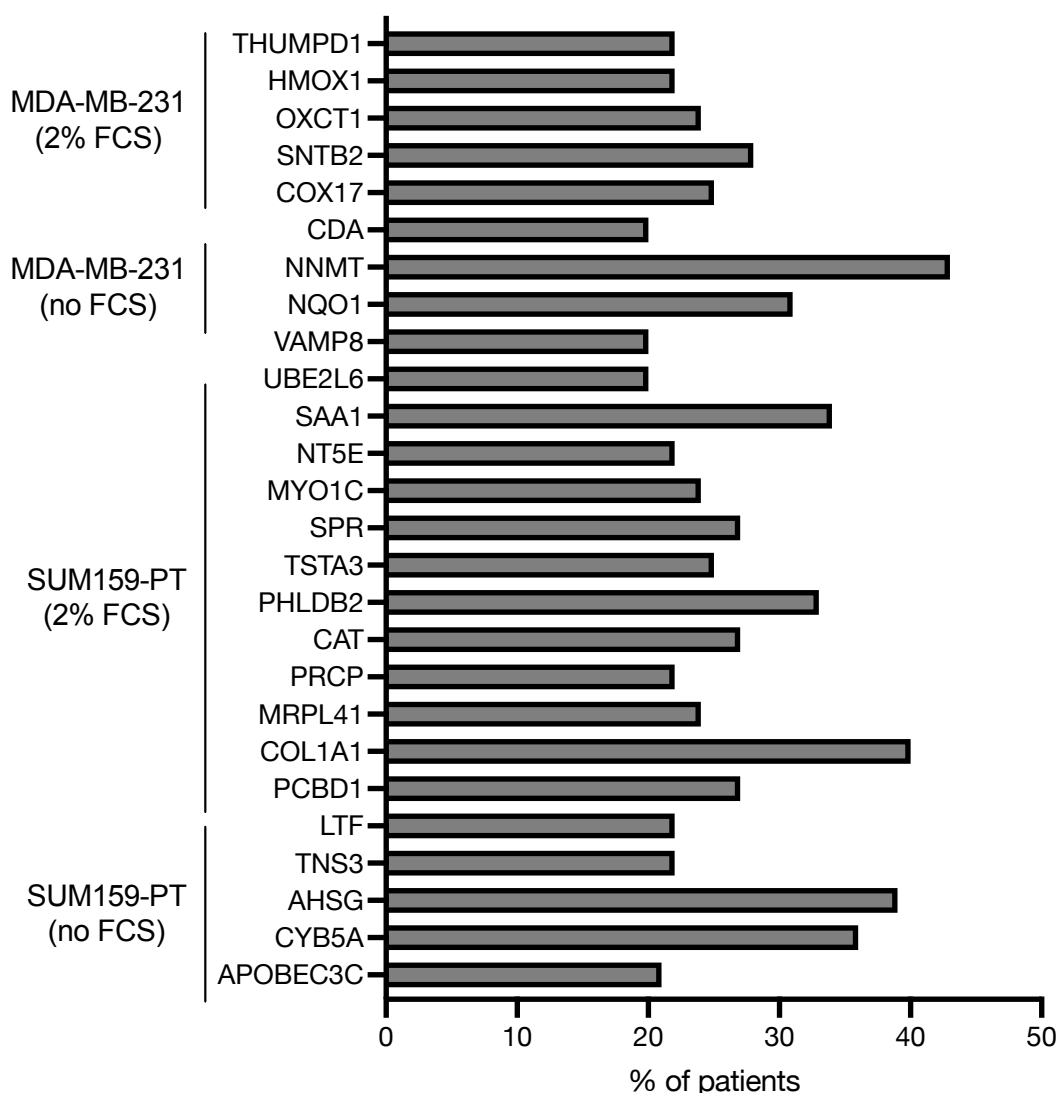


Figure 23. Histogramme représentant le pourcentage de patientes de la cohorte « CPTAC, 2020 », ayant une expression augmentée pour la cible identifiée dans les cellules persistantes. Le niveau d'expression de chaque cible dans les patientes est obtenu à partir du site cbiportal dans l'étude CPTAC, 2020 (n= 122). FCS, *fœtal calf serum*, no FCS signifie absence de sérum.

Lignée cellulaire (condition de culture)	Protéine	% augmentation	pvalue
MDA-MB-231 persistantes (2% sérum)	THUMPD1 (THUMPD Domain Containing 1)	286	0,009
	HMOX1 (Heme Oxygenase 1)	216	2,84E-11
	OXCT1 (3-Oxoacid CoA-Transferase 1)	178	0,001
	SNTB2 (Syntrophin Beta 2)	112	0,008
	COX17 (Cytochrome C oxidase Copper Chaperone)	103	0,0004
MDA-MB-231 persistantes (sans sérum)	CDA (Cytidine Deaminase)	248	7,08E-09
	NNMT (Nicotinamide N-Methyltransferase)	236	7,90E-11
	NQO1 (NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1)	127	2,32E-23
SUM159-PT persistantes (2% sérum)	VAMP8 (Vesicle Associated membrane protein 8)	479	0,003
	UBE2L6 (Ubiquitin conjugating enzyme E2 L6)	316	0,03
	SAA1 (Serum Amyloid A1)	242	1,22E-08
	NT5E (5'-Nucleotidase L2)	238	0,007
	MYO1C (Myosin IC)	157	0,001
	SPR (Sepiapterin reductase)	149	4,54E-28
	TSTA3 (Tissue specific transplantation antigen P35B)	126	0,001
	PHLDB2 (Pleckstrin homology like domain family B member 2)	125	0,004
	CAT (Catalase)	125	2,19E-07
	PRCP (Prolylcarboxypeptidase)	116	0,0003
	MRPL41 (Mitochondrial ribosomal protein L41)	114	0,001
	COL1A1 (Collagen type I alpha 1 chain)	102	1,54E-06
SUM159-PT persistantes (sans sérum)	PCBD1 (Pterin-4 Alpha-Carbinolamine Dehydratase 1)	224	1,81E-15
	LTF (Lactotransferrin)	220	1,19E-08
	TNS3 (Tensin 3)	185	0,001
	AHSG (alpha 2-HS glycoprotein)	133	0,0002
	CYB5A (Cytochrome B5 Type A)	124	4,5E-16
	APOBEC3C (Apolipoprotein B mRNA editing catalytic subunit 3C)	102	1,48E-05

Tableau 7. Protéines identifiées dans les cellules persistantes dont l'expression est vue comme augmentée dans au moins 20% des patientes de la cohorte « CPTAC, 2020 » (cbiportal, n=122). Changement d'expression en pourcentage de l'expression des protéines dans les cellules persistantes des 2 lignées dans les 2 conditions de culture.

Avec le manque de données relatives à la survie dans les analyses cliniques réalisées par spectrométrie de masse, nous avons interrogé dans les bases de données publiques au niveau transcriptomique si l'augmentation de l'ARNm de ces cibles pouvait être associée avec un paramètre de survie clinique. Parmi les 26 cibles identifiées au niveau protéique, six montrent une association entre le niveau élevé d'ARNm et un risque accru de rechute et/ou de métastase dans le TNBC, il s'agit de *COL1A1* (*collagen type 1 alpha 1 chain*), *MRPL41* (*mitochondrial ribosomal protein L41*), *SPR* (*sepiapterin reductase*), *NQO1* (*NADPH quinone dehydrogenase 1*), *SNTB2* (*syntrophin beta 2*) et *TSTA3* (*tissue specific transplantation antigen P53B*, ou *GFUS*) montre une association entre un niveau élevé d'ARNm et un risque accru de rechute et/ou de métastase dans le TNBC (Fig. 24).

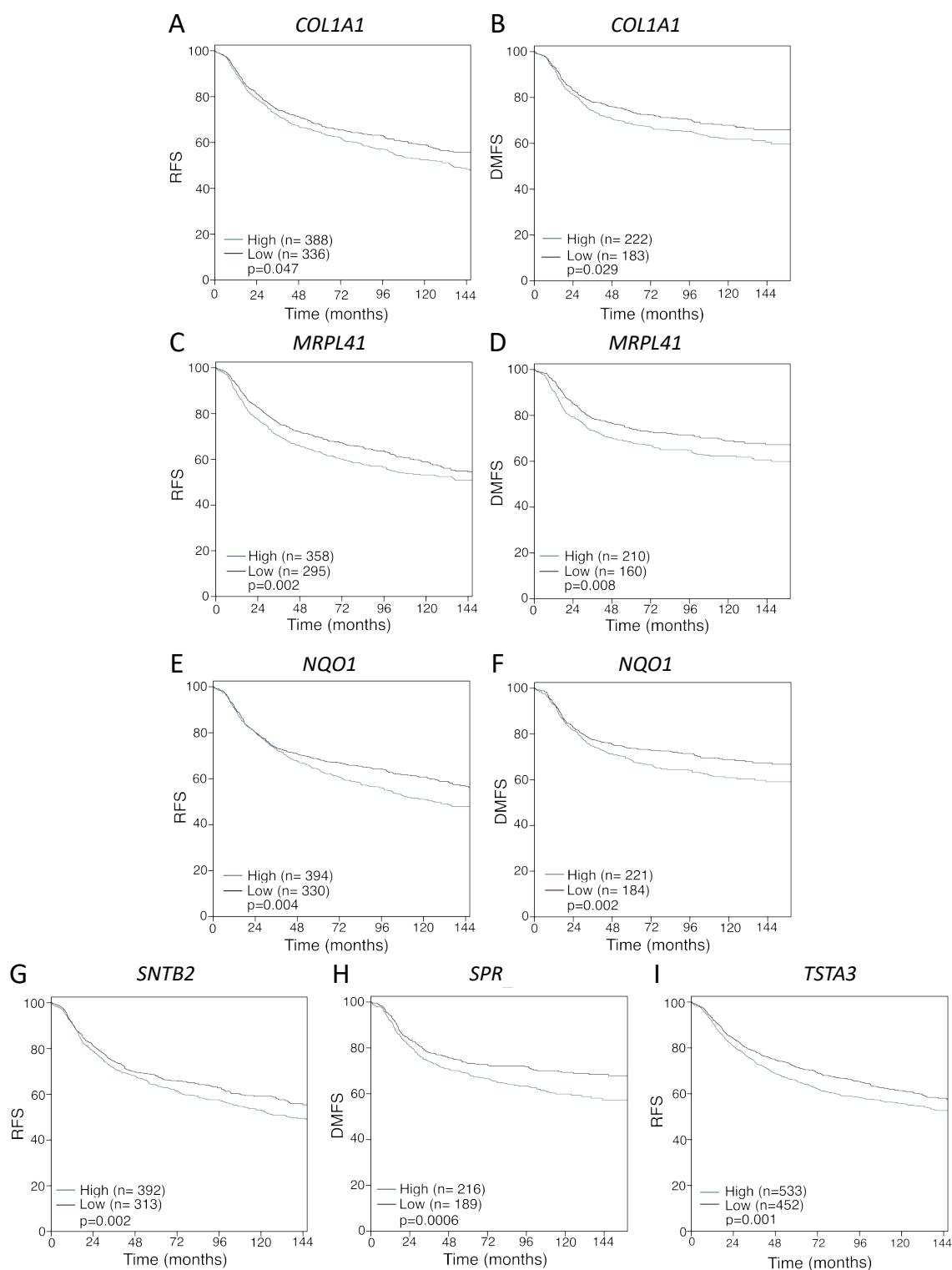


Figure 24. *COL1A1*, *MRPL41*, *NQO1*, *SNTB2*, *SPR* et *TSTA3* sont associés à un risque élevé de rechute et/ou de formation de métastase dans le cancer du sein triple négatif. Analyse de survie sans rechute (RFS, *recurrence free survival* A,C,E,G,I) et de survie sans métastase (DMFS, *disease metastasis free survival* B,D,F,H) au niveau transcriptionnel de *COL1A1* (A-B), *MRPL41* (B-C), *NQO1* (E-F), *SNTB2* (G), *SPR* (H) et *TSTA3* (I). L'analyse est réalisée avec le site bcGenExminier sur les études Affymetrix® (n=4 904), METABRIC (n=1 980), TCGA (n=743) et SCAN-B (n=3 678) en différenciant les sous-types de cancer du sein au niveau

transcriptionnel par array. Analyse de survie sans rechute, n= 1 731 ; analyse de la survie sans métastase, n=1 278.

Pour la poursuite de notre étude nous avons utilisé l'étude de Mertins et collaborateurs réalisée sur 105 patientes aux niveaux transcriptomique et protéomique dont le coefficient de corrélation entre le niveau de transcrit et l'expression protéique est décrit (NCI CPTAC Mertins *et al*, 2016). Le coefficient pour nos 6 cibles dans cette étude est résumé dans le tableau 8. TSTA3 présente la meilleure corrélation ARNm/protéine (0,78 ; $p < 2e-16$), nous avons fait le choix de poursuivre notre analyse bioinformatique avec TSTA3.

Nom de la protéine	Coefficient de corrélation de Pearson	p value
COL1A1	0,60	2,10E-09
MRPL41	0,22	0,04
NQO1	0,37	0,00066
SNTB2	0,33	0,002
SPR	0,73	6,90E-15
TSTA3	0,78	<2,0E-16

Tableau 8. Coefficient de corrélation de Pearson issu de l'étude de Mertins et collaborateurs (NCI CPTAC Mertins *et al*, 2016).

L'ARNm de *TSTA3* est augmenté dans le cancer du sein (Fig. 25A) où son augmentation est reliée à des tumeurs de haut grade (Fig. 25B) et un risque élevé de rechute (Fig. 25C). De plus, le niveau transcriptionnel de *TSTA3* est augmenté dans le tissu métastatique comparé à la tumeur primaire (Fig. 25D-E).

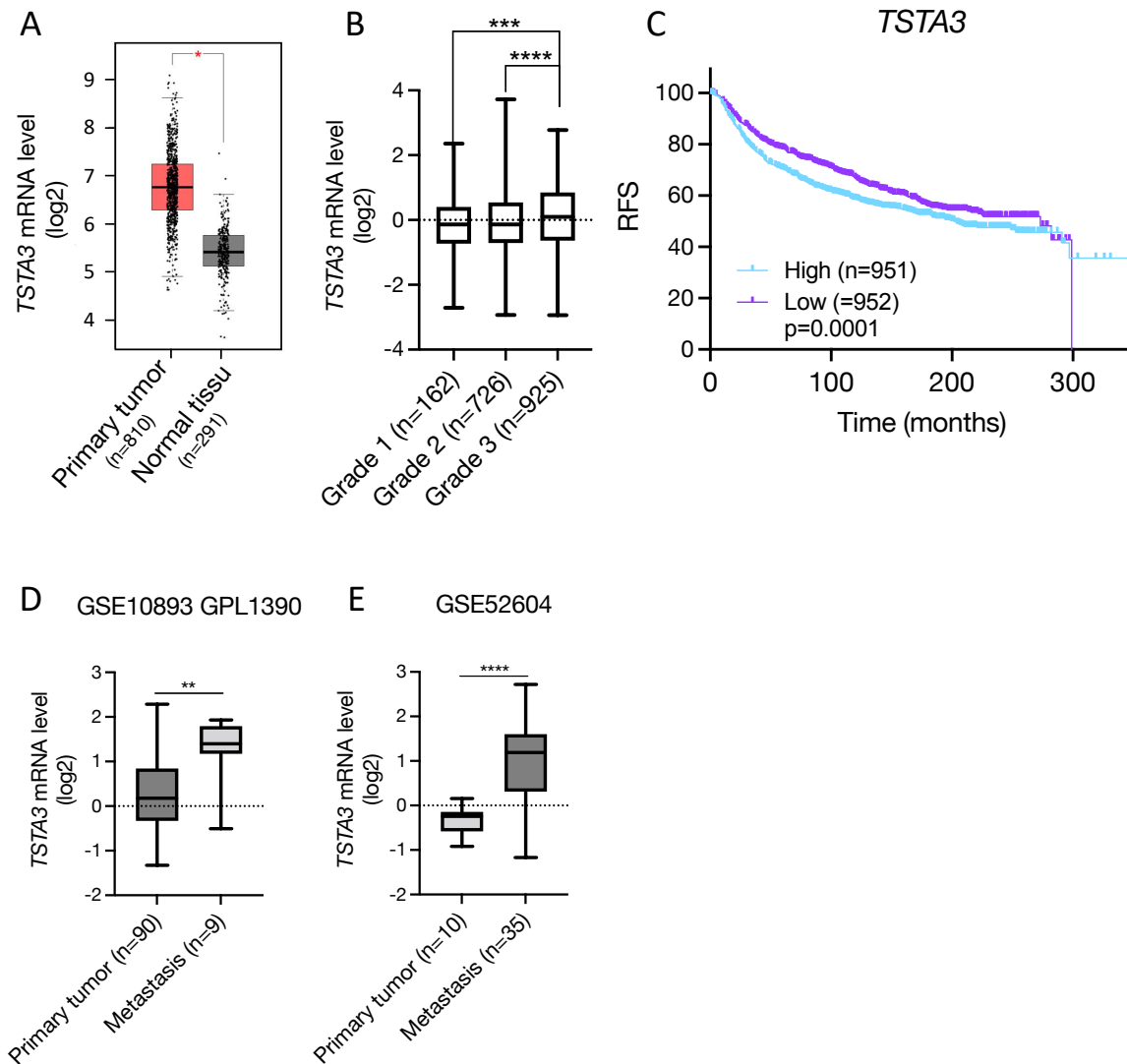


Figure 25. Le niveau de transcrite de *TSTA3* est associé à un mauvais pronostic clinique dans le cancer du sein. (A) niveau d'ARNm de *TSTA3* du tissu sain (« Normal tissu », n=291) comparé à son niveau dans le tissu tumoral (« Primary tumor », n=810). Cette analyse est réalisée dans le site GEPIA2 sur la cohorte TCGA/GTEX. (B) comparaison du niveau d'ARNm de *TSTA3* entre les différents grades histologiques du cancer du sein issu dans la cohorte METABRIC (cbioportal, n= 2 509). (C) kaplan meier montrant le risque de rechute dans le cancer du sein en fonction du niveau de transcrite *TSTA3* dans la cohorte METABRIC. Test statistique « Gehan-Breslow-Wilcoxon test ». (D-E) comparaison du niveau de transcrite *TSTA3* entre la tumeur primaire et la tumeur secondaire dans les patientes présentant un cancer du sein métastatique. L'analyse de la cohorte GSE10893 (n=324) est réalisée par array avec la plateforme GPL1390, « Agilent human 1A oligo UNC custom Microarrays » et celle de la cohorte GSE5604 (n=55) par array avec « Agilent-014850 Whole human genome microarray 4x44K G4112F ». (D) pour l'étude GSE10893, le niveau d'ARNm de *TSTA3* est comparé entre la tumeur primaire (« primary tumor », n=90) et la tumeur secondaire (« Metastasis », n=9). (E) dans l'étude GSE2604, le niveau d'ARNm de *TSTA3* est comparé entre la tumeur primaire (« Primary tumor », n=10) et le tissu métastatique cérébral (« Metastasis », n=35). Test statistique Wilcoxon test, **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$.

L'étude de 2 cohortes indépendantes (GSE20271 et GSE163882) montre que le niveau de transcrit *TSTA3* est augmenté dans les patientes TNBC ne répondant pas au traitement de chimiothérapie (Fig. 26).

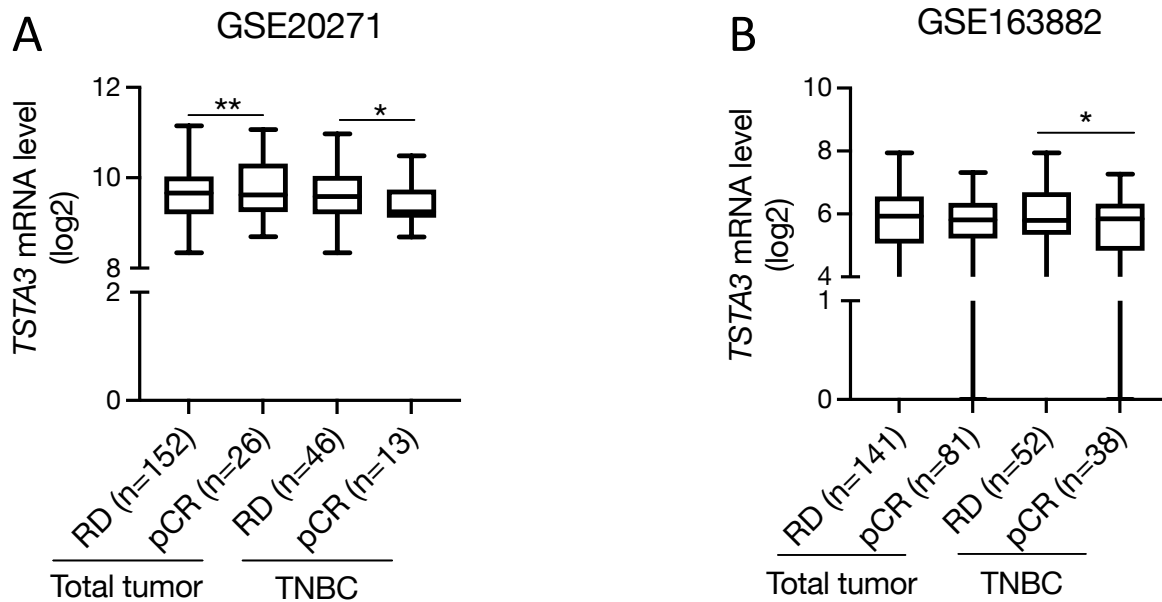


Figure 26. Le haut niveau d'ARNm *TSTA3* est associé à la rechute et à l'absence de réponse au traitement de chimiothérapie dans le cancer du sein triple négatif. (A) l'étude GSE20271 (n=178) est réalisée par array (Affymetrix human genome U133A) et (B) l'étude GSE163882 (n=222) par RNA-seq (Illumina NextSeq 500). Ces deux études analysent le niveau d'ARNm de *TSTA3* dans la tumeur primaire des patientes ayant répondu au traitement de chimiothérapie (pCR, *patient Complet Response*) ou n'ayant pas répondu au traitement (RD, *Residual Disease*). La comparaison est effectuée sans différenciation des sous-types de cancer du sein (« Total tumor ») et au sein du TNBC (triple négatif breast cancer). Test statistique Wilcoxon test, *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ****, $p < 0,0001$.

L'ensemble de ces observations suggère que le haut niveau d'ARNm *TSTA3* est associé à la récurrence et à l'absence de réponse au traitement dans le TNBC. Nous avons ensuite recherché *in silico* le réseau d'interactions protéine-protéine de *TSTA3* afin d'identifier des protéines potentiellement interagissant avec *TSTA3*. A l'aide de la base de données Genemania (<https://genemania.org>, consulté le 30.03.22) nous avons identifié 16 protéines interagissant directement avec *TSTA3* (Fig. 27A). A partir de ce premier réseau, nous avons appliqué différents algorithmes dans le but d'affiner les probabilités d'interactions de *TSTA3* avec les protéines identifiées. Tout d'abord, nous avons utilisé l'algorithme IPCA (*identifying protein complex algorithm*, cytoscape Li M. *et al*, 2008), il permet d'identifier au sein d'un réseau des interactions déjà connues dans d'autres bases de données en éliminant les « fausse » interactions. Cette première approche nous permet d'isoler 7 sous-réseaux (annexe 9), nous avons fait le choix de conserver le premier puisqu'il montre la significativité la plus importante ($p = 1,18E-05$) (Fig. 27B). A partir de ce second réseau, nous avons appliqué un second algorithme ClusterOne (cytoscape, Li M. *et al*, 2017) est appliqué à ce réseau pour isoler les interactants directs de *TSTA3* les plus plausibles. Il est alors identifié deux sous-

réseaux (annexe 9), celui avec la densité d'interaction la plus forte (0,93) est conservé (Fig. 27C).

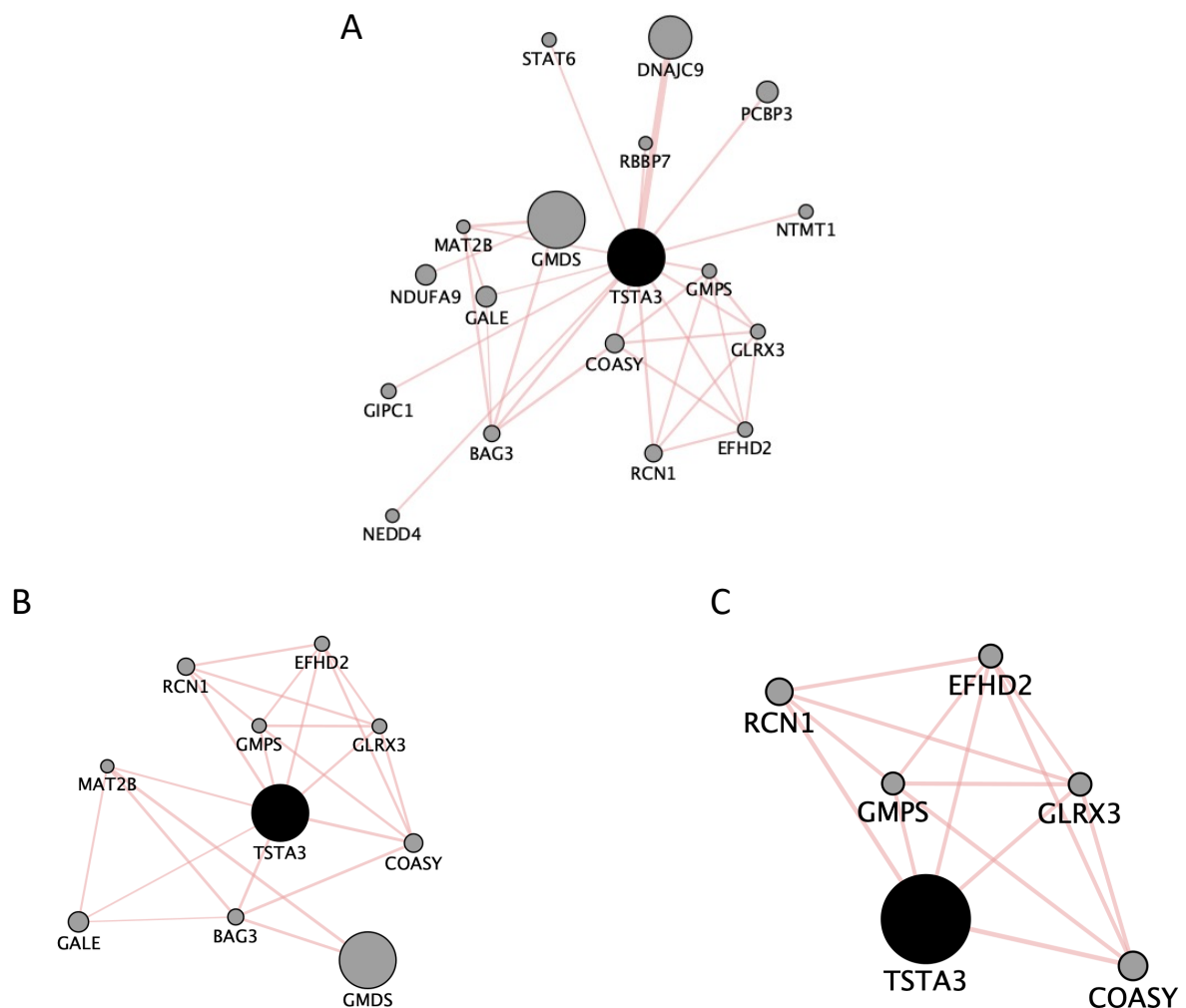


Figure 27. Recherche des protéines interagissant avec TSTA3 *in silico*. Le réseau d'interaction protéiques est identifié à l'aide de la base de données genemania du logiciel cytoscape. Les flèches montrent les interactions physiques prédites entre les protéines de ce réseau. (A) réseau d'interactions protéique de TSTA3 identifié dans genemania. (B) réseau d'interactions protéiques identifié par l'algorithme IPCA au sein du réseau A. (C) réseau d'interactions protéiques identifié par l'algorithme ClusterOne au sein du réseau B.

Ce réseau montre des interactions directes entre TSTA3 et 5 autres protéines : GMPS (*guanine monophosphate synthase*), RCN1 (*reticulocalbin 1*), EFHD2 (*EF-Hand domain family member D2*), GLRX3 (*glutaredoxin 3*) et COASY (*coenzyme A synthase*). L'expression de chacune de ces cibles est évaluée dans les différents sous-types de cancer du sein aux niveaux transcriptionnel (cohorte METABRIC) et protéique (cohorte CPTAC, 2020 cbiportal). Au niveau transcriptionnel, *GMPS*, *RCN1* et *GLRX3* montrent une expression plus élevée dans le TNBC comparé aux autres sous-types de cancer du sein (Fig. 28 A-C). De plus, le niveau élevé d'ARNm de *GMPS* ou de *GLRX3* sont associés à un risque de rechute accru dans le TNBC (Fig.

28D,F). Les niveaux protéiques de GMPS et de RLX3 sont plus élevés dans le TNBC comparés aux autres sous-types de cancer du sein (Fig. 28G,I)

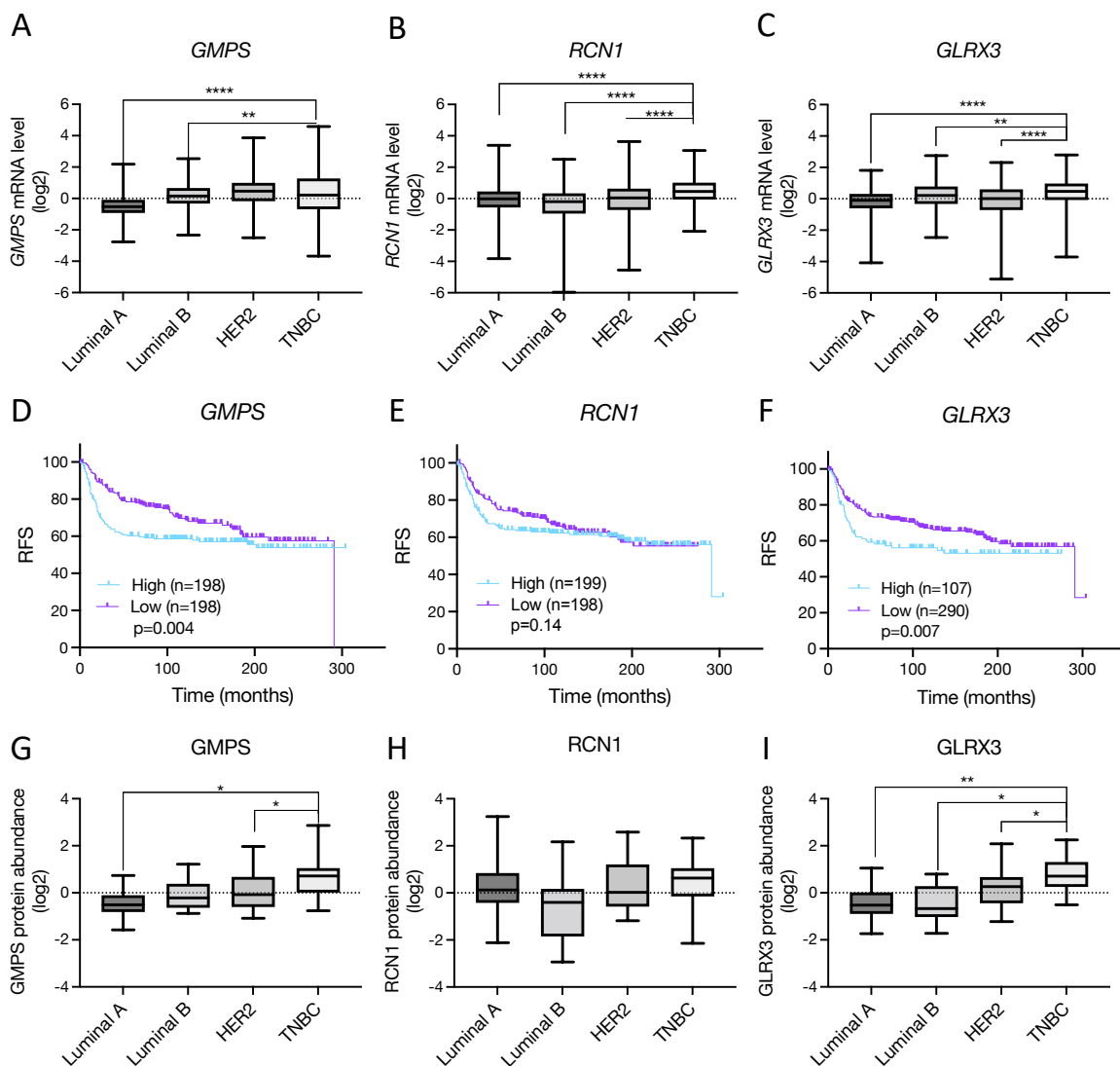


Figure 28. Etude de l'expression et de la valeur pronostique de GMPS, RCN1 et GLRX3 dans le cancer du sein triple négatif. L'évaluation du niveau de transcrite dans les différents sous-types de cancer du sein et l'étude du risque de rechute sont réalisées à partir de l'étude METABRIC (cbioportal, n=2 509). La comparaison du niveau d'expression des protéines entre les sous-types de cancer du sein est réalisée dans l'étude CPTAC, 2020 (cbioportal, n=122). (A-C) comparaison du niveau de transcrite de *GMPS* (A), *RCN1* (B) et *GLRX3* (C) entre les sous-types de cancer du sein. (D-F) kaplan meier de survie sans rechute (RFS « relapse free survival») chez les patientes atteintes de cancer du sein triple négatif pour *GMPS* (D), *RCN1* (E) et *GLRX3* (F). Le temps du risque de rechute est exprimé en mois (« months »). Test statistique « Gehan-Breslow-Wilcoxon test ». (G-I) comparaison de l'expression protéique de *GMPS* (G), *RCN1* (H) et *GLRX3* (I) entre les sous-types de cancer du sein. Test statistique « ANOVA » *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$.

L'ensemble de cette analyse bio-informatique suggère un rôle de TSTA3 dans la rechute et la réponse au traitement de chimiothérapie pour les patientes TNBC. Cela pourrait passer par des interactions avec GMPS et/ou GLRX3.

