



HAL
open science

Microchimérisme foetal dans le cancer du sein

Kamila Kolanska

► **To cite this version:**

Kamila Kolanska. Microchimérisme foetal dans le cancer du sein. Sciences du Vivant [q-bio]. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT : 2023SORUS754 . tel-04715170

HAL Id: tel-04715170

<https://theses.hal.science/tel-04715170v1>

Submitted on 30 Sep 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.

THESE DE DOCTORAT DE SORBONNE UNIVERSITE

École doctorale 394 – Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

réalisée au sein de l'UMR_S938 Inserm-Sorbonne Université

Biologie et thérapeutiques du cancer

directeur : Docteur Michèle Sabbah

Microchimérisme fœtal dans le cancer du sein

présentée par

Kamila Kolanska

dirigée par

le Pr Nathalie Chabbert-Bufferet

soutenue publiquement le 22 septembre 2023

Jury composé de

Mme Virginie Rouiller-Fabre

M. Romain Fontaine

Mme Anne-Sophie Bats

M. Selim Aractingi

Mme Michèle Sabbah

Mme Suzette Delalogue

Mme Nathalie Chabbert-Bufferet

Professeur

Professeur Associé

Professeur

Professeur

Directeur de Recherche

Docteur

Professeur

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Avant tout je souhaite remercier Madame la Professeur Nathalie Chabbert-Buffer, la directrice de ma thèse et surtout mon mentor depuis plus de dix ans. Depuis que vous m'avez pris sous vos ailes, nous avons accompli plein de beaux projets. Je vous admire pour votre regard critique, votre expertise, vos capacités à transmettre les connaissances et votre humanité et accessibilité. Je vous suis très reconnaissante pour vos conseils, accompagnement et soutien tout au long de ma carrière.

Je voudrais remercier Monsieur le Professeur Romain Fontaine, le rapporteur de cette thèse, de me faire honneur de juger mon travail. Je te remercie pour tes remarques et conseils précieux.

Je remercie également Madame le Professeur Anne-Sophie Bats, le rapporteur de cette thèse, pour votre disponibilité et votre soutien lors de ma soutenance de mi-parcours.

Je remercie Madame la Professeur Virginie Rouiller-Fabre, la présidente du jury, de me faire l'honneur de juger mon travail. Je vous exprime mon profond respect pour tout votre travail de recherche et d'encadrement. Votre engagement dans le Master 2 Reprodev et vos encouragements lors de ma soutenance de mémoire m'ont inspiré énormément de motivation pour continuer la recherche fondamentale.

Je remercie Monsieur le Professeur Selim Aractingi d'avoir accepté de faire partie du jury. Je vous remercie pour nos échanges lors de mon travail de Master 2 et votre aide dans la conception de mon projet de thèse. Vos encouragements lors de mon travail de Master 2 étaient très précieuses. Merci pour toute votre confiance.

Je remercie Madame la Directrice de Recherche, Michèle Sabbah, la directrice du laboratoire d'accueil où j'ai réalisé ma thèse. Merci beaucoup pour tes conseils et tous les échanges que nous avons pu avoir au sujet de ma thèse et pas que. J'apprécie ton humanité, ton expérience et ton esprit ouvert.

Je souhaite remercier Madame la Docteur Suzette Delalogue, le membre du jury, de me faire un immense honneur de juger mon travail.

Je voudrais remercier les trois étudiants en Master 2 qui ont pleinement contribué à ce travail, Camille Carrière, Marjolaine le Gac et Merwane Roche. C'était un énorme plaisir de vous diriger. Vous avez effectué un immense travail et je vous remercie pour votre implication et votre aide précieuse. J'adresse mes encouragements plus particulièrement à Merwane qui souhaite poursuivre le double cursus. Je transmets toutes mes amitiés à Camille qui a décidé de poursuivre sa carrière de gynécologue en quittant la région parisienne et à Marjolaine qui poursuit l'activité gynécologique dans le même service que moi.

Dans le même sens, je remercie Nathalie Ferrand, Maurice Zaoui et Mehdi Morel pour toute votre précieuse aide et les conseils au laboratoire. Votre accompagnement était incroyablement important dans le déroulement de ce projet et je vous en suis totalement reconnaissante.

Je remercie Madame la Docteur Justine Varinot pour toute la collaboration que nous avons pu avoir depuis plusieurs années. Ton expertise histopathologique était indispensable dans la réalisation de mes projets de Master 2 et de ma Thèse. J'espère que notre collaboration va pouvoir continuer.

Je remercie Monsieur le Professeur Arsène Mekinian pour tous les échanges et l'accompagnement dans ma thèse de médecine et dans les projets de recherche clinique. Ton expérience et tes connaissances m'impressionnent toujours.

Je remercie Monsieur le Professeur Jean-Marie Jouannic pour ces premiers encouragements que j'ai pu entendre étant une jeune interne. Je vous remercie pour votre soutien et votre confiance.

Je remercie l'ensemble de l'équipe hospitalière du Service de Gynécologie Obstétrique et Médecine de la Reproduction de l'Hôpital Tenon où j'effectue mon activité clinique. Je remercie plus particulièrement Madame la Docteur Lise Selleret. Tu es quelqu'un d'exceptionnel, pleine de ressources et de volonté, une vraie « encyclopédie marchante ». C'était un vrai bonheur de partager le bureau avec toi lors de mon travail de thèse. Tu m'as toujours soutenue et je t'en remercie de tout mon coeur. Je souhaite également remercier Madame la Docteur Emmanuelle Mathieu d'Argent pour ton soutien et ton expertise clinique. Ton engagement dans la prise en charge de patientes et ton énergie débordante redonne sens au travail hospitalier. Je remercie Madame la Docteur Laura Vinsonneau, Madame la Docteur Naouel Yata, Madame la Docteur Léna Bardet et Madame la Docteur Marie Breban ainsi que tous les anciens internes du service pour votre disponibilité à me remplacer et donner un coup de main dans le service au pieds levé à chaque fois quand je faisais des aller-retours au laboratoire. Je remercie Monsieur le Professeur Emile Daraï pour vos précieux conseils, votre énergie infinie et votre exigence qui m'ont permis d'atteindre les objectifs universitaires. Je remercie Monsieur le Docteur Jonathan Cohen qui a réveillé en moi l'envie de poursuivre la recherche quand je pensais abandonner l'idée. Je remercie Madame la Docteur Marie Bornes qui a été mon inspiration incroyable dans mon travail d'obstétricienne. Merci pour ton professionnalisme et ta bienveillance. Je remercie Monsieur le Professeur Cyril Touboul pour ton enthousiasme et ta confiance en moi. Je remercie toute l'équipe des sage-femmes, des infirmières, des secrétaires et des aides-soignantes du service pour votre implication et votre soutien au quotidien. Vous rendez mes journées au travail extrêmement agréables. Je suis fière de travailler dans cette équipe pleine de motivation !

Pour finir, je remercie ma famille. Je remercie mes parents, Danuta et Piotr pour toutes les valeurs que vous avez pu me transmettre, pour toute votre énergie que vous avez investie dans mon éducation et ma formation. Sans vous je n'aurais jamais pu être qui je suis. Dziekuje !

Je remercie mon frère, Maciej, mon presque-jumeau. Nos chemins identiques se sont séparés pendant nos études supérieures, mais tu es toujours proche pour moi malgré la distance.

Je remercie mes beaux-parents, Patrick et Patricia, pour tout votre soutien et votre aide. Je remercie mon beau-frère, Nicolas, pour ta présence.

Et enfin je remercie mon conjoint, Jean-Yves. Tu es toujours présent et tu me soutiens et accompagnes dans mes décisions de tous les jours. Ta présence à mes côtés me renforce. Et surtout et avant tout, grâce à toi, nous avons nos trois trésors, Alice, Emma et Julia. Les filles, vous avez donné un nouveau sens à ma vie.

Table des matières

RESUME.....	6
ABSTRACT	8
RESUME GRAND PUBLIC.....	9
GENERAL PUBLIC SUMMARY.....	9
LISTE D'ABBREVIATIONS.....	10
INTRODUCTION	12
MICROCHIMERISME FOËTAL	12
DEFINITION	12
PHYSIOPATHOLOGIE.....	13
RÔLE DU MICROCHIMERISME DANS LA PATHOLOGIE.....	13
RÔLE DU MICROCHIMERISME DANS LE CANCER.....	17
CANCER DU SEIN.....	19
EPIDEMIOLOGIE	19
ANATOMIE DU SEIN.....	20
FACTEURS DE RISQUE DU CANCER DU SEIN	23
Facteurs non génétiques.....	23
Facteurs génétiques.....	27
CLASSIFICATION DES CANCERS DU SEIN.....	28
MICROENVIRONNEMENT IMMUNITAIRE DANS LE CANCER DU SEIN	30
CANCER DU SEIN ET GROSSESSE	35
CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES ET CANCER	38
CELLULES SOUCHES HEMATOPOIETIQUES ET CANCER.....	41
MICROCHIMERISME ET CANCER DU SEIN	43
RÔLE ANTI-TUMORAL DU MICROCHIMERISME DANS LE CANCER DU SEIN	45
EFFET PROTUMORAL DU MICROCHIMERISME	46
OBJECTIFS.....	46
RESULTATS	48
1- ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE CELLULES PRECURSEURS HEMATOPIETIQUES CD34+ DERIVEES DU SANG DE CORDON ET LIGNEES CELLULAIRES DU CANCER DU SEIN : MECANISME DU MICROCHIMERISME FOËTAL ? (Article 1, soumis).....	50
Introduction.....	50
ARTICLE 1 (soumis)	55

2- CORRELATION ENTRE LE MICROCHIMERISME FOETAL ET LE MICROENVIRONNEMENT IMMUNOLOGIQUE DANS LE CANCER DU SEIN CHEZ LES FEMMES NON-MENOPAUSEES (Article 2, soumis)	88
Introduction	88
ARTICLE 2 (en review).....	89
DISCUSSION GENERALE	107
BIBLIOGRAPHIE	116
VALORISATION DE LA RECHERCHE	125

RESUME

INTRODUCTION

Le microchimérisme se définit par la présence en faible quantité dans un organisme, de cellules ou d'ADN provenant d'un autre individu. Pendant la grossesse le transit transplacentaire de cellules est un phénomène constant et bidirectionnel. Les cellules fœtales capables de traverser la barrière placentaire sont principalement des cellules précurseurs hématopoïétiques, mais aussi des cellules mononucléées sanguines matures.

Pendant que le rôle du microchimérisme fœtal dans l'inflammation et la cicatrisation a été démontré, le rôle des cellules fœtales dans l'oncogenèse est controversé. Si certaines études font évoquer un effet protecteur, d'autres au contraire suggèrent un rôle potentiel dans la progression de la maladie.

L'objectif principal de cette thèse était d'évaluer l'impact des cellules fœtales sur les processus de cancérogenèse dans le cancer du sein par une double approche, expérimentale et translationnelle.

MATERIEL ET METHODES

Dans la phase translationnelle nous avons étudié la présence de cellules fœtales par l'identification du gène SRY par FISH dans le tissu tumoral de cancers du sein à partir d'une bio banque. Les échantillons ont été obtenus des femmes ayant eu un garçon ayant eu un diagnostic de cancer du sein 7 ± 5 ans après l'accouchement. Nous avons évalué la corrélation entre la présence de cellules fœtales au sein de tumeurs mammaires malignes et le sous-type histologique, le stade TNM et l'évolution du cancer du sein. Les modifications immunologiques péri-tumorales et intratumorales observées en présence de cellules fœtales au sein de la tumeur ont été analysés.

Dans la phase expérimentale nous avons analysé les interactions entre cellules fœtales CD34+ dérivés du sang du cordon et lignées cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et MCF-7. Les conséquences cellulaires et moléculaires ont été évaluées par la technique xCELLigence et en analysant la transcriptomique des cellules tumorales.

RESULTATS

Au niveau du tissu tumoral du cancer du sein les cellules fœtales masculines ont été retrouvées dans 5 échantillons sur 23. Ces cellules étaient peu nombreuses et étaient représentées par des lymphocytes dans 3 échantillons, par des fibroblastes dans un échantillon et par des cellules épithéliales dans un échantillon. L'analyse du profil immunitaire du microenvironnement tumoral présentant un microchimérisme fœtal n'a démontré aucune différence par rapport aux tumeurs sans microchimérisme fœtal.

Dans la partie in vitro, nous avons démontré que les cellules fœtales CD34+ dérivées du sang de cordon interagissent avec les cellules tumorales mammaires en provoquant une diminution de la prolifération des cellules MDA-MB-231 et MCF-7 ainsi que la diminution de la migration et l'invasion des cellules MDA-MB-231. L'analyse spatiale des interactions entre les cellules a permis d'émettre l'hypothèse d'une fusion des cellules CD34+ avec les cellules tumorales. L'analyse transcriptomique des cellules tumorales en corrélation avec l'analyse du sécrétome des cellules fœtales CD34+ a permis d'identifier l'IL-17A et l'INF- γ comme potentiels régulateurs d'amont des modifications fonctionnelles observées dans les cellules tumorales.

CONCLUSION

Les cellules fœtales retrouvées au sein des tumeurs représentaient principalement des populations lymphocytaires, fibroblastiques et épithéliales. La prévalence du microchimérisme fœtal au niveau du tissu tumoral mammaire à distance de la grossesse est probablement plus faible que décrit précédemment dans la littérature pour les cancers du sein diagnostiqués pendant la grossesse. Les interactions directes de cellules CD34+ dérivées du sang de cordon avec les cellules du cancer du sein in vitro ont provoqué des modifications fonctionnelles et moléculaires dans les cellules tumorales. Même si, le rôle des cellules CD34+ d'origine fœtale dans le cancer du sein reste à démontrer, ces résultats apportent des nouvelles approches potentielles à explorer.

ABSTRACT

INTRODUCTION

Microchimerism is defined as the presence of a small quantity of cells or DNA originating from another organism. During pregnancy, the transfer of fetal cells through the placental barrier is constant and bidirectional. Fetal cells able to cross the placental barrier are mostly hematopoietic progenitors, but also mature mononuclear blood cells. While the role of fetal microchimerism has been confirmed in inflammation and wound healing, the role of fetal cells in carcinogenesis is controversial. Some studies mention a protective effect of fetal microchimerism, others suggest a potential role of fetal cells in cancer progression.

The principal goal of this thesis was to evaluate the impact of fetal cells on breast carcinogenesis by experimental and translational approaches.

MATERIAL AND METHODS

In the translational phase we have studied the presence of fetal cells in breast tumor tissue from a biobank. Samples were obtained from mothers of boys 7 ± 5 years after birth. Fetal cells were identified by FISH of SRY gene. Correlation between the presence of fetal cells in the tumors and tumor histological subtype, TNM stage and evolution was evaluated. Immunological modifications tumoral and surrounding tissues associated with the presence of fetal cells were also analysed.

In the experimental phase we have evaluated interactions between blood cord derived fetal CD34+ cells and breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7. Cellular and molecular modifications were evaluated by xCELLigence technique and by transcriptomic analysis of breast cancer cell lines.

RESULTS

In breast cancer tissue, male fetal cells were found in 5 out of 23 analyzed samples. Those cells were localized on small surfaces and were identified as lymphocytes in 3 cases, fibroblasts in one case, and epithelial cells in one case. The analysis of tumor immunological microenvironment modifications associated with fetal microchimerism did not reveal any difference compared to tumors without microchimerism.

The in vitro experimental analysis of interactions between umbilical cord derived fetal CD34+ cells and breast cancer cell lines showed a decrease in proliferation of MDA-MB-231 as well as MCF-7 cells, and a decrease in migration and invasion capacities of MDA-MB-231. The 3D analysis of spatial interactions between cells allowed to draw the hypothesis of cell fusion between CD34+ with tumor cells. Transcriptomic analysis of breast cancer cell lines and correlation with the secretome analysis of fetal CD34+ cells identified IL-17A and INF- γ as potential upstream regulators of the functional modifications observed in breast cancer cells.

CONCLUSION

Fetal cells found in tumor tissues were mostly represented by lymphocytes, fibroblasts and epithelial cells. The prevalence of fetal microchimerism in these breast cancers distant from pregnancy was lower than reported in the literature on breast cancer pregnancy during the pregnancy. Direct interactions of umbilical cord derived CD34+ cells with breast cancer cell lines in vitro have been demonstrated and induced functional and molecular modifications in breast cancer cells. Although the role of CD34+ of fetal origin in breast carcinogenesis remains to be fully demonstrated, these results bring new potential approaches to be investigated.

RESUME GRAND PUBLIC

La persistance de cellules fœtales dans le corps de la mère après une grossesse (microchimérisme fœtal) peut jouer un rôle dans l'évolution des maladies. Cette thèse a étudié l'impact des cellules fœtales sur le cancer du sein.

La présence de cellules fœtales dans des cancers du sein a été mise en évidence dans 5 échantillons sur 23 cancers du sein analysés. Le profil immunitaire des cancers et l'évolution de la maladie n'a pas été modifié par la présence de cellules fœtales.

Les interactions entre des cellules fœtales dérivées du sang de cordon et des cellules de cancer du sein en culture ont également été analysées.

Le contact direct des cellules fœtales avec des cellules tumorales a provoqué une diminution de la prolifération, de la migration et des capacités d'invasion de ces dernières, suggérant une diminution de leur agressivité. Des modifications de leur fonctionnement moléculaire ont également été observées. Ces résultats apportent de nouvelles pistes à explorer pour améliorer la compréhension du cancer du sein.

GENERAL PUBLIC SUMMARY

The presence of fetal cells in the maternal body after pregnancy (fetal microchimerism) could play a role in the evolution of some diseases. This thesis evaluated the influence of fetal cells on breast cancer.

Analysis of breast malignant tumors revealed the presence of fetal cells in 5 out of 23 analyzed samples. The immune profile of tumors and evolution of the disease were not modified by the presence of fetal cells.

Interactions between umbilical cord derived fetal cells and breast cancer cell lines cultured in the laboratory were also analyzed. The direct contact of fetal cells with breast cancer cells induced a decrease in proliferative, migratory and invasive capacities of breast cancer cells suggesting a decrease in breast cancer aggressiveness. Functional and molecular modifications were also observed. These results bring new trails to be explored to improve our understanding of breast cancer.

LISTE D'ABBREVIATIONS

APC – allophycocyanin
BRCA – Breast cancer gene
CALG – cancer associé à la grossesse
CCIS – carcinomes canaux in situ
CCL – ligand de chimiokine
CEROG – Comité d'éthique de la recherche en Obstétrique et Gynécologie
CLIS – carcinomes lobulaires in situ
CMH I – complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
CNGOF – Collège National des Gynécologues Obstétriciens Français
CSH – cellules souches hématopoïétiques
CSM – cellules souches mésenchymateuses
DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindol
DMSO – dimethyl sulfoxide
ER – récepteurs aux estrogènes
FasL – protéine Fas-ligand
FCS – Fetal Calf Serum
FGF – fibroblast growth factor
FISH – hybridation in situ fluorescence
FITC – fluorescein isothiocyanate
GM-CSF – granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GSEA – Gene Set Enrichment Analysis
GVH – greffon versus l'hôte
HER2 – récepteur à l'epidermal growth factor 2
HES – hématoxyline-éosine-safran
HLA – antigènes des leucocytes humains
HPS – hématoxyline-phloxine-safran
hUC-MSC – human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells
IHC - immunohistochimie
IL-6 – interleukine 6
IMC – indice de masse corporelle
IMDM – Iscove's Modified Dulbecco's Medium
INF – interferon
IPA – Ingenuity Pathway Analysis
MACS - Magnetic-activated cell sorting
NK – lymphocytes Natural Killers
PABC – Pregnancy Associated Breast Cancer
PAPC – pregnancy-associated progenitor cells
PBS – phosphate-buffered saline
PCR – réaction de polymérisation en chaîne
PD-L1 – protéine "Programmed death-ligand 1"
PGE2 – prostaglandine E2
PPBC – Post-Partum Breast Cancer
PR – récepteurs à la progestérone
RH – récepteurs hormonaux
RMA – Robust Multichip Average
RR – risque relatif
RTCA – Real-Time Cell Analysis

SBR – Scarff-Bloom-Richardson
SD – standard deviation
SDF – stromal cell-derived factor
SR – survival rate
TEM – transition épithélio-mésenchymateuse
TFH – lymphocytes T follicular helpers
TGF- β – Transforming Growth Factor-beta
THS – traitement hormonal substitutif
TILs – Lymphocytes infiltrant la tumeur
TLS – structures lymphoïdes tertiaires
UCB – umbilical cord blood

INTRODUCTION

MICROCHIMERISME FŒTAL

DEFINITION

Le microchimérisme se définit par la présence en faible quantité dans un organisme, de cellules ou d'ADN provenant d'un autre individu sans qu'il n'y ait de réaction de greffon versus l'hôte (GVH) ou de rejet de greffe (1). Ce phénomène de microchimérisme peut être observé dans les suites d'une transfusion sanguine ou d'une transplantation d'organe, mais aussi physiologiquement après une grossesse.

Pendant la grossesse le transit transplacentaire de cellules est un phénomène constant et bidirectionnel. Il commence vers la quatrième semaine de grossesse et se poursuit jusqu'à l'accouchement (2). Le transfert fœto-maternel est à l'origine du microchimérisme fœtal (présence de cellules fœtales chez la mère) et le transfert materno-fœtal à l'origine du microchimérisme maternel (présence de cellules maternelles chez l'enfant) (3). Le fœtus peut également acquérir des cellules dont certaines peuvent être d'origine fœtale provenant d'une grossesse antérieure (4).

Les cellules fœtales capables de traverser la barrière placentaire sont principalement des cellules précurseurs hématopoïétiques (5,6), mais aussi des cellules mononucléées sanguines matures. Parmi les cellules matures les lymphocytes T sont détectés dans 30-58%, les lymphocytes B dans 45-75%, les lymphocytes Natural Killers (NK) dans 44-62% et les cellules présentatrices d'antigène dans 26-58% (7,8).

Les précurseurs hématopoïétiques microchimériques dans le sang circulant de femmes ont été mis en évidence par l'identification du chromosome Y par hybridation in situ fluorescence (FISH) sur les cellules CD34+. Ces précurseurs hématopoïétiques (CD34+) microchimériques peuvent être détectés chez près de 50% de femmes multipares en bonne santé (9–12).

Les cellules souches mésenchymateuses d'origine fœtale ont été également mises en évidence par l'identification du chromosome Y par FISH. L'origine mésenchymateuse de ces cellules a été confirmée par des critères morphologiques et phénotypiques et un potentiel de différenciation et d'auto-renouvellement. Ces cellules souches microchimériques ont été retrouvées au sein de la moelle osseuse de femmes jusqu'à 38 ans après un dernier accouchement (13).

PHYSIOPATHOLOGIE

Durant la grossesse, la mère acquiert des cellules souches fœtales ayant la capacité de s'orienter vers différentes lignées selon le tissu dans lequel elles ont migré. Deux mécanismes ont été formulés, il s'agirait soit de cellules souches embryonnaires capables ensuite de se différencier en cellules souches circulantes spécifiques de tissus soit de cellules souches hématopoïétiques circulantes pré programmées vers la voie hématopoïétique qui pourraient dans certaines circonstances sortir de leur voie programmée pour se différencier en une autre lignée (14,15).

RÔLE DU MICROCHIMERISME DANS LA PATHOLOGIE

Le rôle du microchimérisme fœtal dans l'inflammation et la cicatrisation a été démontré. La présence de cellules d'origine fœtale a été mise en évidence dans des tissus cibles de pathologies auto-immunes qui apparaissent chez les femmes en âge de procréer et qui sont fréquemment exacerbées par la grossesse, telles que la sclérodermie, le syndrome de Gougerot-Sjögren, la cholangite biliaire primitive et les thyroïdites auto-immunes (16,17). L'hypothèse initiale expliquant le lien entre ces pathologies et la grossesse était la réaction auto-immune déclenchée ou aggravée par la présence dans les tissus cibles de ces cellules au caractère semi-allogénique (18).