III. Les modifications du métabolisme énergétique acquis par les cellules persistantes

Dans le cancer il est observé un effet Warburg c'est-à-dire l'acquisition par les cellules d'un profil métabolique glycolytique même en condition d'aérobie (Warburg O., 1930). Cependant, des études récentes ont montré que les cellules TNBC persistantes au traitement de chimiothérapie montrent une dépendance à l'OXPPOS. Son inhibition retarde la croissance et augmente la sensibilité aux agents de chimiothérapie (Echeverria G. *et al*, 2019).

Au regard de la littérature, nous avons commencé par comparer la respiration mitochondriale, ou OXPPOS, et la glycolyse entre les cellules persistantes et contrôles. Pour cela nous avons utilisé la technique d'oxygraphie à l'aide de la machine de Seahorse (Agilent) qui permet d'évaluer l'OXPPOS par la mesure de la consommation d'oxygène (OCR). La glycolyse est mesurée par l'acidification du milieu extracellulaire (ECAR). Ces paramètres sont évalués en condition basale puis en condition de stress grâce à l'injection de différents inhibiteurs ou stimulateur de ces voies (Fig. 29A,E,I).

La mesure de l'OXPPOS montre que les cellules MDA-MB-231 persistantes augmentent significativement leurs respirations basale et maximale (Fig. 29B-C). Le paramètre « ATP turnover » montre la part de respiration mitochondriale dédiée à la formation d'ATP. Il est évalué par la différence entre l'OCR basal et le niveau d'OCR après l'injection d'oligomycine, un inhibiteur de l'ATP-synthase. Sa valeur est plus élevée dans les cellules MDA-MB-231 persistantes que dans les contrôles suggérant un rôle plus important de l'OXPPOS dans la production d'énergie pour ces cellules persistantes (Fig. 29D). De même, les cellules MDA-MB-231 persistantes dissociées des tumeurs primaires formées en souris SCID conservent un plus haut niveau d'OCR maximal *ex vivo* comparé aux cellules de tumeur primaire contrôles (Fig. 29G). Ce résultat suggère que l'augmentation de l'OXPPOS en condition de stress participe à l'agressivité tumorale. De façon inattendue, les cellules SUM159-PT persistantes et contrôles présentent un profil d'OXPPOS est similaire entre elles (Fig. 29I-L).

La glycolyse reste inchangée entre les cellules MDA-MB-231 persistantes et contrôles (Fig. 29M-N). Les cellules SUM159-PT persistantes présente une légère diminution de la glycolyse basale mais la capacité glycolytique est semblables à celles des cellules SUM159-PT persistantes et contrôles (Fig. 29O-P). L'ensemble de ces résultats montre que les MDA-MB-231 persistantes adoptent un profil énergétique d'OXPPOS sans modifier l'activité de la glycolyse.

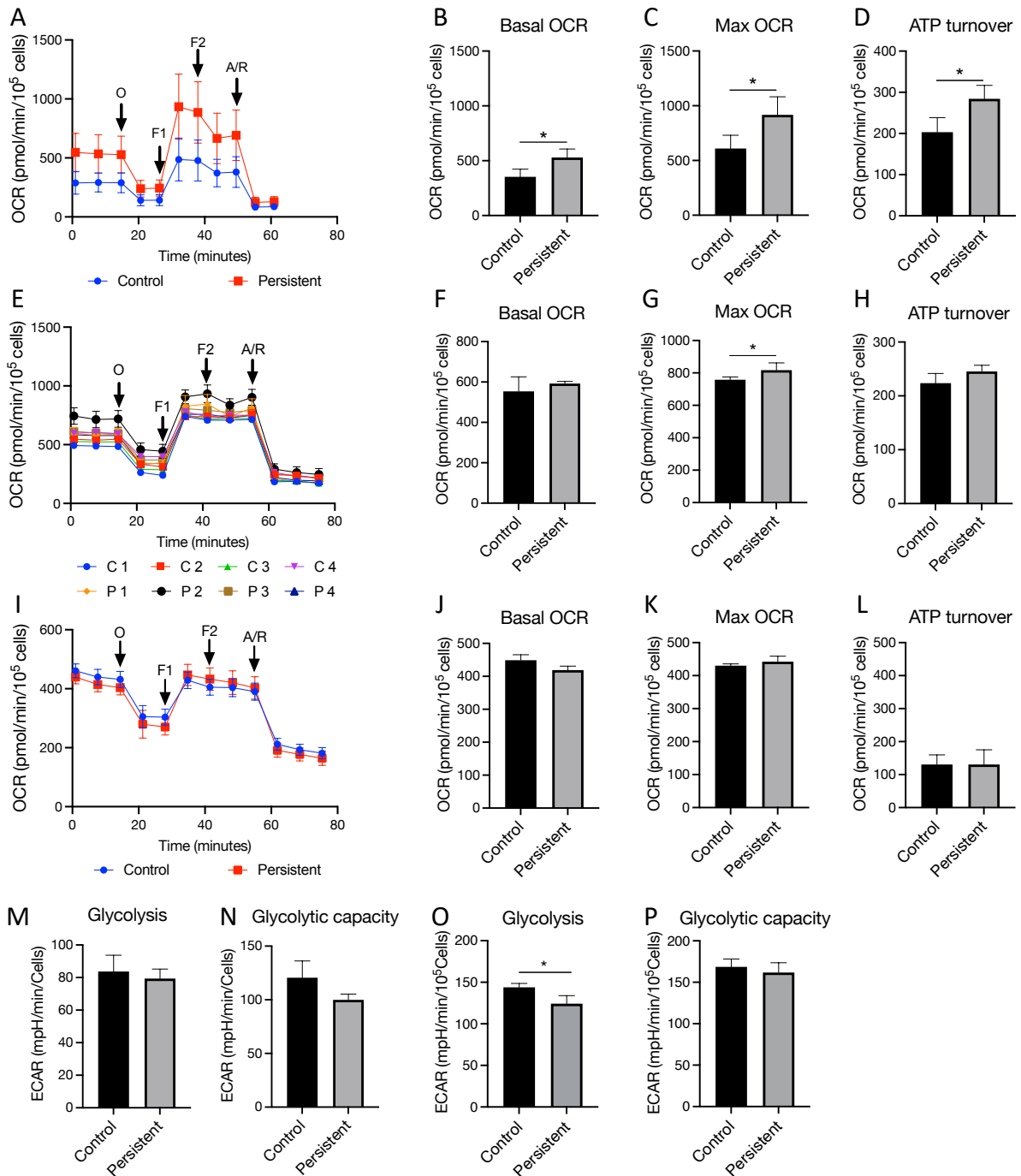


Figure 29. Caractérisation du métabolisme énergétique des cellules persistantes *in vitro* et *ex vivo*. Les fonctions mitochondriales des MDA-MB-231 (A-H) et SUM159-PT (I-L) persistantes ou contrôles sont mesurées à l'aide du Seahorse (Agilent). Vingt-quatre heures avant la mesure, les cellules sont ensemencées dans des plaques XFe24 dans un milieu de culture contenant 2% de sérum. Pour l'analyse *ex vivo* (E-H), les cellules MDA-MB-231 persistantes ou contrôles sont dissociées des tumeurs primaires de souris SCID (24 h après le sacrifice) par digestion enzymatique. Ces cellules sont ensuite ensemencées dans des plaques de Seahorse XFe96 24 h avant l'analyse. (A,E,I) courbes de la consommation d'oxygène (OCR) sous l'influence des différents inhibiteurs décrits dans « matériels et méthodes ». O : oligomycine ; F1 : première concentration de FCCP ; F2 : deuxième injection de FCCP ; A/R : antimycine/roténone ; pour la courbe E, C : cellules issues des tumeurs primaires formées par les MDA-MB-231 contrôles ; P : cellules issues des tumeurs primaires formées par les MDA-MB-231 persistantes. Graphiques des MDA-MB-231 *in vitro* (B-D) et *ex vivo* (F-H) ainsi que des SUM159-PT (J-L) montrant l'OCR basale (« Basal OCR », B,F,J), l'OCR max

(« Max OCR », C,G,K) et de la formation d'ATP (« ATP turnover », C,H,L). (M-P) La glycolyse est mesurée il est décrit dans « matériels et méthodes ». Vingt-quatre heures avant la mesure, les cellules MDA-MB-231 et SUM159-PT persistantes ou contrôles sont ensemencées dans des plaques XFe24 dans un milieu de culture contenant 2% de sérum. Les graphiques montrent les valeurs de l'acidification du milieu extracellulaire (ECAR) permettant d'évaluer la glycolyse en condition basale (M,P) ou en condition de stress (« Glycolytic capacity », N,P). Les graphiques quantitatifs et les courbes sont issus de 3 expériences indépendantes. Test statistique « unpaired student t-test », *, $p < 0,05$.

Afin d'évaluer le potentiel énergétique des différentes lignées, nous avons réalisé un diagramme bioénergétique permettant d'évaluer l'OXPPOS en fonction de la glycolyse en condition basale (point plein) et de stress (point vide) (Fig. 30). En condition basale, les cellules MDA-MB-231 contrôles et persistantes sont classées comme étant quiescentes. En condition de stress, les cellules MDA-MB-231 contrôles restent quiescentes tendant vers un profil glycolytique suggérant qu'elles répondent au stress plus par une augmentation de la glycolyse que de l'OXPPOS. Les MDA-MB-231 persistantes deviennent « aerobic » montrant clairement qu'elles privilégient l'OXPPOS pour répondre à la forte demande énergétique. De façon intéressante, les SUM159-PT persistantes et contrôles montrent un profil glycolytique que ce soit en condition basale ou de stress suggérant qu'elles privilégient la glycolyse pour la production d'énergie.

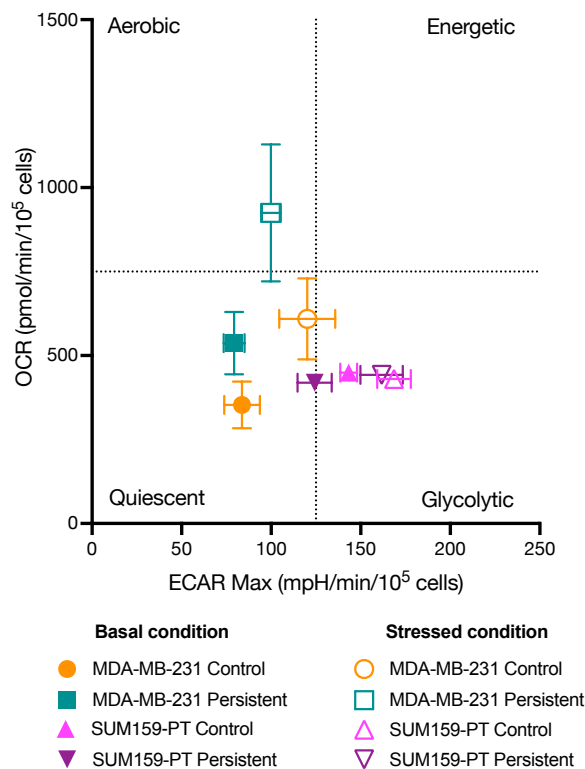


Figure 30. Organisation énergétique des cellules persistantes et contrôles. Graphique du ratio entre l'OCR et l'ECAR en condition basale (point plein) et de stress (point vide) des cellules MDA-MB-231 et SUM159-PT persistantes ou contrôles. Chaque cadran représente un état métabolique : « Aerobic », les cellules privilégient l'OXPPOS à la glycolyse ; « Energetic », les cellules montrent une activité élevée de l'OXPPOS et de la glycolyse ; « Quiescent », les cellules montrent une activité faible de l'OXPPOS et de la glycolyse ;

« Glycolytic », les cellules privilégient la glycolyse à l'OXPPOS. Le graphique est réalisé à partir des résultats obtenus pour la mesure de l'OXPPOS et de la glycolyse.

Ces résultats suggèrent que l'augmentation du niveau d'OXPPOS pourrait être en lien avec la diminution de la sensibilité aux drogues des cellules MDA-MB-231 persistantes. En effet, les 2 lignées cellulaires persistantes montrent une augmentation du potentiel invasif *in vitro* et *in vivo*. Seule la sensibilité aux drogues et le profil énergétique les différencient.

La modification de l'OXPPOS peut être la conséquence de changement au niveau de la masse ou du potentiel de membrane mitochondriale, d'expression des protéines des complexes de la chaîne respiratoire ou encore de l'utilisation de certains substrats.

L'évaluation de la masse mitochondriale, à l'aide d'une sonde marquant les protéines mitochondriales, montre que dans les deux lignées la masse ne varie pas entre les cellules contrôles et persistantes (Fig. 31A-B). Le potentiel mitochondrial est évalué par l'utilisation d'une sonde mitochondriale dont la fluorescence varie en fonction de son activité (Fig. 31C-D). Les cellules MDA-MB-231 persistantes possèdent un potentiel de membrane plus élevé que les cellules contrôles (Fig. 31C). Aucune différence n'est observée entre les cellules SUM159-PT persistantes et contrôles (Fig. 31D). Cela suggère que le changement de potentiel de membrane entre les cellules MDA-MB-231 persistantes et contrôles pourrait jouer un rôle dans l'augmentation de l'OXPPOS.

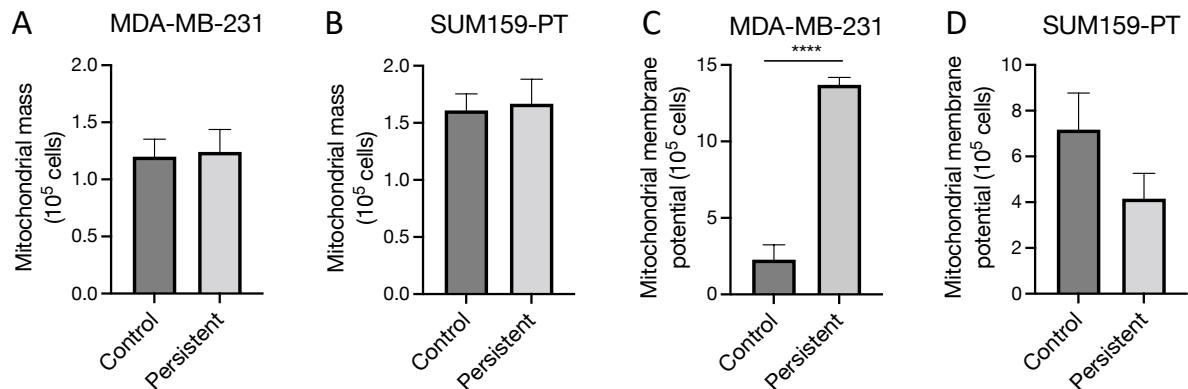


Figure 31. Mesure de la masse mitochondriale et du potentiel de membrane mitochondrial. (A-B) mesure de la masse mitochondriale. Les cellules MDA-MB-231 (A) et SUM159-PT (B) persistantes ou contrôles sont marquées avec la sonde mitochondriale Mitotracker Green® avant d'être analysées par cytométrie de flux pour mesurer la masse mitochondriale. Les graphiques représentent la masse de mitochondrie (« Mitochondrial Mass ») évaluée par la moyenne de fluorescence de $\times 10^5$ cellules. (C-D) mesure du potentiel de membrane mitochondrial. Les cellules MDA-MB-231 (C) et SUM159-PT (D) persistantes ou contrôles sont ensemencées la veille du marquage avec la sonde mitochondriale Mitotracker Red®. Après le marquage, la fluorescence des cellules est mesurée à l'aide du Celigo. Les graphiques montrent le potentiel de membrane évalué par la moyenne de fluorescence pour 10^5 cellules. Les graphiques quantitatifs sont issus de 3 expériences indépendantes. Test statistique « unpaired student t-test », ****, $p < 0,0001$.

L'analyse de l'expression des protéines des complexes de la chaîne respiratoire est réalisée à l'aide de l'analyse protéomique (Tableau 9). Certaines protéines montrent une augmentation de leur expression, notamment COX17 dans les MDA-MB-231 et NDUFV2 pour les SUM159-PT. Cependant, la majorité des protéines montrent un changement d'expression faible pouvant même être diminuée comparée aux contrôles (ex. SDHA dans les 2 lignées).

Electron transporter chain complex	Protein	Symbol	Expression ratio MDA-MB-231 persistent/control (pvalue)	Expression ratio persistent/control SUM159-PT (pvalue)
Complex I	NADH:Ubiquinone oxidoreductase subunit A5	NDUFA5	1.17 (0.23)	1.52 (5.97E-05)
	NADH:Ubiquinone oxidoreductase subunit A8	NDUFA8	1.02 (0.63)	1.28 (0.0001)
	NADH:Ubiquinone oxidoreductase subunit AB1	NDUFAB1	1.34 (4.32E-08)	1.02 (0.15)
	NADH:Ubiquinone oxidoreductase subunit S3	NDUFS3	0.98 (0.7)	1.76 (5.65E-09)
	NADH:Ubiquinone oxidoreductase subunit S7	NDUFS7	1.07 (0.08)	1.40 (2.82E-07)
	NADH:Ubiquinone oxidoreductase subunit V2	NDUFV2	1.03 (0.82)	2 (2.71E-06)
Complex II	Succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A	SDHA	0.61 (1.72E-15)	0.86 (0.003)
	Succinate dehydrogenase complex iron sulfur subunit B	SDHB	0.68 (4.28E-11)	0.94 (0.53)

Tableau 9. Comparaison des niveaux de protéines du complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale entre les cellules persistantes et contrôles. Le tableau montre le changement d'expression des protéines dans les cellules persistantes MDA-MB-231 et SUM159-PT incluses dans les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Les valeurs représentent le ratio entre le niveau d'expression dans les cellules

persistantes et les cellules contrôles de chaque lignée. Le tableau est réalisé à partir des résultats obtenus avec l'analyse par spectrométrie de masse dans la condition de culture 2% SVF.

Electron transporter chain complex	Protein	Symbol	Expression ratio MDA-MB-231 persistent/control (pvalue)	Expression ratio persistent/control SUM159-PT (pvalue)
Complex III	Ubiquinol-cytochrome C reductase core protein 1	UQCRC1	1.14 (0.0017)	0.99 (0.65)
	Ubiquinol-cytochrome C reductase core protein 2	UQCRC2	1.28 (2.39E-05)	1.09 (0.09)
Complex IV	Cytochrome C oxidase copper chaperonne	COX17	2 (0.0004)	1.69 (0.0006)
	Cytochrome C oxidase subunit 6C	COX6C	1.05 (0.05)	0.81 (0.0013)
ATP synthase	ATP synthase F1 subunit alpha	ATP5F1A	0.97 (0.19)	1.18 (0.0004)
	ATP synthase F1 subunit beta	ATP5F1B	1.02 (0.004)	1.20 (6.98E-09)
	ATP synthase F1 subunit delta	ATP5F1D	0.94 (0.008)	1.40 (1.81E-07)
	ATP synthase membrane subunit F	ATP5MF	0.92 (0.0012)	1.24 (4.34E-13)
	ATP synthase peripheral stalk subunit F6	ATP5PF	0.81 (0.02)	1.27 (0.004)
	ATP synthase peripheral stalk subunit OSCP	ATP5PO	1.03 (0.25)	1.25 (0.0002)

Tableau 9, suite. Comparaison des niveaux de protéines du complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale entre les cellules persistantes et contrôles.

Cette étude est complétée par une analyse métabolomique dans la lignée MDA-MB-231 puisque le métabolisme énergétique des cellules persistantes et contrôles diffère (Fig. 32A, Annexe 10). Les résultats montrent une augmentation de la production d'intermédiaires de la glycolyse dans les cellules persistantes pouvant être en lien avec une augmentation de

son activité. De façon intéressante, la production de pyruvate est augmentée dans les cellules persistantes mais pas la production de lactate qui reste équivalente entre les 2 conditions. Cela suggère une augmentation de l'utilisation du pyruvate vers la mitochondrie pour les cellules persistantes. De même, la diminution de la glutamine dans les cellules persistantes est associée à une tendance à l'élévation de la concentration en glutamate suggérant une possible augmentation du métabolisme de la glutamine dans les cellules persistantes. L'augmentation de la production d'intermédiaires du cycle de Krebs laisse penser à une possible augmentation de son activité.

Pour obtenir une vue globale du métabolisme énergétique dans les cellules MDA-MB-231 persistantes, nous avons effectué une analyse croisée d'enrichissement à l'aide du site Métaboanalyst (consulté le 17.03.22). Ce site permet d'identifier les voies métaboliques modifiées en fonction de l'expression des protéines associées au métabolisme et/ou de la concentration en métabolites détectés par spectrométrie de masse (Fig. 32B). Les résultats montrent l'enrichissement d'une voie métabolique (« pathway impact ») en fonction de la valeur de significativité (p value en log de base 10). Les voies de synthèse de l'arginine, du métabolisme de certains acides aminés et du pyruvate ainsi que du cycle de Krebs semblent les plus enrichies dans les cellules MDA-MB-231 persistantes. L'ensemble de ces résultats suggère que l'augmentation de l'OXPPOS dans les MDA-MB-231 persistantes n'est pas due à une augmentation du nombre de complexes de la chaîne respiratoire, mais peut-être, à une augmentation de la glycolyse aérobie, du métabolisme de la glutamine et du fonctionnement accru du cycle de Krebs.

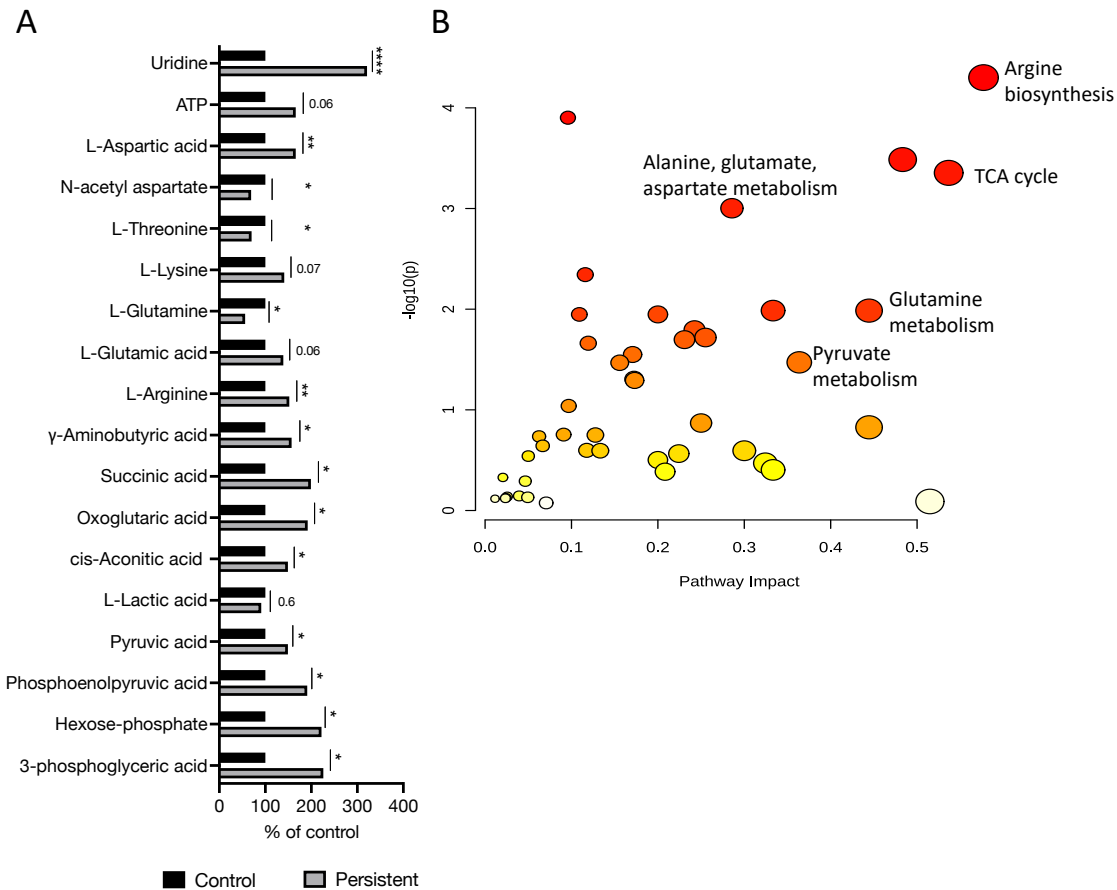


Figure 32. Etude moléculaire des changements métaboliques observés dans les cellules MDA-MB-231 persistantes. (A) Les cellules MDA-MB-231 persistantes et contrôles sont comparées par métabolomique pour évaluer les changements dans la production des métabolites. Le graphique montre l'ensemble des métabolites dont la concentration est augmentée dans les cellules MDA-MB-231 persistantes. La concentration de chaque métabolite dans les cellules persistantes est rapportée à sa concentration dans les cellules contrôles. Le changement de concentration est exprimé en pourcentage. Test statistique « unpaired student t-test », *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ****, $p < 0,0001$. (B) graphique issu des données de protéomique et de métabolomique montrant l'enrichissement (« $-\log_{10}(P)$ », abscisse) et l'importance (« Pathway impact », ordonnée) des voies de signalisation dérégulées dans les cellules MDA-MB-231 persistantes. Les données de protéomique correspondent à l'ensemble des protéines rattaché au métabolisme énergétique avec une expression significativement augmentée dans les cellules MDA-MB-231 persistantes. Ce graphique a été réalisé à l'aide du site Metaboanalyst et le module « Joint Pathway ».

Afin d'évaluer l'importance du métabolisme de la glutamine et du glucose dans les cellules MDA-MB-231 persistantes nous avons réalisé une mesure de l'OXPPOS dans des conditions où ces voies sont inhibées (Fig. 33). Pour cela le métabolisme de la glutamine est inhibé par du BPTES (inhibiteur pharmacologique de la glutamine synthase ; Fig. 33A-B) et le métabolisme du pyruvate avec de l'UK-5099 (inhibiteur pharmacologique du transport du pyruvate dans la mitochondrie ; Fig. 33C-D). L'inhibition du métabolisme de la glutamine n'influence pas l'OXPPOS des cellules contrôles. Cependant, les cellules contrôles ne sont plus capables de maintenir l'OXPPOS en condition de stress lorsque le métabolisme du pyruvate est inhibé. Pour les cellules persistantes, l'inhibition du métabolisme de la glutamine diminue l'OCR maximal mais pas le basal. Lorsque le métabolisme du pyruvate est empêché, les cellules

persistantes ne sont plus capables de maintenir leur OXPHOS en condition basale et de stress. Nous avons complété cette analyse par la mesure de l'OXPHOS en présence de glutamine, de glucose et de pyruvate ou en présence de la glutamine uniquement (Fig. 33E-G). Dans la condition où les cellules sont en absence de glucose et de pyruvate, les cellules persistantes ne sont pas capables de maintenir l'OXPHOS alors que les cellules contrôles le peuvent (Fig. 33G). Ces données laissent penser que le pyruvate est essentiel pour les cellules persistantes dans le maintien de la respiration mitochondriale.

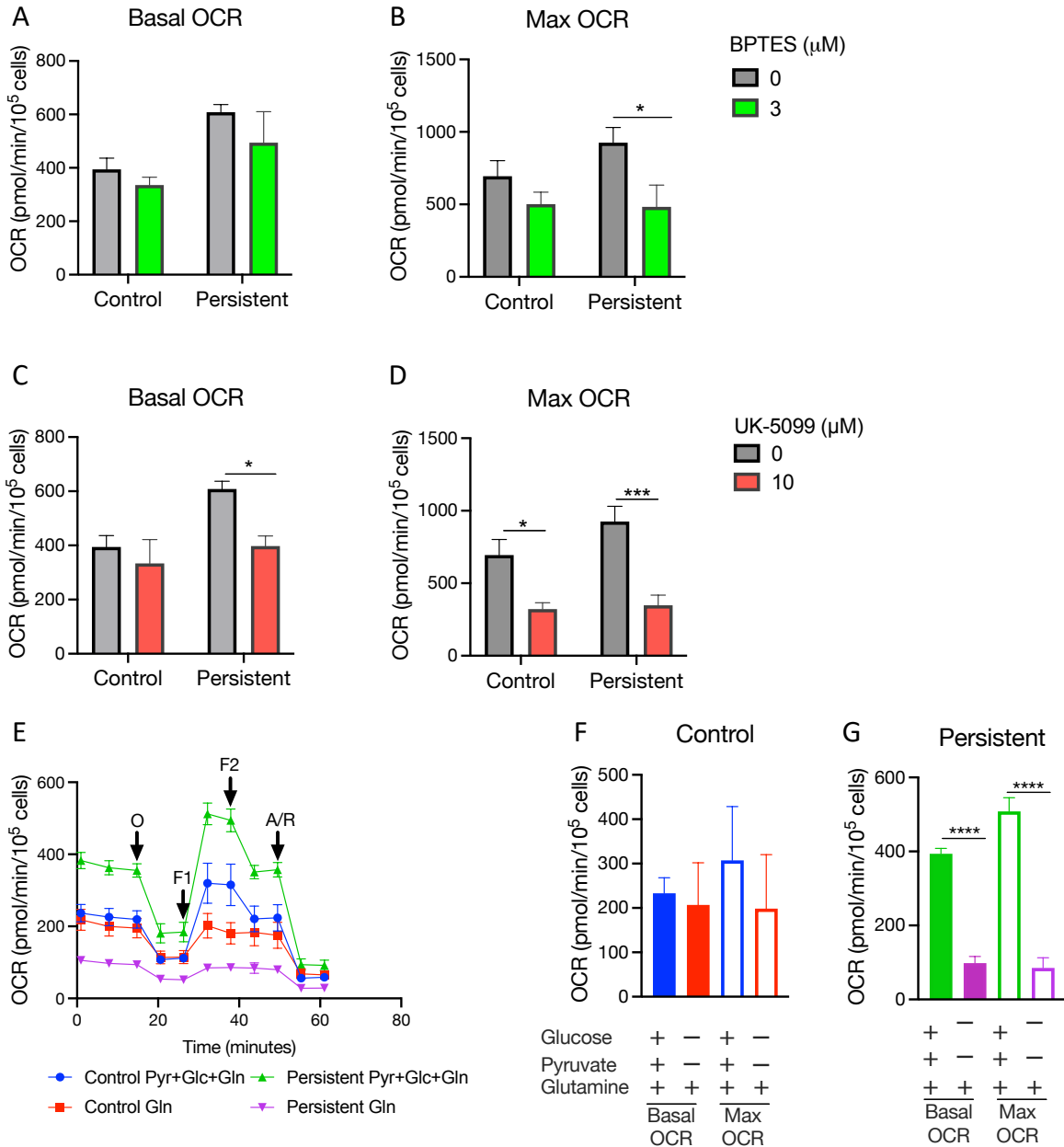


Figure 33. Etude fonctionnelle du rôle du pyruvate et de la glutamine dans le maintien de l'OXPHOS des cellules MDA-MB-231 persistantes et contrôles. (A-D) L'OXPHOS des cellules MDA-MB-231 persistantes ou contrôles est mesurée en inhibant le métabolisme de la glutamine (A-B) ou en empêchant l'entrée de pyruvate dans la mitochondrie (C-D). Le métabolisme de la glutamine est inhibé par un traitement au BPTES (3 μM) et celui du pyruvate est empêché par traitement avec de l'UK-5099 (10 μM). Les cellules sont

incubées 30 minutes avant l'analyse au Seahorse avec ces inhibiteurs. Les graphiques montrent l'OXPHOS en condition basale (« Basal OCR », A,C) et de stress (« Max OCR », B,D). (E-G) mesure de l'OXPHOS des cellules MDA-MB-231 persistantes (G) ou contrôles (F) en absence ou présence de pyruvate et de glucose. Trente minutes avant l'analyse, les cellules sont rincées et incubées dans un milieu complet (Pyr + Glc+ Gln) ou ne contenant que de la glutamine (Gln). Les graphiques montrent les valeurs de la respiration basale (« Basal OCR ») ou en condition de stress (« Max OCR ») dans les 2 conditions. O : oligomycine ; F1 : première concentration de FCCP ; F2 : deuxième injection de FCCP ; A/R : antimycine/roténone ; Pyr : pyruvate ; Glc : glucose ; Gln : glutamine. Les graphiques quantitatifs et la courbe sont issus de 3 expériences indépendantes. Test statistique « unpaired student *t*-test », *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$.

L'ensemble de ces résultats montre que les cellules SUM159-PT semblent avoir un métabolisme plus glycolytique qu'oxydatif pour la production d'énergie. Les cellules MDA-MB-231 persistantes adoptent un profil métabolique d'OXPHOS associé à une augmentation du potentiel de membrane mitochondriale. Il semblerait que les cellules MDA-MB-231 persistantes montrent une dépendance au métabolisme du pyruvate pour le maintien de l'OXPHOS.

IV. Le rôle du métabolisme énergétique dans l'agressivité tumorale et la réponse aux drogues de chimiothérapie

Les résultats obtenus dans la partie précédente montrent que les cellules MDA-MB-231 persistantes diminuent leur sensibilité aux drogues et adoptent un profil métabolique d'OXPPOS. Cependant, les cellules SUM159-PT persistantes conservent une sensibilité aux drogues. De plus, leur profil énergétique est semblable aux cellules contrôles. L'ensemble de ces données nous ont amenés à l'hypothèse suivante : l'OXPPOS pourrait jouer un rôle dans l'agressivité tumorale et la réponse au traitement de chimiothérapie.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé deux types d'inhibiteurs de l'OXPPOS :

- la tigécycline, un inhibiteur direct de l'OXPPOS, qui s'oppose à l'activité de la sous-unité 30S du ribosome mitochondrial empêchant la traduction de ses protéines (Olson M. *et al*, 2006),
- l'UK-5099, un inhibiteur indirect de l'OXPPOS, qui agit sur les MPC empêchant l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie pour son intégration dans le cycle de Krebs (Halestrap A. *et al*, 1976).

Dans un premier temps nous avons traité les cellules avec une gamme de concentration de chaque inhibiteur (Fig. 34). De façon surprenante, les cellules persistantes et contrôles montrent la même sensibilité aux inhibiteurs de l'OXPPOS, suggérant qu'il n'y a pas de dépendance particulière à l'OXPPOS pour la prolifération cellulaire.

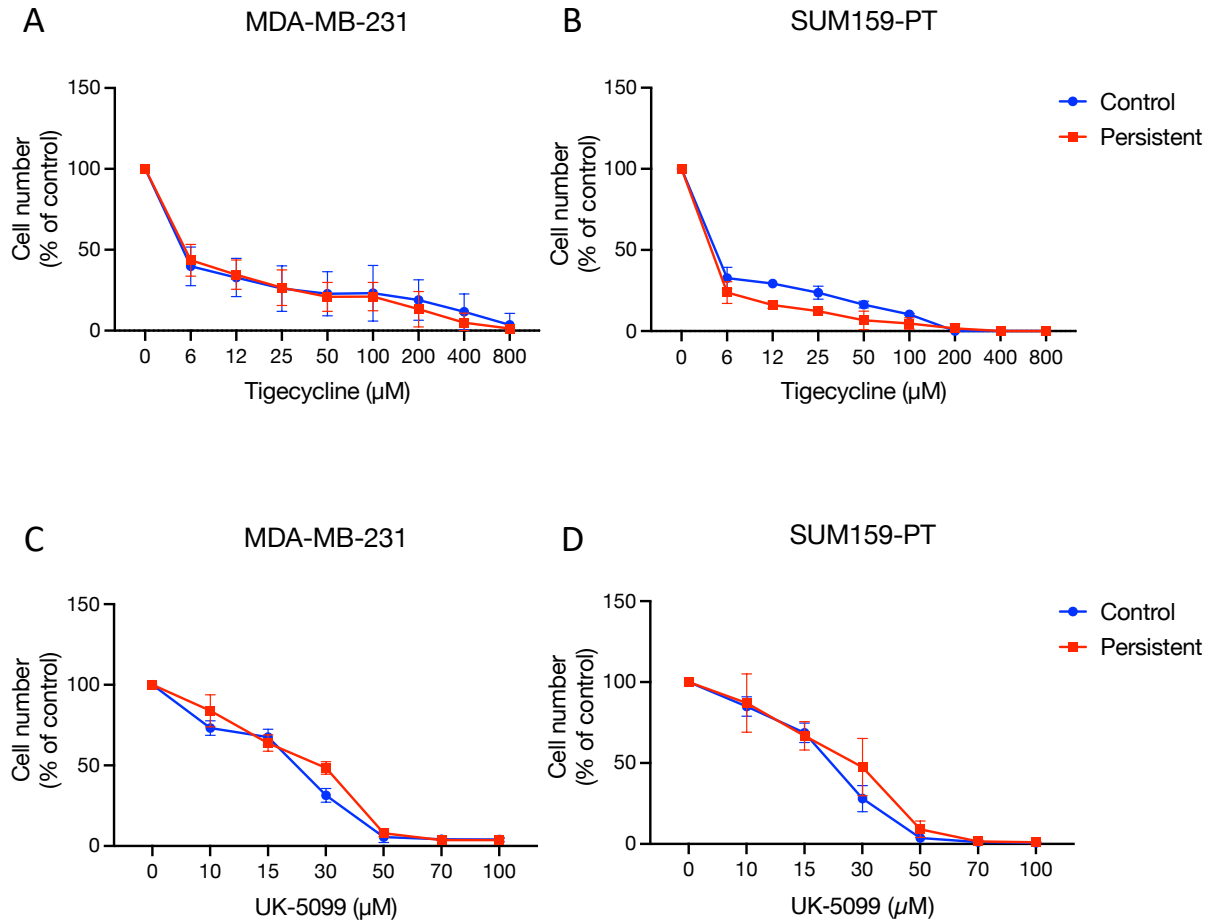


Figure 34. Evaluation de l'effet des inhibiteurs de l'OXPPOS sur la prolifération des cellules persistantes et contrôles. Les cellules MDA-MB-231 (A,C) et SUM159-PT (B,D) persistantes ou contrôles sont traitées durant 96 h avec une gamme de concentration de tigécycline (0 – 800 μM, A-B) ou d'UK-5099 (0 – 100 μM, C-D). A la fin des 96 h de traitement, les cellules sont marquées au Hoestch 33342 pour être dénombrées au Celigo. Les courbes montrent le pourcentage de cellules restantes à la fin de l'expérience. Les courbes sont issues de 3 expériences indépendantes. Test statistique « unpaired student t-test ».

Nous avons ensuite recherché une concentration de chaque inhibiteur diminuant l'OXPPOS sans agir sur la croissance cellulaire (Fig.35 ; Fig.36). Le traitement des cellules persistantes et contrôles avec 3 μM de tigécycline ne change pas la prolifération cellulaire (Fig. 35A,D) ni la répartition des cellules dans le cycle cellulaire (données non montrées). En revanche, elle permet de réduire l'OXPPOS des cellules MDA-MB-231 persistantes (Fig. 35B-C).

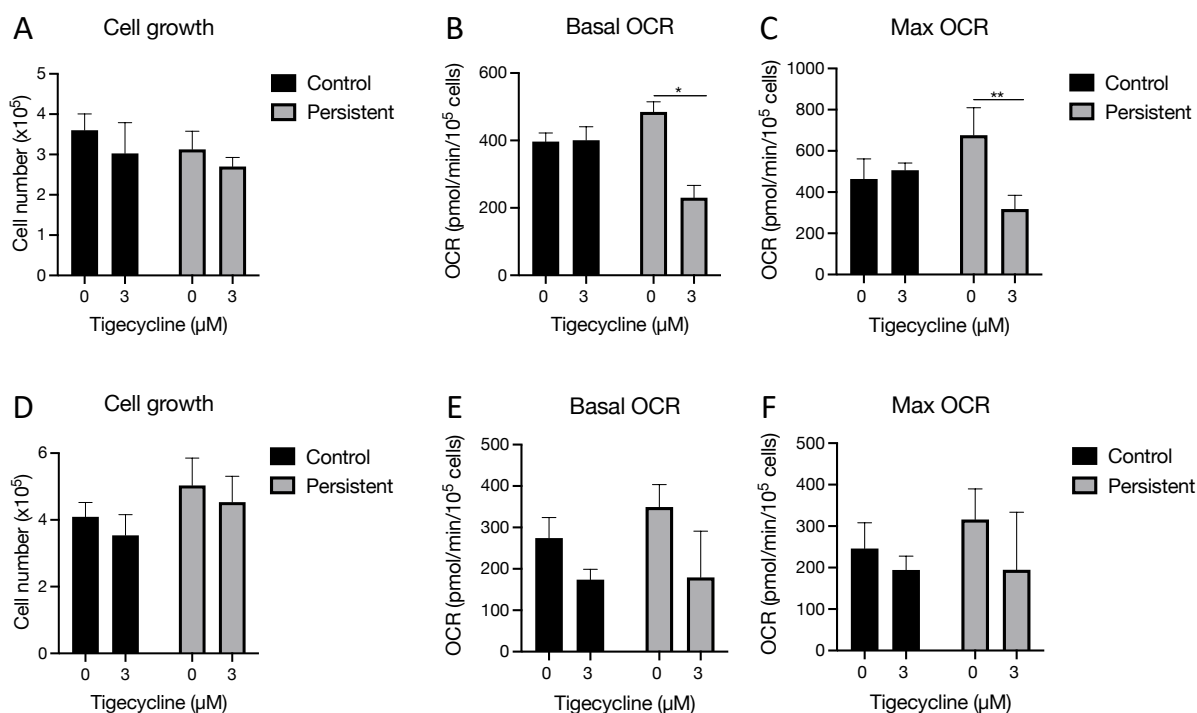


Figure 35. Concentration de tigécycline suffisante pour diminuer l'OXPPOS sans impacter la croissance cellulaire des cellules persistantes et contrôles. (A,D) le nombre de cellules MDA-MB-231 (A) et SUM159-PT (D) persistantes ou contrôles restant après un traitement avec de la tigécycline à 3 μM. Le comptage est effectué à la lame de malassez. (B-C, E-F) mesure de l'OXPPOS des cellules MDA-MB-231 (B-C) et SUM159-PT (E-F) persistantes ou contrôles après un traitement de 96 h avec 3 μM de tigécycline. Les graphiques montrent l'OCR basal (« Basal OCR », B,E) et maximal (« Max OCR », C,F). Test statistique « unpaired student *t*-test » *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

Concernant l'UK-5099, 10 μM est suffisant pour diminuer la respiration maximale des cellules MDA-MB-231 persistantes ainsi que l'OXPPOS des cellules MDA-MB-231 contrôles et des cellules SUM159-PT persistantes sans affecter la croissance cellulaire (Fig. 36). Cependant, pour les SUM159-PT contrôles, cette concentration diminue l'OXPPOS mais aussi de 30% la prolifération cellulaire (Fig. 36D). L'analyse du cycle cellulaire associe cette diminution à une augmentation de la phase S (données non montrées).

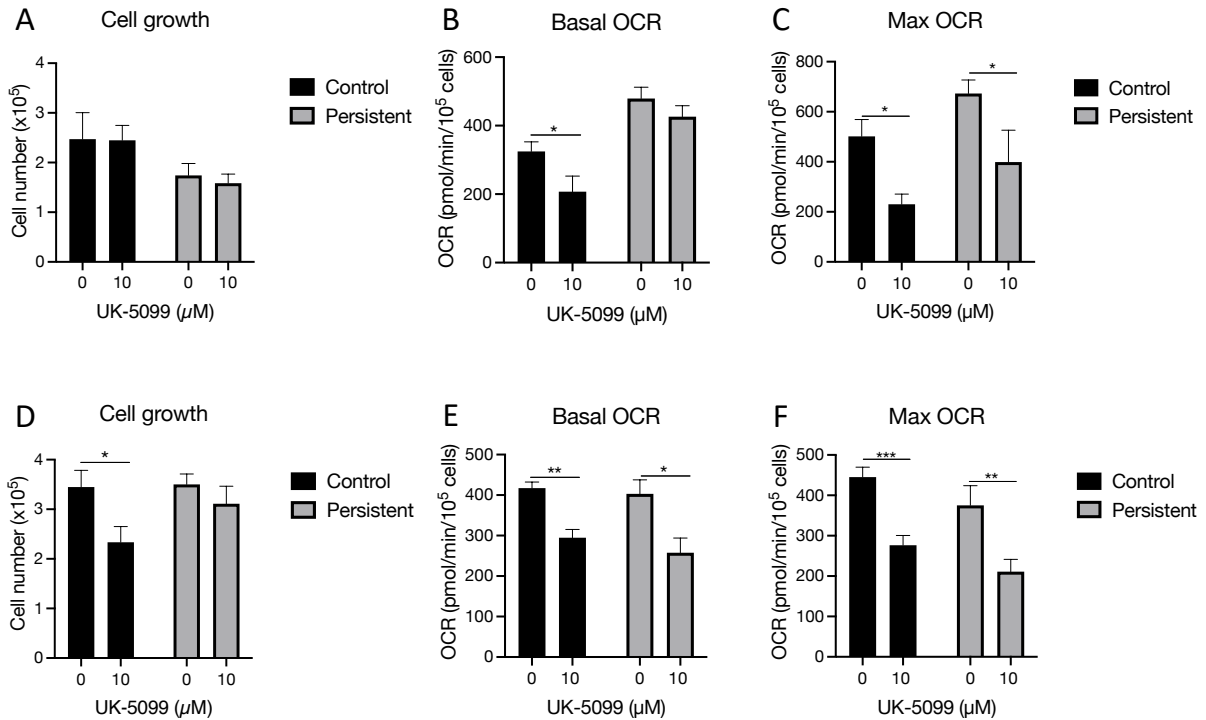


Figure 36. Concentration d'UK-5099 suffisante pour diminuer l'OXPPOS sans impacter la croissance cellulaire des cellules persistantes. (A,D) le nombre de cellules MDA-MB-231 (A) et SUM159-PT (D) persistantes ou contrôles restant à la fin du traitement avec de l'UK-5099 à 10 μM. Le comptage est effectué à la lame de malassez. (B-C, E-F) mesure de l'OXPPOS des cellules MDA-MB-231 (B-C) et SUM159-PT (E-F) persistantes ou contrôles à la suite d'un traitement de 96 h avec 10 μM d'UK-5099. Les graphiques montrent l'OCR basal (« Basal OCR », B,E) et maximal (« Max OCR », C,F). Test statistique « unpaired student *t*-test » *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ****, $p < 0,0001$.

Nous avons aussi évalué si les inhibiteurs de l'OXPPOS pouvaient influencer le potentiel invasif des cellules persistantes et contrôles. Les résultats montrent que la diminution de l'OXPPOS par la tigécycline ou l'UK-5099 abaisse la capacité invasive des cellules persistantes et contrôles des deux lignées (Fig. 37). Ceci suggère que l'OXPPOS participe au processus invasif.

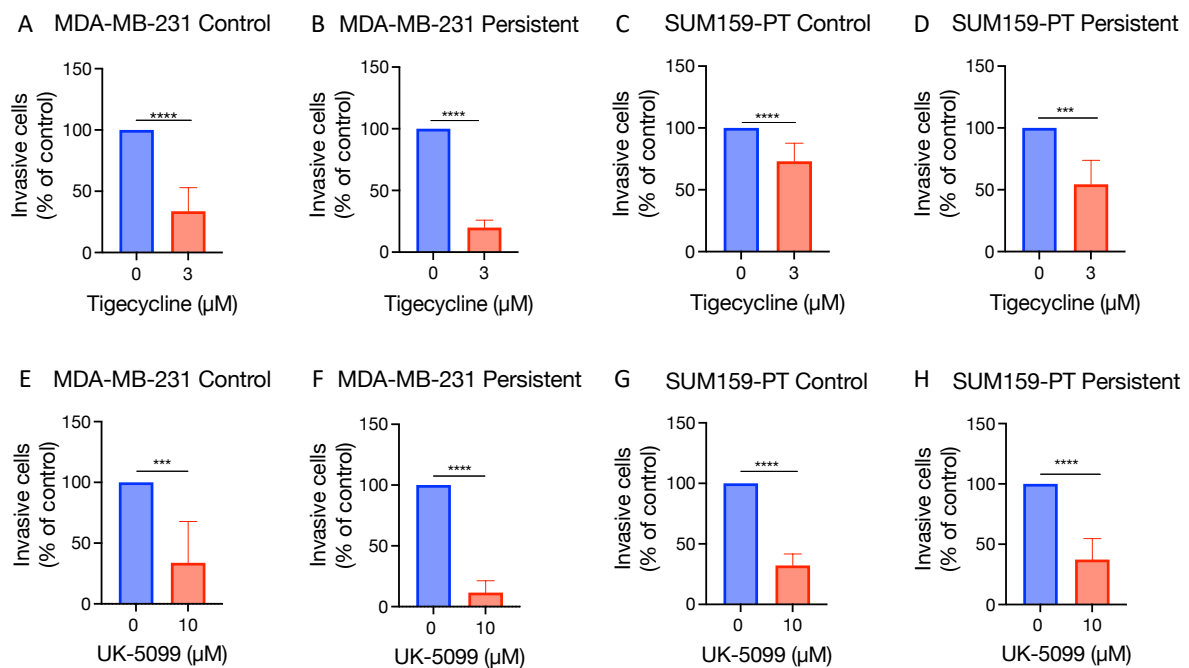


Figure 37. La réduction de l’OXPHOS diminue le potentiel invasif des cellules persistantes et contrôles. Les cellules MDA-MB-231 (A-B, E-F) et SUM159-PT (C-D, G-H) persistantes (B,D,F,H) ou contrôles (A,C,E,G) sont traitées durant 96 h avec 3 μM de tigécycline (A-D) ou 10 μM d’UK-5099 (E-H) avant d’être ensemencées dans un système de transwell pré-traité avec du Matrigel®. Les cellules sont ensemencées dans la partie supérieure du transwell pour 24 h. Les cellules ayant traversé la couche de Matrigel® sont marquées au Hoestch 33342 pour être dénombrées au microscope à fluorescence (Nikon, 10x). Les graphiques quantitatifs sont issus de 3 expériences indépendantes. Test statistique « unpaired student *t*-test » ***, $p < 0,001$, ****, $p < 0,01$.

Enfin, nous avons évalué si la diminution de l’OXPHOS pouvait agir sur la sensibilité aux drogues des cellules persistantes et contrôles. Pour cela les cellules sont traitées avec une gamme de concentrations d’épirubicine ou de paclitaxel combinée à la tigécycline ou à l’UK-5099 durant 96 heures. L’ajout de tigécycline augmente la sensibilité des MDA-MB-231 persistantes et des SUM159-PT contrôles à l’épirubicine alors qu’il n’influence pas la réponse des cellules MDA-MB-231 contrôles et des SUM159-PT persistantes (Fig. 38A-D). L’association de tigécycline avec du paclitaxel n’influence pas significativement la réponse des cellules persistantes et contrôles au traitement (Fig. 38E-H).

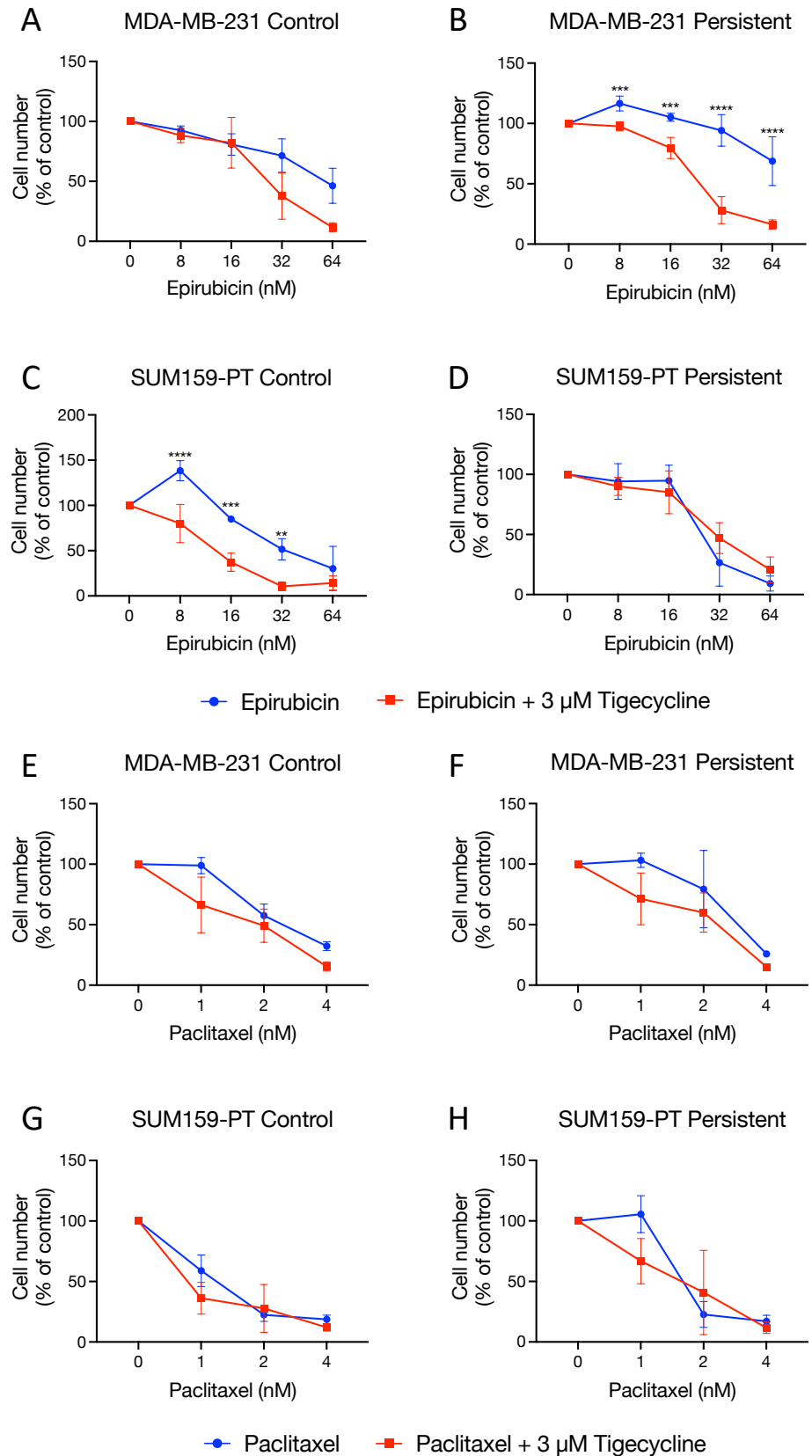


Figure 38. Effet de la tigécycline sur la sensibilité des cellules persistantes ou contrôles à l'épirubicine et au paclitaxel. Pour cela, les cellules MDA-MB-231 (A-B, E-F) et SUM159-PT (C-D, G-H) persistantes (B,D,F,H) ou contrôles (A,C,E,G) sont traitées durant 96 h en combinant 3 μM tigécycline avec une gamme de doses

d'épirubicine (8 – 64 nM, A-D) ou de paclitaxel (1 – 4 nM, E-H). Le nombre de cellules restantes à la fin du traitement est évalué au Celigo à la suite d'un marquage au Hoechst 33342. Les courbes représentent le pourcentage de cellules restantes après le traitement combiné. Les courbes sont représentatives de 3 expériences indépendantes. Test statistique « unpaired student t-test » **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,01$.

La combinaison d'UK-5099 à l'épirubicine augmente la sensibilité à l'épirubicine des cellules persistantes ainsi que des cellules contrôles des 2 types cellulaires (Fig. 39A-D). Néanmoins, l'ajout d'UK-5099 ne permet pas d'augmenter significativement la réponse au paclitaxel des cellules persistantes et contrôles (Fig. 39E-H).

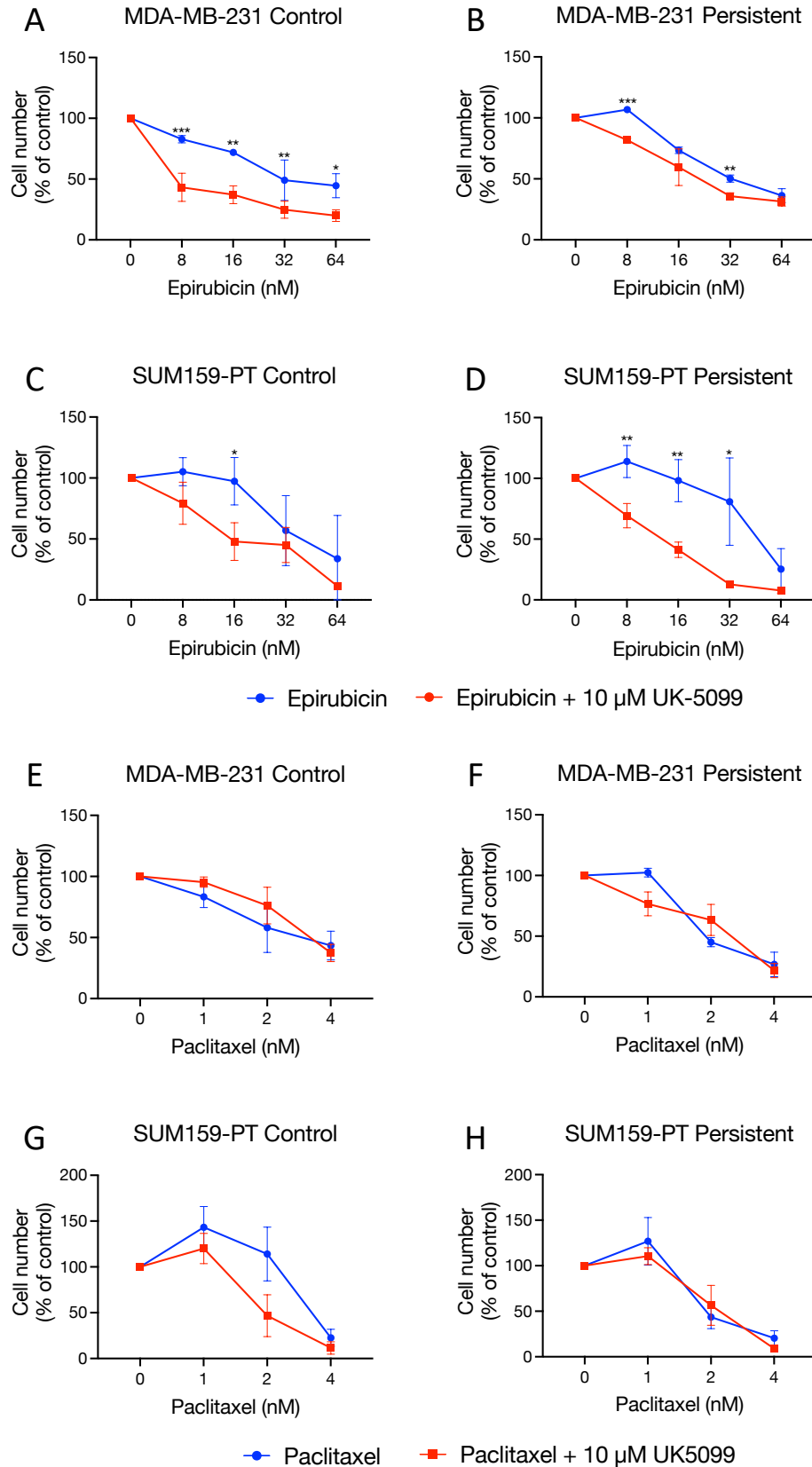


Figure 39. Effet de l'UK-5099 sur la sensibilité des cellules persistantes ou contrôles à l'épirubicine ou au paclitaxel. Les cellules MDA-MB-231 (A-B, E-F) et SUM159-PT (C-D, G-H) persistantes (B,D,F,H) ou contrôles (A,C,E,G) sont traitées durant 96 h en combinant 10 μM d'UK-5099 avec une gamme de

doses d'épirubicine (8 – 64 nM, A-D) ou de paclitaxel (1 – 4 nM, E-H). Le nombre de cellules restantes à la fin du traitement est évalué au Celigo à la suite d'un marquage au Hoestch 33342. Les courbes représentent le pourcentage de cellules restantes après le traitement combiné. Les courbes sont représentatives de 3 expériences indépendantes. Test statistique « unpaired student *t*-test » *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Ces données suggèrent que la réduction de l'OXPPOS ne permet pas d'augmenter de façon systématique la sensibilité des cellules aux drogues en mono-traitement. Nous avons ensuite vérifié si la réduction de l'OXPPOS influencerait la réponse au traitement en mimant le protocole clinique. Pour cela, les cellules MDA-MB-231 et SUM159-PT persistantes ou contrôles ont été traitées durant 48 heures avec de la tigécycline ou de l'UK-5099 combiné à de l'épirubicine et du cyclophosphamide puis avec du paclitaxel associé à la tigécycline ou de l'UK-5099 pour de nouveau 48 heures (Fig. 40). La tigécycline ne modifie pas la réponse au traitement de chimiothérapie des cellules MDA-MB-231 persistantes et contrôles ainsi que des SUM159-PT contrôles (Fig. 40A-B, vert). Une faible augmentation de la réponse au traitement est observée dans le cas des cellules SUM159-PT persistantes (Fig. 40B panel de droite vert). En revanche, l'UK-5099 augmente de façon importante la réponse au traitement mimant le protocole clinique que ce soit dans les cellules MDA-MB-231 et SUM159-PT persistantes ou contrôles (Fig. 40A-B, rose). Ce résultat montre que le métabolisme mitochondrial du pyruvate participe à réduire la sensibilité au traitement des cellules TNBC.

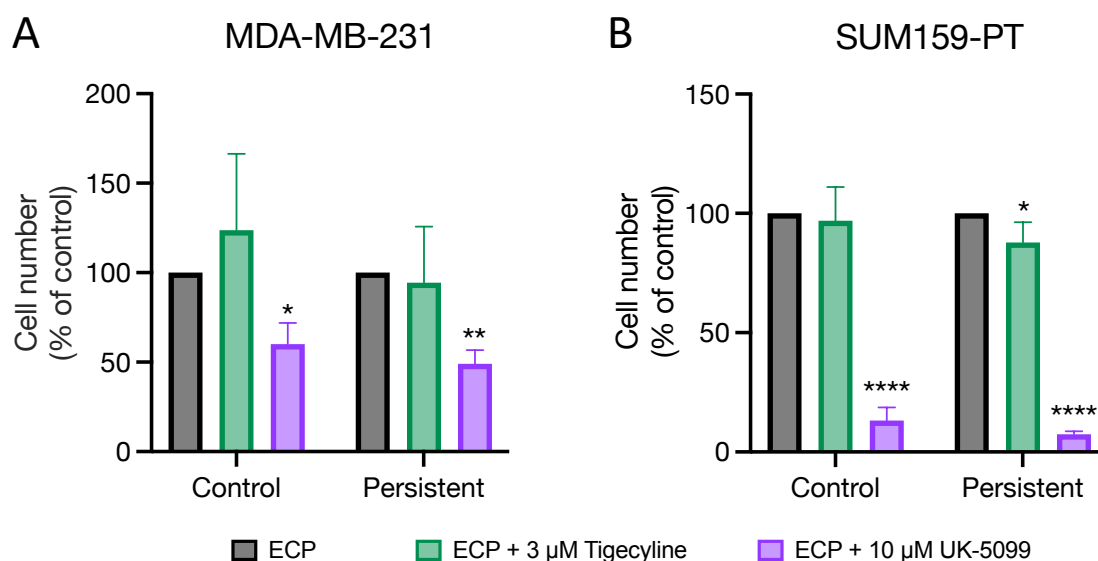


Figure 40. Effets de la tigécycline et de l'UK-5099 sur la sensibilité des cellules persistantes et contrôles au traitement combiné et séquentiel de chimiothérapie. Les cellules MDA-MB-231 (A) et SUM159-PT (B) sont co-traitées pendant 96 h avec 3 µM de tigécycline (en vert) ou 10 µM d'UK-5099 (rose) et des agents de chimiothérapie mimant le protocole clinique en combinant l'épirubicine, cyclophosphamide et du paclitaxel (ECP), comme décrit dans « matériels et méthodes ». Le nombre de cellules restantes à la fin du traitement est évalué au Celigo à la suite d'un marquage au Hoestch 33342. Les graphiques comparent le nombre de cellules (exprimé en pourcentage) restantes à la fin du traitement ECP seul au traitement ECP combiné à la tigécycline (barres vertes) ou à l'UK-5099 (barres roses). Les graphiques sont représentatifs de 3 expériences indépendantes. Test statistique « ANOVA » *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

L'ensemble de ces résultats montre que la réduction de l'OXPPOS permet de diminuer le potentiel invasif des cellules persistantes et contrôles suggérant une dépendance à l'OXPPOS dans le processus invasif. Vis-à-vis de la sensibilité aux agents de chimiothérapie, la diminution de l'OXPPOS par le ciblage du métabolisme mitochondrial du pyruvate permet de re-sensibiliser les cellules persistantes à l'épirubicine mais aussi à augmenter la réponse au traitement combiné et séquentiel de chimiothérapie que ce soit dans les cellules persistantes ou contrôles.

V. Le métabolisme énergétique et son influence dans la réponse au traitement de chimiothérapie des cellules natives MCF-7 et MDA-MB-468

La partie précédente décrit le rôle de l'OXPPOS dans la sensibilité aux agents de chimiothérapie ainsi que dans le potentiel invasif des cellules persistantes. Dans l'objectif de compléter ces données, nous avons utilisé deux lignées de cancer du sein natives de sous-types différents pour évaluer l'intérêt de cibler l'OXPPOS dans le traitement de première intention du cancer du sein.

Pour cela, nous avons utilisé la lignée MCF-7 (luminal A) et la lignée MDA-MB-468 (triple négative). Les cellules MCF-7 montrent un OXPPOS plus élevé que les cellules MDA-MB-468 en condition basale (Fig. 41B). A l'inverse, les cellules MDA-MB-468 montrent une activité glycolytique plus importante que les MCF-7 en condition basale (Fig. 41E). En condition de stress, les cellules MCF-7 et MDA-MB-468 montrent des niveaux d'OXPPOS et de glycolyse similaires (Fig. 41C,F).

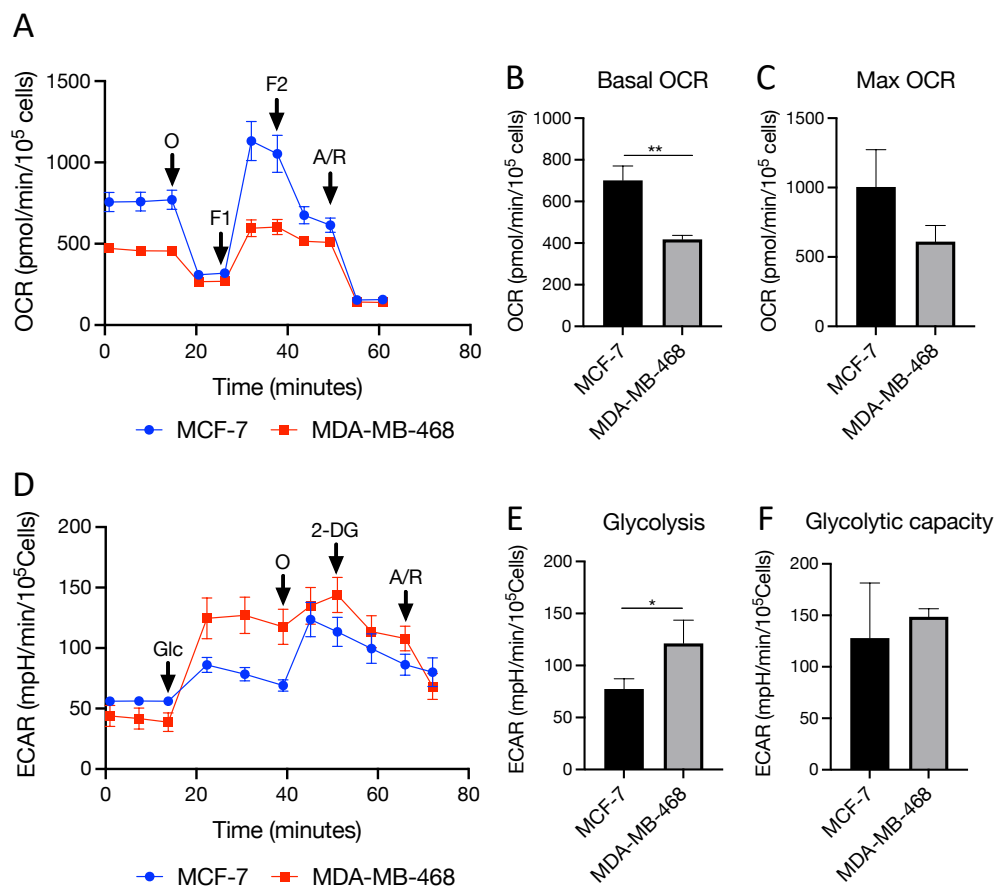


Figure 41. Caractérisation métabolique des cellules MCF-7 et MDA-MB-468. L'OXPPOS (A-C) et la glycolyse (D-F) des cellules MCF-7 et MDA-MB-468 sont évaluées à l'aide du Seahorse. Vingt-quatre heures avant l'analyse les cellules sont ensemencées dans des plaques de Seahorse XFe24. (A,D) courbes de la consommation d'oxygène (A, OCR) et de l'activité glycolytique (D, ECAR) sous l'influence des différents inhibiteurs décrits dans « matériels et méthodes ». (B-C) graphiques quantitatifs de la respiration

mitochondriale en condition basale (« Basal OCR », B) et de stress (« Max OCR », C). (E-F) graphiques quantitatifs de l'activité glycolytique en condition basale (« Glycolysis », E) ou de stress (« Glycolytic capacity », F). O : oligomycine ; F1 : première concentration de FCCP ; F2 : deuxième injection de FCCP ; A/R : antimycine/roténone ; Glc : glucose ; 2DG : 2-déoxyglucose. Les graphiques et les courbes sont représentatifs de 3 expériences indépendantes. Test statistique « unpaired student *t*-test » *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

Le diagramme énergétique présenté sur la figure 42, montre que les MCF-7 en condition basale ont un profil quiescent. Elles deviennent hautement énergétiques en condition de stress par l'augmentation de l'OXPPOS et de la glycolyse. De façon intéressante, les cellules MDA-MB-468 en condition basale et de stress conservent leur profil glycolytique. Ces observations montrent qu'il existe une grande hétérogénéité métabolique entre les différentes lignées de cancer du sein *in vitro*.