Après la disparition des mécanismes de tolérance immunitaire mis en route pendant la grossesse, tels que l'inhibition des lymphocytes T reconnaissant les antigènes paternels non partagés, la présence de lymphocytes T régulateurs ou la présence de modulateurs de la réponse immunitaire innée comme antigènes des leucocytes humains (HLA)-G, ces cellules fœtales pourraient être reconnues par le système immunitaire. Le tableau clinique de ces maladies auto-immunes était par ailleurs jugé compatible avec un phénomène de réaction de GVH (19). Si une première série d'études sur la sclérodermie retrouvait effectivement des taux de cellules fœtales circulantes significativement plus élevées chez les femmes atteintes par la maladie (20–22), d'autres études plus récentes n'ont pas retrouvé de différence significative avec les groupes contrôles (23–26). Des résultats discordants ont également été obtenus pour la cirrhose biliaire primitive, le syndrome de Gougerot-Sjögren, les thyroïdites auto-immunes et le lupus érythémateux disséminé (27–31).

La présence de cellules microchimériques d'origine fœtale dans des tissus maternels thyroïdiens, pulmonaires, cutanés et lymphatiques indemnes de toute pathologie dysimmunitaire a également été mise en évidence (32,33) faisant remettre en question le rôle des cellules fœtales dans le déclenchement ou l'aggravation des maladies auto-immunes. La présence de cellules fœtales en quantités plus importantes dans des tissus pathologiques s'expliquerait simplement par le fait de leur implication dans la réparation tissulaire, en tant que dérivés de cellules souches hématopoïétiques et mésenchymateuses recrutées à partir de la moelle osseuse. Le concept de « pregnancy-associated progenitor cells » (PAPC) a ainsi été proposé par Khosrotehrani et al. (34). Un adressage spécifique des cellules fœtales vers des tissus maternels lésés dans un modèle de régénérescence hépatique impliquant les cellules souches a pu être démontré (35). Une migration de cellules fœtales après des lésions

cérébrales sur un modèle murin a également pu être mis en évidence, traduisant un passage à travers la barrière hémato-méningée et une différenciation en cellules neuronales ou gliales (36). Un adressage de cellules fœtales vers le tissu lésé du myocarde a également été mis en évidence (37). Les résultats de ces études suggèrent la capacité des cellules fœtales de migrer et se différencier dans un nombre très important de tissus d'origine mésodermique, ectodermique et endodermique.

Un rôle potentiel du microchimérisme fœtal a également été mis en évidence dans le contexte des greffes allogéniques de cellules souches hématopoïétiques, utilisées dans les maladies hématologiques et plus rarement dans les cancers solides. Parmi les complications classiques de ces thérapeutiques figure le rejet de greffe et la réaction de GVH, avec des manifestations principalement cutanées, digestives et hépatiques. Le degré de compatibilité HLA entre le donneur et le receveur est le principal facteur prédictif de la survenue de ces complications, et constitue un important facteur limitant quant à leur faisabilité lorsqu'il n'existe pas de donneur HLA-identique dans l'entourage des patients. La solution d'une greffe haplo identique (qui nécessite le partage d'un seul haplotype HLA entre le donneur et le receveur), disponible dans plus de 90% des cas dans la famille du patient, constitue une alternative. Dans un essai clinique prospectif, 26 patients présentant des cancers solides évolués et résistants à la chimiothérapie ont bénéficié d'une allogreffe de cellules hématopoïétiques issues de sang périphérique (38). La survie globale et la survie sans progression des patients ayant obtenu un greffon issu de donneuses présentant un microchimérisme fœtal étaient plus importantes que celles des patients ayant reçu un greffon issu de donneurs n'en présentant pas. Les cellules fœtales, ayant déjà été capables de s'intégrer dans l'organisme maternel, seraient plus aptes à se greffer une seconde fois dans un nouvel organisme receveur. Ce chimérisme

mixte, constitué de cellules souches hématopoïétiques de la donneuse et de cellules fœtales résultant d'une grossesse antérieure, pourrait être accepté plus facilement par le patient receveur que les cellules d'un donneur seules (Figure 1). Le bénéfice du développement d'un chimérisme mixte impliquant un microchimérisme fœtal chez les receveurs de transplantations d'organes solides ou de moelle hématopoïétique a été suggéré dans deux autres études (39,40).

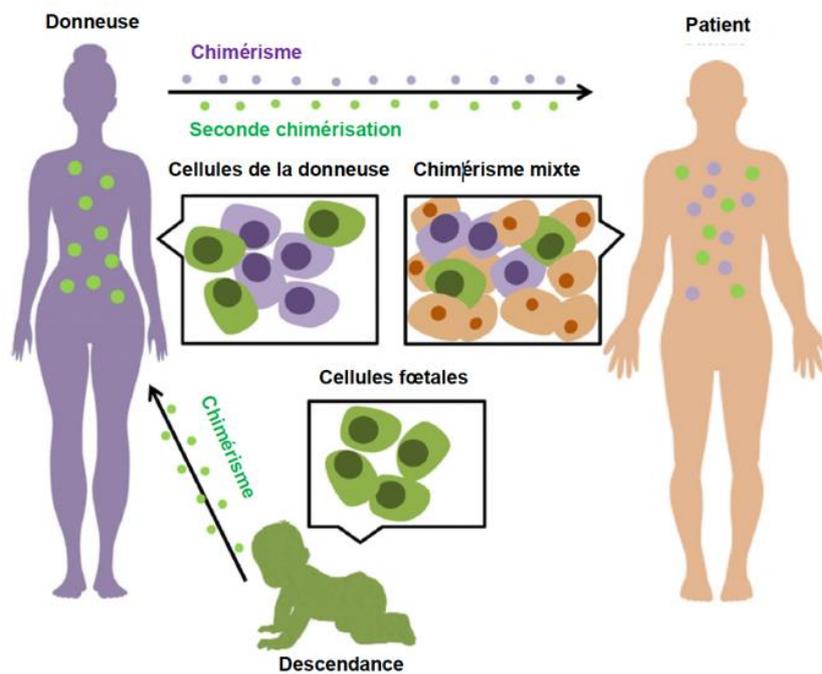


Figure 1. Représentation schématique du mécanisme de seconde chimérisation. (D'après Cismaru CA. et al. *Incognito : Are Microchimeric Fetal Stem Cells that Cross Placental Barrier Real Emissaries of Peace? Stem Cell Reviews and Reports* 14(5), 632-641 (2018))

Les issues cliniques en lien avec le microchimérisme fœtal ont été résumés dans la revue par Fjeldstad et al. (41) (Tableau 1).

Tableau 1. Issues cliniques en lien avec le microchimerisme fœtal (d'après Kara et al, 2013 (37).

Table 1. Maternal acquisition of fetal genetic material and associated clinical outcomes. The table indicates which of the maternal (or fetal) outcomes associated with excessive cellular fetal microchimerism (cFMC) and/or cell-free fetal DNA (cffDNA)^a are beneficial versus detrimental.

Beneficial maternal outcomes	Comments
Wound healing	Excessive cFMC postpartum is associated with improved wound healing, suggesting a beneficial association. ^{12,13}
Detrimental maternal (or fetal) outcomes	Comments
Preeclampsia	Excessive cFMC ^{14,15} and cffDNA ^{16a} during pregnancy is associated with preeclampsia, suggesting a detrimental association
HELLP (hemolysis, elevated liver enzymes, low platelets)	The correlation between excessive cffDNA ^a and preeclampsia during pregnancy is strengthened in preeclampsia complicated by HELLP ¹⁶
Fetal growth restriction (FGR)	Excessive cFMC during pregnancy is associated with FGR, ¹⁷ suggesting a detrimental association
Spontaneous preterm labor	Excessive cffDNA ^a during pregnancy is associated with spontaneous preterm labor, ¹⁸ suggesting a detrimental association
Hashimoto's thyroiditis, systemic lupus erythematosus, Sjögren's syndrome	Excessive cFMC in maternal tissue and/or circulation long term is associated with these conditions and appears detrimental (though some studies show conflicting results). ¹⁹ Pregnancy is associated with flares or reactivation of disease ^{20,21}
Systemic sclerosis and primary biliary cirrhosis	Excessive cFMC in maternal tissue and/or circulation long term is associated with these conditions and appears to be detrimental. ¹⁹ Pregnancy is associated with worsening of certain features or symptoms of disease, but disease remains otherwise stable ^{21,22}
Detrimental maternal outcomes long term, beneficial in the short term	Comments
Rheumatoid arthritis (RA)	Excessive cFMC in maternal blood and affected organs long term is associated with RA exacerbation. ¹⁹ During pregnancy on the other hand, high levels of cffDNA ^a in maternal circulation correlates with low levels of RA activity, ²³ suggesting a temporary pregnancy-related beneficial effect ^{23,24}
Grave's disease and multiple sclerosis (MS)	cFMC in maternal tissue/and or circulation long term is associated with Grave's disease and MS, ¹⁹ suggesting a detrimental association in the long term. Like with RA, these conditions often ameliorate in the short term during pregnancy ²⁴
Beneficial maternal outcomes long term, beneficial or detrimental in the short term	Comments
Cancer (melanoma, breast cancer, cervical cancer, uterine cancer, ovarian cancer, lung cancer, colon cancer, thyroid cancer)	Excessive cFMC appears to be beneficial in the long term with respect to cancer overall, ^{19,25} but in the short term the correlation appears positive or negative depending on the type and timing of the malignancy ⁶
Unclear whether beneficial or detrimental to maternal outcomes	Comments
Cardiovascular disease (CVD)	Excessive cFMC and CVD mortality long term have been linked by a trend. ²⁵ However, several studies suggest that enhanced cFMC is associated with tissue repair following cardiovascular damage ²⁶⁻²⁸

^aDistinction between cellular fetal microchimerism (cFMC) and cell-free fetal DNA (cffDNA) is important as the two may invoke different immunological and other responses. cffDNA is considered a marker of apoptotic placental debris shed into the maternal circulation during pregnancy and is rapidly cleared following delivery.²⁴ cFMC denotes intact cells of fetal origin with stem cell-like properties that may persist in the woman's body for decades, potentially replenishing stem cell niches and continuing to interact with the maternal immune system long term.^{5,29} cffDNA is more prevalent in maternal circulation during pregnancy than cFMC and is, on average, present in greater amounts¹ (see "The physiology of cFMC" section for further details).

RÔLE DU MICROCHIMERISME DANS LE CANCER

Le rôle des cellules fœtales dans l'oncogenèse est controversé. Si certaines études font envisager un effet protecteur, d'autres au contraire suggèrent un rôle potentiel dans la progression de la maladie. La co-occurrence de ces deux hypothèses en fonction du type cellulaire et du tissu cible est envisageable.

L'implication des cellules souches mésenchymateuses allogéniques, issues le plus souvent du cordon ombilical, dans l'évolution des tumeurs, et notamment des carcinomes mammaires, a fait l'objet de nombreuses études.

La présence de cellules fœtales XY dans des échantillons tissulaires issus de pièce d'hystérectomie pour cancers du col (carcinomes épidermoïdes ou adénocarcinomes) a été identifiée en FISH chez 6 des 8 patientes présentant un cancer du col de l'utérus (42). Les cellules fœtales XY étaient absentes sur les 5 échantillons témoins sains prélevés chez des femmes ayant eu un accouchement d'un garçon par le passé. La caractérisation par immuno-FISH de ces cellules microchimériques a permis de démontrer que 44 % des cellules étaient de phénotype lymphoïde (CD45+) et 24 % étaient épithéliales (Cytokératine+) (42).

L'analyse du microchimérisme fœtal dans les carcinomes papillaires de la thyroïde a démontré des quantités plus élevées de cellules fœtales dans des tissus thyroïdiens néoplasiques par rapport au tissu thyroïdien sain issu du lobe controlatéral (43), suggérant un recrutement des cellules fœtales sur le site tumoral primitif. La sous-population de cellules fœtales de phénotype lymphoïde (CD45+) a été identifiée exclusivement dans les tissus tumoraux tandis que la population de cellules fœtales épithéliales différenciées (Thyroglobuline+) a été retrouvée à la fois dans les tissus tumoraux et dans les tissus sains. L'hypothèse d'un rôle cytotoxique des cellules fœtales lymphoïdes vis-à-vis des cellules tumorales était soulevée, tandis que la nature épithéliale de l'autre population pouvait témoigner de son implication dans la réparation tissulaire.