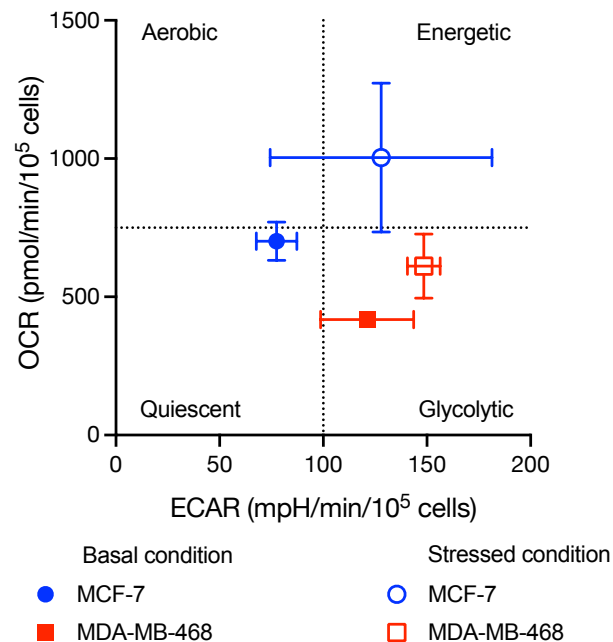


Figure 42. Organisation énergétique des cellules MCF-7 et MDA-MB-468. Graphique du ratio entre l'OCR et l'ECAR en condition basale (point plein) et de stress (point vide) des cellules MCF-7 et MDA-MB-468 persistantes ou contrôles. Chaque cadran représente un état métabolique : « Aerobic », les cellules privilégient l'OXPPOS à la glycolyse ; « Energetic », les cellules montrent une activité élevée de l'OXPPOS et de la glycolyse ; « Quiescent », les cellules montrent une activité faible de l'OXPPOS et de la glycolyse ; « Glycolytic », les cellules privilégient la glycolyse à l'OXPPOS. Le graphique est réalisé à partir des résultats obtenus pour la mesure de l'OXPPOS et de la glycolyse.

Avec les concentrations de tigécycline et d'UK-5099 utilisées pour les cellules persistantes, nous avons évalué la prolifération, le potentiel invasif et la sensibilité aux drogues de ces deux lignées. Le traitement seul avec de la tigécycline ou de l'UK-5099 durant 96 heures n'influence pas la prolifération cellulaire (Fig. 43) ni leur répartition dans le cycle cellulaire (données non montrées).

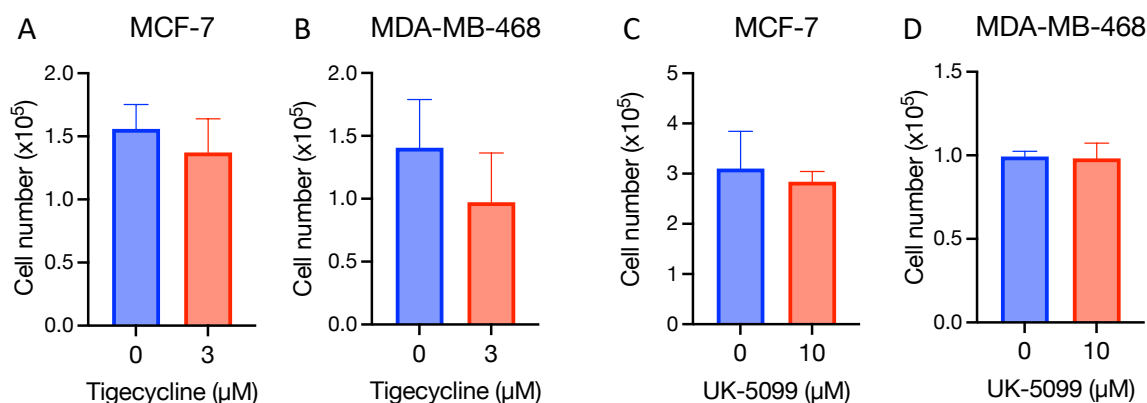


Figure 43. Effets de la tigécycline et de l'UK-5099 sur la prolifération des cellules MCF-7 et MDA-MB-468. Les cellules sont traitées avec de la tigécycline (3 μM) et de l'UK-5099 (10 μM) durant 96 h. Le nombre de cellules MCF-7 (A,C) et MDA-MB-468 (B,D) restant à la fin du traitement est évalué par comptage à la lame de malassez. Les graphiques sont représentatifs de 3 expériences indépendantes. Test statistique « unpaired student t-test ».

La capacité invasive des cellules MCF-7 est diminuée à la suite du traitement avec de la tigécycline mais pas avec de l'UK-5099 (Fig. 44A,C). Le traitement des cellules MDA-MB-468 avec de la tigécycline ou de l'UK-5099 réduit leur potentiel invasif (Fig. 44B,D). Ce résultat confirme les observations précédentes sur les cellules persistantes et montre un lien entre l'OXPPOS et l'invasion cellulaire.

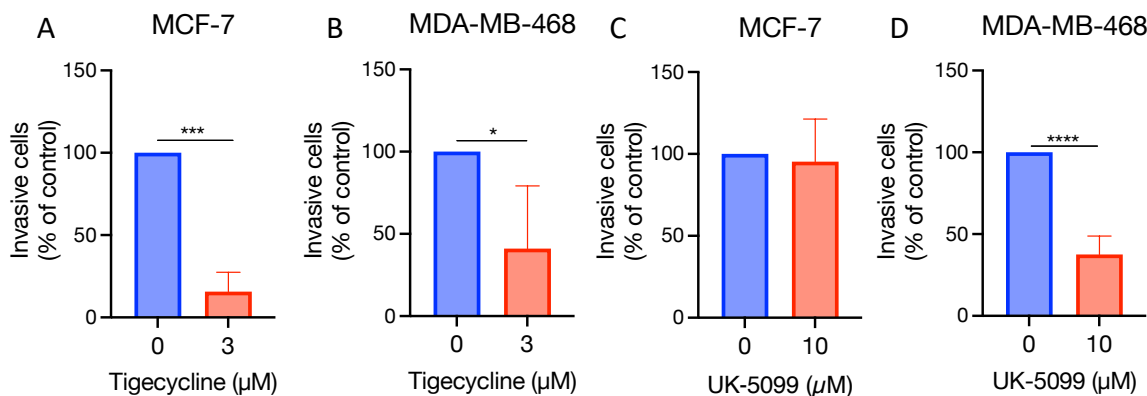


Figure 44. Effets de la tigécycline et de l'UK-5099 sur le potentiel invasif des cellules MCF-7 et MDA-MB-468. Les cellules MCF-7 (A,C) et MDA-MB-468 (B,D) sont traitées durant 96 h avec 3 μM de tigécycline (A-B) ou 10 μM d'UK-5099 (C-D) avant d'être ensemencées dans un système de transwell pré-traité avec du Matrigel®. Les cellules sont ensemencées dans la partie supérieure du transwell pour 24 h. Les cellules ayant traversé la couche de Matrigel® sont marquées au Hoestch 33342 pour être dénombrées au microscope à fluorescence (Nikon, 10x). Les graphiques quantitatifs sont issus de 3 expériences indépendantes. Test statistique « unpaired student t-test », *, $p < 0,05$, ***, $p < 0,001$, ****, $p < 0,01$.

La sensibilité aux drogues de chimiothérapie (épirubicine et paclitaxel) est évaluée tout d'abord de façon individuelle (Fig. 45). Les cellules MCF-7 et MDA-MB-468 montrent une sensibilité similaire à l'épirubicine (Fig. 45A). La lignée MCF-7 semble plus sensible au paclitaxel comparé à la lignée MDA-MB-468 (Fig. 45B).

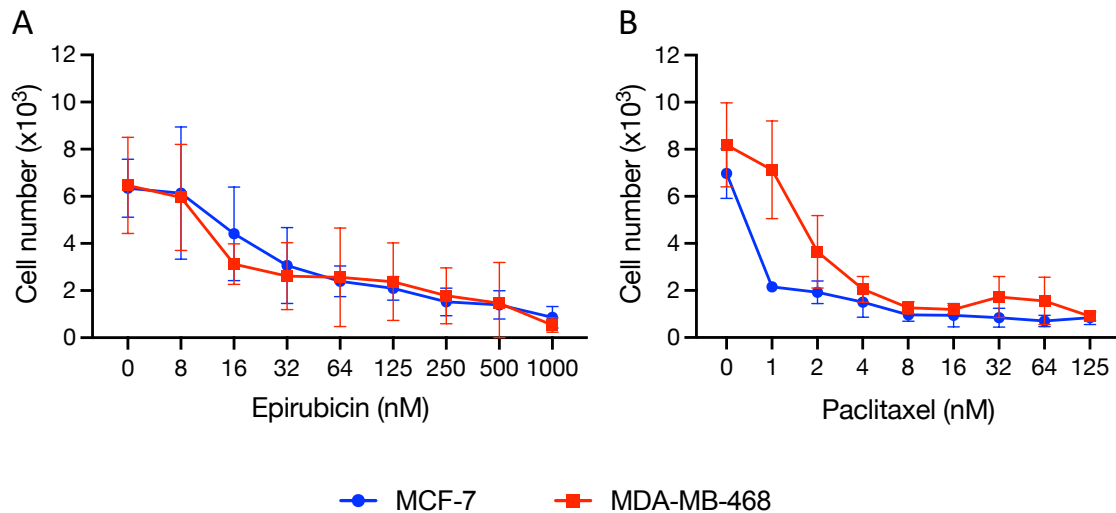


Figure 45. Mesure de la sensibilité aux agents de chimiothérapie des cellules MCF-7 et MDA-MB-468. Les cellules MCF-7 (en bleu) et MDA-MB-468 (en rouge) sont traitées durant 96 h avec une gamme de concentration d'épirubicine (8 – 1000 nM) ou de paclitaxel (1 – 125 nM). Le nombre de cellules restantes à la fin du traitement est évalué au Celigo à la suite d'un marquage au Hoestch 33342. Les courbes sont représentatives de 3 expériences indépendantes. Test statistique « unpaired student t-test ».

Ensuite, nous avons analysé si, comme avec les cellules persistantes, l'ajout des inhibiteurs de l'OXPPOS aux drogues de chimiothérapie classique augmente la réponse au traitement sur les cellules natives (Fig. 46). La tigécycline augmente la sensibilité des cellules MCF-7 et MDA-MB-468 à l'épirubicine mais pas au paclitaxel (Fig. 46A-D). Le traitement combinant l'UK-5099 avec de l'épirubicine ou du paclitaxel ne change pas significativement la réponse de ces cellules au traitement avec les drogues seules (Fig. 46E-H).

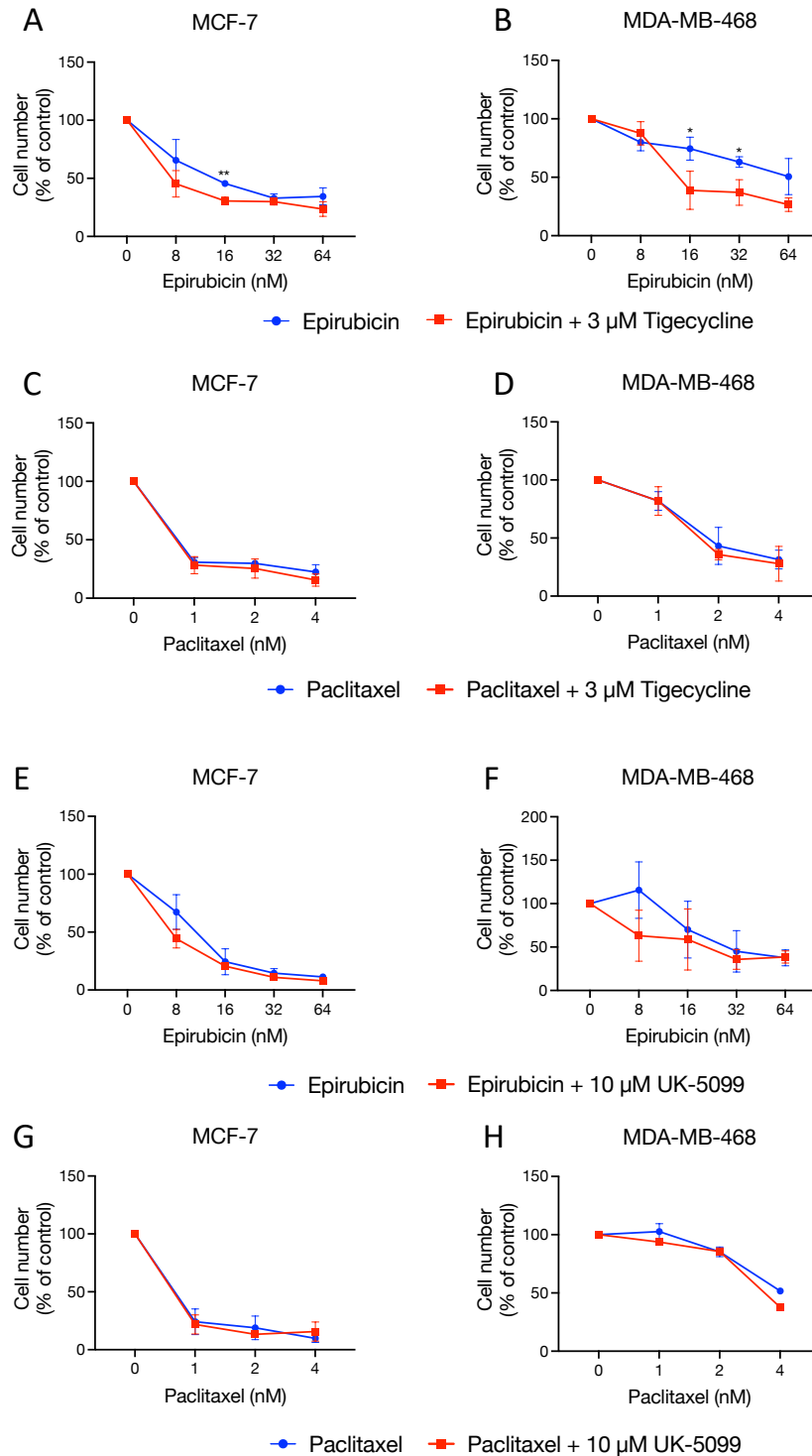


Figure 46. Effets de la tigécycline et de l'UK-5099 sur la sensibilité des cellules MCF-7 et MDA-MB-468 à l'épirubicine et au paclitaxel. (A-D) effet de la tigécycline ou de l'UK-5099 (E-H) sur la sensibilité aux agents de chimiothérapie épirubicine et paclitaxel. Pour cela, les cellules MCF-7 (A,C,E,G) et MDA-MB-468 (B,D,F,H) sont traitées durant 96 h en combinant 3 μM de tigécycline ou 10 μM d'UK-5099 avec une gamme de doses d'épirubicine (8 – 64 nM, A-B, E-F) ou de paclitaxel (1 – 4 nM, C-D, G-H). Le nombre de cellules restantes à la fin du traitement est évalué au Celigo à la suite d'un marquage au Hoestch 33342. Les courbes représentent le pourcentage de cellules restantes après le traitement combiné. Les courbes sont représentatives de 3 expériences indépendantes. Test statistique « unpaired student t-test » *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Comme précédemment avec les cellules persistantes et contrôles, nous avons évalué l'effet d'un traitement séquentiel combinant des anthracyclines (épirubicine et cyclophosphamide) à un taxane (paclitaxel) (ECP). A ce traitement, il est rajouté les inhibiteurs de l'OXPPOS, la tigécycline ou l'UK-5099 (Fig. 47). Tout comme les cellules persistantes, l'ajout de la tigécycline au traitement ECP n'a aucun effet sur la croissance cellulaire, l'ajout de l'UK-5099 permet d'améliorer la réponse des MDA-MB-468 au traitement ECP, mais pas de celle des cellules MCF-7 (Fig. 47). L'ensemble de ces résultats montrent que le ciblage de l'OXPPOS avec de la tigécycline ou de l'UK-5099 permet de diminuer le potentiel invasif des cellules de cancer du sein. La combinaison de l'UK-5099 avec les trois agents de chimiothérapie augmente la réponse des cellules MDA-MB-468 au traitement.

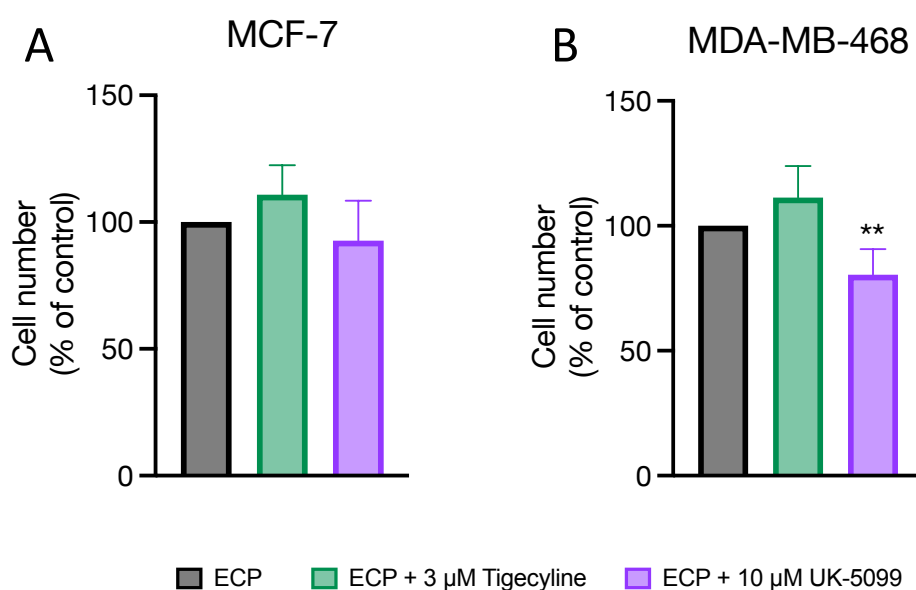


Figure 47. Effets de la tigécycline et de l'UK-5099 sur la sensibilité des cellules MCF-7 et MDA-MB-468 au traitement combiné et séquentiel de chimiothérapie. Les cellules MCF-7 (A) et MDA-MB-468 (B) sont co-traitées avec 3 µM de tigécycline (en vert) ou 10 µM d'UK-5099 (rose) ainsi que tout d'abord de l'épirubicine et du cyclophosphamide (pour les MCF-7 : 12 – 60 nM ; pour les MDA-MB-468 : 28 – 140 nM) durant 48 h puis avec du paclitaxel (pour les MCF-7 : 0,5 nM ; pour les MDA-MB-468 : 4 nM) pour de nouveau 48 h (ECP). Le nombre de cellules restantes à la fin du traitement est évalué au Celigo à la suite d'un marquage au Hoestch 33342. Les graphiques comparent le nombre de cellules (en pourcentage) restantes à la fin du traitement ECP seul au traitement ECP combiné à la tigécycline ou à l'UK-5099 en pourcentage. Les graphiques sont représentatifs de 3 expériences indépendantes. Test statistique « ANOVA » **, $p < 0,01$.

L'ensemble de ces résultats montre que l'OXPPOS participe au processus invasif des cellules de cancer du sein que ce soient les cellules persistantes ou les cellules natives. Concernant la sensibilité aux agents de chimiothérapie, l'inhibition du métabolisme mitochondrial du pyruvate permet d'augmenter la sensibilité à l'épirubicine ainsi que la réponse au traitement mimant celui réalisé en clinique (ECP) dans les cellules persistantes et natives de sous-type triple négatives.

Discussion et perspectives

Malgré de nombreuses avancées dans l'amélioration thérapeutique du cancer du sein, la réponse au traitement dans le TNBC reste insatisfaisante avec un risque élevé de métastase. La génération de thérapies ciblées applicables au TNBC permet d'améliorer la réponse au traitement pour un nombre restreint de patientes exprimant certains marqueurs (ex. PDL1 pour les immunothérapies) (Tomao M. *et al*, 2015 ; Manjunath M. and Choudhary B., 2021). Cependant, toutes ne répondront pas au traitement avec la présence d'une tumeur résiduelle pouvant participer à la rechute et à la formation de métastase moins de 5 ans après le traitement (Fitzpatrick A. and Tutt A., 2019).

Dans le cas du TNBC l'importante hétérogénéité tumorale, due à la plasticité cellulaire, pourrait être à l'origine de la persistance au traitement. Des recherches récentes ont permis de mettre en évidence l'existence d'un caractère hybride, aussi bien phénotypique que métabolique, et de son lien avec l'agressivité tumorale et l'échappement thérapeutique (Qin S. *et al*, 2020). Ce lien donne de nouvelles pistes pour améliorer la prise en charge thérapeutique des patientes TNBC.

Afin d'évaluer l'impact de la plasticité cellulaire chimio-induite dans l'agressivité tumorale et l'échappement thérapeutique, nous avons généré deux modèles de la persistance au traitement de chimiothérapie à partir de deux lignées TNBC (MDA-MB-231 et SUM159-PT). L'obtention de ces 2 types de lignées persistantes se fait en mimant le protocole clinique consistant en l'administration combinée et séquentielle de 2 types d'agents cytotoxiques (anthracyclines et taxane). Ainsi, mes travaux de thèse ont permis de démontrer que les cellules persistantes au traitement se caractérisent au niveau phénotypique par une augmentation du potentiel invasif *in vitro* et *in vivo* ainsi qu'une croissance accrue en condition de stress (ex. faible densité cellulaire, absence de sérum). Plus précisément, nous avons montré qu'à la suite d'une exposition courte aux drogues l'expression de la vimentine est augmentée. Ceci participe à l'agressivité tumorale et à la réponse au traitement de chimiothérapie. L'exposition chronique et prolongée aux agents cytotoxiques induit un changement de profil métabolique avec l'augmentation de l'OXPPOS associée à la diminution de la sensibilité aux drogues dans la lignée MDA-MB-231. L'étude de l'inhibition de l'OXPPOS montre son lien avec la réponse au traitement et l'invasion cellulaire dans le cancer du sein. L'analyse du protéome montre des changements moléculaires associés avec l'agressivité tumorale. Elle met en avant entre autres l'augmentation de TSTA3 qui pourrait être en lien avec la rechute locale ou à distance dans le TNBC.

Dans cette partie, nous discuterons tout d'abord du rôle de la vimentine dans l'agressivité tumorale. Nous examinerons aussi le rôle de l'OXPPOS dans la persistance au traitement dans le cancer du sein et plus particulièrement le TNBC. Ensuite, nous analyserons les modifications protéiques induites par le traitement de long terme ainsi que le lien entre certaines cibles et le pronostic clinique dans le TNBC. En dernier lieu, nous discuterons de

l'apport des 2 modèles de persistance dans la compréhension des mécanismes d'échappement thérapeutique.

A. Le rôle de la vimentine dans l'agressivité tumorale

Pour étudier la plasticité cellulaire due au traitement de chimiothérapie, nous avons commencé par traiter les cellules TNBC MDA-MB-231 et SUM159-PT de la même façon qu'en clinique. Pour cela, il est administré deux types d'agents cytotoxiques (anthracyclines et taxane) de façon séquentielle durant 96 heures. Afin d'étudier la persistance au traitement, la caractérisation des cellules restantes est effectuée 96 heures après la fin du traitement. Cette étude met en évidence dans les cellules persistantes l'augmentation de l'invasion *in vitro* et *in vivo* ainsi que la capacité de formation de sphères. Au niveau moléculaire, cela est associé à l'élévation de l'expression de la vimentine, de CD49f et de NANOG des marqueurs respectivement de la TEM et du caractère souche.

Cependant, les cellules persistantes montrent une prolifération ralentie juste après le traitement. A l'inverse, au sein d'une matrice comme le Matrigel®, leur potentiel prolifératif augmente. Ce résultat montre la pertinence d'étudier le comportement cellulaire au sein d'un microenvironnement mimant les conditions *in vivo* (Habanjar O. *et al*, 2021). De plus, il appuie le fait que les cellules persistantes acquièrent un caractère invasif avec la formation de colonies dispersées au sein de la matrice.

L'augmentation de la proportion de cellules au caractère souche est possible dans notre population de cellules persistantes. En effet, nous observons une élévation de la capacité de formation de sphères ainsi que l'expression de deux marqueurs des CSC NANOG et CD49f. D'autres études montrent qu'à la suite d'une première exposition à un seul agent cytotoxique la proportion de CSC est augmentée (Jia D. *et al*, 2017 ; Liu P. *et al*, 2013). Plus particulièrement, elles montrent que l'expression de NANOG est élevée à la suite d'un traitement avec du paclitaxel ou de la doxorubicine dans les MDA-MB-231 (Jia D. *et al*, 2017). Il en est de même dans des cellules rendues résistantes au paclitaxel par exposition chronique à des doses croissantes (Liu P. *et al*, 2013). De façon intéressante, il est observé que l'activation de la signalisation Wnt1 associée à l'expression de NANOG dans la glande mammaire murine mène à la formation de tumeur et à l'apparition de métastases (Lu X. *et al*, 2014). Dans le cancer du sein, NANOG est associé à un mauvais pronostic de survie clinique (Nagata T. *et al*, 2014). Ainsi, l'ensemble de nos résultats associés à ceux des précédentes études décrivent un second rôle de NANOG dans la progression tumorale et la résistance aux agents de chimiothérapie.

L'expression de CD49f est associée au caractère souche dans de nombreux types de cancers solides (Zhao W. *et al*, 2017). Dans le cancer du sein, il est relié à un mauvais pronostic clinique (Ye F. *et al*, 2015). Nos cellules MDA-MB-231 persistantes, dont le potentiel invasif et le caractère souche sont augmentés, montrent une augmentation de la proportion de cellules

CD49f positives. Une étude menée par Gomez-Miragaya et collaborateurs a démontré dans un modèle de PDX que la sous-population de cellules cancéreuses mammaires CD49f positives pouvait être initiatrice de tumeurs (Gomez-Miragaya J. *et al*, 2017). Dans le TNBC, la proportion de cellules CD49f positives s'accroît dans la tumeur primaire au cours du traitement de chimiothérapie. Une autre étude montre que son inhibition dans des cellules isolées de tumeur mammaire murine *brca1* mutée réduit leur potentiel invasif. Cela suppose un rôle de CD49f dans le processus invasif (Brooks *et al*, 2016). L'ensemble de ces données ajouté à nos résultats suggère que CD49f pourrait être un marqueur de l'agressivité tumorale dans le cancer du sein.

L'un des points les plus intéressants de cette étude est l'augmentation de l'expression de la vimentine dans les deux lignées cellulaires persistantes. Comme il a été décrit dans l'introduction, la vimentine est un marqueur canonique ainsi qu'un régulateur clé de la TEM dans différents types de cancers, dont le cancer du sein (Danielsson F. *et al*, 2018). Il est connu que de nombreux facteurs et voies de signalisation sont communs au phénotype souche et au processus de TEM. Comme il a été décrit par Peuhu et collaborateur, la vimentine joue un rôle dans le caractère souche *in vivo* et *in vitro* (Peuhu E. *et al*, 2017). En effet, les souris pour lesquelles l'expression de la vimentine est inhibée montrent un retard de croissance de la glande mammaire ainsi qu'une diminution du nombre de cellules basales comparées aux cellules luminales dans l'épithélium mammaire. *In vitro* ces cellules inhibées pour la vimentine montrent une diminution de la capacité de formation de sphères comparées aux cellules natives. Conformément à cette étude, l'inhibition de la vimentine dans nos cellules persistantes diminue leur potentiel de formation de sphère alors que sa surexpression dans des cellules natives augmente cette capacité. La vimentine pourrait être un facteur commun aux caractères souches et invasifs dans le TNBC. D'autres études font part du rôle de la vimentine dans la régulation de la dynamique d'assemblage du réseau d'actine (Leduc C. *et al*, 2017 ; Mendez M. *et al*, 2010) ainsi que de son rôle central dans la TEM induite par Ras, SLUG et le TGF- β dans le cancer du sein (Virtakoivu R. *et al*, 2015 ; Vuoriluoto K. *et al*, 2011). Virtakoivu et collaborateurs montrent que dans les cellules invasives TNBC, SLUG et la vimentine sont exprimés de façon concomitante suite à l'activation de la signalisation ERK (Virtakoivu R. *et al*, 2015). Le maintien de l'activation de ERK dépend de la présence de la vimentine dans ces cellules et permet la phosphorylation de SLUG ainsi que l'invasion cellulaire. L'ensemble de ces données suggère un lien entre le niveau d'expression de la vimentine et le potentiel invasif dans le TNBC.

Dans nos cellules persistantes, l'augmentation de l'expression de la vimentine est associée avec l'activation d'Akt dans les cellules persistantes. De façon intéressante, son inhibition dans les cellules persistantes diminue la phosphorylation d'Akt sur la sérine 473 alors que sa surexpression l'augmente. Ainsi, la vimentine pourrait être un régulateur de l'activation d'Akt. Dans le sarcome l'activation d'Akt induit une augmentation de la phosphorylation de la vimentine (Zhu Q. *et al*, 2011). Ceci s'oppose à sa dégradation par les caspases augmentant la survie et la migration cellulaire. Dans le cancer du sein, l'interaction entre la vimentine et MAP2K4 (*mitogen activated protein kinase kinase 2*) active la signalisation Akt menant à

l'augmentation de la prolifération et de l'invasion cellulaire (Liu S *et al*, 2019). Ces données, associées à nos résultats, décrivent un lien fonctionnel entre Akt et la vimentine dans les processus de prolifération et d'invasion.

L'élévation de l'expression de la vimentine est associée avec un risque de rechute et une survie clinique courte dans le TNBC (Yamashita N. *et al*, 2013). Récemment, Masuda et collaborateurs ont montré que les patientes TNBC ne répondant pas au traitement de chimiothérapie néo-adjuvant changent de sous-type tumoral en passant d'un profil moléculaire de tumeur « basal-like » vers « mesenchymal » (Masuda H. *et al*, 2022). De façon intéressante, aucune tumeur premièrement diagnostiquée comme « mesenchymal » n'acquiert un profil « basal-like ». Cela s'accompagne de l'augmentation de l'expression de la vimentine caractéristique de la signature moléculaire de la TEM. Dans notre étude, nous avons montré que le niveau d'expression de la vimentine influence la réponse au traitement avec des drogues de chimiothérapie. Cela décrit la vimentine comme un potentiel marqueur de la réponse au traitement dans le TNBC. Actuellement, aucune corrélation directe en clinique n'a été faite entre la réponse au traitement de chimiothérapie et le niveau d'expression de la vimentine dans le TNBC (Budianto M. *et al*, 2018). Cependant, la réponse au traitement utilisant la simvastatin, un inhibiteur de la synthèse du cholestérol, dépend de l'expression de la vimentine (Strouhalova K. *et al*, 2020). Son utilisation sur les cellules MDA-MB-231 augmente l'entrée en apoptose des cellules de façon dépendante à l'expression de la vimentine. De même, la withaferin A (composé chimique dérivant de l'acnistus arborescens) nécessite l'expression de la vimentine pour inhiber la croissance et la néo-vascularisation *in vivo* (Strouhalova K. *et al*, 2020). La détermination du niveau d'expression de la vimentine permettrait d'affiner la stratégie thérapeutique employée dans le cancer du sein.

En conclusion, notre travail en accord avec les données de la littérature, indique un rôle de la vimentine dans l'agressivité tumorale et l'échappement thérapeutique du TNBC. Cette étude demande à être complétée pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires en lien avec la sous-population de cellules surexprimant la vimentine et la sensibilité aux agents de chimiothérapie ainsi que la récurrence. De plus, il serait intéressant d'évaluer le rôle de l'axe CD49f/NANOG/vimentine dans la prédiction de la réponse au traitement de chimiothérapie et/ou de thérapies ciblées dans le TNBC.

B. L'implication de l'OXPHOS dans l'invasion cellulaire et la réponse au traitement de chimiothérapie

Notre première approche de la persistance au traitement nous a permis d'évaluer les effets d'une première exposition aux drogues sur la plasticité cellulaire. Le second modèle de persistance à long terme, nous permet d'apprécier les conséquences d'une exposition répétée à la même dose de drogues en mimant le protocole clinique.

Les cellules persistantes à ce traitement montrent une prolifération accrue en condition de stress et un haut potentiel métastatique *in vitro* et *in vivo*. De précédentes études montrent que le traitement de chimiothérapie a des effets pro-tumorigènes en favorisant la prolifération et l'invasion cellulaires (Naik A. *et al*, 2018 ; Middleton J. *et al*, 2018). Ainsi, l'échappement thérapeutique ne passe pas uniquement par des modifications moléculaires, mais aussi par des changements phénotypiques favorisés par la plasticité cellulaire (Qin S. *et al*, 2020). Elle permet la sélection durant le traitement de sous-populations cellulaires, mais aussi l'induction de changement génétique et épigénétique favorisant la survie. La sous-population de CSC est décrite comme le caractère le plus augmenté à la suite du traitement (d'Alterio C. *et al*, 2020). De façon intéressante, les cellules MDA-MB-231 persistantes montrent une plus faible capacité de formation de sphères comparée aux cellules SUM159-PT persistantes. D'autres données expérimentales ont montré qu'après un traitement répété avec des drogues le potentiel de formation de sphères n'est pas modifié (Naik A. *et al*, 2018 ; Echeverria G. *et al*, 2019). De même, Almendro et collaborateurs montrent qu'à la suite du traitement de chimiothérapie il n'y a pas particulièrement d'enrichissement en cellules CD44⁺/CD24⁻ dans la tumeur primaire mammaire (Almendro V. *et al*, 2014). Plus particulièrement dans les tumeurs TNBC, cette sous-population aura tendance à diminuer après le traitement. Le marquage CD44⁺/CD24⁻ identifie des cellules souches proliférantes qui peuvent alors être éliminées par chimiothérapie. Dans cette étude, les cellules résiduelles TNBC montrent une augmentation du marquage CD44⁺/CD24⁺ marqueurs de cellules moins proliférantes. Il est alors possible que le traitement de chimiothérapie induise un enrichissement en CSC quiescente limitant leur identification par des tests fonctionnels *in vitro* tels que la capacité de formation de sphères. Il serait alors intéressant de compléter la caractérisation phénotypique des cellules persistantes par une recherche des marqueurs de surface du caractère souche afin d'évaluer la proportion de cette sous-population au sein de nos cellules persistantes.

Deux autres points différencient les cellules MDA-MB-231 et SUM159-PT persistantes, le premier concerne la sensibilité aux agents de chimiothérapie. Les cellules MDA-MB-231 persistantes montrent une sensibilité diminuée alors que celle des cellules SUM159-PT persistantes est conservée. D'un point de vue clinique, il est décrit que des patients en situation de rechute et traités de nouveau avec le même traitement de chimiothérapie montrent de nouveau une réponse au traitement (Palmieri C. *et al*, 2010). Le second point

différenciant les cellules MDA-MB-231 persistantes des cellules SUM159-PT persistantes est le métabolisme énergétique. Les cellules MDA-MB-231 persistantes montrent une augmentation de leur capacité à utiliser l'OXPHOS comparée aux cellules contrôles. Les cellules SUM159-PT persistantes et contrôles montrent un profil énergétique similaire entre elles. Ainsi, les cellules SUM159-PT persistantes conservent leur sensibilité au traitement et leur métabolisme énergétique. A l'inverse, les MDA-MB-231 persistantes montrent une diminution de la sensibilité aux drogues associée à une augmentation de l'OXPHOS. Une étude sur les cellules résiduelles issues de PDX traitées par chimiothérapie montre un niveau d'OXPHOS augmenté (Echeverria G. *et al*, 2019). De même, une analyse transcriptomique sur des tumeurs de patientes n'ayant pas répondu au traitement de chimiothérapie montre une augmentation des transcrits de gènes en lien avec le fonctionnement de l'OXPHOS (Evans K. *et al*, 2021). Ces données de la littérature associées à nos résultats nous font supposer que l'OXPHOS joue un rôle dans la réponse au traitement de chimiothérapie.

Dans notre étude nous avons fait le choix d'utiliser la tigécycline (un inhibiteur direct de l'OXPHOS) pour comprendre le rôle de l'OXPHOS dans la sensibilité aux drogues. Cet inhibiteur est un antibiotique, son action sur l'OXPHOS passe par l'inhibition de la sous-unité 30S du ribosome mitochondrial empêchant la traduction des protéines mitochondriales (Dong Z. *et al*, 2019). Ainsi, elle induit la diminution de l'activité des complexes I et IV de la chaîne respiratoire menant à réduire l'OXPHOS, la formation d'ATP et le potentiel de membrane mitochondriale (Tan J. *et al*, 2017). La tigécycline montre aussi un effet anticancéreux avec la diminution de la prolifération cellulaire et de l'invasion dans les cancers du poumon, de l'ovaire et du foie (Dong Z. *et al*, 2019). De plus, elle montre un effet synergique avec le cisplatine et le paclitaxel dans les cancers de l'ovaire et du rein (Dong Z. *et al*, 2019). Peu d'études s'intéressent au rôle de la tigécycline dans le cancer du sein. Jones et collaborateurs ont montré qu'elle a un effet antiprolifératif sur les cellules TNBC déficientes en RB1 (Jones R. *et al*, 2016). Une autre étude montre que le traitement avec de la tigécycline diminue le potentiel de formation de sphères *in vitro* dans différents types de cancers, dont le cancer du sein (Dong Z. *et al*, 2019). Plus récemment, Huang et collaborateurs ont montré que la combinaison de tigécycline avec du pyrvinium pamoate, un antiparasitaire, a un effet antiprolifératif et pro-apoptotique dans le cancer du sein *in vitro* (Huang S. *et al*, 2022).

Dans l'objectif d'étudier plus finement l'effet de l'OXPHOS dans la réponse au traitement de chimiothérapie à l'aide de la tigécycline nous avons utilisé une concentration permettant de réduire l'OXPHOS sans influencer sur la croissance cellulaire. Cette stratégie diffère des autres études qui utilisent majoritairement des doses agissant sur la croissance (la dose IC50). Avec cette stratégie, la diminution seule de l'OXPHOS dans les cellules MDA-MB-231 persistantes permet d'augmenter la sensibilité à l'épirubicine mais pas au paclitaxel. Pour les cellules SUM159-PT persistantes, l'ajout de tigécycline ne montre pas d'effet significatif sur la réponse aux drogues de chimiothérapie utilisées ici. Sur les cellules natives MCF-7 et MDA-

MB-468 ainsi que les cellules SUM159-PT contrôles, l'ajout de tigécycline augmente la réponse au traitement avec de l'épirubicine mais pas au paclitaxel.

D'autres études montrent que l'inhibition de la mitochondrie permet d'augmenter la sensibilité aux drogues (Dong Z. *et al*, 2019). Notamment, l'utilisation d'un autre inhibiteur direct de l'OXPPOS la metformine (antidiabétique utilisé dans le traitement du diabète de type 2) qui cible l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire (Samuel S. *et al*, 2020). Son utilisation dans un modèle de cellules MCF-7 rendues résistantes au tamoxifène ou à la rapamycine, permet de restaurer la sensibilité à ces agents par l'inactivation de mTOR (Sorokin D. *et al*, 2020). Dans le TNBC, le traitement avec de la metformine augmente la réponse au cisplatine en ciblant RAD51 (Lee J. *et al*, 2019). Néanmoins, les auteurs de ces différentes études font part d'un effet anticancéreux de la metformine non pas par la diminution de l'OXPPOS mais par l'activation/inhibition de voies de signalisation spécifique (Samuel S. *et al*, 2020). **Ainsi, pour la première fois, ce travail montre un lien direct entre le niveau d'OXPPOS et la réponse au traitement de chimiothérapie dans les cellules de cancer du sein.**

Le TNBC est décrit dans de nombreuses études comme étant dépendant au métabolisme de la glutamine pour la survie cellulaire (Delgir S. *et al*, 2021). Cependant, nos analyses fonctionnelles et métabolomiques montrent une dépendance pour le métabolisme du pyruvate dans le maintien de l'OXPPOS des cellules MDA-MB-231 persistantes. Cela suppose que le traitement induit une addiction au métabolisme du pyruvate pour la survie cellulaire. De plus, ces cellules persistantes étant moins sensibles aux agents de chimiothérapie, nous avons voulu savoir si en diminuant l'OXPPOS uniquement en bloquant le métabolisme mitochondrial du pyruvate cela augmenterait la sensibilité aux drogues.

Pour cela, les cellules sont traitées avec de l'UK-5099 un inhibiteur du transport du pyruvate par son action sur les MPC (Halestrap A. 1976). L'ajout d'UK-5099 augmente la sensibilité à l'épirubicine pour les deux lignées de cellules persistantes. Une précédente étude menée dans le cancer du sein montre un effet synergique entre l'inhibition de la glycolyse par le 2DG (2-déoxy-D-glucose, un analogue non métabolisable du glucose) et le traitement avec des anthracyclines (Zhang F. et Atf R., 2009). Nos résultats complètent ces données en montrant que l'inhibition seul du métabolisme du pyruvate suffit à augmenter la sensibilité à l'épirubicine *in vitro*.

De façon surprenante, le traitement avec de l'UK-5099 dans les cancers de l'ovaire et de la prostate montre à l'inverse un effet pro-tumoral avec la diminution de la sensibilité au docetaxel un agent cytotoxique de la famille des taxanes (Li X. *et al*, 2017 ; Bader D. *et al*, 2019). Dans notre étude, nous n'avons pas observé d'effet synergique du traitement avec du paclitaxel et un inhibiteur de l'OXPPOS, que ce soit la tigécycline ou l'UK-5099. Il est alors possible que la diminution de l'OXPPOS ne suffise à augmenter la réponse au taxane.

De façon intéressante, l'UK-5099 augmente la réponse à notre traitement de court terme mimant le protocole clinique dans les cellules persistantes et les cellules contrôles des deux lignées ainsi que dans la lignée triple négative MDA-MB-468. De précédentes études montrent dans le cancer du sein que l'inhibition du pyruvate avec de l'UK-5099 induit une

diminution de l'OXPHOS, de la proportion de CSC et de la prolifération cellulaire (Corbet C. *et al*, 2018 ; Jung K. *et al*, 2019). Dans le cancer de la thyroïde, le métabolisme mitochondrial du pyruvate est nécessaire pour la survie et l'invasion/migration des cellules cancéreuses (Strickaert A. *et al*, 2019). **Ainsi, notre étude complète les connaissances actuelles sur la fonction de l'OXPHOS dans l'échappement thérapeutique où le métabolisme mitochondrial du pyruvate semble y jouer un rôle important.**

Lorsque le traitement de court terme est combiné à la tigécycline, il ne montre pas d'effet supplémentaire sur la réponse au traitement de chimiothérapie pour les cellules MDA-MB-231 persistantes ainsi que les cellules contrôles, MCF-7 et les MDA-MB-468. L'augmentation de la réponse observée sur les cellules SUM159-PT persistantes, reste faible. Il est possible que l'action de la tigécycline portant sur la traduction des protéines mitochondriale et non directement sur l'OXPHOS ne soit pas suffisante pour augmenter la réponse au traitement clinique *in vitro*. Cela suggère que pour augmenter la sensibilité au traitement, il y a la nécessité de cibler l'OXPHOS de façon fonctionnelle c'est-à-dire en bloquant le métabolisme des substrats du cycle de Krebs et/ou par le ciblage de la chaîne respiratoire mitochondriale. Une étude récente montre que la combinaison d'inhibiteur du métabolisme tel que la metformine augmente la sensibilité *in vitro* des cellules TNBC aux agents de chimiothérapie classique comme le paclitaxel et l'épirubicine (Lopez-Camacho E. *et al*, 2022). Dans la littérature, l'IACS-010759, un autre inhibiteur spécifique du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (Vangapandu H. *et al*, 2018), montre aussi de bons résultats dans des études pré-cliniques sur les cancers solides ainsi que la leucémie myéloïde aigüe. Son effet est particulièrement efficace dans les cellules avec un profil OXPHOS élevé (Molina J. *et al*, 2018). Le traitement de PDX TNBC en combinant des anthracyclines avec de l'IACS-010759, montre un ralentissement de la croissance tumorale (Echeverria G. *et al*, 2019). Une autre étude dans le cancer du sein, montre que son utilisation stabilise la croissance de PDX issus de patientes TNBC lorsqu'il est combiné au palbociclib (inhibiteur des CDK4/6) ou avec du carbozantinib (un inhibiteur de kinase) (Evans K. *et al*, 2021). Des études cliniques de phase I font état de son utilisation dans différents types de cancers, dont le cancer du sein de haut grade (NCT03291938). Ainsi, il serait intéressant de compléter cette étude en évaluant les effets de l'IACS-010759 sur la sensibilité aux drogues conventionnelles de chimiothérapie de nos cellules persistantes.

De façon intéressante, nos résultats montrent que la diminution de l'OXPHOS diminue aussi le potentiel invasif que les cellules aient été exposées aux drogues de chimiothérapie au préalable ou non. Une précédente étude menée par Porporato et collaborateurs montre que les cellules hautement invasives présentent une élévation de l'OXPHOS (Porporato P. *et al*, 2014). D'autres études montrent que le traitement avec de la metformine diminue les capacités invasives et migratoires des cellules de différents types de cancers, dont le cancer du sein (Chen Y. *et al*, 2020 ; Yenmis G. *et al*, 2021). **Ces observations, combinées à nos résultats, montrent qu'un OXPHOS fonctionnel est nécessaire pour permettre le processus invasif.**

Ce travail montre une association entre le niveau d'OXPHOS et la réponse au traitement conventionnel de chimiothérapie *in vitro*. Actuellement le suivi de la réponse au traitement chez les patients peut se faire *via* l'utilisation de TEP-scan (tomographie à émission de positron) avec un analogue du glucose non métabolisable (^{18}F [FDG]glucose) à travers la capacité des tumeurs à capter le glucose. Il a été ainsi montré que la captation du glucose est associée à l'agressivité tumorale dans le cancer du sein (Kwon H. *et al*, 2021). Ce type de mesure est limité au métabolisme du glucose et ne permet pas d'appréhender le métabolisme tumoral dans sa globalité. Une approche plus fonctionnelle à l'aide du Seahorse, comme nous l'avons fait dans notre étude, permettrait d'avoir une compréhension plus globale du métabolisme énergétique de la tumeur chez les patients. En effet, dans la leucémie myéloïde aigüe une étude récente montre que l'analyse au Seahorse de biopsie de patient permet la prédiction de la réponse au traitement anticancéreux. De plus, elle permet d'évaluer l'intérêt thérapeutique de cibler le métabolisme énergétique dans le traitement anti-cancéreux (Fovez Q. *et al*, 2021).

Mon travail de thèse sera poursuivi par une étude fonctionnelle du niveau d'OXPHOS dans une cohorte de patientes TNBC en collaboration avec le centre Oscart Lambret (Centre de lutte contre le cancer de Lille). Ce projet consiste à évaluer s'il existe une différence du niveau d'OXPHOS entre les patients répondeurs et non-répondeurs au traitement de chimiothérapie, et si le niveau d'OXPHOS peut-être associé à un risque de rechute. A plus long terme, il serait intéressant d'évaluer la pertinence thérapeutique de combiner les inhibiteurs métaboliques avec les agents de chimiothérapie classique et/ou les thérapies ciblées dans le cancer du sein triple négatif.

C. Les changements d'expression protéique des cellules persistantes au traitement de chimiothérapie

Dans le TNBC, le traitement de chimiothérapie reste la meilleure solution thérapeutique. Cependant, il existe actuellement peu de marqueurs efficaces pour prédire la réponse au traitement (Ferrari P. *et al*, 2022). De plus, la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la persistance aux agents anticancéreux est restreinte. Par spectrométrie de masse, nous avons caractérisé le protéome de nos cellules persistantes pour le comparer à celui des cellules contrôles. De cette façon, il a été identifié, pour chacune des lignées persistantes, environ 1 000 protéines dans chaque condition dont le niveau d'expression augmente à la suite du traitement de chimiothérapie. Parmi celles dont l'expression est augmentée d'au moins 100%, 26 sont retrouvées augmentées dans au moins 20% des patientes d'une cohorte de cancer du sein (CPTAC, 2020 cbioportal, n=122).

Parmi ces cibles, TSTA3 a particulièrement retenu notre attention. A l'aide d'analyses dans les bases de données publiques, nous avons pu relier l'augmentation de son ARNm avec des tumeurs de haut grade et la métastase dans le cancer du sein.

Dans la littérature, TSTA3 est l'enzyme permettant la biosynthèse du GDP-L-fucose qui est lui le substrat de nombreuses fucosyltransférases (Tonetti M. *et al*, 1996). L'augmentation de l'expression de TSTA3 favorise la progression tumorale dans le cancer du poumon, de l'œsophage (Gao Y. *et al*, 2021 ; Zhang L. *et al*, 2020). Une étude sur TSTA3 menée par Sun et collaborateurs dans le cancer du sein associe l'augmentation de son expression avec la progression tumorale (Sun Y. *et al*, 2016). Au niveau clinique, une augmentation de la concentration sérique des protéines fucosylées est observée chez les patients atteints de cancer du sein et non répondeur au traitement de chimiothérapie (Keeley T. *et al*, 2019). Une seconde étude montre que l'augmentation de la fucosylation dans la tumeur mammaire est associée à un risque élevé de rechute et une survie courte (Koh Y. *et al*, 2013). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans notre étude par bio-informatique de TSTA3.

L'originalité de notre travail est le lien entre l'augmentation de TSTA3 dans la tumeur primaire et l'absence de réponse au traitement de chimiothérapie dans le TNBC. De plus, le niveau de TSTA3 est augmenté dans les lésions métastatiques comparées à la tumeur primaire.

In sillico nous avons mis en lumière l'existence d'un réseau d'interactions protéiques associant TSTA3 avec 5 autres protéines (GLRX3, COASY, RCN1, EFDH2 et GMPS). Parmi ces cibles supposées de TSTA3, GMPS et GLRX3 sont vues comme associées avec un risque élevé de rechute dans le TNBC. Dans la littérature, GMPS favorise la prolifération et la survie cellulaire dans les cancers du sein et de l'utérus *via* la signalisation STAT3/p53 (Su X. *et al*, 2021 ; Wang J. *et al*, 2021). GLRX3 est associé dans le cancer du nasopharynx à l'augmentation de la migration et de l'invasion cellulaire (He F. *et al*, 2016). Dans le cancer du pancréas, il est associé au caractère souche (Jo J. *et al*, 2021). Notre étude montre aussi un lien entre TSTA3 et RCN1 dont le niveau d'ARNm est augmenté dans le TNBC mais, son niveau de transcrit n'est pas relié ici à un pronostic clinique. Néanmoins, dans le cancer du poumon l'augmentation du niveau protéique de RCN1 promeut la migration et la prolifération des cellules cancéreuses (Fu H. *et al*, 2021). L'expression de RCN1 est augmentée dans les cellules résistantes aux drogues de chimiothérapie dans les cancers du foie, utérin et du nasopharynx (Wang J.W. *et al*, 2021 ; Huang Z. *et al*, 2020 ; May E. *et al*, 2014).

Le rôle de la fucosylation est étudié depuis de nombreuses années dans la progression tumorale de nombreux cancers dont le cancer du sein (Keeley T. *et al*, 2019). Cependant, le rôle de ces régulateurs dans la progression tumorale est moins caractérisé spécifiquement dans le cancer du sein. De façon intéressante, dans le cancer du foie, l'inhibition pharmacologique de TSTA3 mène à la diminution du potentiel invasif des cellules cancéreuses *in vitro* faisant de lui une cible potentielle dans le traitement de la métastase (Kizuka Y. *et al*, 2017). De plus, les protéines trouvées *in sillico* interagissant avec TSTA3 sont toutes associées avec la résistance aux agents cytotoxiques et/ou à l'invasion. **L'ensemble de ces données montre l'intérêt d'approfondir notre étude bio-informatique par une validation expérimentale afin de comprendre le rôle fonctionnel de TSTA3 et de ses potentielles partenaires dans l'invasion et la sensibilité aux drogues de chimiothérapie.**

En plus de TSTA3, 5 autres protéines (COL1A1, MRPL41, SPR, NQO1 et SNTB2) sont augmentées dans nos cellules persistantes au traitement de long terme ainsi que dans une cohorte de patientes de cancer du sein (CPTAC, 2020 n=122). Chacune d'elle est associée avec un risque accru de rechute et/ou de formation de métastase dans le TNBC lorsque leur niveau de transcrite est élevé. En effet, dans le cancer du sein l'augmentation l'expression de la COL1A1 promeut la métastase, le caractère souche et la prolifération (Zhu X. *et al*, 2018 ; Shea M. *et al*, 2018). Son expression est sous la régulation des signalisations mTOR et TGF- β (Shea M. *et al*, 2018). L'expression de MRPL41 est associée à la signalisation p53 et la présence des récepteurs aux œstrogènes (Kim T. *et al*, 2013). L'expression de SPR est reliée à la prolifération cellulaire et la concentration de ROS (Zhang X. *et al*, 2020). Dans le cancer hépatique, l'expression de SPR est régulée par l'axe FoxO3a/Bim favorisant la progression tumorale (Wu Y. *et al*, 2020). Dans le cancer du sein, il existe un lien entre NQO1 et le caractère souche (Kim D. *et al*, 2018). De même, il est un régulateur du métabolisme glycolytique, de la stabilité de l'expression de HIF1 en condition d'aérobie et la résistance aux drogues de chimiothérapie (Zhu K. *et al*, 2020 ; Oh E. *et al*, 2016 ; Glorieux C. *et al*, 2016). Enfin, dans le cancer du poumon, l'expression de SNTB2 est reliée à la résistance à la radiothérapie (Im C. *et al*, 2013). Ainsi, l'augmentation de l'expression de ces protéines est associée avec la progression tumorale de différents types de cancers. Cependant, peu d'études fonctionnelles s'intéressent à leur rôle dans le cancer du sein. Il serait alors intéressant d'examiner le rôle de ces protéines dans le mécanisme de persistance aux drogues de chimiothérapie avec notre modèle.

La recherche de voies de signalisation montre un enrichissement significatif dans les deux lignées persistantes pour les signalisations VEGFA/VEGFR2 (*vascular endothelial growth factor A/vascular endothelial growth factor receptor 2*), MAPK et Wnt. La voie VEGFA/VEGFR2 est connue pour son rôle dans la progression du cancer du sein (Zhu X. et Zhou W., 2015). Elle joue un rôle dans la survie, la perméabilité vasculaire, la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Dans le cancer du sein, elle est impliquée dans la migration et l'auto-renouvellement des CSC favorisant la progression et l'invasion tumorale. VEGFR2 active au niveau intracellulaire la signalisation JAK2/STAT3 permettant la dimérisation de STAT3 avec c-MYC induisant l'expression de SOX2 et favorisant l'auto-renouvellement des CSC (Zhu X. et Zhou W., 2015). De plus, l'expression du VEGF est vue comme augmentée dans le TNBC comparé aux autres sous-types de cancer du sein (Linderholm B. *et al*, 2009). Comme il a été décrit dans l'introduction, les voies MAPK et Wnt sont associées à la TEM, au caractère souche ainsi qu'à la sensibilité aux agents de chimiothérapie (Guo Y. *et al*, 2020 ; Xu X. *et al*, 2020).

L'enrichissement en ces voies de signalisation dans nos cellules persistantes suggère l'augmentation de leur activation. Ceci est en accord avec les modifications phénotypiques de nos cellules (augmentation du potentiel de formation de sphères, de survie et du potentiel invasif). **Il serait alors intéressant d'étudier plus finement le rôle de ces voies dans nos cellules persistantes afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de la persistance au traitement.**

D. Inconvénient et apport de notre modèle d'étude de la persistance au traitement

Les patientes TNBC montrent dans un premier temps une bonne réponse au traitement de chimiothérapie comparé aux autres sous-types de cancer du sein (Prat A. *et al*, 2015) Cependant, les patientes ne présentant qu'une réponse partielle seront en rechute moins de 5 ans après le traitement avec la reprise de la croissance de la tumeur primaire et/ou l'apparition de métastases (Carey L. *et al*, 2007 ; Fitzpatrick A. and Tutt A., 2019). De nombreuses études ont été réalisées *in vitro* et *in vivo* pour mieux comprendre l'échappement thérapeutique dans le TNBC et proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour améliorer la survie clinique (Yin L. *et al*, 2020 ; Manjunath M. and Choudhary B., 2021).

De nombreux modèles d'études ont été mis au point pour permettre l'acquisition de ces connaissances. La plupart d'entre eux ont été mis au point *in vitro* dans des modèles de culture en monocouche ou en 3 dimensions (3D). Ces deux modèles ont en commun la possibilité de mesurer l'effet d'un grand nombre de drogues et de suivre la dynamique de la réponse au traitement en temps réel. De plus, il existe de nombreux tests fonctionnels utilisables dans ces conditions permettant de valider les effets sur l'agressivité tumorale. Cependant, la culture en monocouche ne permet pas d'évaluer le rôle du microenvironnement tumoral ni les interactions cellules-cellules. Le modèle de culture 3D permet de combler ce manque (Roarty K. and Echeverria G., 2021). Notamment avec la culture sous forme d'organoïdes, c'est-à-dire une structure recréant les fonctions et l'architecture du tissu originel, a permis une meilleure compréhension de la progression tumorale dans le cancer du sein (Yang L. *et al*, 2020). Ce type de culture, a pour avantage de pouvoir être établi à partir de cellules isolées de biopsie tumorale faisant de lui un bon outil prédictif *in vitro* de la réponse au traitement de chimiothérapie (Rae C. *et al*, 2021). Zumwalde et collaborateurs ont aussi démontré la possibilité d'intégrer des cellules du stroma tumoral (lymphocytes T) dans les organoïdes de cancer du sein pour étudier leur rôle dans l'action anti-tumorale (Zumwalde N. *et al*, 2016). D'autres modèles sont générés *in vivo*, c'est le cas des PDX qui, comme les organoïdes, dérivent de biopsies tumorales. Il a comme avantage de récapituler l'hétérogénéité tumorale ainsi que d'avoir un microenvironnement proche de celui retrouvé chez les patients. Néanmoins, il est le plus souvent établi dans des souris immunodéficientes, ce qui occulte le rôle du système immunitaire dans la réponse anti-tumorale (Roarty K. and Echeverria G., 2021). Récemment, il a été démontré que la génération de PDX et d'organoïdes à partir de ces PDX forment un outil essentiel dans l'étude au long terme de la réponse au traitement dans le TNBC (Guillen K. *et al*, 2022).

Il est important de souligner que la majorité des études analyse la résistance aux drogues avec des doses souvent très supérieures à celles utilisées en clinique. De même, la majorité des analyses sont réalisées à la suite d'une exposition de 24 à 72 heures des cellules à ces

agents, ce qui est beaucoup plus court que le temps de traitement en clinique (environ 18 semaines). Ces divergences pointent la nécessité de changement de méthodologie pour améliorer la compréhension des mécanismes non pas de résistance, mais de persistance au traitement de chimiothérapie dans le cancer. En effet, chez les patients les cellules résiduelles ne seront pas forcément résistantes aux drogues et un second traitement avec les mêmes drogues aux mêmes doses peut se trouver toujours efficace (Palmieri C. *et al*, 2010). Cela est le cas pour nos cellules SUM159-PT persistantes au traitement de long terme et montré par Echeverria et collaborateur dans un modèle de PDX issu de patientes TNBC (Echeverria G. *et al*, 2019).

Dans le cancer, la différence entre la persistance et la résistance au traitement n'est pas clairement définie. *In vitro*, Risom et collaborateurs décrivent les cellules persistantes comme une sous-population de cellules avec un potentiel prolifératif réduit leur permettant d'échapper au traitement ciblant les cellules hautement proliférantes (Risom T. *et al*, 2018). Ces cellules pré-existent dans la tumeur primaire et peuvent acquérir des mutations et/ou des modifications épigénétiques au cours du traitement de chimiothérapie menant à la formation de quelques clones résistants aux traitements (Russo M. *et al*, 2019). Cependant, l'échappement thérapeutique passe aussi par des changements métaboliques menant à l'activation de voie de signalisation comme mTOR qui augmente la survie cellulaire (Allen E. *et al*, 2016). Certaines cellules stromales acquièrent un profil de cellules tumorales, ce sont par exemple les CAF (*cancer associated fibroblastes*) et les TAM (*tumor associated macrophages*). Ces cellules sont dites « activées » par les cellules tumorales pour permettre la progression tumorale. En effet, leurs présences dans le microenvironnement tumoral augmentent la concentration en cytokines et facteurs de croissance favorisant la survie cellulaire et l'invasion tumorale (Cassetta L. and Pollard J., 2018 ; Watson S. *et al*, 2018). Ainsi, la persistance au traitement de chimiothérapie n'implique pas uniquement la résistance aux drogues, mais un ensemble d'événements augmentant la survie cellulaire. Il y a alors un intérêt d'étudier la persistance au traitement de chimiothérapie en utilisant un protocole de traitement se rapprochant de celui réalisé en clinique.

De précédentes études *in vitro* utilisent cette stratégie de traitement dans le cancer du sein en réalisant dans un premier temps 4 cycles de traitement combinant la doxorubicine au cyclophosphamide suivie de 4 cycles de traitement avec du paclitaxel. Dans leur protocole, chaque cycle de traitement débute au moment où les cellules redeviennent confluentes. Cependant, les doses utilisées sont très supérieures à celles administrées en clinique (Naik A. *et al*, 2018 ; Al-Zeheimi N. *et al*, 2019). Dans mon travail de thèse, nous avons généré deux modèles de persistance au traitement de chimiothérapie en utilisant des concentrations proches de celles administrées en clinique (Mielke S. 2005 ; Hunz M. *et al*, 2007). Le premier modèle, dit de court terme, est réalisé sur un mode approchant celui déjà référencé dans la littérature c'est-à-dire sans respecter de « pause » entre les traitements et avec une exposition courte des cellules aux drogues (deux fois 48 heures). Le second dit de long terme,

respecte la chronologie du protocole clinique avec des temps de repos identiques entre chaque cycle de traitement. La caractérisation phénotypique des cellules persistantes obtenues à la suite des deux modes de traitement montre qu'elles acquièrent une augmentation du potentiel invasif *in vitro* et *in vivo* ainsi qu'une croissance augmentée en matrice. Cependant, les cellules persistantes au traitement de long terme ne montrent pas d'augmentation de l'expression de la vimentine ni d'aucun autre marqueur du processus de TEM. Réciproquement, les cellules MDA-MB-231 persistantes au traitement de court terme ne montrent pas de changement du métabolisme énergétique. De nombreuses études montrent un lien entre la reprogrammation métabolique et le processus de TEM (Sun X. *et al*, Front. Cell. Dev. Biol., 2020 ; Thomson T. *et al*, 2019). **Ce travail pourrait être poursuivi avec une étude de la dynamique d'activation du processus de TEM et des changements du métabolisme énergétique au cours du traitement. Potentiellement, cette dynamique pourrait participer à l'échappement thérapeutique.**

Notre modèle a pour principal défaut d'être généré en l'absence de microenvironnement tumoral. Ceci est commun à la majorité des modèles d'études de résistance et/ou de persistance au traitement anticancéreux réalisé *in vitro* (Roarty K. and Echeverria G., 2021). Cependant, cela occulte l'importance des cellules stromales dans la réponse au traitement. De nombreuses études montrent que le traitement de chimiothérapie influence le microenvironnement tumoral en favorisant l'invasion, mais aussi l'échappement thérapeutique (Plava J. *et al*, 2021). Parmi les différents types cellulaires composant le microenvironnement tumoral, les macrophages (cellules du système immunitaire inné) sont les plus présents dans les tumeurs solides. En présence des cellules cancéreuses, ainsi que sous influence des drogues de chimiothérapie, ils acquièrent un phénotype pro-tumorigène, ce sont les TAM (Larionova I. *et al*, 2019). Certaines études montrent qu'ils participent à l'augmentation du potentiel invasif et à l'échappement thérapeutique dans le cancer du sein (Munir M. *et al*, 2021). D'autres types cellulaires montrent aussi un rôle important dans la progression tumorale. Une importante innervation de la tumeur mammaire est associée à un mauvais pronostic clinique (Jézéquel P. *et al*, 2019). L'innervation favorise l'invasion/migration des cellules cancéreuses *via* une interaction directe avec les cellules cancéreuses ou indirecte par la sécrétion de neurotransmetteurs tels que le « nerve growth factor », l'acide γ -aminobutyric et l'acétylcholine (Cervantes-Villagrana R. *et al*, 2020). Le stroma tumoral mammaire est riche en cellules adipeuses. Ces cellules sécrètent un grand nombre de facteurs (ex. œstrogène, leptine, IL-6, MMP, CCL5, acide lactique, pyruvate) favorisant l'invasion/migration, l'acquisition d'un caractère souche ainsi que la reprogrammation métabolique sur les cellules cancéreuses (Yao H. *et al*, 2021 ; Goto H. *et al*, 2019).

Dans l'objectif d'améliorer la compréhension des mécanismes d'échappement thérapeutique, il serait intéressant de générer des modèles de persistance au traitement clinique en incluant le microenvironnement tumoral au travers de modèle de culture en 3D telle que la culture d'organoïdes.

En conclusion, mon travail de thèse a permis pour la première fois d'étudier le rôle de la plasticité cellulaire dans le cadre de la persistance au traitement de chimiothérapie. La mise en lumière de ces changements phénotypique et moléculaire ouvre des perspectives d'études tant au niveau moléculaire qu'au niveau métabolique comme discuté précédemment. Pour répondre à de nombreuses questions soulevées, il sera aussi essentiel d'utiliser des modèles de persistance comprenant le microenvironnement tumoral et le système immunitaire.