Microchimérisme fœtal a également été mis en évidence dans le tissu des mélanomes découverts pendant la grossesse ou jusqu'à 6 mois du post-partum (44). La présence de cellules XY a été retrouvé dans 10 échantillons sur 16, comparé à 1 échantillon sur

8 du tissu provenant de nevi diagnostiqués pendant la grossesse. Le phénotype des cellules XY correspondait principalement aux cellules endothéliales.

Lors de l'analyse de pièces opératoires de chirurgie thoracique, des cellules fœtales ont été mis en évidence en quantités sept fois supérieures dans des tissus pulmonaires et thymiques pathologiques en comparaison avec des échantillons de moelle osseuse prélevés chez les mêmes patientes (45). Ces cellules fœtales étaient isolées et dispersées sur l'ensemble des échantillons, mais nettement plus fréquemment retrouvées à la périphérie ou au contact immédiat des lésions tumorales.

De manière similaire, une localisation préférentielle des cellules fœtales au niveau des lésions tumorales sur des pièces opératoires de cancer du sein a été retrouvée avec des signaux SRY en réaction de polymérisation en chaîne (PCR) significativement plus nombreux au cœur des tumeurs par rapport aux tissus adjacents et aux tissus sains à distance (46). Un signal positif était détecté sur 100% des 19 pièces opératoires étudiées au niveau des sites tumoraux, et 64% des échantillons étudiés au niveau des sites sains à distance de la tumeur. La quantité d'ADN SRY détecté suivait un gradient allant de 171 pg/ml au centre de la tumeur à 86 pg/ml en périphérie et 7 pg/ml dans le tissu normal. Cette observation pourrait être expliquée par l'attraction des cellules fœtales par le tissu tumoral et/ou son micro-environnement périphérique.

CANCER DU SEIN

EPIDEMIOLOGIE

Le cancer du sein est le premier cancer de la femme avec 58 083 nouveaux cas estimés en France en 2020 (47,48). C'est la première cause de décès par cancer chez la femme avec 12 146 décès en 2018 (14% des décès par cancer en 2018) (48). L'âge médian au diagnostic est de 61 ans. La survie moyenne à 5 ans est estimée à près de

85% avec une constante augmentation de la survie nette (49). Le taux de mortalité diminue d'année en année (-1.5 par an en moyenne entre 2005 et 2012) (48). Ceci est expliqué par l'amélioration des traitements et par un dépistage du cancer du sein de plus en plus adapté au niveau de risque de chaque femme, qui permet de diagnostiquer les cancers à un stade plus précoce, de meilleur pronostic.

Le développement du cancer du sein est multifactoriel, impacté par des facteurs génétiques et non génétiques.

ANATOMIE DU SEIN

Le sein est constitué d'une glande mammaire et d'un tissu conjonctif de soutien (Figure 2). La glande mammaire est une glande exocrine hormono-dépendante, qui se développe et fonctionne notamment sous l'influence des hormones sexuelles ovariennes (les œstrogènes et la progestérone).

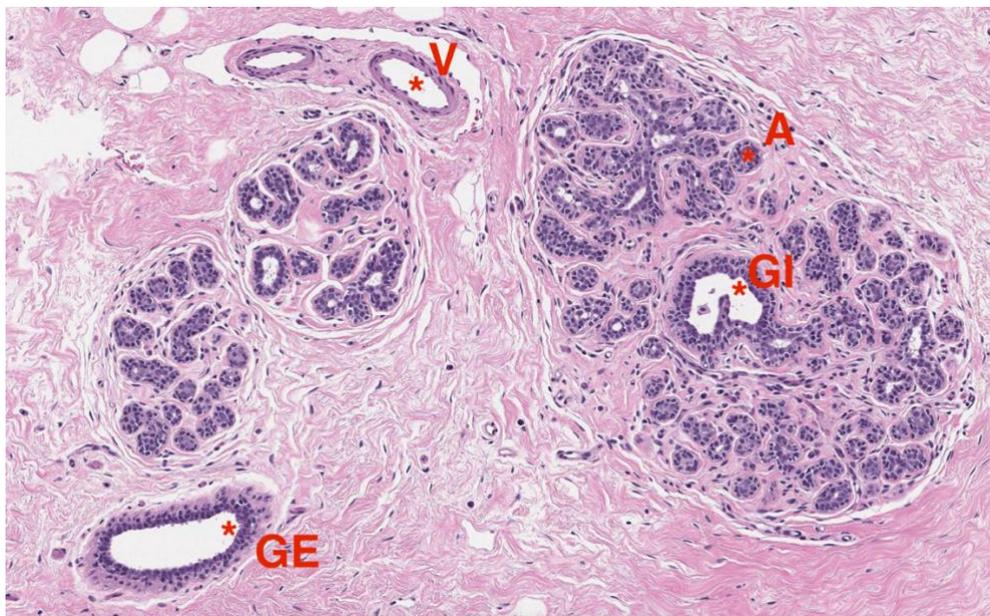


Figure 2. Histologie normale du parenchyme mammaire adulte (coloration standard, HE) (D'après *Rosen's Breast Pathology, 4th Edition, Wolter's Kluwer, 2015*).

A : alvéole / acini ; GI : galactophore intralobulaire ; GE : galactophore extralobulaire ; V : vaisseau.

Le sein est constitué de quinze à vingt lobes, contenant chacun des lobules et des canaux, assurant la production et le transport de lait vers le mamelon en période d'allaitement. Les lobules sont essentiellement situés en périphérie par rapport au mamelon et sont plus particulièrement nombreux dans le quadrant supéro-externe. Chaque lobule contient dix à cent alvéoles (ou acini) dont la paroi est constituée de cellules épithéliales sécrétoires et de cellules myoépithéliales contractiles. Chaque alvéole est drainée par un ductule dont la paroi est tapissée de cellules épithéliales non sécrétoires et de cellules myoépithéliales. Ces ductules confluent en un canal lactifère lobulaire ou galactophore lobulaire, qui rejoint le système canalaire extralobulaire. Ce dernier est constitué de canaux de plus grand calibre, à contours festonnés, qui confluent progressivement de manière arborescente pour réaliser les canaux lactifères majeurs, dont une dizaine atteindra le mamelon en surface (Figure 3). A leur partie terminale, ils présentent une zone de transition entre un épithélium cubocylindrique de type glandulaire et un épithélium malpighien kératinisant, analogue à celui qui tapisse la surface du mamelon.

Le tissu conjonctif comprend des fibres de collagène, du tissu adipeux, des filets nerveux et des vaisseaux sanguins ou lymphatiques. Il est subdivisé en tissu conjonctif dit palléal, plus lâche et plus richement vascularisé, qui borde immédiatement les lobules, et en tissu conjonctif interlobulaire plus dense et fibreux. En situation physiologique, il ne comporte que de rares cellules inflammatoires dispersées : lymphocytes, plasmocytes et macrophages.

La proportion des deux composants, épithélial et conjonctif, varie en fonction de facteurs individuels et de l'âge (50).

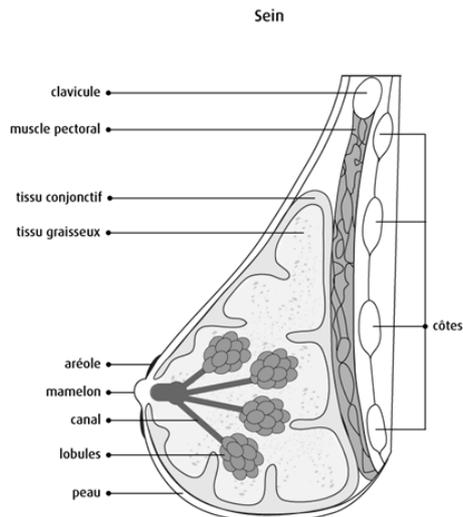


Figure 3. Structure anatomique du sein (D'après Haute Autorité de Santé, *Dépistage et prévention du cancer du sein*, 2015)

Le sein est constitué de deux compartiments : la glande mammaire et le tissu conjonctif. La glande mammaire est composée de 15 à 20 lobes séparés par du tissu graisseux, contenant chacun des lobules et des canaux assurant la production et le transport du lait vers le mamelon en période d'allaitement. Le tissu conjonctif comprend des fibres, de la graisse et des vaisseaux sanguins et lymphatiques. La proportion de ces deux composants varie en fonction de facteurs individuels et de l'âge.

Le drainage lymphatique du cancer du sein se dirige essentiellement vers les ganglions axillaires (Figure 4). La diffusion ganglionnaire axillaire se fait de proche en proche à partir des ganglions les plus proches de la tumeur pour ensuite atteindre les ganglions situés sous la veine axillaire et gagner les ganglions sous-claviculaires et mammaires internes (à l'intérieur du thorax, autour du sternum) (51). L'atteinte ganglionnaire est un élément majeur du pronostic.

Ganglions lymphatiques du sein

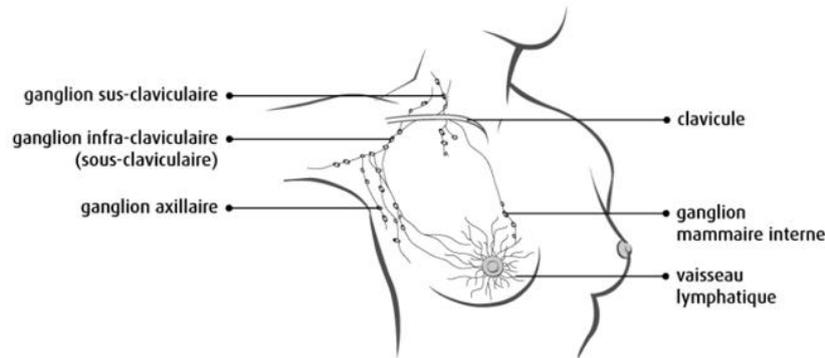


Figure 4. Drainage lymphatique ganglionnaire des seins (D'après Haute Autorité de Santé, *Dépistage et prévention du cancer du sein*, 2015)

Les ganglions lymphatiques de drainage du sein sont axillaires, sus-claviculaires, sous-claviculaires et mammaires internes (à l'intérieur du thorax, autour du sternum). Le drainage lymphatique du sein serait orienté selon un axe antéropostérieur : la partie superficielle du sein se drainerait dans le creux axillaire, conformément aux observations anatomiques classiques, et la partie profonde se drainerait dans les chaînes mammaires interne et externe.

FACTEURS DE RISQUE DU CANCER DU SEIN

Facteurs non génétiques

Facteurs de risque intrinsèques

Après le genre, l'âge est considéré comme le facteur de risque le plus important. Près de 50% des cancers du sein sont diagnostiqués entre 50 et 69 ans et environ 28% sont diagnostiqués après 69 ans (52). Le risque de cancer du sein est quatre fois plus important chez les femmes âgées de plus de 50 ans que chez celles âgées de moins de 50 ans (53).

Une exposition précoce et prolongée à une imprégnation hormonale endogène augmente le risque de cancer du sein. Ainsi une ménarche précoce avant 12 ans, une ménopause tardive après 54 ans majorent ce risque.

Les grossesses modulent également le risque de cancer du sein, la nulliparité et un âge supérieur à 30 ans à la première naissance majorent ce risque. Une diminution

estimée du risque à -8% par enfant né et une augmentation du risque de +3% par année supplémentaire avant la première grossesse ont été rapportés (54).

Le surpoids et l'obésité, notamment après la ménopause (55–57), sont également des facteurs de risque démontrés de cancer du sein. Une revue de la littérature réalisée par Carmichael en 2002 analysant 7 études de cohortes prospectives et incluant 337 819 femmes et 4385 cancers du sein invasifs a rapporté un risque relatif (RR) de cancer du sein de 1,26 chez des femmes ménopausées ayant un indice de masse corporelle (IMC) ≥ 28 kg/m² (56). Cette augmentation du risque serait linéaire, de 9 à 31% pour une augmentation de 5 kg/m² d'IMC chez la femme ménopausée (58).

Le diabète de type 2 augmente également le risque de cancer du sein avec un impact négatif sur le risque de mortalité par cancer du sein (59,60).

Parmi les facteurs en lien avec la glande mammaire une densité mammaire radiologique supérieure à 75% après la ménopause (BIRADS-D) est un facteur de risque de développer un cancer du sein (61,62). Le diagnostic d'une lésion frontière du sein (lésions épithéliales mammaires avec atypies), telles que l'hyperplasie canalaire atypique, l'hyperplasie lobulaire atypique et le carcinome lobulaire in situ place les femmes dans un groupe à risque élevé de cancer du sein (61). Le sur-risque de cancer du sein serait compris entre 2 et 10 fois selon les lésions concernées (63,64).

Les antécédents personnels de cancer notamment de cancer du sein, de l'ovaire ou de l'endomètre augmentent le risque de cancer du sein de façon avérée (61). Le sur-risque est majoré quand le premier cancer du sein est survenu avant l'âge de 40 ans (rapport d'incidence compris entre 2,8 et 7,4 comparé à la population générale) (65). Chez ces femmes, le RR de cancer du sein contralatéral est également majoré en cas

d'antécédent familial (RR = 5 pour plusieurs parents atteints) et d'IMC élevé (RR compris entre 1,37 et 1,77) (65).

Facteurs de risque extrinsèques

Le mode de vie peut influencer le risque de cancer du sein. Une relation linéaire entre la consommation d'alcool et le cancer du sein a été mise en évidence et ceci dès une consommation moyenne d'un verre d'alcool par jour (66,67) avec une augmentation du risque de 10% (IC95% : [5 -15]) pour chaque verre d'alcool quotidien supplémentaire (10g) (66).

L'activité physique pourrait diminuer le risque de cancer du sein. En effet, dans la cohorte E3N, les auteurs ont démontré une réduction du risque de cancer du sein observée pour une activité modérée à vigoureuse de 30-60 minutes par jour (68).

Le tabagisme actif de plus de 10 ans est également considéré comme facteur de risque de cancer du sein.

Un antécédent personnel d'irradiation thoracique médicale à haute dose notamment un antécédent d'irradiation pour maladie de Hodgkin majore le risque de survenue de cancer du sein particulièrement quand la maladie est survenue à un âge jeune (61,69).

L'exposition aux hormones exogènes peut également impacter le risque de cancer du sein. Les contraceptifs hormonaux, utilisés depuis plus de 10 ans, peuvent augmenter ce risque (13). Une étude danoise de 2017 incluant 1,8 millions de femmes utilisatrices de contraception hormonale a rapporté un RR de 1,20 (IC95% [1.14 - 1.26]). Ce risque est temps-dépendant passant de RR de 1,09 (IC 95% [0.96 - 1.23]) quand l'utilisation est de moins d'un an à un RR de 1,38 (IC95% [1.26 - 1.51]) pour une utilisation de plus de 10 ans (71). Une revue de la littérature du Collège National des Gynécologues Obstétriciens Français (CNGOF), confirme que la prise d'une contraception

œstroprogestative est associée à un sur-risque de cancer du sein en cours d'utilisation (72). Ce risque néanmoins revient au risque de la population non-exposée 5 ans après l'arrêt de l'utilisation.

Le traitement hormonal substitutif (THS) de la ménopause a été suggéré comme facteur de risque de cancer du sein (61). En effet, un essai clinique américain randomisée, prospective en double insu réalisé en 2002 par Women's Health Initiative, comparant le THS (estrogènes conjugués et méthoxyprogestérone) au placebo a démontré un RR de cancer du sein de 1,26 (IC95% [1.00-1.59]) chez les utilisatrices du THS (73). Cependant, ce surrisque n'a pas été confirmé en cas d'utilisation des estrogènes seuls.

En 2003, l'étude de cohorte, prospective, Million Women Study, incluant plus d'un million de femmes en Grande-Bretagne a montré un RR de cancer du sein de 1,66 (IC95% : [1.58-1.75]) chez les utilisatrices du THS ainsi qu'un risque de surmortalité avec un RR de 1,22 (IC 95% : [1.00-1.48]) (74). L'étude de cohorte française E3N portant sur près de 100 000 femmes volontaires adhérentes à la Mutuelle Générale de l'Education Nationale a trouvé un surrisque des traitements combinés dépendant principalement du choix du progestatifs (75). Ainsi une absence de risque significatif, pour une durée d'utilisation inférieure à 4 ans a été mise en évidence pour la progestérone micronisée ou la dydrogestérone vs. une augmentation du risque avec un RR de 1,69 (IC 95% : [1.50-1.91]) pour les autres progestatifs de synthèse. Le RR retrouvé en cas de prise d'œstrogènes seuls était de 1,29 (IC95% : [1.02-1.65]).

Facteurs génétiques

L'origine génétique pourrait concerner jusqu'à 5 à 10 % des cancers du sein (61) avec des taux pouvant atteindre 10% au sein de certaines populations présentant des mutations fondatrices (76).

Une histoire familiale de cancer du sein ou de l'ovaire dans la branche maternelle ou paternelle est un facteur de risque reconnu (61). Les femmes ayant un antécédent familial de cancer du sein chez une parente au 1er degré présentent un risque deux fois plus élevé de cancer du sein comparé aux femmes sans antécédent familial (77). Le surrisque augmente avec le nombre de cas familiaux de cancer du sein invasif et avec l'âge précoce au diagnostic. Près de 20 à 30% des cancers du sein sont découverts chez des femmes ayant des antécédents familiaux de cancers, dont des cancers du sein (52). Cette observation peut être expliquée par l'exposition environnementale aux facteurs extrinsèques ou à des facteurs héréditaires, néanmoins le rôle du hasard ne peut être écarté (78).

La prédisposition génétique identifiée est le plus souvent liée à la présence d'une altération constitutionnelle de deux gènes intervenant dans certains mécanismes de réparation de l'ADN : BRCA 1 (Breast cancer gene 1), localisé sur le bras long du chromosome 17 et BRCA 2, localisé sur le bras long du chromosome 13 (79). Leur transmission se fait sur un mode autosomique dominant avec une pénétrance variable selon les familles et les générations (61,65). En fonction du type de gène impliqué, des antécédents familiaux de cancer du sein et de l'âge de la patiente, le risque à vie de cancer du sein chez les femmes porteuses d'une mutation BRCA varie entre 40 % et 85 % à 80 ans contre 12 % dans la population générale (80–83).

D'autres gènes ont également été identifiés tels que TP53 (syndrome de Li Fraumeni), STK11(syndrome de Peutz-Jeghers), PTEN (syndrome de Cowden), CDH1, ATM, PALB2 notamment.

CLASSIFICATION DES CANCERS DU SEIN

Le cancer du sein est une pathologie hétérogène aussi bien au niveau histologique que cellulaire. Il apparaît important de pouvoir classer ces différents cancers du sein afin d'adapter au mieux la stratégie thérapeutique. Plusieurs classifications existent reposant sur les caractéristiques anatomopathologiques de la tumeur, son grade histologique, le stade carcinologique et la classification moléculaire. La majorité des tumeurs mammaires (95%) sont des adénocarcinomes. Les tumeurs mammaires peuvent franchir ou non la lame basale les classant ainsi en adénocarcinome non infiltrant (ou *in situ*) ou infiltrant/invasifs (52).

Les adénocarcinomes *in situ* représentent 15% des adénocarcinomes mammaires et correspondent au stade initial du cancer. Ils se subdivisent en deux types en fonction de la zone de prolifération des cellules malignes. Ainsi, les tumeurs dérivées de la lumière des canaux galactophores sont des carcinomes canaux *in situ* (CCIS) et les tumeurs dérivées d'un lobule sont des carcinomes lobulaires *in situ* (CLIS) (52,65). Les adénocarcinomes infiltrants représentent environ 80% des adénocarcinomes mammaires. Les cellules cancéreuses de ces tumeurs ont la capacité de rejoindre la circulation sanguine et acquérir des propriétés métastatiques. Les métastases mammaires se développent en premier lieu dans le cerveau, les poumons et les os. Deux principaux types de cancer infiltrant sont identifiés : les carcinomes canaux

infiltrants pour 75% et les carcinomes lobulaires infiltrants pour 5-15% des adénocarcinomes infiltrants (52,65).

La classification TNM reposant sur le degré d'extension du cancer est utilisée en clinique. Cette classification prend en compte la taille de la tumeur (T), l'atteinte ganglionnaire (N) et la présence de métastases (M).

La classification par grade Scarff-Bloom-Richardson (SBR) est utilisée en histologie et repose sur trois critères : le degré de différenciation cellulaire, la forme du noyau et l'activité mitotique estimant la vitesse de division cellulaire.

En plus du grade histopronostique, l'évaluation de l'expression des récepteurs aux œstrogènes (ER), à la progestérone (PR) et du récepteur à l'épidermal growth factor 2 (HER2) est systématiquement effectuée par immunohistochimie (IHC). Le marquage Ki-67 associé à la prolifération cellulaire est également réalisé afin d'évaluer le pronostic.

Une classification moléculaire a été proposée au début des années 2000 permettant d'aborder le cancer du sein par sa biologie, notamment l'expression des récepteurs hormonaux (RH) ER et PR et du HER2 (84). Les cancers du sein sont ainsi subdivisés en deux groupes : les tumeurs RH+ et les tumeurs RH-.

Les tumeurs RH+ représentent 50 à 70% des tumeurs (85,86). Elles sont qualifiées de luminales de par leur profil d'expression rappelant celui des cellules luminales de l'épithélium mammaire (84). On distingue les tumeurs luminales A et luminales B. Les tumeurs luminales A sont les plus fréquentes (40 à 60%) avec un meilleur pronostic et un faible taux de récurrence. Elles sont généralement de bas grade. Elles expriment fortement ER et généralement PR, contrairement aux tumeurs luminales B moins fréquentes (10 à 20%) et généralement de haut grade, exprimant plus faiblement ER.

Une partie de ces tumeurs lumineales B surexpriment HER2 et subdivisent ce groupe en tumeurs lumineales B HER2- et tumeurs lumineales B HER2+.

Les tumeurs RH- représentent 30% des tumeurs (85,86). On distingue les tumeurs sur-exprimant HER2 (HER2+) et les tumeurs dites basal like, la plus souvent triple négative, c'est-à-dire n'exprimant aucun des trois récepteurs. Ces tumeurs RH- ont un pronostic plus sombre.

MICROENVIRONNEMENT IMMUNITAIRE DANS LE CANCER DU SEIN

Il est désormais bien établi que la transformation néoplasique d'un tissu induit une réponse immunitaire dirigée contre les cellules tumorales. La progression du cancer résulte ainsi d'un échappement des cellules tumorales à la veille immunitaire, faisant suite à une phase d'élimination – au cours de laquelle les cellules tumorales sont entièrement détruites par le système immunitaire - et à une phase d'équilibre, pendant laquelle leur croissance est simplement inhibée (87).

Parmi les principaux mécanismes d'échappement documentés pour les cellules carcinomateuses mammaires figurent notamment une diminution de l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) et une augmentation de l'expression de facteurs immunosuppresseurs, ce qui entraîne une diminution de l'activité lytique des cellules T cytotoxiques CD8+ (88).

Lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs)

La principale méthode d'évaluation globale quantitative en routine de l'intensité de la réponse immunitaire induite par les cellules tumorales repose sur le score TILs (« tumor infiltrating lymphocytes »). Ce score, établi sur une coloration histologique standard (hématoxyline-éosine-safran, HES ou hématoxyline-phloxine-safran, HPS),

correspond au pourcentage de la surface du stroma tumoral occupée par des cellules inflammatoires (lymphocytes, plasmocytes et éventuellement macrophages) rapportée à la surface totale du stroma (88).

Le phénotype « TILs élevé » (Figure 5) est plus fréquemment observé dans les tumeurs triple négatives et les tumeurs surexprimant l'HER2. Au sein de ces groupes, il a été associé statistiquement à des grades histologiques plus élevés et à une moindre fréquence d'invasion lymphovasculaire (89).