Bibliographie

Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, *et al.* Circulating Tumor Cell Clusters Are Oligoclonal Precursors of Breast Cancer Metastasis. *Cell*. 2014;158(5):1110-1122. doi:10.1016/j.cell.2014.07.013

Achuthan S, Santhoshkumar TR, Prabhakar J, *et al.* Drug-induced Senescence Generates Chemoresistant Stemlike Cells with Low Reactive Oxygen Species. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(43):37813-37829. doi:10.1074/jbc.M110.200675

Al-Hajj M, Wicha M, Benito-Hernandez A, *et al.* Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003 Apr 1;100(7):3983-8. doi : 10.1073/pnas.0530291100

Allen E, Miéville P, Warren CM, *et al.* Metabolic Symbiosis Enables Adaptive Resistance to Anti-angiogenic Therapy that Is Dependent on mTOR Signaling. *Cell Reports*. 2016;15(6):1144-1160. doi:10.1016/j.celrep.2016.04.029

Almansour NM. Triple-Negative Breast Cancer: A Brief Review About Epidemiology, Risk Factors, Signaling Pathways, Treatment and Role of Artificial Intelligence. *Front Mol Biosci*. 2022;9:836417. doi:10.3389/fmolb.2022.836417

Almendro V, Cheng YK, Randles A, *et al.* Inference of Tumor Evolution during Chemotherapy by Computational Modeling and In Situ Analysis of Genetic and Phenotypic Cellular Diversity. *Cell Reports*. 2014;6(3):514-527. doi:10.1016/j.celrep.2013.12.041

Almozyan S, Colak D, Mansour F, *et al.* PD-L1 promotes OCT4 and Nanog expression in breast cancer stem cells by sustaining PI3K/AKT pathway activation. *Int J Cancer*. 2017;141(7):1402-1412. doi:10.1002/ijc.30834

Altemus MA, Goo LE, Little AC, *et al.* Breast cancers utilize hypoxic glycogen stores via PYGB, the brain isoform of glycogen phosphorylase, to promote metastatic phenotypes. Rishi A, ed. *PLoS ONE*. 2019;14(9):e0220973. doi:10.1371/journal.pone.0220973

D'Alterio C, Scala S, Sozzi G, *et al.* Paradoxical effects of chemotherapy on tumor relapse and metastasis promotion. *Seminars in Cancer Biology*. 2020;60:351-361. doi:10.1016/j.semcancer.2019.08.019

Al-Zeheimi N, Adham SA. Modeling Neoadjuvant chemotherapy resistance in vitro increased NRP-1 and HER2 expression and converted MCF7 breast cancer subtype. *Br J Pharmacol*. 2020;177(9):2024-2041. doi:10.1111/bph.14966

An J, Peng C, Tang H, *et al.* New Advances in the Research of Resistance to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *IJMS*. 2021;22(17):9644. doi:10.3390/ijms22179644

Avanzato D, Pupo E, Ducano N, *et al.* High USP6NL levels in breast cancer sustain chronic AKT phosphorylation and GLUT1 stability fueling aerobic glycolysis. *Cancer Res.* Published online April 24, 2018;canres.3018.2017. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-3018

Bader DA, Hartig SM, Putluri V, *et al.* Mitochondrial pyruvate import is a metabolic vulnerability in androgen receptor-driven prostate cancer. *Nat Metab.* 2019;1(1):70-85. doi:10.1038/s42255-018-0002-y

Balko JM, Giltane JM, Wang K, *et al.* Molecular Profiling of the Residual Disease of Triple-Negative Breast Cancers after Neoadjuvant Chemotherapy Identifies Actionable Therapeutic Targets. *Cancer Discovery.* 2014;4(2):232-245. doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0286

Baram T, Rubinstein-Achiasaf L, *et al.* Inflammation-Driven Breast Tumor Cell Plasticity: Stemness/EMT, Therapy Resistance and Dormancy. *Front Oncol.* 2021;10:614468. doi:10.3389/fonc.2020.614468

Basu S, Dong Y, Kumar R, *et al.* Slow-cycling (dormant) cancer cells in therapy resistance, cancer relapse and metastasis. *Seminars in Cancer Biology.* 2022;78:90-103. doi:10.1016/j.semcan.2021.04.021

Bean JF, Qiu YY, Yu S, *et al.* Glycolysis inhibition and its effect in doxorubicin resistance in neuroblastoma. *Journal of Pediatric Surgery.* 2014;49(6):981-984. doi:10.1016/j.jpedsurg.2014.01.037

Bhola NE, Balko JM, Dugger TC, *et al.* TGF- β inhibition enhances chemotherapy action against triple-negative breast cancer. *J Clin Invest.* 2013;123(3):1348-1358. doi:10.1172/JCI65416

Bocci F, Gearhart-Serna L, Boareto M, *et al.* Toward understanding cancer stem cell heterogeneity in the tumor microenvironment. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019;116(1):148-157. doi:10.1073/pnas.1815345116

Braicu C, Buse M, Busuioc C, *et al.* A Comprehensive Review on MAPK: A Promising Therapeutic Target in Cancer. *Cancers.* 2019;11(10):1618. doi:10.3390/cancers11101618

Brooks DLP, Schwab LP, Krutilina R, *et al.* ITGA6 is directly regulated by hypoxia-inducible factors and enriches for cancer stem cell activity and invasion in metastatic breast cancer models. *Mol Cancer.* 2016;15(1):26. doi:10.1186/s12943-016-0510-x

Budianto MB, Pardjianto B, Karyono S, *et al.* Vimentin, E-cadherin, and CD44+/CD24- as predictor of neoadjuvant chemotherapy response in patients with breast cancer stage IIIB subtype luminal. *Drug Invent Today*, 2018, 10(9):1661-1665

Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, *et al.* Comprehensive Genomic Analysis Identifies Novel Subtypes and Targets of Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2015;21(7):1688-1698. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0432

Camarda R, Zhou AY, Kohnz RA, *et al.* Inhibition of fatty acid oxidation as a therapy for MYC-overexpressing triple-negative breast cancer. *Nat Med.* 2016;22(4):427-432. doi:10.1038/nm.4055

Cao J, Zhang M, Wang B, *et al.* Chemoresistance and Metastasis in Breast Cancer Molecular Mechanisms and Novel Clinical Strategies. *Front Oncol.* 2021;11:658552. doi:10.3389/fonc.2021.658552

Carey LA, Dees EC, Sawyer L, *et al.* The Triple Negative Paradox: Primary Tumor Chemosensitivity of Breast Cancer Subtypes. *Clin Cancer Res.* 2007;13(8):2329-2334. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1109

Cassetta L, Pollard JW. Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2018;17(12):887-904. doi:10.1038/nrd.2018.169

Cervantes-Villagrana RD, Albores-García D, Cervantes-Villagrana AR, *et al.* Tumor-induced neurogenesis and immune evasion as targets of innovative anti-cancer therapies. *Sig Transduct Target Ther.* 2020;5(1):99. doi:10.1038/s41392-020-0205-z

Chakrabarty A, Chakraborty S, Bhattacharya R, *et al.* Senescence-Induced Chemoresistance in Triple Negative Breast Cancer and Evolution-Based Treatment Strategies. *Front Oncol.* 2021;11:674354. doi:10.3389/fonc.2021.674354

Charafe-Jauffret E, Chaffanet M, Bertucci F, *et al.* Les cancers du sein vers un modèle cellulaire et moléculaire intégré, *Med Sci (Paris)* 2007 ; 23 : 626-632

Chen J, Lee HJ, Wu X, *et al.* Gain of Glucose-Independent Growth upon Metastasis of Breast Cancer Cells to the Brain. *Cancer Res.* 2015;75(3):554-565. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-2268

Chen YC, Li H, Wang J. Mechanisms of metformin inhibiting cancer invasion and migration. *Am. J. Transl. Res.* 2020;12(9):4885-4901

Chen Z, Fang Z, Ma J. Regulatory mechanisms and clinical significance of vimentin in breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2021;133:111068. doi:10.1016/j.biopha.2020.111068

Cheng F, Shen Y, Mohanasundaram P, *et al.* Vimentin coordinates fibroblast proliferation and keratinocyte differentiation in wound healing via TGF- β -Slug signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113(30). doi:10.1073/pnas.1519197113

Chernosky NM, Tamagno I. The Role of the Innate Immune System in Cancer Dormancy and Relapse. *Cancers*. 2021;13(22):5621. doi:10.3390/cancers13225621

Chintalapani SR, Bala S, Konatam ML, *et al.* Triple-negative breast cancer: Pattern of recurrence and survival outcomes. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology*. 2019;40(01):67-72. doi:10.4103/ijmpo.ijmpo_132_18

Corbet C, Bastien E, Draoui N, *et al.* Interruption of lactate uptake by inhibiting mitochondrial pyruvate transport unravels direct antitumor and radiosensitizing effects. *Nat Commun*. 2018;9(1):1208. doi:10.1038/s41467-018-03525-0

Cortet M, Bertaut A, Molinié F, *et al.* Trends in molecular subtypes of breast cancer: description of incidence rates between 2007 and 2012 from three French registries. *BMC Cancer*. 2018;18(1):161. doi:10.1186/s12885-018-4080-8

Dang CV. MYC on the Path to Cancer. *Cell*. 2012;149(1):22-35. doi:10.1016/j.cell.2012.03.003

Damen MPF, Rheenen J, Scheele CLGJ. Targeting dormant tumor cells to prevent cancer recurrence. *FEBS J*. 2021;288(21):6286-6303. doi:10.1111/febs.15626

Danielsson F, Peterson M, Caldeira Araújo H, *et al.* Vimentin Diversity in Health and Disease. *Cells*. 2018;7(10):147. doi:10.3390/cells7100147

De Angelis ML, Francescangeli F, La Torre F, *et al.* Stem Cell Plasticity and Dormancy in the Development of Cancer Therapy Resistance. *Front Oncol*. 2019;9:626. doi:10.3389/fonc.2019.00626

Delgir S, Bastami M, Ilkhani K, *et al.* The pathways related to glutamine metabolism, glutamine inhibitors and their implication for improving the efficiency of chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2021;787:108366. doi:10.1016/j.mrrev.2021.108366

De Luca A, Fiorillo M, Peiris-Pagès M, *et al.* Mitochondrial biogenesis is required for the anchorage-independent survival and propagation of stem-like cancer cells. *Oncotarget*. 2015;6(17):14777-14795. doi:10.18632/oncotarget.4401

Desbats MA, Giacomini I, Prayer-Galetti T, *et al.* Metabolic Plasticity in Chemotherapy Resistance. *Front Oncol*. 2020;10:281. doi:10.3389/fonc.2020.00281

Diana A, Carlino F, Franzese E, *et al.* Early Triple Negative Breast Cancer: Conventional Treatment and Emerging Therapeutic Landscapes. *Cancers*. 2020;12(4):819. doi:10.3390/cancers12040819

Dökümcü K, Farahani RM. Evolution of Resistance in Cancer: A Cell Cycle Perspective. *Front Oncol*. 2019;9:376. doi:10.3389/fonc.2019.00376

Dong X, Bai X, Ni J, *et al.* Exosomes and breast cancer drug resistance. *Cell Death Dis*. 2020;11(11):987. doi:10.1038/s41419-020-03189-z

Dong Z, Abbas MN, Kausar S, *et al.* Biological Functions and Molecular Mechanisms of Antibiotic Tigecycline in the Treatment of Cancers. *IJMS*. 2019;20(14):3577. doi:10.3390/ijms20143577

Doyen J, Trastour C, Ettore F, *et al.* Expression of the hypoxia-inducible monocarboxylate transporter MCT4 is increased in triple negative breast cancer and correlates independently with clinical outcome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2014;451(1):54-61. doi:10.1016/j.bbrc.2014.07.050

Dupuy F, Tabariès S, Andrzejewski S, *et al.* PDK1-Dependent Metabolic Reprogramming Dictates Metastatic Potential in Breast Cancer. *Cell Metabolism*. 2015;22(4):577-589. doi:10.1016/j.cmet.2015.08.007

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of randomized trials. *The Lancet*. 2005;365:1687-1717

Echeverria GV, Ge Z, Seth S, *et al.* Resistance to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer mediated by a reversible drug-tolerant state. *Sci Transl Med*. 2019;11(488):eaav0936. doi:10.1126/scitranslmed.aav0936

Edwards A, Brennan K. Notch Signalling in Breast Development and Cancer. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:692173. doi:10.3389/fcell.2021.692173

Elamrani A, Kyatti M, Mustapha B *et al.* Cancer du sein : Données actuelles, 2013, ScienceLib Editions Mersenne, Volume 5, ISSN 2111-4706

Evans KW, Yuca E, Scott SS, *et al.* Oxidative Phosphorylation Is a Metabolic Vulnerability in Chemotherapy-Resistant Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res*. 2021;81(21):5572-5581. doi:10.1158/0008-5472.CAN-20-3242

Feng Y, Spezia M, Huang S, *et al.* Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & Diseases*. 2018;5(2):77-106. doi:10.1016/j.gendis.2018.05.001

Ferrari P, Scatena C, Ghilli M, *et al.* Molecular Mechanisms, Biomarkers and Emerging Therapies for Chemotherapy Resistant TNBC. *IJMS*. 2022;23(3):1665. doi:10.3390/ijms23031665

Fitsiou E, Soto-Gamez A, Demaria M. Biological functions of therapy-induced senescence in cancer. *Seminars in Cancer Biology*. Published online March 2021:S1044579X21000717. doi:10.1016/j.semcan.2021.03.021

Fitzpatrick A, Tutt A. Controversial issues in the neoadjuvant treatment of triple-negative breast cancer. *Ther Adv Med Oncol*. 2019;11:175883591988258. doi:10.1177/1758835919882581

Fovez Q, Laine W, Goursaud L, *et al.* Clinically Relevant Oxygraphic Assay to Assess Mitochondrial Energy Metabolism in Acute Myeloid Leukemia Patients. *Cancers*. 2021;13(24):6353. doi:10.3390/cancers13246353

Fu H, Chen R, Wang Y, *et al.* Reticulocalbin 1 is required for proliferation and migration of non-small cell lung cancer cells regulated by osteoblast-conditioned medium. *J Cell Mol Med*. 2021;25(24):11198-11211. doi:10.1111/jcmm.17040

Galluzzi L, Green DR. Autophagy-Independent Functions of the Autophagy Machinery. *Cell*. 2019;177(7):1682-1699. doi:10.1016/j.cell.2019.05.026

Gandhi N, Das G. Metabolic Reprogramming in Breast Cancer and Its Therapeutic Implications. *Cells*. 2019;8(2):89. doi:10.3390/cells8020089

Gao Y, Zhang G, Liu J, *et al.* Tissue-specific transplanted antigen P35B functions as an oncogene and is regulated by microRNA-125a-5p in lung cancer. *Oncol Rep*. 2021;45(5):72. doi:10.3892/or.2021.8023

Gao X, Liu X, Lu Y, *et al.* PIM1 is responsible for IL-6-induced breast cancer cell EMT and stemness via c-myc activation. *Breast Cancer*. 2019;26(5):663-671. doi:10.1007/s12282-019-00966-3

García-Prat L, Martínez-Vicente M, Perdiguero E, *et al.* Autophagy maintains stemness by preventing senescence. *Nature*. 2016;529(7584):37-42. doi:10.1038/nature16187

Ghajar CM, Peinado H, Mori H, *et al.* The perivascular niche regulates breast tumour dormancy. *Nat Cell Biol.* 2013;15(7):807-817. doi:10.1038/ncb2767

Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, *et al.* ALDH1 Is a Marker of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome. *Cell Stem Cell.* 2007;1(5):555-567. doi:10.1016/j.stem.2007.08.014

Glorieux C, Sandoval JM, Dejeans N, *et al.* Overexpression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and genomic gain of the NQO1 locus modulates breast cancer cell sensitivity to quinones. *Life Sciences.* 2016;145:57-65. doi:10.1016/j.lfs.2015.12.017

Godet I, Mamo M, Thurnheer A, *et al.* Post-Hypoxic Cells Promote Metastatic Recurrence after Chemotherapy Treatment in TNBC. *Cancers.* 2021;13(21):5509. doi:10.3390/cancers13215509

Goldman A, Majumder B, Dhawan A, *et al.* Temporally sequenced anticancer drugs overcome adaptive resistance by targeting a vulnerable chemotherapy-induced phenotypic transition. *Nat Commun.* 2015;6(1):6139. doi:10.1038/ncomms7139

Goldman A, Khiste S, Freinkman E, *et al.* Targeting tumor phenotypic plasticity and metabolic remodeling in adaptive cross-drug tolerance. *Sci Signal.* 2019;12(595):eaas8779. doi:10.1126/scisignal.aas8779

Gomatou G, Syrigos N, Vathiotis IA, *et al.* Tumor Dormancy: Implications for Invasion and Metastasis. *IJMS.* 2021;22(9):4862. doi:10.3390/ijms22094862

Gómez-Miragaya J, Palafox M, Paré L, *et al.* Resistance to taxanes in triple-negative breast cancer associates with the dynamics of CD49f+ tumor-initiating population. *Stem Cell Rep.* 2017, 19, 2723–2733.

Gong Y, Ji P, Yang YS, *et al.* Metabolic-Pathway-Based Subtyping of Triple-Negative Breast Cancer Reveals Potential Therapeutic Targets. *Cell Metabolism.* 2021;33(1):51-64.e9. doi:10.1016/j.cmet.2020.10.012

Gong X, Hou Z, Endsley MP, *et al.* Interaction of tumor cells and astrocytes promotes breast cancer brain metastases through TGF- β 2/ANGPTL4 axes. *npj Precis Onc.* 2019;3(1):24. doi:10.1038/s41698-019-0094-1

Gooding AJ, Schiemann WP. Epithelial–Mesenchymal Transition Programs and Cancer Stem Cell Phenotypes: Mediators of Breast Cancer Therapy Resistance. *Mol Cancer Res.* 2020;18(9):1257-1270. doi:10.1158/1541-7786.MCR-20-0067

Goto H, Shimono Y, Funakoshi Y, *et al.* Adipose-derived stem cells enhance human breast cancer growth and cancer stem cell-like properties through adipisin. *Oncogene*. 2019;38(6):767-779. doi:10.1038/s41388-018-0477-8

Grosse-Wilde A, Fouquier d'Hérouël A, McIntosh E, *et al.* Stemness of the hybrid Epithelial/Mesenchymal State in Breast Cancer and Its Association with Poor Survival. Ben-Jacob E, ed. *PLoS ONE*. 2015;10(5):e0126522. doi:10.1371/journal.pone.0126522

Guillen KP, Fujita M, Butterfield AJ, *et al.* A human breast cancer-derived xenograft and organoid platform for drug discovery and precision oncology. *Nat Cancer*. 2022;3(2):232-250. doi:10.1038/s43018-022-00337-6

Guo Y, Pan W, Liu S, *et al.* ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). *Exp Ther Med*. Published online January 15, 2020. doi:10.3892/etm.2020.8454

Gwark S, Kim J, Kwon NJ, *et al.* Analysis of the serial circulating tumor cell count during neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Sci Rep*. 2020;10(1):17466. doi:10.1038/s41598-020-74577-w

Habanjar O, Diab-Assaf M, Caldefie-Chezet F, *et al.* 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. *Int J Mol Sci*. Published online 2021:35.

Halestrap AP. The Mechanism of the Inhibition of the Mitochondrial Pyruvate Transporter by α -Cyanocinnamate Derivatives. 156:3.

Hao Y, Baker D, ten Dijke P. TGF- β -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *IJMS*. 2019;20(11):2767. doi:10.3390/ijms20112767

Havas KM, Milchevskaya V, Radic K, *et al.* Metabolic shifts in residual breast cancer drive tumor recurrence. *Journal of Clinical Investigation*. 2017;127(6):2091-2105. doi:10.1172/JCI89914

He F, Wei L, Luo W, *et al.* Glutaredoxin 3 promotes nasopharyngeal carcinoma growth and metastasis via EGFR/Akt pathway and independent of ROS. *Oncotarget*. 2016;7(24):37000-37012. doi:10.18632/oncotarget.9454

He L, Wick N, Germans SK, *et al.* The Role of Breast Cancer Stem Cells in Chemoresistance and Metastasis in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers*. 2021;13(24):6209. doi:10.3390/cancers13246209

Hinz N, Jücker M. Distinct functions of AKT isoforms in breast cancer: a comprehensive review. *Cell Commun Signal*. 2019;17(1):154. doi:10.1186/s12964-019-0450-3

Huang SW, Sun MT, Lee WS, *et al.* Cancer as an infectious disease: A different treatment alternative using a combination of tigecycline and pyrvinium pamoate – An example of breast cancer. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2022;55(1):51-59. doi:10.1016/j.jmii.2020.12.008

Huang ZH, Qiao J, Feng YY, *et al.* Reticulocalbin-1 knockdown increases the sensitivity of cells to Adriamycin in nasopharyngeal carcinoma and promotes endoplasmic reticulum stress-induced cell apoptosis. *Cell Cycle*. 2020;19(13):1576-1589. doi:10.1080/15384101.2020.1733750

Hunz M, Jetter A, Warm M, *et al.* Plasma and Tissue Pharmacokinetics of Epirubicin and Paclitaxel in Patients Receiving Neoadjuvant Chemotherapy for Locally Advanced Primary Breast Cancer. *Clin Pharmacol Ther*. 2007;81(5):659-668. doi:10.1038/sj.clpt.6100067

Im CN, Kim BM, Moon EY, *et al.* Characterization of H460R, a Radioresistant Human Lung Cancer Cell Line, and Involvement of Syntrophin Beta 2 (SNTB2) in Radioresistance. *Genomics Inform*. 2013;11(4):245. doi:10.5808/GI.2013.11.4.245

İşeri ÖD, Kars MD, Gündüz U. Two different docetaxel resistant MCF-7 sublines exhibited different gene expression pattern. *Mol Biol Rep*. 2012;39(4):3505-3516. doi:10.1007/s11033-011-1123-5

Jahanban-Esfahlan R, Seidi K, Manjili MH, *et al.* Tumor Cell Dormancy: Threat or Opportunity in the Fight against Cancer. *Cancers*. 2019;11(8):1207. doi:10.3390/cancers11081207

Jeon YJ, Khelifa S, Ratnikov B, *et al.* Regulation of Glutamine Carrier Proteins by RNF5 Determines Breast Cancer Response to ER Stress-Inducing Chemotherapies. *Cancer Cell*. 2015;27(3):354-369. doi:10.1016/j.ccell.2015.02.006

Jeter CR, Liu B, Liu X, *et al.* NANOG promotes cancer stem cell characteristics and prostate cancer resistance to androgen deprivation. *Oncogene*. 2011;30(36):3833-3845. doi:10.1038/onc.2011.114

Jeter CR, Yang T, Wang J, *et al.* Concise Review: NANOG in Cancer Stem Cells and Tumor Development: An Update and Outstanding Questions. *Stem Cells*. 2015;33(8):2381-2390. doi:10.1002/stem.2007

Jézéquel P, Campone M, Gouraud W, *et al.* bc-GenExMiner: an easy-to-use online platform for gene prognostic analyses in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012;131:765-775.

Jézéquel P, Kerdraon O, Hondermarck H, *et al.* Identification of three subtypes of triple-negative breast cancer with potential therapeutic implications. *Breast Cancer Res.* 2019;21(1):65. doi:10.1186/s13058-019-1148-6

Jia D, Li L, Andrew S, *et al.* An autocrine inflammatory forward-feedback loop after chemotherapy withdrawal facilitates the repopulation of drug-resistant breast cancer cells. *Cell Death Dis.* 2017;8(7):e2932-e2932. doi:10.1038/cddis.2017.319

Jia D, Park J, Jung K, *et al.* Elucidating the Metabolic Plasticity of Cancer: Mitochondrial Reprogramming and Hybrid Metabolic States. *Cells.* 2018;7(3):21. doi:10.3390/cells7030021

Jia D, Lu M, Jung KH, *et al.* Elucidating cancer metabolic plasticity by coupling gene regulation with metabolic pathways. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019;116(9):3909-3918. doi:10.1073/pnas.1816391116

Jo JH, Kim SA, Lee JH, *et al.* GLRX3, a novel cancer stem cell-related secretory biomarker of pancreatic ductal adenocarcinoma. *BMC Cancer.* 2021;21(1):1241. doi:10.1186/s12885-021-08898-y

Jolly MK, Boareto M, Huang B, *et al.* Implications of the Hybrid Epithelial/Mesenchymal Phenotype in Metastasis. *Front Oncol.* 2015;5. doi:10.3389/fonc.2015.00155

Jolly MK, Somarelli JA, Sheth M, *et al.* Hybrid epithelial/mesenchymal phenotypes promote metastasis and therapy resistance across carcinomas. *Pharmacology & Therapeutics.* 2019;194:161-184. doi:10.1016/j.pharmthera.2018.09.007

Jones RA, Robinson TJ, Liu JC, *et al.* RB1 deficiency in triple-negative breast cancer induces mitochondrial protein translation. *Journal of Clinical Investigation.* 2016;126(10):3739-3757. doi:10.1172/JCI81568

Jung K, Lee J, Park J, *et al.* Troglitazone exerts metabolic and antitumor effects on T47D breast cancer cells by suppressing mitochondrial pyruvate availability. *Oncol Rep.* Published online December 16, 2019. doi:10.3892/or.2019.7436

Kabraji S, Solé X, Huang Y, *et al.* AKT1^{low} quiescent cancer cells persist after neoadjuvant chemotherapy in triple negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2017;19(1):88. doi:10.1186/s13058-017-0877-7

Kar R, Jha NK, Jha SK, *et al.* A “NOTCH” Deeper into the Epithelial-To-Mesenchymal Transition (EMT) Program in Breast Cancer. *Genes.* 2019;10(12):961. doi:10.3390/genes10120961

Keeley TS, Yang S, Lau E. The Diverse Contributions of Fucose Linkages in Cancer. *Cancers*. 2019;11(9):1241. doi:10.3390/cancers11091241

Kim D, Cho JY. NQO1 is Required for β -Lapachone-Mediated Downregulation of Breast-Cancer Stem-Cell Activity. *IJMS*. 2018;19(12):3813. doi:10.3390/ijms19123813

Kim J whan, Tchernyshyov I, Semenza GL, *et al.* HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metabolism*. 2006;3(3):177-185. doi:10.1016/j.cmet.2006.02.002

Kim TW, Kim B, Kim JH, *et al.* Nuclear-encoded mitochondrial MTO1 and MRPL41 are regulated in an opposite epigenetic mode based on estrogen receptor status in breast cancer. *BMC Cancer*. 2013;13(1):502. doi:10.1186/1471-2407-13-502

Kizuka Y, Nakano M, Yamaguchi Y, *et al.* An Alkynyl-Fucose Halts Hepatoma Cell Migration and Invasion by Inhibiting GDP-Fucose-Synthesizing Enzyme FX, TSTA3. *Cell Chemical Biology*. 2017;24(12):1467-1478.e5. doi:10.1016/j.chembiol.2017.08.023

Koh YW, Lee HJ, Ahn JH, *et al.* Expression of Lewis X Is Associated With Poor Prognosis in Triple-Negative Breast Cancer. *Am J Clin Pathol*. 2013;139(6):746-753. doi:10.1309/AJCP2E6QNDIDPTTC

Kong D, Hughes CJ, Ford HL. Cellular Plasticity in Breast Cancer Progression and Therapy. *Front Mol Biosci*. 2020;7:72. doi:10.3389/fmolb.2020.00072

Kreger B, Johansen E, Cerione R, *et al.* The Enrichment of Survivin in Exosomes from Breast Cancer Cells Treated with Paclitaxel Promotes Cell Survival and Chemoresistance. *Cancers*. 2016;8(12):111. doi:10.3390/cancers812011

Krishna BM, Jana S, Singhal J, *et al.* Notch signaling in breast cancer: From pathway analysis to therapy. *Cancer Letters*. 2019;461:123-131. doi:10.1016/j.canlet.2019.07.012

Kvokačková B, Remšík J, Jolly MK, *et al.* Phenotypic Heterogeneity of Triple-Negative Breast Cancer Mediated by Epithelial–Mesenchymal Plasticity. *Cancers*. 2021;13(9):2188. doi:10.3390/cancers13092188

Kwon HW, Lee JH, Pakh K, *et al.* Clustering subtypes of breast cancer by combining immunohistochemistry profiles and metabolism characteristics measured using FDG PET/CT. *Cancer Imaging*. 2021;21(1):55. doi:10.1186/s40644-021-00424-4

Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell*. 2017;168(4):670-691. doi:10.1016/j.cell.2016.11.037

Lampa M, Arlt H, He T, *et al.* Glutaminase is essential for the growth of triple-negative breast cancer cells with a deregulated glutamine metabolism pathway and its suppression synergizes with mTOR inhibition. Tan M, ed. *PLoS ONE*. 2017;12(9):e0185092. doi:10.1371/journal.pone.0185092

Larionova I, Cherdyntseva N, Liu T, *et al.* Interaction of tumor-associated macrophages and cancer chemotherapy. *Oncotmmunology*. 2019;8(7):e1596004. doi:10.1080/2162402X.2019.1596004

Leduc C., Etienne-Manneville S. Regulation of microtubule-associated motors drives intermediate filament network polarization. *J. Cell Biol.* 2017, 216, 1689–1703.

Lee HY, Cha J, Kim SK, *et al.* c-MYC Drives Breast Cancer Metastasis to the Brain, but Promotes Synthetic Lethality with TRAIL. *Mol Cancer Res*. 2019;17(2):544-554. doi:10.1158/1541-7786.MCR-18-0630

Lee JO, Kang MJ, Byun WS, *et al.* Metformin overcomes resistance to cisplatin in triple-negative breast cancer (TNBC) cells by targeting RAD51. *Breast Cancer Res*. 2019;21(1):115. doi:10.1186/s13058-019-1204-2

Lee K min, Giltneane JM, Balko JM, *et al.* MYC and MCL1 Cooperatively Promote Chemotherapy-Resistant Breast Cancer Stem Cells via Regulation of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. *Cell Metabolism*. 2017;26(4):633-647.e7. doi:10.1016/j.cmet.2017.09.009

Lee KL, Kuo YC, Ho YS, *et al.* Triple-Negative Breast Cancer: Current Understanding and Future Therapeutic Breakthrough Targeting Cancer Stemness. *Cancers*. 2019;11(9):1334. doi:10.3390/cancers11091334

Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, *et al.* Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*. 2011;121(7):2750-2767. doi:10.1172/JCI45014

Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, *et al.* Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. Sapino A, ed. *PLoS ONE*. 2016;11(6):e0157368. doi:10.1371/journal.pone.0157368

Lehmann BD, Colaprico A, Silva TC, *et al.* Multi-omics analysis identifies therapeutic vulnerabilities in triple-negative breast cancer subtypes. *Nat Commun*. 2021;12(1):6276. doi:10.1038/s41467-021-26502-6

Li D. The Notch ligand Jagged1 as a target for anti-tumor therapy. *Front Oncol*. 2014;4. doi:10.3389/fonc.2014.00254

Li M, Chen J er, Wang J xin, *et al.* Modifying the DPCLUS algorithm for identifying protein complexes based on new topological structures. *BMC Bioinformatics*. 2008;9(1):398. doi:10.1186/1471-2105-9-398

Li M, Li D, Tang Y, *et al.* CytoCluster: A Cytoscape Plugin for Cluster Analysis and Visualization of Biological Networks. *IJMS*. 2017;18(9):1880. doi:10.3390/ijms18091880

Li X, Han G, Li X, *et al.* Mitochondrial pyruvate carrier function determines cell stemness and metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncotarget*. 2017;8(28):46363-46380. doi:10.18632/oncotarget.18199

Liao TT, Yang MH. Hybrid Epithelial/Mesenchymal State in Cancer Metastasis: Clinical Significance and Regulatory Mechanisms. *Cells*. 2020;9(3):623. doi:10.3390/cells9030623

Lim SO, Li CW, Xia W, *et al.* EGFR Signaling Enhances Aerobic Glycolysis in Triple-Negative Breast Cancer Cells to Promote Tumor Growth and Immune Escape. *Cancer Res*. 2016;76(5):1284-1296. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-2478

Linderholm BK, Hellborg H, Johansson U, *et al.* Significantly higher levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and shorter survival times for patients with primary operable triple-negative breast cancer. *Annals of Oncology*. 2009;20(10):1639-1646. doi:10.1093/annonc/mdp062

Liu P, Kumar IS, Brown S, *et al.* Disulfiram targets cancer stem-like cells and reverses resistance and cross-resistance in acquired paclitaxel-resistance triple-negative breast cancer cells. *Brit. J. Cancer* 2013, 109, 1876–1885.

Liu S, Cong Y, Wang D, *et al.* Breast Cancer Stem Cells Transition between Epithelial and Mesenchymal States Reflective of their Normal Counterparts. *Stem Cell Reports*. 2014;2(1):78-91. doi:10.1016/j.stemcr.2013.11.009

Liu S, Chen S, Yuan W, *et al.* PD-1/PD-L1 interaction up-regulates MDR1/P-gp expression in breast cancer cells via PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways. *Oncotarget*. 2017;8(59):99901-99912. doi:10.18632/oncotarget.21914

Liu S, Huang J, Zhang Y, *et al.* MAP2K4 interacts with vimentin to activate the PI3K/AKT pathway and promotes breast cancer pathogenesis. *Aging* 2019, 11, 10697–10710.

Liu Y, Zhang J, Sun X, *et al.* Down-regulation of miR-29b in carcinoma associated fibroblasts promotes cell growth and metastasis of breast cancer. *Oncotarget*. 2017;8(24):39559-39570. doi:10.18632/oncotarget.17136

Liu Y, Zhu C, Tang L, *et al.* MYC dysfunction modulates stemness and tumorigenesis in breast cancer. *Int J Biol Sci.* 2021;17(1):178-187. doi:10.7150/ijbs.51458

López-Camacho E, Trilla-Fuertes L, Gámez-Pozo A, *et al.* Synergistic effect of antimetabolic and chemotherapy drugs in triple-negative breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2022;149:112844. doi:10.1016/j.biopha.2022.112844

Lu H, Samanta D, Xiang L, *et al.* Chemotherapy triggers HIF-1–dependent glutathione synthesis and copper chelation that induces the breast cancer stem cell phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015;112(33). doi:10.1073/pnas.1513433112

Lu X, Mazur SJ, Lin T, *et al.* The pluripotency factor nanog promotes breast cancer tumorigenesis and metastasis. *Oncogene* 2014, 33, 2655–2664.

Luo M, Shang L, Brooks MD, *et al.* Targeting Breast Cancer Stem Cell State Equilibrium through Modulation of Redox Signaling. *Cell Metabolism.* 2018;28(1):69-86.e6. doi:10.1016/j.cmet.2018.06.006

Lyssiotis CA, Kimmelman AC. Metabolic Interactions in the Tumor Microenvironment. *Trends in Cell Biology.* 2017;27(11):863-875. doi:10.1016/j.tcb.2017.06.003

Ma J hui, Qin L, Li X. Role of STAT3 signaling pathway in breast cancer. *Cell Commun Signal.* 2020;18(1):33. doi:10.1186/s12964-020-0527-z

Machida K. Pluripotency Transcription Factors and Metabolic Reprogramming of Mitochondria in Tumor-Initiating Stem-like Cells. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2018;28(11):1080-1089. doi:10.1089/ars.2017.7241

Manjunath M, Choudhary B. Triple-negative breast cancer: A run-through of features, classification and current therapies (Review). *Oncol Lett.* 2021;22(1):512. doi:10.3892/ol.2021.12773

Marotti JD, de Abreu FB, Wells WA, *et al.* Triple-Negative Breast Cancer. *The American Journal of Pathology.* 2017;187(10):2133-2138. doi:10.1016/j.ajpath.2017.05.018

Martin-Orozco E, Sanchez-Fernandez A, Ortiz-Parra I, *et al.* WNT Signaling in Tumors: The Way to Evade Drugs and Immunity. *Front Immunol.* 2019;10:2854. doi:10.3389/fimmu.2019.02854

Masuda H, Harano K, Miura S, *et al.* Changes in Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes in Patients Without Pathologic Complete Response After Neoadjuvant Systemic Chemotherapy. *JCO Precision Oncology.* 2022;(6):e2000368. doi:10.1200/PO.20.00368

May EWS, Lin ST, Lin CC, *et al.* Identification of up- and down-regulated proteins in doxorubicin-resistant uterine cancer cells: Reticulocalbin-1 plays a key role in the development of doxorubicin-associated resistance. *Pharmacological Research*. 2014;90:1-17. doi:10.1016/j.phrs.2014.08.007

Mendez MG, Kojima SI, Goldman RD. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J*. 2010, 24, 1838–1851.