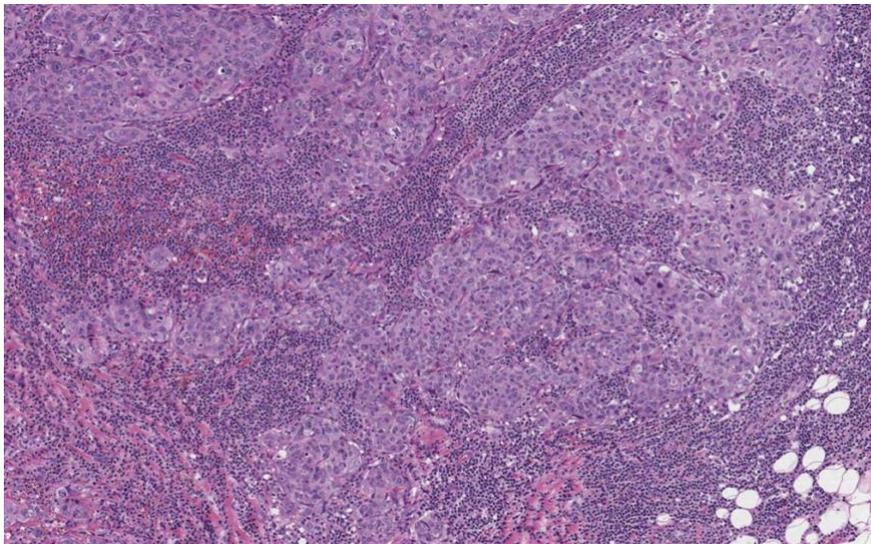


Figure 5. Carcinome canalaire infiltrant l'architecture médullaire, Grade Elston-Ellis III, TILs élevé (80%) (coloration standard, HE) (D'après WHO Classification of tumors of the breast, 5th Edition, WHO Press, 2019)

Plusieurs études récentes ont démontré une corrélation significative entre le phénotype « TILs élevé » (avec un seuil couramment retenu entre 40 et 60%) et le taux de régression histologique complète des cancers du sein après chimiothérapie néoadjuvante (90). Cette relation a pu être mise en évidence dans tous les sous-types d'adénocarcinomes mammaires, indépendamment de l'expression des récepteurs hormonaux ou de l'HER2. Une corrélation positive entre le score TILs établi au diagnostic et la survie globale des patientes a également été mise en évidence pour

les tumeurs triples-négatives et les tumeurs non-luminales HER2+ (91). En revanche, cet impact sur la survie globale n'a pas été mis en évidence pour les tumeurs exprimant les récepteurs hormonaux.

La détermination précise des sous-types cellulaires composant les TILs est difficile en routine. Les modalités de leur évaluation ne sont pas encore définies (coloration standard ou spécifique par exemple). Néanmoins, des travaux de recherche ont permis de préciser le rôle individuel des différents types cellulaires impliqués (Figure 6).

La majorité des cellules qui composent l'infiltrat sont des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques. Les autres cellules représentées dans l'infiltrat du stroma dans des proportions variables sont des cellules NK, macrophages et cellules dendritiques présentatrices d'antigène. Ainsi, les cellules T CD4+ de type Th1, cellules T CD8+ cytotoxiques, cellules NK, macrophages M1 et cellules dendritiques sont considérées comme protectrices contre la croissance tumorale. A l'inverse, les cellules T CD4+ de type Th2, les cellules T CD4+ régulateurs exprimant la protéine « forkhead box P3 » (FOXP3) et les macrophages M2 favoriseraient la progression tumorale (88).

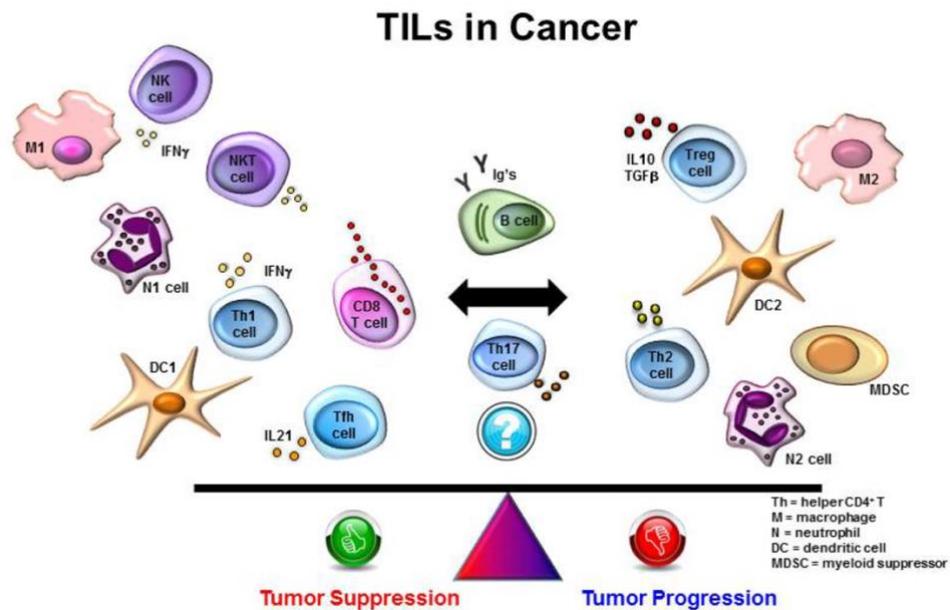


Figure 6. Le dialogue cellulaire entre différentes sous-classes de leucocytes et leur contribution prédominante à des activités pro ou anti-tumorales (D'après Salgado R., Denkert C. et al. *The evaluation of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an international TILs working group 2014. Annals of Oncology 2015. 26(2), 259-71*)

Leucocytes de la lignée myéloïde, macrophages aux propriétés pro-tumorigènes (M2) ou anti-tumorigènes (M1), sous-types de lymphocytes T helpers, lymphocytes T cytotoxiques, lymphocytes T régulateurs, lymphocytes B et cellules dendritiques.

Le ratio lymphocytaire CD4 / CD8 au sein du stroma tumoral a été identifié comme un marqueur pronostic complémentaire au TILs (89). Ce ratio lymphocytaire CD4/CD8 serait plus élevé dans les tumeurs surexprimant l'antigène HER2. Une corrélation statistiquement significative entre ce ratio et la survie sans récurrence et la survie globale dans le cas des tumeurs triples négatives a été mise en évidence (9).

Structures lymphoïdes tertiaires (TLS)

Le rôle des structures lymphoïdes tertiaires (TLS) dans le cancer du sein a été également exploré. Ces structures, décrites récemment dans diverses tumeurs malignes et dans des sites d'inflammation chronique non néoplasiques, sont analogues aux organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques), mais induites localement au sein du microenvironnement. Leur formation est une réaction de lymphocytes B au sein d'un follicule primaire à une présentation antigénique

classique par des cellules dendritiques. Les lymphocytes B sont ainsi activés. En parallèle les follicules primaires sont stimulés par des lymphocytes TFH (« follicular helpers ») CD4+ pour constituer un follicule lymphoïde secondaire qui aboutira finalement à l'apparition d'un centre germinatif. Leur rôle est de fournir localement des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques, T CD4+ helpers, lymphocytes B mémoires et plasmocytes producteurs d'anticorps, afin de participer à la clairance tumorale (92).

Les TLS peuvent être identifiées facilement en histologie standard. Leur présence peut être éventuellement confirmée à l'aide d'un marquage immunohistochimique dirigé contre les lymphocytes B (CD20+) et/ou les cellules folliculaires dendritiques (CD21+ / CD23+). Elles sont le plus souvent situées au niveau du front d'infiltration des tumeurs (Figure 7). Elles ont été associées à un pronostic plus favorable dans de nombreux cancers solides, et notamment dans le cancer du sein où leur signification pronostique est globalement superposable à celle du phénotype « TILs élevé » (91).

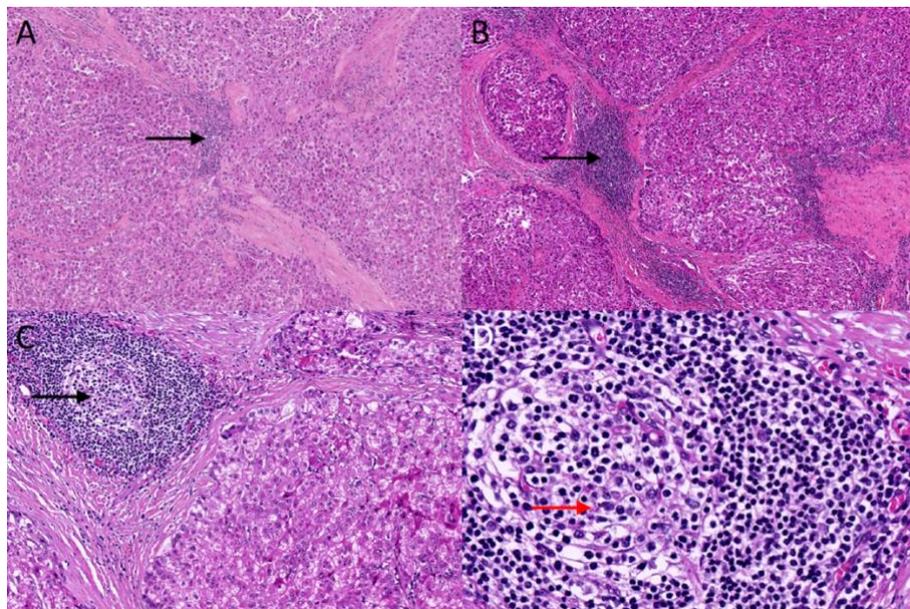


Figure 7. Structure lymphoïde tertiaire (TLS) (flèches noires) avec centre germinatif (flèche rouge) associée à un carcinome hépatocellulaire (CHC) (coloration standard, HES). (D'après Calderaro J. et al. *Intra-tumoral tertiary lymphoid structures are associated with a low risk of early recurrence of hepatocellular carcinoma. J. Hepatol* 2019. 70(1), 58-65)

CANCER DU SEIN ET GROSSESSE

Le risque de cancer du sein est influencé par la grossesse. Comme souligné auparavant, chaque naissance diminue le risque estimé de 8%. Chaque année supplémentaire avant la première grossesse augmente ce risque de 3% (54).

Néanmoins, le pronostic du cancer du sein serait dépendant de la temporalité de survenue du cancer par rapport à la grossesse (93–95). Pendant la grossesse, en post-partum immédiat et jusqu'à trois à quatre années après l'accouchement une augmentation du risque de cancer du sein a été suggérée (96). A long terme et notamment 15 ans après l'accouchement, la parité pourrait être un facteur protecteur contre le cancer du sein. Cette observation a permis d'avancer des hypothèses expliquant l'effet bénéfique de la grossesse sur la survenue du cancer du sein.

Cancer du sein associé à la grossesse

Le cancer associé à la grossesse (CALG) est une entité particulière en oncologie, défini comme un cancer diagnostiqué pendant la grossesse ou jusqu'à un an voire 4-5 ans après l'accouchement. Le cancer du sein avec son incidence de 1 / 3 000 à 1 / 10 000 grossesses est le premier CALG devant le cancer du col utérin. Les cancers du sein associés à la grossesse surviennent dans 60% des cas pendant la gestation, et dans 40% des cas au cours de l'année suivant l'accouchement. Ils représentent 3,8% de l'ensemble des cancers du sein, et jusqu'à 18% des cancers du sein survenant chez les femmes de moins de 30 ans (97).

En comparaison avec les cancers du sein non associés à la grossesse, les CALG sont plus souvent des carcinomes canaux infiltrants de grade histologique élevé, de plus grande taille au diagnostic et plus souvent associés à un envahissement ganglionnaire

allant jusqu'à 70% des cas. Ils n'expriment généralement pas les RH, et surexpriment la protéine HER2 dans près de 40 % des cas. Ils sont également plus souvent associés à une réponse inflammatoire significative avec un phénotype « TILs élevé » dans 14 à 28% des cas (98). Il existe par ailleurs fréquemment un retard diagnostique du fait des modifications anatomiques du sein au cours de la grossesse qui peut influencer le stade du cancer lors de sa découverte, et son pronostic (97).

Néanmoins, les analyses après ajustement selon l'âge montre que le pronostic des patientes avec CALG est similaire aux femmes non enceintes présentant un cancer du sein (99,100). Les connaissances actuelles permettent de proposer un traitement similaire à celui proposé en dehors d'une grossesse, en adaptant la séquence thérapeutique à l'âge gestationnel, au stade de la maladie et au choix de la patiente.