Middleton J, Stover D, Hai T. Chemotherapy-Exacerbated Breast Cancer Metastasis: A Paradox Explainable by Dysregulated Adaptive-Response. *IJMS*. 2018;19(11):3333. doi:10.3390/ijms19113333

Mielke S. Association of Paclitaxel Pharmacokinetics with the Development of Peripheral Neuropathy in Patients with Advanced Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2005;11(13):4843-4850. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0298

Milanovic M, Fan DNY, Belenki D, *et al.* Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness. *Nature*. 2018;553(7686):96-100. doi:10.1038/nature25167

Molina JR, Sun Y, Protopopova M, *et al.* An inhibitor of oxidative phosphorylation exploits cancer vulnerability. *Nat Med*. 2018;24(7):1036-1046. doi:10.1038/s41591-018-0052-4

Morein D, Erlichman N, Ben-Baruch A. Beyond Cell Motility: The Expanding Roles of Chemokines and Their Receptors in Malignancy. *Front Immunol*. 2020;11:952. doi:10.3389/fimmu.2020.00952

Mullen AR, Wheaton WW, Jin ES, *et al.* Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. *Nature*. 2012;481(7381):385-388. doi:10.1038/nature10642

Munir MT, Kay MK, Kang MH, *et al.* Tumor-Associated Macrophages as Multifaceted Regulators of Breast Tumor Growth. *IJMS*. 2021;22(12):6526. doi:10.3390/ijms22126526

Nakano A, Tsuji D, Miki H, *et al.* Glycolysis Inhibition Inactivates ABC Transporters to Restore Drug Sensitivity in Malignant Cells. Zhang L, ed. *PLoS ONE*. 2011;6(11):e27222. doi:10.1371/journal.pone.0027222

Naik A, Al-Yahyaee A, Abdullah N, *et al.* Neuropilin-1 promotes the oncogenic Tenascin-C/integrin $\beta 3$ pathway and modulates chemoresistance in breast cancer cells. *BMC Cancer*. 2018;18(1):533. doi:10.1186/s12885-018-4446-y

Nagata T, Shimada Y, Sekine S, *et al.* Prognostic significance of NANOG and KLF4 for breast cancer. *Breast Cancer*. 2014;21(1):96-101. doi:10.1007/s12282-012-0357-y

NCI CPTAC, Mertins P, Mani DR, *et al.* Proteogenomics connects somatic mutations to signalling in breast cancer. *Nature*. 2016;534(7605):55-62. doi:10.1038/nature18003

Noh KH, Kim BW, Song KH, *et al.* Nanog signaling in cancer promotes stem-like phenotype and immune evasion. *J Clin Invest*. 2012;122(11):4077-4093. doi:10.1172/JCI64057

Nomura A, Dauer P, Gupta V, *et al.* Microenvironment mediated alterations to metabolic pathways confer increased chemo-resistance in CD133+ tumor initiating cells. *Oncotarget*. 2016;7(35):56324-56337. doi:10.18632/oncotarget.10838

Oh ET, Kim J whan, Kim JM, *et al.* NQO1 inhibits proteasome-mediated degradation of HIF-1 α . *Nat Commun*. 2016;7(1):13593. doi:10.1038/ncomms13593

Olson MW, Ruzin A, Feyfant E, *et al.* Functional, Biophysical, and Structural Bases for Antibacterial Activity of Tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(6):2156-2166. doi:10.1128/AAC.01499-05

Omarini C, Guaitoli G, Pipitone S, *et al.* Neoadjuvant treatments in triple-negative breast cancer patients: where we are now and where we are going. *CMAR*. 2018; Volume 10:91-103. doi:10.2147/CMAR.S146658

Ortega MA, Fraile-Martínez O, Asúnsolo Á, *et al.* Signal Transduction Pathways in Breast Cancer: The Important Role of PI3K/Akt/mTOR. *Journal of Oncology*. 2020;2020:1-11. doi:10.1155/2020/9258396

Padmanaban V, Krol I, Suhail Y, *et al.* E-cadherin is required for metastasis in multiple models of breast cancer. *Nature*. 2019;573(7774):439-444. doi:10.1038/s41586-019-1526-3

Palmieri C, Krell J, James CR, *et al.* Rechallenging with anthracyclines and taxanes in metastatic breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010;7(10):561-574. doi:10.1038/nrclinonc.2010.122

Peng F, Wang JH, Fan WJ, *et al.* Glycolysis gatekeeper PDK1 reprograms breast cancer stem cells under hypoxia. *Oncogene*. 2018;37(8):1062-1074. doi:10.1038/onc.2017.368

Perou CM, Sørлие T, Eisen MB, *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-752. doi:10.1038/35021093

Peuhu E, Virtakoivu R, Mai A, *et al.* Epithelial vimentin plays a functional role in mammary gland development. *Development* 2017, 144, 4103–41113.

Phi LTH, Sari IN, Yang YG, *et al.* Cancer Stem Cells (CSCs) in Drug Resistance and their Therapeutic Implications in Cancer Treatment. *Stem Cells International*. 2018;2018:1-16. doi:10.1155/2018/5416923

Plava J, Burikova M, Cihova M, *et al.* Chemotherapy-triggered changes in stromal compartment drive tumor invasiveness and progression of breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2021;40(1):302. doi:10.1186/s13046-021-02087-2

Poele RHT, Okorokov AL, Jardine L, *et al.* DNA Damage is Able to Induce Senescence in Tumor Cells In Vitro and In Vivo. *Cancer Res* (2002) 62:1876–83.

Polioudaki H, Agelaki S, Chiotaki R, *et al.* Variable expression levels of keratin and vimentin reveal differential EMT status of circulating tumor cells and correlation with clinical characteristics and outcome of patients with metastatic breast cancer. *BMC Cancer*. 2015;15(1):399. doi:10.1186/s12885-015-1386-7

Porporato PE, Payen VL, Pérez-Escuredo J, *et al.* A Mitochondrial Switch Promotes Tumor Metastasis. *Cell Reports*. 2014;8(3):754-766. doi:10.1016/j.celrep.2014.06.043

Prado-Vázquez G, Gámez-Pozo A, Trilla-Fuertes L, *et al.* A novel approach to triple-negative breast cancer molecular classification reveals a luminal immune-positive subgroup with good prognoses. *Sci Rep*. 2019;9(1):1538. doi:10.1038/s41598-018-38364-y

Prat A, Fan C, Fernández A, *et al.* Response and survival of breast cancer intrinsic subtypes following multi-agent neoadjuvant chemotherapy. *BMC Med*. 2015;13(1):303. doi:10.1186/s12916-015-0540-z

Qin S, Jiang J, Lu Y, *et al.* Emerging role of tumor cell plasticity in modifying therapeutic response. *Sig Transduct Target Ther*. 2020;5(1):228. doi:10.1038/s41392-020-00313-5

Qu J, Zhao X, Wang J, *et al.* MYC overexpression with its prognostic and clinicopathological significance in breast cancer. *Oncotarget*. 2017;8(55):93998-94008. doi:10.18632/oncotarget.21501

Rae C, Amato F, Braconi C. Patient-Derived Organoids as a Model for Cancer Drug Discovery. *IJMS*. 2021;22(7):3483. doi:10.3390/ijms22073483

Ramani VC, Lemaire CA, Triboulet M, *et al.* Investigating circulating tumor cells and distant metastases in patient-derived orthotopic xenograft models of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2019;21(1):98. doi:10.1186/s13058-019-1182-4

Ren Z, Liang H, Galbo PM, *et al.* Redox signaling by glutathione peroxidase 2 links vascular modulation to metabolic plasticity of breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2022;119(8):e2107266119. doi:10.1073/pnas.2107266119

Rios AC, Capaldo BD, Vaillant F, *et al.* Intracлонаl Plasticity in Mammary Tumors Revealed through Large-Scale Single-Cell Resolution 3D Imaging. *Cancer Cell*. 2019;35(4):618-632.e6. doi:10.1016/j.ccell.2019.02.010

Risom T, Langer EM, Chapman MP, *et al.* Differentiation-state plasticity is a targetable resistance mechanism in basal-like breast cancer. *Nat Commun*. 2018;9(1):3815. doi:10.1038/s41467-018-05729-w

Roarty K, Echeverria GV. Laboratory Models for Investigating Breast Cancer Therapy Resistance and Metastasis. *Front Oncol*. 2021;11:645698. doi:10.3389/fonc.2021.645698

Russo M, Crisafulli G, Sogari A, *et al.* Adaptive mutability of colorectal cancers in response to targeted therapies. *Science*. 2019;366(6472):1473-1480. doi:10.1126/science.aav4474

Saleh T, Tyutyunyk-Massey L, Gewirtz DA. Tumor Cell Escape from Therapy-Induced Senescence as a Model of Disease Recurrence after Dormancy. *Cancer Res*. 2019;79(6):1044-1046. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-3437

Samanta D, Park Y, Andrabi SA, *et al.* PHGDH Expression Is Required for Mitochondrial Redox Homeostasis, Breast Cancer Stem Cell Maintenance, and Lung Metastasis. *Cancer Research*. 2016;76(15):4430-4442. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-0530

Samuel SM, Varghese E, Koklesová L, *et al.* Counteracting Chemoresistance with Metformin in Breast Cancers: Targeting Cancer Stem Cells. *Cancers*. 2020;12(9):2482. doi:10.3390/cancers12092482

Sang N, Stiehl DP, Bohensky J, *et al.* MAPK Signaling Up-regulates the Activity of Hypoxia-inducible Factors by Its Effects on p300. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(16):14013-14019. doi:10.1074/jbc.M209702200

Santonja A, Sánchez-Muñoz A, Lluch A, *et al.* Triple negative breast cancer subtypes and pathologic complete response rate to neoadjuvant chemotherapy. *Oncotarget*. 2018;9(41):26406-26416. doi:10.18632/oncotarget.25413

Saxena M, Stephens MA, Pathak H, *et al.* Transcription factors that mediate epithelial–mesenchymal transition lead to multidrug resistance by upregulating ABC transporters. *Cell Death Dis*. 2011;2(7):e179-e179. doi:10.1038/cddis.2011.61

Shea MP, O’Leary KA, Wegner KA, *et al.* High collagen density augments mTOR-dependent cancer stem cells in ER α + mammary carcinomas, and increases mTOR-independent lung metastases. *Cancer Letters*. 2018;433:1-9. doi:10.1016/j.canlet.2018.06.02

Shen L, O’Shea JM, Kaadige MR, *et al.* Metabolic reprogramming in triple-negative breast cancer through Myc suppression of TXNIP. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112(17):5425-5430. doi:10.1073/pnas.1501555112

Shen M, Dong C, Ruan X, *et al.* Chemotherapy-Induced Extracellular Vesicle miRNAs Promote Breast Cancer Stemness by Targeting *ONECUT2*. *Cancer Res*. 2019;79(14):3608-3621. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-4055

Shenoy S. Cell plasticity in cancer: A complex interplay of genetic, epigenetic mechanisms and tumor micro-environment. *Surgical Oncology*. 2020;34:154-162. doi:10.1016/j.suronc.2020.04.017

Sher G, Salman NA, Khan AQ, *et al.* Epigenetic and breast cancer therapy: Promising diagnostic and therapeutic applications. *Seminars in Cancer Biology*. Published online August 2020: S1044579X20301814. doi:10.1016/j.semcancer.2020.08.009

Shibue T, Weinberg RA. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(10):611-629. doi:10.1038/nrclinonc.2017.44

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA A Cancer J Clin*. 2020;70(1):7-30. doi:10.3322/caac.21590

Sorokin D, Shchegolev Y, Scherbakov A, *et al.* Metformin Restores the Drug Sensitivity of MCF-7 Cells Resistant Derivates via the Cooperative Modulation of Growth and Apoptotic-Related Pathways. *Pharmaceuticals*. 2020;13(9):206. doi:10.3390/ph13090206

Strickaert A, Corbet C, Spinette SA, *et al.* Reprogramming of Energy Metabolism: Increased Expression and Roles of Pyruvate Carboxylase in Papillary Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2019;29(6):845-857. doi:10.1089/thy.2018.0435

Strouhalova K, Přečková M, Gandalovičová A, *et al.* Vimentin Intermediate Filaments as Potential Target for Cancer Treatment. *Cancers*. 2020;12(1):184. doi:10.3390/cancers12010184

Su X, Feng C, Wang S, *et al.* The noncoding RNAs SNORD50A and SNORD50B-mediated TRIM21-GMPS interaction promotes the growth of p53 wild-type breast cancers by degrading p53. *Cell Death Differ*. 2021;28(8):2450-2464. doi:10.1038/s41418-021-00762-7

Sun G, Montell DJ. Q&A: Cellular near death experiences—what is anastasis? *BMC Biol.* 2017;15(1):92. doi:10.1186/s12915-017-0441-z

Sun X, Wang M, Wang M, *et al.* Metabolic Reprogramming in Triple-Negative Breast Cancer. *Front Oncol.* 2020a;10:428. doi:10.3389/fonc.2020.00428

Sun X, Wang M, Wang M, *et al.* Exploring the Metabolic Vulnerabilities of Epithelial–Mesenchymal Transition in Breast Cancer. *Front Cell Dev Biol.* 2020b;8:655. doi:10.3389/fcell.2020.00655

Sun Y, Liu X, Zhang Q, *et al.* Oncogenic potential of TSTA3 in breast cancer and its regulation by the tumor suppressors miR-125a-5p and miR-125b. *Tumor Biol.* 2016;37(4):4963-4972. doi:10.1007/s13277-015-4178-4

Tan J, Song M, Zhou M, *et al.* Antibiotic tigecycline enhances cisplatin activity against human hepatocellular carcinoma through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2017;483(1):17-23. doi:10.1016/j.bbrc.2017.01.021

Thomson TM, Balcells C, Cascante M. Metabolic Plasticity and Epithelial-Mesenchymal Transition. *JCM.* 2019;8(7):967. doi:10.3390/jcm8070967

Timmerman LA, Holton T, Yuneva M, *et al.* Glutamine Sensitivity Analysis Identifies the xCT Antiporter as a Common Triple-Negative Breast Tumor Therapeutic Target. *Cancer Cell.* 2013;24(4):450-465. doi:10.1016/j.ccr.2013.08.020

Tomao S, Tomao F, Rossi L, *et al.* Triple-negative breast cancer: new perspectives for targeted therapies. *OTT.* Published online January 2015:177. doi:10.2147/OTT.S67673

Tonetti M, Sturla L, Bisso A, *et al.* Synthesis of GDP-L-fucose by the Human FX Protein. *Journal of Biological Chemistry.* 1996;271(44):27274-27279. doi:10.1074/jbc.271.44.27274

Usman S, Waseem NH, Nguyen TKN, *et al.* Vimentin Is at the Heart of Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) Mediated Metastasis. *Cancers.* 2021;13(19):4985. doi:10.3390/cancers13194985

Vangapandu HV, Alston B, Morse J, *et al.* Biological and metabolic effects of IACS-010759, an OxPhos inhibitor, on chronic lymphocytic leukemia cells. *Oncotarget.* 2018;9(38):24980-24991. doi:10.18632/oncotarget.25166

Varghese E, Samuel SM, Líšková A, *et al.* Targeting Glucose Metabolism to Overcome Resistance to Anticancer Chemotherapy in Breast Cancer. *Cancers*. 2020;12(8):2252. doi:10.3390/cancers12082252

Vlashi E, Lagadec C, Vergnes L, *et al.* Metabolic differences in breast cancer stem cells and differentiated progeny. *Breast Cancer Res Treat*. 2014;146(3):525-534. doi:10.1007/s10549-014-3051-2

Virtakoivu R, Mai A, Mattila E, *et al.* Vimentin-ERK signaling uncouples slug gene regulatory function. *Cancer Res*. 2015, 75, 2349–2362.

Vuoriluoto K, Haugen H, Kiviluoto S, *et al.* Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. *Oncogene* 2011, 30, 1436–1448.

Wang B, Ao J, Yu D, *et al.* Inhibition of mitochondrial translation effectively sensitizes renal cell carcinoma to chemotherapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017;490(3):767-773. doi:10.1016/j.bbrc.2017.06.115

Wang B, Tian T, Kalland KH, *et al.* Targeting Wnt/ β -Catenin Signaling for Cancer Immunotherapy. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2018;39(7):648-658. doi:10.1016/j.tips.2018.03.008

Wang B, Kohli J, Demaria M. Senescent Cells in Cancer Therapy: Friends or Foes? *Trends in Cancer*. 2020;6(10):838-857. doi:10.1016/j.trecan.2020.05.004

Wang J, Wu Y, Li Y, *et al.* Guanosine monophosphate synthase upregulation mediates cervical cancer progression by inhibiting the apoptosis of cervical cancer cells via the Stat3/P53 pathway. *Int J Oncol*. 2021;58(4):3. doi:10.3892/ijo.2021.5183

Wang JW, Ma L, Liang Y, *et al.* RCN1 induces sorafenib resistance and malignancy in hepatocellular carcinoma by activating c-MYC signaling via the IRE1 α -XBP1s pathway. *Cell Death Discov*. 2021;7(1):298. doi:10.1038/s41420-021-00696-6

Wang L, Zhang S, Wang X. The Metabolic Mechanisms of Breast Cancer Metastasis. *Front Oncol*. 2021;10:602416. doi:10.3389/fonc.2020.602416

Wang ML, Wu CW (Ken), Chiou SH. Targeting cancer stem cells: emerging role of Nanog transcription factor. *OTT*. Published online September 2013:1207. doi:10.2147/OTT.S38114

Wang T, Fahrmann JF, Lee H, *et al.* JAK/STAT3-Regulated Fatty Acid β -Oxidation Is Critical for Breast Cancer Stem Cell Self-Renewal and Chemoresistance. *Cell Metabolism*. 2018;27(1):136-150.e5. doi:10.1016/j.cmet.2017.11.001

Wang X, Pei X, Guo G, *et al.* Exosome-mediated transfer of long noncoding RNA H19 induces doxorubicin resistance in breast cancer. *Journal Cellular Physiology*. 2020;235(10):6896-6904. doi:10.1002/jcp.29585

Wang Z, Jiang Q, Dong C. Metabolic reprogramming in triple-negative breast cancer. *Cancer Biol Med*. 2020;17(1):44-59. doi:10.20892/j.issn.2095-3941.2019.0210

Wang J, Wu Y, Li Y, *et al.* Guanosine monophosphate synthase upregulation mediates cervical cancer progression by inhibiting the apoptosis of cervical cancer cells via the Stat3/P53 pathway. *Int J Oncol*. 2021;58(4):3. doi:10.3892/ijo.2021.5183

Warburg O. The Metabolism of Tumors. In: Constable & Co Ltd (1930).

Watson SS, Dane M, Chin K, *et al.* Microenvironment-Mediated Mechanisms of Resistance to HER2 Inhibitors Differ between HER2+ Breast Cancer Subtypes. *Cell Systems*. 2018;6(3):329-342.e6. doi:10.1016/j.cels.2018.02.001

Wilde L, Roche M, Domingo-Vidal M, *et al.* Metabolic coupling and the Reverse Warburg Effect in cancer: Implications for novel biomarker and anticancer agent development. *Seminars in Oncology*. 2017;44(3):198-203. doi:10.1053/j.seminoncol.2017.10.004

Willis, R.A. The spread of tumours in the human body. *Br. J. Surg.* (1934) 22, 196–196

Wise R, Zolkiewska A. Metalloprotease-dependent activation of EGFR modulates CD44+/CD24- populations in triple negative breast cancer cells through the MEK/ERK pathway. *Breast Cancer Res Treat*. 2017;166(2):421-433. doi:10.1007/s10549-017-4440-0

Winter M, Meignan S, Völkel P, *et al.* Vimentin Promotes the Aggressiveness of Triple Negative Breast Cancer Cells Surviving Chemotherapeutic Treatment. *Cells*. 2021;10(6):1504. doi:10.3390/cells10061504

Wu Y, Du H, Zhan M, *et al.* Sepiapterin reductase promotes hepatocellular carcinoma progression via FoxO3a/Bim signaling in a nonenzymatic manner. *Cell Death Dis*. 2020;11(4):248. doi:10.1038/s41419-020-2471-7

Wu Z, Wu J, Zhao Q, *et al.* Emerging roles of aerobic glycolysis in breast cancer. *Clin Transl Oncol*. 2020;22(5):631-646. doi:10.1007/s12094-019-02187-8

- Xiang L**, Semenza GL. Hypoxia-inducible factors promote breast cancer stem cell specification and maintenance in response to hypoxia or cytotoxic chemotherapy. In: *Advances in Cancer Research*. Vol 141. Elsevier; 2019:175-212. doi:10.1016/bs.acr.2018.11.001
- Xiong G**, Stewart RL, Chen J, *et al.* Collagen prolyl 4-hydroxylase 1 is essential for HIF-1 α stabilization and TNBC chemoresistance. *Nat Commun*. 2018;9(1):4456. doi:10.1038/s41467-018-06893-9
- Xu H**, Lin F, Wang Z, *et al.* CXCR2 promotes breast cancer metastasis and chemoresistance via suppression of AKT1 and activation of COX2. *Cancer Letters*. 2018;412:69-80. doi:10.1016/j.canlet.2017.09.030
- Xu W**, Yang Z, Lu N. A new role for the PI3K/Akt signaling pathway in the epithelial-mesenchymal transition. *Cell Adhesion & Migration*. 2015;9(4):317-324. doi:10.1080/19336918.2015.1016686
- Xu X**, Zhang M, Xu F, *et al.* Wnt signaling in breast cancer: biological mechanisms, challenges and opportunities. *Mol Cancer*. 2020;19(1):165. doi:10.1186/s12943-020-01276-5
- Yamashita, N.**, Tokunaga, E., Kitao, H., *et al.* Vimentin as a poor prognostic factor for triple-negative breast cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. 2013, 139, 739–746.
- Yang D**, Peng M, Hou Y, *et al.* Oxidized ATM promotes breast cancer stem cell enrichment through energy metabolism reprogram-mediated acetyl-CoA accumulation. *Cell Death Dis*. 2020;11(7):508. doi:10.1038/s41419-020-2714-7
- Yang L**, Liu B, Chen H, *et al.* Progress in the application of organoids to breast cancer research. *J Cell Mol Med*. 2020;24(10):5420-5427. doi:10.1111/jcmm.15216
- Yang J**, Antin P, Berx G, *et al.* Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(6):341-352. doi:10.1038/s41580-020-0237-9
- Yao D**, Dai C, Peng S. Mechanism of the Mesenchymal–Epithelial Transition and Its Relationship with Metastatic Tumor Formation. *Mol Cancer Res*. 2011;9(12):1608-1620. doi:10.1158/1541-7786.MCR-10-0568
- Yao H**, He S. Multi-faceted role of cancer-associated adipocytes in the tumor microenvironment (Review). *Mol Med Rep*. 2021;24(6):866. doi:10.3892/mmr.2021.12506
- Ye, F.**, Qiu, Y., Li, L., *et al.* The presence of EpCAM⁻/CD49f⁺ cells in breast cancer is associated with a poor clinical outcome. *J. Breast Cancer* 2015, 18, 242–248.

Ye X, Tam WL, Shibue T, *et al.* Distinct EMT programs control normal mammary stem cells and tumour-initiating cells. *Nature*. 2015;525(7568):256-260. doi:10.1038/nature14897

Yenmis G, Yaprak Sarac E, Besli N, *et al.* Anti-cancer effect of metformin on the metastasis and invasion of primary breast cancer cells through mediating NF-kB activity. *Acta Histochemica*. 2021;123(4):151709. doi:10.1016/j.acthis.2021.151709

Yin L, Duan JJ, Bian XW, *et al.* Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Res*. 2020;22(1):61. doi:10.1186/s13058-020-01296-5

Yu H, Lee H, Herrmann A, *et al.* Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(11):736-746. doi:10.1038/nrc3818

Zaal EA, Berkers CR. The Influence of Metabolism on Drug Response in Cancer. *Front Oncol*. 2018;8:500. doi:10.3389/fonc.2018.00500

Zhang F, Aft R. Chemosensitizing and cytotoxic effects of 2-deoxy-D-glucose on breast cancer cells. *J Can Res Ther*. 2009;5(9):41. doi:10.4103/0973-1482.55140

Zhang J, Wang Z, Hu X, *et al.* Cisplatin and gemcitabine as the first line therapy in metastatic triple negative breast cancer: Cisplatin and Gemcitabine as first line therapy in mTNBC. *Int J Cancer*. 2015;136(1):204-211. doi:10.1002/ijc.28966

Zhang L, Li Y, Wang Q, *et al.* The PI3K subunits, P110 α and P110 β are potential targets for overcoming P-gp and BCRP-mediated MDR in cancer. *Mol Cancer*. 2020;19(1):10. doi:10.1186/s12943-019-1112-1

Zhang L, Gao Y, Zhang X, *et al.* TSTA3 facilitates esophageal squamous cell carcinoma progression through regulating fucosylation of LAMP2 and ERBB2. *Theranostics*. 2020;10(24):11339-11358. doi:10.7150/thno.48225

Zhang N, Zhang H, Liu Y, *et al.* SREBP1, targeted by miR-18a-5p, modulates epithelial-mesenchymal transition in breast cancer via forming a co-repressor complex with Snail and HDAC1/2. *Cell Death Differ*. 2019;26(5):843-859. doi:10.1038/s41418-018-0158-8

Zhang X, Chen Y, Wang K, *et al.* The knockdown of the sepiapterin reductase gene suppresses the proliferation of breast cancer by inducing ROS-mediated apoptosis. *Int. J. Exp. Pathol*. 2020;13(9):2228-2239

Zhang Y, Zhang H, Wang M, *et al.* Hypoxia in Breast Cancer—Scientific Translation to Therapeutic and Diagnostic Clinical Applications. *Front Oncol.* 2021;11:652266. doi:10.3389/fonc.2021.652266

Zhao, W., Li, Y.; Zhang, X. Stemness-related markers in cancer. *Cancer Transl. Med.* 2017, 3, 87–95.

Zhou M, Zhao Y, Ding Y, *et al.* Warburg effect in chemosensitivity: Targeting lactate dehydrogenase-A re-sensitizes Taxol-resistant cancer cells to Taxol. *Mol Cancer.* 2010;9(1):33. doi:10.1186/1476-4598-9-33

Zhu K, Li Y, Deng C, *et al.* Significant association of PKM2 and NQO1 proteins with poor prognosis in breast cancer. *Pathology - Research and Practice.* 2020;216(11):153173. doi:10.1016/j.prp.2020.153173

Zhu QS, Rosenblatt K, Huang KL, *et al.* Vimentin is a novel AKT1 target mediating motility and invasion. *Oncogene.* 2011;30(4):457-470. doi:10.1038/onc.2010.421

Zhu X, Zhou W. The Emerging Regulation of VEGFR-2 in Triple-Negative Breast Cancer. *Front Endocrinol.* 2015;6. doi:10.3389/fendo.2015.00159

Zhu X, Rao X, Yao W, Zou X. Downregulation of MiR-196b-5p impedes cell proliferation and metastasis in breast cancer through regulating COL1A. *Am. J. Transl. Res.* 2018;10(10):3122-3132

Zumwalde NA, Haag JD, Sharma D, *et al.* Analysis of Immune Cells from Human Mammary Ductal Epithelial Organoids Reveals V δ 2⁺ T Cells That Efficiently Target Breast Carcinoma Cells in the Presence of Bisphosphonate. *Cancer Prev Res.* 2016;9(4):305-316. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-15-0370-T

Annexes

Annexe 1. Liste des protéines dont l'expression est augmentée d'au moins 100% dans les MDA-MB-231 persistantes comparés aux cellules contrôles. Les cellules sont cultivées en présence de 2% de sérum.

Protéine	Symbol	Identifiant Uniprot	% d'augmentation	p value
THUMP domain-containing protein 1	THUMPD1	Q9NXG2	286,49	0,00968702
Metallothionein-1E;Metallothionein-1F;Metallothionein-1B;Metallothionein-1L	MT1E; MT1F; MT1B; MT1L	P04732;P04733;P07438;Q93083	234,31	5,25E-06
Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha	PMPCA	Q10713	226,46	4,01E-06
Heme oxygenase 1	HMOX1	P09601	216,61	2,84E-11
Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1, mitochondrial	OXCT1	P55809	178,66	0,0015372
Periodic tryptophan protein 2 homolog	PWP2	Q15269	165,72	0,00413745
E3 ubiquitin-protein ligase RNF114	RNF114	Q9Y508	145,47	0,01629289
Cytidine deaminase	CDA	P32320	138,91	5,92E-11
Protein NipSnap homolog 1	NIPSNAP1	Q9BPW8	128,26	0,00571123

Annexe 1, suite.

Protéine	Symbol	Identifiant Uniprot	% d'augmentation	p value
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit gamma, mitochondrial	IDH3G	P51553	127,21	9,56E-08
Core-binding factor subunit beta	CBFB	Q13951	124,74	0,00534884
Emerin	EMD	P50402	117,60	2,88E-10
Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	HPRT1	P00492	114,04	6,63E-18
Beta-2-syntrophin	SNTB2	Q13425	112,40	0,00830491
Elongation factor 1-alpha 2	EEF1A2	Q05639	109,61	2,77E-14
KRR1 small subunit processome component homolog	KRR1	Q13601	106,92	1,19E-05
Cytochrome c oxidase copper chaperone	COX17	Q14061	103,27	0,00049639

Annexe 2. Liste des protéines dont l'expression est augmentée d'au moins 100% dans les MDA-MB-231 persistantes comparés aux cellules contrôles. Les cellules sont cultivées en absence de sérum.

Protéine	Symbol	Identifiant Uniprot	% d'augmentation	p value
Periodic tryptophan protein 2 homolog	PWP2	Q15269	282,55	0,01568462
Cytidine deaminase	CDA	P32320	248,96	7,08E-09
Nicotinamide N-methyltransferase	NNMT	P40261	236,98	7,90E-11
Protein NipSnap homolog 1	NIPSNAP1	Q9BPW8	215,73	9,04E-06
Elongation factor 1-alpha 2	EEF1A2	Q05639	196,20	0,00013326
Tryptophan 2,3-dioxygenase	TDO2	P48775	193,12	2,28E-10
Saccharopine dehydrogenase-like oxidoreductase	SCCPDH	Q8NBX0	158,90	4,03E-05
Hepatoma-derived growth factor-related protein 2	HDGFL2	Q7Z4V5	156,35	0,01135617
Ribosome production factor 2 homolog	RPF2	Q9H7B2	134,10	1,04E-09
Aldo-keto reductase family 1 member C1	AKR1C1	Q04828	130,61	2,05E-25
NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1	NQO1	P15559	127,62	2,32E-23
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit gamma, mitochondrial	IDH3G	P51553	125,28	1,29E-06
Vacuolar protein sorting-associated protein 4A	VPS4A	Q9UN37	114,12	6,25E-05
Kinesin-like protein KIF2C	KIF2C	Q99661	105,55	3,77E-06
Translation initiation factor eIF-2B subunit delta	EIF2B4	Q9UI10	102,80	1,21E-05

Annexe 3. Liste des protéines dont l'expression est augmentée d'au moins 100% dans les SUM159-PT persistantes comparés aux cellules contrôles. Les cellules sont cultivées en présence de 2% de sérum.

Protéine	Symbol	Identifiant Uniprot	% d'augmentation	p value
P antigen family member 5	PAGE5	Q96GU1	1242,48	1,31E-11
Vesicle-associated membrane protein 8	VAMP8	Q9BV40	479,99	0,00357164
Ubiquitin/ISG15-conjugating enzyme E2 L6	UBE2L6	O14933	316,12	0,03304558
Serum amyloid A-1 protein	SAA1	PODJI8	242,78	1,22E-08
5'-nucleotidase	NT5E	P21589	238,44	0,00758911
Apolipoprotein L2	APOL2	Q9BQE5	233,70	0,00609932
NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	NDUFS1	P28331	221,14	1,85E-08
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 C	UBE2C	O00762	203,29	0,00012117
Dihydrofolate reductase	DHFR	P00374	172,23	0,01631323
E3 ubiquitin-protein ligase RNF114	RNF114	Q9Y508	169,22	0,00196674
Unconventional myosin-1c	MYO1C	O00159	157,07	0,0019366
Zinc finger protein 638	ZNF638	Q14966	152,18	0,01367814
Tight junction protein ZO-2	TJP2	Q9UDY2	149,58	9,49E-05
Sepiapterin reductase	SPR	P35270	149,54	4,54E-28
Atlastin-2	ATL2	Q8NHH9	147,68	2,12E-05
Dolichol-phosphate mannosyltransferase subunit 1	DPM1	O60762	146,22	0,00683312
DNA polymerase epsilon subunit 3	POLE3	Q9NRF9	133,78	2,65E-06

Annexe 3, Suite.

Protéine	Symbol	Identifiant Uniprot	% d'augmentation	p value
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mitochondrial	NDUFA9	Q16795	130,12	6,07E-08
tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase non-catalytic subunit TRM6	TRMT6	Q9UJA5	128,83	0,01159787
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex assembly factor 2	NDUFAF2	Q8N183	128,69	0,00285926
Ankyrin repeat domain-containing protein 17	ANKRD17	O75179	128,54	0,00834248
Thymosin beta-10	TMSB10	P63313	128,28	0,00732008
GDP-L-fucose synthase	TSTA3	Q13630	126,32	0,00118305
Pleckstrin homology-like domain family B member 2	PHLDB2	Q86SQ0	125,93	0,00492673
Catalase	CAT	P04040	125,75	2,19E-07
Spartin	SPART	Q8N0X7	124,31	3,85E-07
AFG3-like protein 2	AFG3L2	Q9Y4W6	119,45	0,01078992
Lysosomal Pro-X carboxypeptidase	PRCP	P42785	116,46	0,00034654
39S ribosomal protein L41, mitochondrial	MRPL41	Q8IXM3	114,19	0,00121023
WASH complex subunit 5	WASHC5	Q12768	110,72	0,00498952

Annexe 3, Suite.