Hormones en lien avec la grossesse

L'augmentation du risque de cancer du sein associé à la grossesse pourrait être expliquée par l'élévation physiologique des concentrations en estrogènes et/ou autres facteurs de croissance pendant la grossesse.

Cellules souches mammaires en lien avec la grossesse

Cellules souches mammaires sont impliquées dans les modifications structurales au sein du tissu mammaire. Elles possèdent un potentiel de différenciation en cellules myoépithéliales luminales et basales (101–103). Elles pourraient participer à l'initiation de la cancérogénèse mammaire (104).

Physiologiquement durant la grossesse le nombre de cellules épithéliales mammaires augmente massivement, du fait de l'expansion du contingent de cellules souches et des cellules intermédiaires proliférantes (Figure 8). Cette prolifération de cellules

épithéliales s'accompagne d'une augmentation de l'angiogenèse et d'une augmentation du contingent de cellules stromales, ainsi que de changements de la matrice extracellulaire. Ainsi, si la grossesse survient chez une femme dont l'épithélium mammaire contient une cellule souche présentant une altération génétique à risque, une sélection clonale peut être observée.

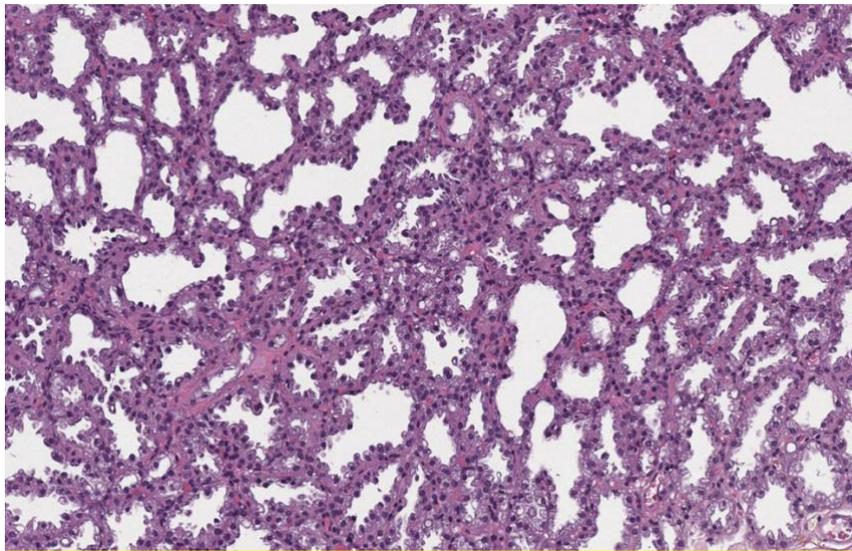


Figure 8. Aspect histologique d'un adénome lactant, forme extrême de l'hyperplasie lobulaire avec hyperplasie sécrétoire observée pendant la grossesse (coloration standard, HE). (D'après Rosen's Breast Pathology, 4th Edition (Wolter's Kluwer, 2015))

En revanche après la grossesse, le nombre de ces cellules épithéliales décroît parallèlement à une diminution de la densité mammaire. Lors de cette involution, la protéolyse induisant la dégradation de la matrice extracellulaire pourrait provoquer des lésions de la membrane basale. Ceci pourrait faciliter la progression, l'invasion et l'essaimage métastatique de cellules tumorales (105).

La diminution du risque de cancer du sein à distance de l'accouchement pourrait être expliquée par la perte du potentiel de transformation néoplasique par les cellules souches mammaires en lien avec leur différenciation pendant la grossesse. La

différenciation du tissu mammaire serait amorcée par la première grossesse puis accentuée par les suivantes.

Immunité en lien avec la grossesse

Pendant la grossesse un état d'immunotolérance maternelle est établi afin de permettre l'implantation et la placentation (106). Cet état d'immunotolérance pourrait inhiber le système de la veille immunitaire contre les cellules tumorales au cours de la grossesse, notamment par le biais de l'antigène HLA-G, marqueur initialement identifié à la surface des cellules trophoblastiques, qui semble également fréquemment exprimé par les cellules tumorales mammaires pendant la grossesse (107).

Cellules fœtales

Les cellules fœtales allogéniques transmises à la mère pendant la grossesse, pourraient participer à la surveillance immunitaire contre le cancer du sein à distance de la grossesse. Tandis que les cellules d'origine hématopoïétique joueraient un rôle de sentinelle et de médiateurs dans la veille immunitaire contre les cellules tumorales, les cellules mésenchymateuses seraient impliquées dans la réparation des tissus lésés (18).

CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES ET CANCER

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont des cellules progénitrices pluripotentes non hématopoïétiques qui contribuent au maintien et à la régénération des tissus conjonctifs (108). Bien que les CSM résident essentiellement dans la moelle osseuse, elles sont également relativement abondantes dans d'autres tissus, notamment le tissu adipeux, le derme, l'endomètre, le cordon ombilical ou la pulpe

dentaire (109). Outre leur aptitude à se différencier en cellules mésenchymateuses spécialisées telles que les fibroblastes, les adipocytes, les chondrocytes, les ostéoblastes ou les cellules endothéliales, les CSM ont également un rôle immunomodulateur via leur capacité à produire des chémokines, notamment la prostaglandine E2 (PGE2), l'interleukine 6 (IL-6), la protéine Fas-ligand (FasL) ou la protéine « Programmed death-ligand 1 » (PD-L1). La contribution des CSM à la réparation tissulaire a été mise en évidence après la survenue de dommages tissulaires et dans les contextes d'inflammation chronique, où des signaux endocrines spécifiques sont produits par les tissus lésés afin de mobiliser des CSM pluripotentes de la moelle osseuse et de les recruter dans des tissus cibles. L'implication des CSM dans la formation de cicatrices fibreuses a notamment été démontrée (110).

Dans le tissu tumoral du cancer du sein le stroma a des propriétés proches de celles du tissu atteint d'une inflammation chronique ou en voie de cicatrisation. Les cellules stromales recrutées au sein de la tumeur ont des capacités à la fois pro et anti-tumorigènes. Elles induisent une réaction desmoplastique stimulant une sécrétion constante de facteurs de croissance, de cytokines et de protéines de remodelage de la matrice extracellulaire. Les interactions entre les cellules du stroma tumoral et les cellules mésenchymateuses sont capables d'induire l'acquisition du potentiel invasif puis métastatique par les cellules tumorales. La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) qui se traduit par la diminution de l'expression de molécules d'adhésion conduisant à une perte partielle du phénotype épithélial des cellules carcinomateuses pourrait être induite par les CSM (111).

Les CSM injectées par voie intraveineuse semblent être attirées par les niches tumorales de gliomes, adénocarcinomes coliques, carcinomes ovariens, sarcomes de Kaposi et mélanomes, mais aussi par les niches tumorales du cancer du sein (112).

Ce recrutement serait lié à la production par les cellules tumorales de facteurs solubles, notamment l'IL-6 (113).

Le rôle de CSM dans la cancérogénèse n'est pas complètement élucidé. Néanmoins, les résultats *in vitro* et *in vivo* retrouvent principalement un effet pro-oncogène des CSM dans les cancers en général et plus particulièrement dans le cancer du sein.

Dans un modèle murin de xénogreffe, l'injection intraveineuse concomitante de CSM et de cellules tumorales mammaires humaines provoquait une croissance tumorale plus importante et un taux de métastases pulmonaires plus élevé (112). Ceci pourrait être lié à la sécrétion de la cytokine ligand de chimiokine 5 (CCL5) par les CSM stimulée par le contact avec les cellules tumorales mammaires. La cytokine CCL2 de manière paracrine pourrait augmenter les capacités de migration et d'invasion de cellules tumorales.

Ces résultats ont été confirmés *in vitro* après exposition de cellules carcinomateuses mammaires à un milieu conditionné de cellules souches mésenchymateuses issus de sang de cordon où une augmentation de la prolifération et de la migration des cellules tumorales exposées ont été observées (114).

Un effet opposé a été noté dans un modèle murin où l'injection concomitante de cellules tumorales mammaires et de CSM humaines à des souris réduisait la prévalence de métastases mammaires et conduisait à une inhibition de la croissance des cellules tumorales par un effet pro-apoptotique (115).

CELLULES SOUCHES HEMATOPOIETIQUES ET CANCER

Contrairement aux cellules immunitaires matures et aux CSM, le rôle de cellules souches hématopoïétiques (CSH) dans la cancérogénèse a été peu étudié avec des résultats expérimentaux discordants.

Dans un modèle murin de carcinome hépatocellulaire une surexpression des gènes WNT4 et p53 impliqués dans l'oncogénèse hépatique a été observée chez les rat après injection intraveineuse de cellules précurseurs hématopoïétiques humaines CD34+, comparé aux contrôles n'ayant pas reçu d'injection de CD34+ (116). Ceci s'accompagnait d'une augmentation du pourcentage de cellules cancéreuses progénitrices et une augmentation du grade histologique des carcinomes hépatocellulaires par rapport au groupe contrôle. Ces résultats suggéraient un effet délétère des CSH CD34+ sur la progression des carcinomes hépatocellulaires.

L'attraction de cellules hématopoïétiques par les nid tumoraux de glioblastome après injection intraveineuse a été mise en évidence (117). Dans un modèle de co-culture de cellules de glioblastome avec des cellules hématopoïétiques CD34+ dérivées de la moelle osseuse humaine, une interaction comportant un échange de marquage de la surface cellulaire a été démontrée (Figure 9) (118). Ces interactions ont inhibé la transition épithélio-mésenchymateuse de cellules de glioblastome induite par le « Transforming Growth Factor-beta » (TGF- β 1). En revanche, lorsqu'une interaction avec les CSH était permise, les cellules de glioblastome présentaient un index de prolifération plus faible (28).

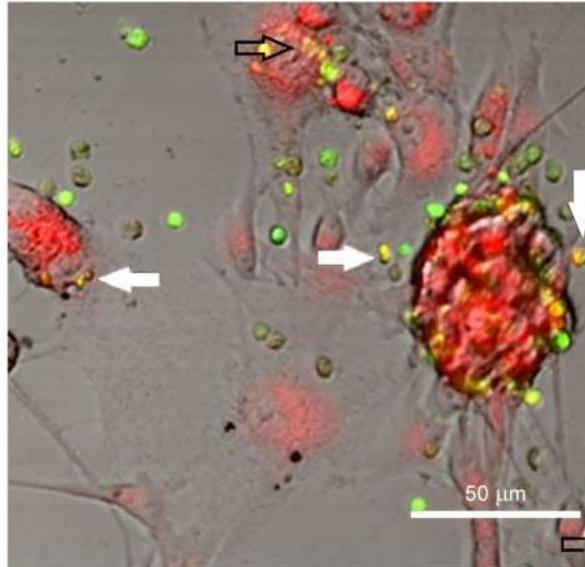


Figure 9. Photographie en microscopie confocale après marquage cellulaire fluorescent. (D'après Milkina et al. *Interaction of hematopoietic CD34+ CD45+ stem cells and cancer cells stimulated by TGF- β 1 in a model of glioblastoma in vitro.* *Oncol Rep.* 2018 Nov;40:2595–607)

Interactions entre les cellules de glioblastome (rouge) et les cellules hématopoïétiques CD34+ dérivées de la moelle osseuse humaine (vert) comportant un échange de marquage fluorescent entre les cellules.

Aucune étude n'a étudié le rôle des cellules hématopoïétiques CD34+ dans le cancer du sein. En revanche, il existe des protocoles thérapeutiques expérimentaux utilisant la greffe de CSH dans certains cancers solides, notamment dans le cancer du sein. L'origine du greffon est la moelle osseuse, le sang périphérique ou le sang placentaire, et ces greffes peuvent être autologues ou allogéniques. L'objectif de ces transplantations consiste à réapprovisionner la moelle hématopoïétique en cellules souches dans le cas d'une autogreffe, ou en activant une nouvelle immunité contre les cellules cancéreuses dans le cas d'une allogreffe. Dans les deux cas, les effecteurs de la réponse thérapeutique attendue sont des cellules immunitaires différenciées et non les cellules souches elles-mêmes.