Protéine	Symbol	Identifiant Uniprot	% d'augmentation	p value
Vacuolar ATPase assembly integral membrane protein VMA21	VMA21	Q3ZAQ7	109,53	0,00035118
U3 small nucleolar RNA-interacting protein 2	RRP9	O43818	107,97	0,00592693
HIV Tat-specific factor 1	HTATSF1	O43719	107,84	0,04980573
ATP-binding cassette sub-family F member 2	ABCF2	Q9UG63	102,91	2,72E-09
Collagen alpha-1(I) chain	COL1A1	P02452	102,74	1,54E-06
Serine/threonine-protein kinase 10	STK10	O94804	101,10	0,00613093
NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	NDUFV2	P19404	100,70	2,71E-06

Annexe 4. Liste des protéines dont l'expression est augmentée d'au moins 100% dans les SUM159-PT persistantes comparés aux cellules contrôles. Les cellules sont cultivées en absence de sérum.

Protéine	Symbol	Identifiant Uniprot	% d'augmentation	p value
P antigen family member 5	PAGE5	Q96GU1	926,83	2,14E-11
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 C	UBE2C	O00762	292,58	6,49E-08
Keratin, type II cytoskeletal 79	KRT79	Q5XKE5	284,75	4,65E-08
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mitochondrial	NDUFA9	Q16795	249,83	7,48E-11
DNA ligase 1	LIG1	P18858	231,20	8,04E-10
Pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase	PCBD1	P61457	224,22	1,81E-15
Lactotransferrin	LTF	P02788	220,31	1,19E-08
Serum amyloid A-1 protein	SAA1	P0DJ18	196,99	0,01171049
Tensin-3	TNS3	Q68CZ2	185,20	0,00107564
WD repeat-containing protein 61	WDR61	Q9GZS3	174,20	0,00026737
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5	NDUFA5	Q16718	161,27	3,67E-12
Aldo-keto reductase family 1 member C2	AKR1C2	P52895	160,72	1,23E-13
Protein S100-A2	S100A2	P29034	146,88	0,00145854
E3 ubiquitin-protein ligase RNF114	RNF114	Q9Y508	136,29	0,0133687
Alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG	P02765	133,87	0,00053495
NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	NDUFV2	P19404	130,92	3,87E-06
Cytochrome b5	CYB5A	P00167	124,42	4,50E-16
Phospholipase A-2-activating protein	PLAA	Q9Y263	120,50	0,00027727

Annexe 4, Suite.

Protéine	Symbol	Identifiant Uniprot	% d'augmentation	p value
Glutaredoxin-1	GLRX	P35754	118,14	2,40E-07
Unconventional myosin-1c	MYO1C	O00159	113,88	0,00234477
Nicotinamide phosphoribosyltransferase	NAMPT	P43490	111,40	1,21E-05
Cell growth-regulating nucleolar protein	LYAR	Q9NX58	107,59	8,26E-07
Glycogenin-1	GYG1	P46976	105,01	0,00311558
FAST kinase domain-containing protein 4	TBRG4	Q969Z0	104,35	3,63E-07
Catalase	CAT	P04040	104,04	3,66E-07
Inactive ribonuclease-like protein 10	RNASE10	Q5GAN6	102,55	5,39E-07
DNA dC->dU-editing enzyme APOBEC-3C	APOBEC3C	Q9NRW3	102,07	1,48E-05

Annexe 5 (Figures 1-3). Fonctions moléculaires, processus biologiques et voies de signalisation majeures enrichies dans les cellules MDA-MB-231 persistantes. Les cellules sont cultivées en présence de 2% de sérum.

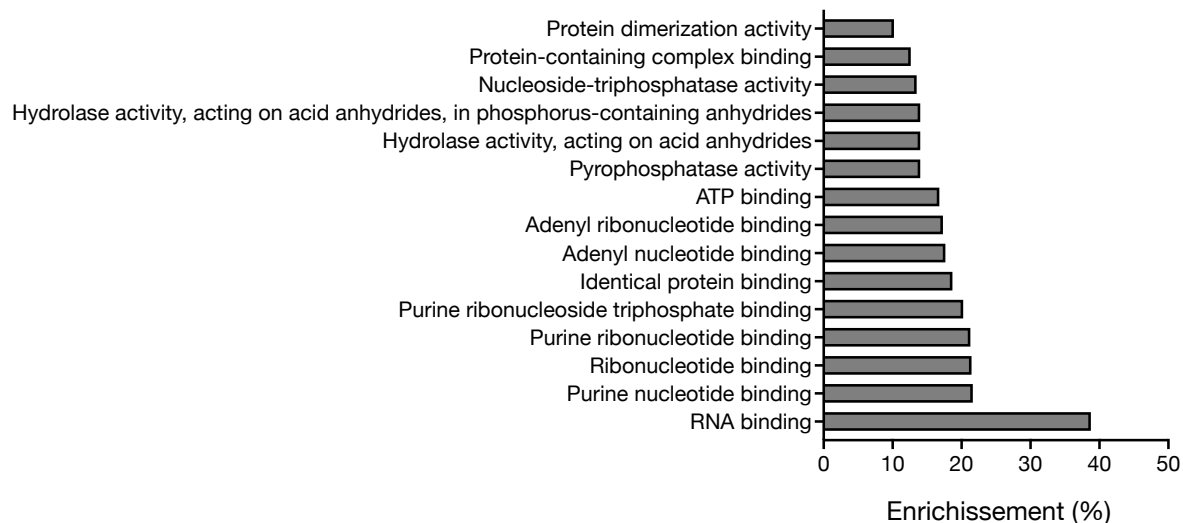


Figure 1. Les 15 fonctions moléculaires les plus enrichies dans les cellules MDA-MB-231 persistantes. L'enrichissement correspond au nombre de protéines identifiées dans la fonction moléculaire, rapporté au nombre total de protéines (578) dont l'expression est significativement augmentée. L'analyse est réalisée à l'aide du site Toppgene.

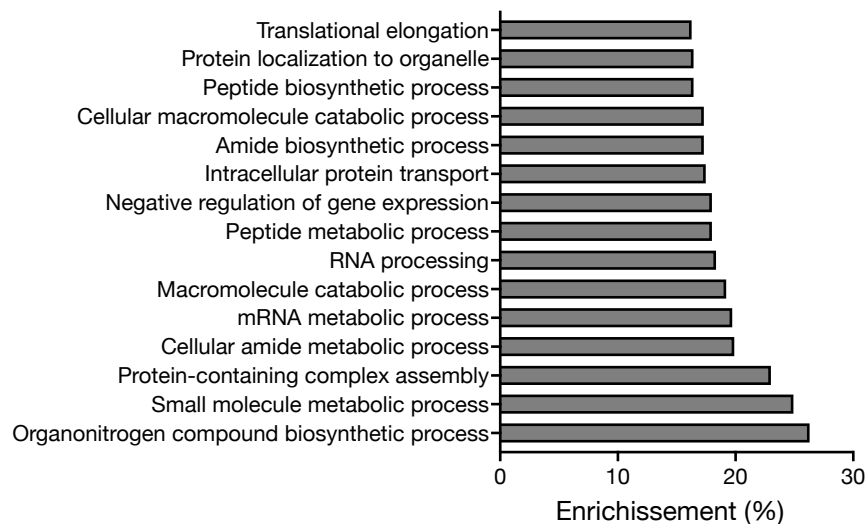


Figure 2. Les 15 processus biologiques les plus enrichies dans les cellules MDA-MB-231 persistantes. L'enrichissement correspond au nombre de protéines identifiées dans le processus biologique rapporté au nombre total de protéines (578) dont l'expression est significativement augmentée. L'analyse est réalisée à l'aide du site Toppgene.

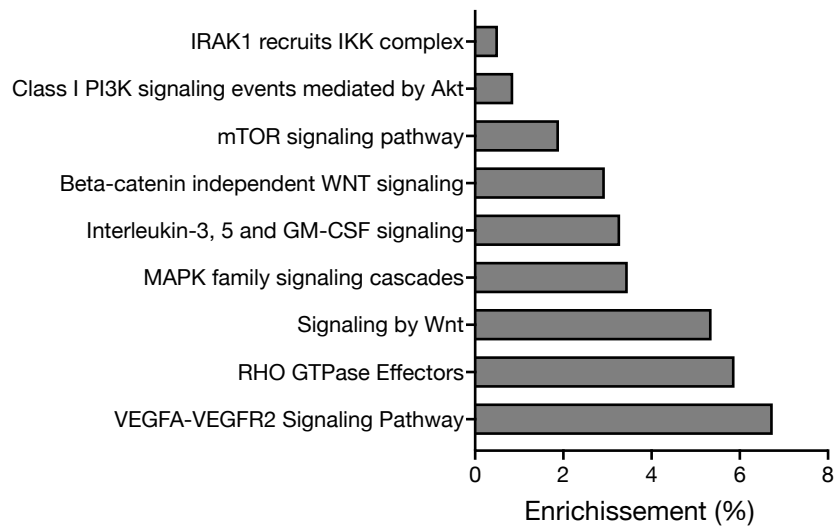


Figure 3. Voies de signalisation majeures enrichies dans les cellules MDA-MB-231 persistantes. L'enrichissement correspond au nombre de protéines identifiées dans la voie de signalisation rapporté au nombre total de protéines (578) dont l'expression est significativement augmentée. L'analyse est réalisée à l'aide du site Toppgene.

Annexe 6 (Figures 4-6). Fonctions moléculaires, processus biologiques et voies de signalisation majeures enrichies dans les cellules MDA-MB-231 persistantes. Les cellules sont cultivées en absence de sérum.

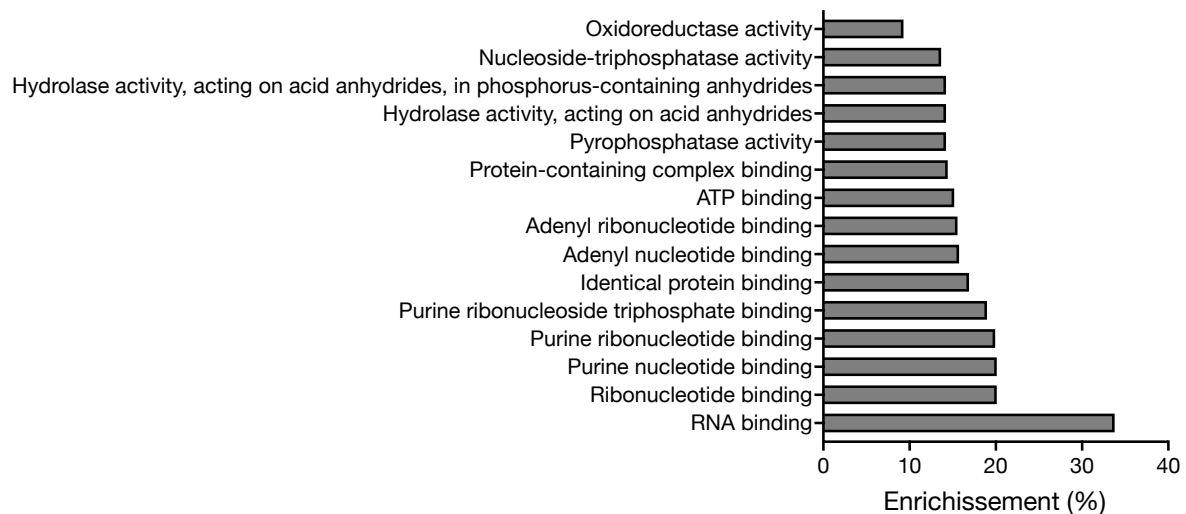


Figure 4. Les 15 fonctions moléculaires les plus enrichies dans les cellules MDA-MB-231 persistantes. L'enrichissement correspond au nombre de protéines identifiées dans la fonction moléculaire, rapporté au nombre total de protéines (527) dont l'expression est significativement augmentée. L'analyse est réalisée à l'aide du site Toppgene.

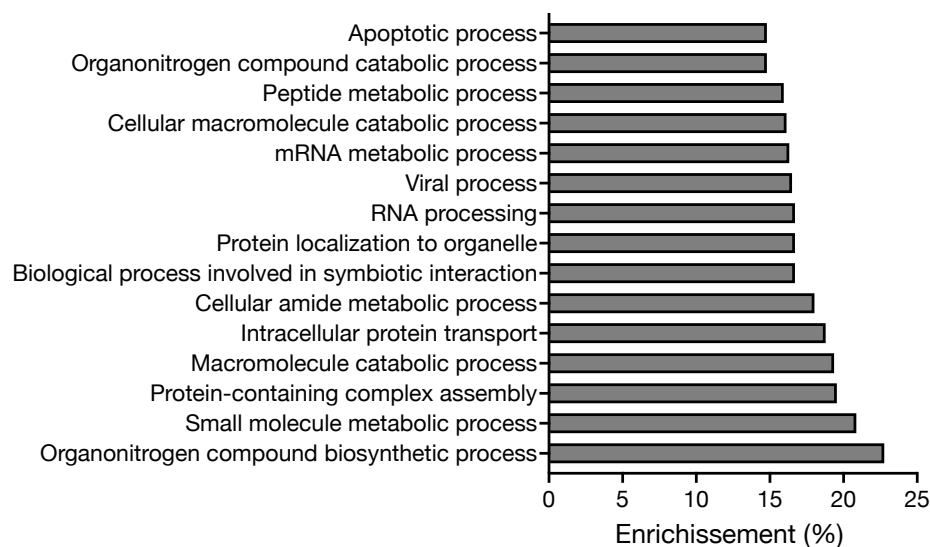


Figure 5. Les 15 processus biologiques les plus enrichies dans les cellules MDA-MB-231 persistantes. L'enrichissement correspond au nombre de protéines identifiées dans le processus biologique rapporté au nombre total de protéines (527) dont l'expression est significativement augmentée. L'analyse est réalisée à l'aide du site Toppgene.

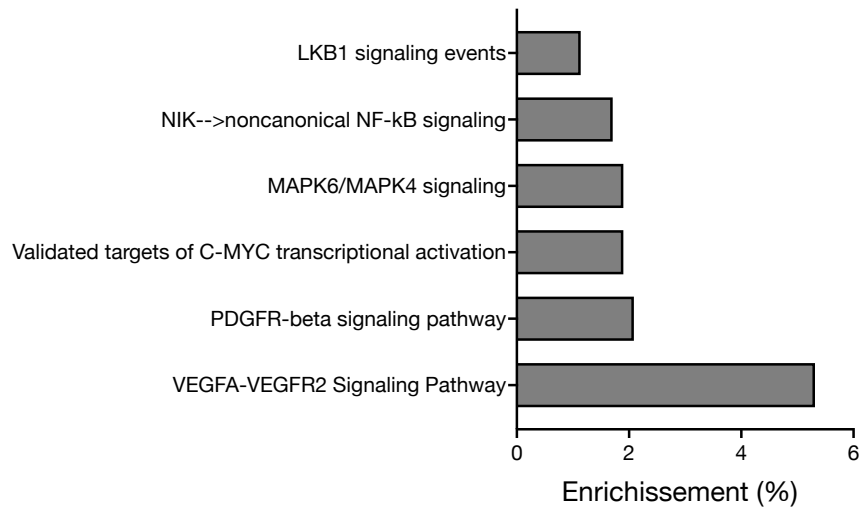


Figure 6. Voies de signalisation majeures enrichies dans les cellules MDA-MB-231 persistantes. L'enrichissement correspond au nombre de protéines identifiées dans la voie de signalisation rapporté au nombre total de protéines (527) dont l'expression est significativement augmentée. L'analyse est réalisée à l'aide du site Toppgene.

Annexe 7 (Figures 7-9). Fonctions moléculaires, processus biologiques et voies de signalisation majeures enrichies dans les cellules SUM159-PT persistantes. Les cellules sont cultivées en présence de 2% de sérum.

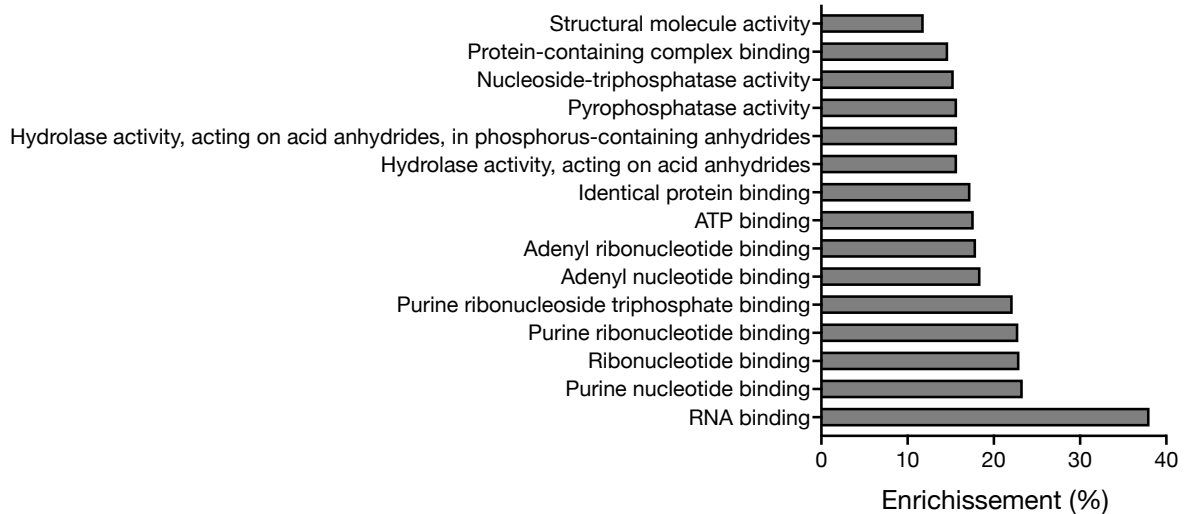


Figure 7. Les 15 fonctions moléculaires les plus enrichies dans les cellules SUM159-PT persistantes. L'enrichissement correspond au nombre de protéines identifiées dans la fonction moléculaire, rapporté au nombre total de protéines (775) dont l'expression est significativement augmentée. L'analyse est réalisée à l'aide du site Toppgene.

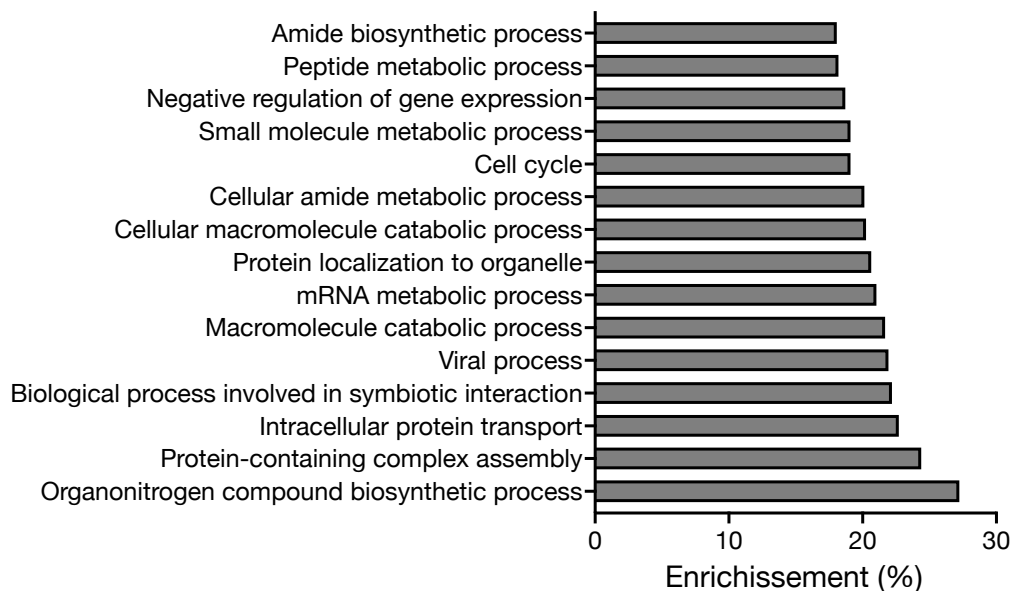


Figure 8. Les 15 processus biologiques les plus enrichies dans les cellules SUM159-PT persistantes. L'enrichissement correspond au nombre de protéines identifiées dans le processus biologique rapporté au nombre total de protéines (775) dont l'expression est significativement augmentée. L'analyse est réalisée à l'aide du site Toppgene.

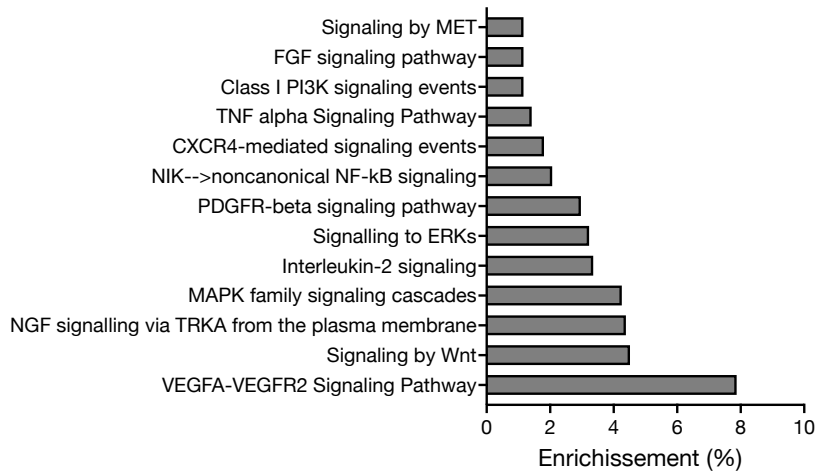


Figure 9. Voies de signalisation majeures enrichies dans les cellules SUM159-PT persistantes. L'enrichissement correspond au nombre de protéines identifiées dans la voie de signalisation rapporté au nombre total de protéines (775) dont l'expression est significativement augmentée. L'analyse est réalisée à l'aide du site Toppgene.

Annexe 8 (Figures 10-12). Fonctions moléculaires, processus biologiques et voies de signalisation majeures enrichies dans les cellules SUM159-PT persistantes. Les cellules sont cultivées en absence de sérum.

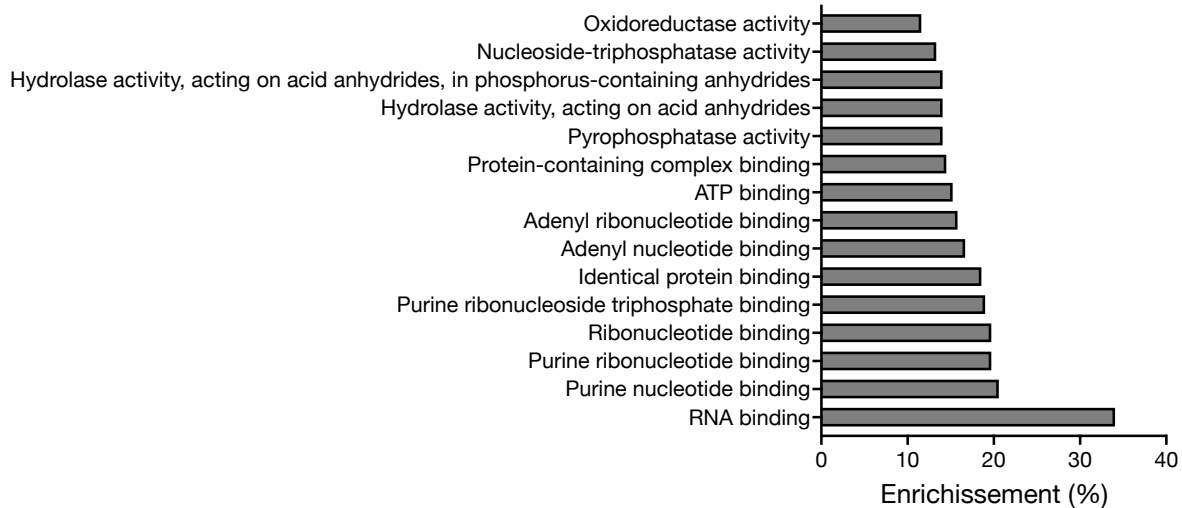


Figure 10. Les 15 fonctions moléculaires les plus enrichies dans les cellules SUM159-PT persistantes. L'enrichissement correspond au nombre de protéines identifiées dans la fonction moléculaire, rapporté au nombre total de protéines (690) dont l'expression est significativement augmentée. L'analyse est réalisée à l'aide du site Toppgene.

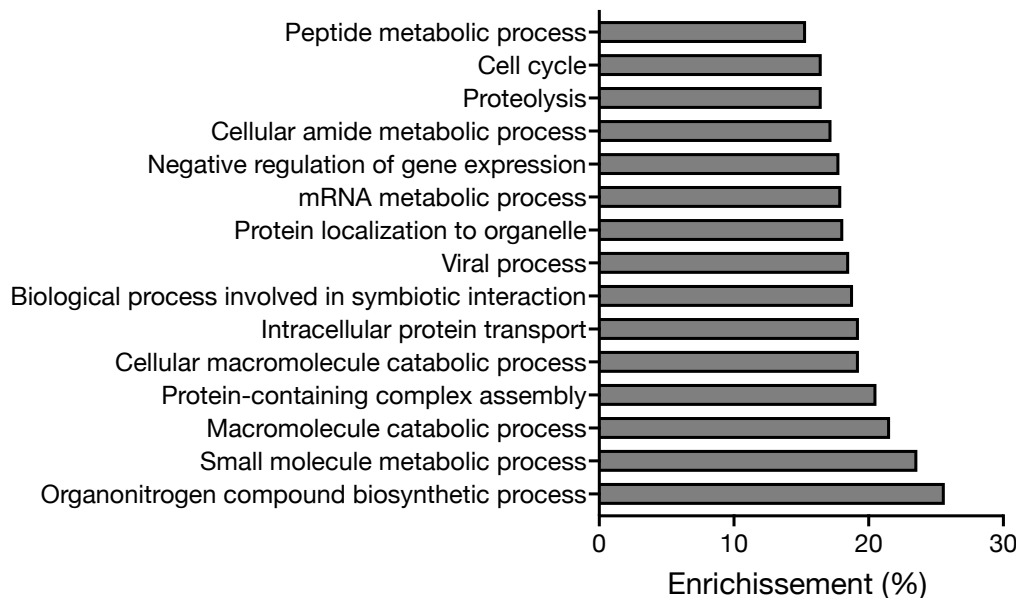


Figure 11. Les 15 processus biologiques les plus enrichies dans les cellules SUM159-PT persistantes. L'enrichissement correspond au nombre de protéines identifiées dans le processus biologique rapporté au nombre total de protéines (690) dont l'expression est significativement augmentée. L'analyse est réalisée à l'aide du site Toppgene.

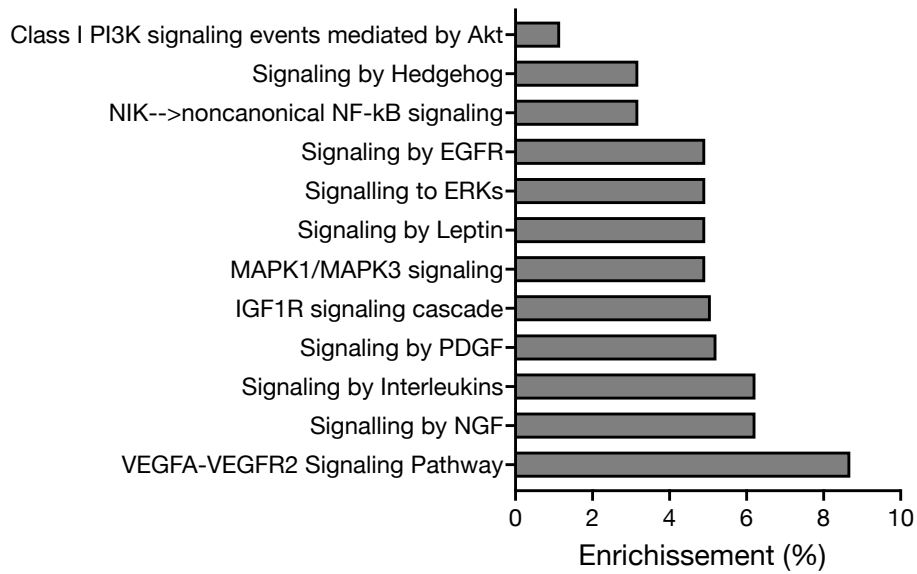


Figure 12. Voies de signalisation majeures enrichies dans les cellules SUM159-PT persistantes. L'enrichissement correspond au nombre de protéines identifiées dans la voie de signalisation rapporté au nombre total de protéines (690) dont l'expression est significativement augmentée. L'analyse est réalisée à l'aide du site Toppgene.

Annexe 9. Analyse de réseau d'interactions protéiques. L'analyse est réalisée à l'aide des algorithmes IPCA et ClusterOne de la suite Cytocluster du logiciel cytoscape.

IPCA Network (p value)	ClusterOne sub-network analysis				
	Cluster	Protein list	Density	Quality	p value
Network 1 (1,18E-05)	Cluster 1	TSTA3, COASY, GLRX3, EFHD2, RCN1, GMPS	0.93	0.778	0.002
	Cluster 2	TSTA3, COASY, GMDS, BAG3, GALE, MAT2B	0.667	0.58	0.035
Network 2 (3,14E-05)	Cluster 3	TSTA3, GMDS, GALE, MAT2B, BAG3, GMPS, COASY	0.57	0.8	0.001
	Cluster 4	TSTA3, MAT2B, GMDS, NDUFA9, BAG3, GALE, COASY	0.52	0.733	0.003
Network 3 (3,05E-05)	Cluster 5	TSTA3, GALE, MAT2B, BAG3, NTMT1, COASY, GMPS, GLRX3	0.5	0.87	0.0004
	Cluster 6	TSTA3, MAT2B, GMDS, NDUFA9, BAG3, GALE, COASY	0.52	0.68	0.005
Network 4 (3,17E-05)	Cluster 7	TSTA3, BAG3, MAT2B, GALE, NEDD4, COASY, GLRX3, GMPS	0.5	0.87	0.0004
	Cluster 8	TSTA3, MAT2B, GMDS, NDUFA9, BAG3, GALE, COASY	0.5	0.68	0.005
Network 5 (7,97E-05)	Cluster 9	TSTA3, BAG3, MAT2B, GALE, PCBP3, GMPS, COASY	0.52	0.84	0.001
	Cluster 10	TSTA3, COASY, BAG3, GMDS, NDUFA9, MAT2B, GALE	0.52	0.78	0.002
Network 6 (2,02E-04)	Cluster 11	TSTA3, GALE, MAT2B, GMDS, BAG3, COASY, GMPS	0.57	0.72	0.0006
	Cluster 12	TSTA3, GALE, MAT2B, BAG3, DNAJC9, COASY, GMPS	0.52	0.84	0.001
Network 7 (2,02E-04)	Cluster 13	TSTA3, STAT6, COASY, GALE, BAG3, GMDS, MAT2B	0.52	0.91	0.0008
	Cluster 14	TSTA3, COASY, GALE, BAG3, GMDS, MAT2B, NDUFA9	0.52	0.91	0.0008

Annexe 10. Liste des métabolites identifiés dans les cellules MDA-MB-231 persistantes et contrôles. Le tableau montre le ratio (en %) de la concentration de chaque métabolite.

Voie métabolique	Métabolites	Ratio d'expression persistantes/contrôles (%)	p value
Glycolyse	3-phosphoglycérate acid	226	0,04
	Fructose1,6-biphosphate	186	0,27
	Hexose	81	0,49
	Hexose phosphate	222	0,026
	L-Lactic acid	91	0,65
	Phosphoenolpyruvic acid	191	0,04
	Glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase	112	0,86
	Pyruvic acid	149	0,03
Cycle de Krebs	Citric acid	101	0,95
	Fumaric acid	118	0,68
	Malic acid	78	0,78
	α-cetoglutaric acid	192	0,04
	Succinic acid	199	0,02
Acides aminés	γ-Aminobutyric acid	157	0,04
	Glycine	87	0,42
	IleLeu	100	0,98
	L-Alanine	131	0,17
	L-Arginine	152	0,002
	L-Asparagine	144	0,25
	L-Cyteine	89	0,57
	Glutamic acid	149	0,06
	L-Glutamine	56	0,04
	L-Histidine	81	0,41
	L-Lysine	141	0,07
	L-Methionine	92	0,72
	L-Phenylalanine	74	0,13
	L-Proline	76	0,19
L-Serine	82	0,28	

Annexe 10, Suite.

Voie métabolique	Métabolites	Ratio d'expression persistantes/contrôles (%)	p value
Acides aminés	L-Threonine	93	0,72
	L-Valine	85	0,41
	Acid pyroglutamic	111	0,49
	Taurine	101	0,93
	L-Tyrosine	83	0,4
	N-Acetyl aspartate	69	0,02
	Aspartic acid	166	0,006
	Argininosuccinic acid	63	0,73
	L-Citruline	92	0,73
Nucléotides	AMP (Adénosine mono-phosphate)	65	0,29
	ADP (Adénosine di-phosphate)	93	0,72
	ATP (Adénosine tri-phosphate)	166	0,06
	dATP (déoxyAdénine tri-phosphate)	114	0,58
	CMP (Cytidine mono-phosphate)	231	0,35
	CDP (Cytidine di-phosphate)	122	0,46
	CTP (Cytidine tri-phosphate)	113	0,56
	GMP (Guanoside mono-phosphate)	192	0,29
	GDP (Guanoside di-phosphate)	131	0,34
	GTP (Guanoside tri-phosphate)	111	0,67
	Uridine	321	0,00002
	UTP (Uridine tri-phosphate)	107	0,76

Annexe 10, Suite.

Voie métabolique	Métabolites	Ratio d'expression persistantes/contrôles (%)	p value
Nucléotide-ose	Uridine diphosphate hexose	163	0,24
	Uridine diphosphate-N-acetylglucosamine	109	0,71
	Uridine diphosphate glucuronic acid	160	0,63
Oxydo-reduction	Glutathione	88	0,53
	Methionine sulfoxide	98	0,92
	NADH (nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen)	111	0,78
	Oxidized glutathione	91	0,69
	NAD (nicotinamide adenine dinucleotide)	98	0,94