MICROCHIMERISME ET CANCER DU SEIN

Les cellules fœtales ont été mises en évidence dans le tissu de 90% de carcinomes canaux du sein dans le contexte de CALG (Figure 10) (119), et jusqu'à 100% de cancers du sein non liés à la grossesse, tout type confondu (120). Elles ont été principalement détectées au sein de la tumeur et, avec une fréquence moins élevée, dans le tissu paratumoral ou le tissu sain (119,120). Vingt pourcent des cellules fœtales présentes dans le tissu tumoral mammaire ont été identifiées comme stromales et 16% comme épithéliales (119). Contrairement aux tumeurs cutanées, leur phénotype n'était que très rarement endothélial. Les cellules immunitaires d'origine fœtale n'ont pas été observées au sein de la tumeur mammaire (119,121).

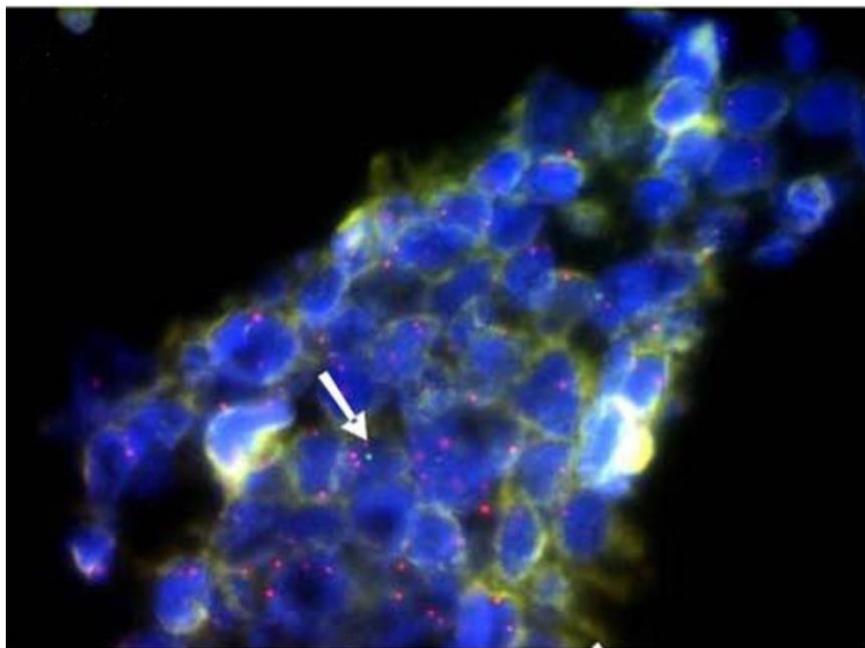


Figure 10. Photographie en microscopie après FISH dirigée contre les chromosomes X et Y. (D'après Dubernard G. et al. *Breast cancer stroma frequently recruits fetal derived cells during pregnancy.* *Breast Cancer Res.* 2008; 10(1), R14)

Cellules fœtales présentant le chromosome Y (vert) au milieu de cellules maternelles présentant deux chromosomes X (rouges).

Le rôle du microchimérisme fœtal dans le cancer du sein n'est pas complètement élucidé. Dans un modèle murin de microchimérisme utilisant des souris transgéniques

MMTV-Ras développant des tumeurs mammaires et salivaires pendant ou au décours d'une grossesse, la présence de cellules fœtales était détectée dans 100% de tumeurs (122). Le nombre de cellules fœtales augmentait avec le grade histologique du cancer avec 29 cellules fœtales par million de cellules maternelles pour les tumeurs de haut grade versus 13 cellules fœtales par million de cellules maternelles pour les tumeurs de bas grade, $p=0,032$) (Figure 11). La majorité de ces cellules fœtales (62%) avaient un phénotype épithélial. Ce résultat laissait supposer que, recrutées telles quelles ou différenciées à partir de progéniteurs sous l'influence de l'environnement tumoral, ces cellules joueraient un rôle dans la réparation tissulaire. Leur présence, plus importante au niveau des tumeurs de haut grade renforcerait cette hypothèse, en imaginant que le recrutement de ces cellules ou la différenciation de leurs progéniteurs augmenterait avec l'ampleur des dégâts tissulaires.

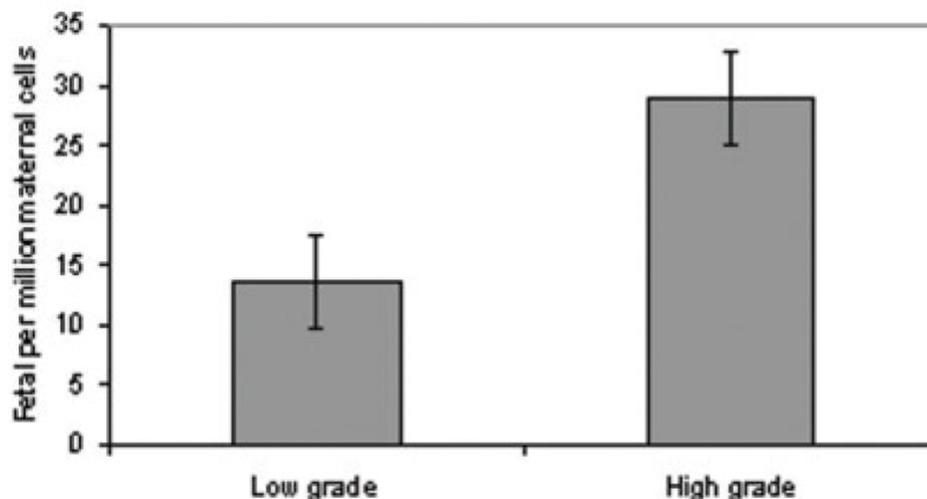


Figure 11. Comparaison de l'incidence du microchimérisme fœtal entre les tumeurs mammaires selon le grade histologique. (D'après Dubernard G. et al. *Increased fetal cell microchimerism in high grade breast carcinomas occurring during pregnancy. Int. J. Cancer* 2009 ; 124, 1054-1059)

RÔLE ANTI-TUMORAL DU MICROCHIMERISME DANS LE CANCER DU SEIN

Un rôle protecteur du microchimérisme fœtal dans le cancer du sein a été suggéré à la suite des travaux de Gadi et al. (123). Dans cette étude, la détection du chromosome Y par PCR quantitative dans des prélèvements de sang périphérique de mères ayant précédemment accouché d'un garçon a mis en évidence une prévalence de cellules fœtales circulantes significativement inférieure chez des femmes avec cancer du sein comparé aux femmes contrôles en bonne santé (56% versus 26% respectivement). Ce premier résultat suggérait que la présence de cellules fœtales circulantes pouvait avoir un effet protecteur vis-à-vis de la survenue d'un cancer du sein (OR=0,29 ; p=0,02).

L'effet protecteur du microchimérisme fœtal au niveau tissulaire a également été suggéré (124). L'analyse des tissus mammaires non tumoraux a mis en évidence une prévalence plus importante du microchimérisme fœtal chez des femmes sans antécédent de cancer du sein comparé aux femmes atteintes d'un cancer du sein. Suite à ces résultats l'hypothèse d'un rôle immunologique des cellules fœtales dans la veille immunitaire anti-tumorale et dans le processus de réparation des tissus lésés a été formulée.

Dans une étude prospective publiée en 2012 (125), la détection de cellules fœtales dans le sang périphérique d'une cohorte de 272 patientes était associée à une réduction significative du risque de survenue d'un cancer du sein dans un délai de 9 à 13 ans. Cependant, elle était associée à une augmentation du risque de développer un cancer du côlon dans ce même délai.

Dans un modèle murin des CSM dérivées du sang de cordon ombilical ont été injectées par voie veineuse, simultanément ou secondairement à une injection intramammaire de cellules de cancer du sein chez des souris (115). Injectées

simultanément, ces cellules fœtales permettaient une inhibition de la formation de tumeurs mammaires et de la diffusion des cellules cancéreuses. Injectées secondairement, elles étaient responsables d'une diminution de la taille tumorale et du nombre de métastases pulmonaires.

EFFET PROTUMORAL DU MICROCHIMERISME

L'effet d'exposition indirecte des cellules de cancer du sein aux CSM dérivées du sang de cordon ombilical a été évalué dans un système de co-culture transmembranaire (126). Une augmentation des capacités de migration et d'invasion a été observée dans les cellules exposées aux CSM fœtales. L'effet d'induction de métastases par les CSM a été confirmé *in vivo* dans un modèle murin de xenogreffe (126).

OBJECTIFS

L'objectif principal de cette thèse était d'évaluer l'impact des cellules fœtales sur les processus de cancérogénèse dans le cancer du sein par une double approche, expérimentale et translationnelle.

Dans la phase expérimentale les interactions entre les cellules hématopoïétiques fœtales dérivés du sang du cordon et différentes lignées de cellules cancéreuses mammaires et leurs conséquences cellulaires et moléculaires ont été évaluées.

Dans la phase translationnelle la corrélation entre la présence de cellules fœtales au sein de tumeurs mammaires malignes et le type, le stade TNM et l'évolution du cancer du sein ont été décrites, à partir d'une collection biologique du centre de prise en charge des cancers au sein de l'hôpital Tenon. Les modifications immunologiques

péritumorales et intratumorales provoqués par la présence de cellules fœtales au sein de la tumeur ont également été décrites.

RESULTATS

Le projet MoSaiC (**M**icrochimerisme fœtal et **C**ancer du **S**ein) comportait trois volets MoSaiC 1, MoSaiC 2 et MoSaiC 3, avec une approche expérimentale (MoSaiC 3) et une approche translationnelle (MoSaiC 1 et 2). L'objectif du volet MoSaiC 1 était d'évaluer l'impact du microchimérisme fœtal sur le profil immunitaire tumoral (TILs) du cancer du sein à partir d'une collection de tumeurs mammaires. L'objectif du volet MoSaiC 2 était d'évaluer la corrélation entre la présence du microchimérisme fœtal dans le sang circulant et le diagnostic du cancer du sein en analysant les sous-populations de cellules immunitaires. L'objectif du volet MoSaiC 3 était d'évaluer les interactions entre les cellules fœtales CD34+ dérivées du sang de cordon avec les cellules tumorales du cancer du sein *in vitro*. Les trois études ont été préalablement validés par le CPP (MoSaiC 1 : CEROG – Comité d'éthique de la recherche en Obstétrique et Gynécologie, N° 2019-GYN-0202 ; MoSaiC 2 : Comité de protection des personnes Ouest II (CA), N° 2019-A00705-52 ; MoSaiC 3 : Comité de Protection des Personnes, N° 2019-A00705-52) la partie expérimentale utilisant également des cellules humaines obtenues de patientes.

Ce travail a été financé par le prix Ruban Rose (Association le cancer du sein parlons-en !).

Ce manuscrit décrit les résultats obtenus dans le cadre des études MOSAIC 1 et 3.

Le premier temps du travail expérimental de la thèse a consisté à mettre au point la technique d'extraction des cellules précurseurs hématopoïétiques CD34+ à partir de sang du cordon et à les caractériser.

1- ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE CELLULES PRECURSEURS HEMATOPIETIQUES CD34+ DERIVEES DU SANG DE CORDON ET LIGNEES CELLULAIRES DU CANCER DU SEIN : MECANISME DU MICROCHIMERISME FOËTAL ? (Article 1, soumis)

Introduction

La seconde partie du travail expérimental a concerné l'étude des interactions entre les cellules précurseurs hématopoïétiques CD34+ et les cellules tumorales mammaires.

Ce travail a été mené au sein de l'UMRS938 en collaboration avec la Plateforme de GENOMI'C (Institut Cochin, Paris), la Plateforme de Cytométrie CISA du Centre de Recherche de Saint Antoine et le Dr L. Kobari (équipe Développement hématopoïétique et leucémique: maladies et thérapie cellulaire, Centre de Recherche de Saint Antoine).

L'hématopoïèse est le processus la production des cellules matures et fonctionnelles du sang pendant toute la vie d'un organisme. Le sang contient différentes populations cellulaires matures provenant de différentes lignées cellulaires. Les granulocytes, les monocytes et les cellules dendritiques appartiennent à la lignée myéloïde, tandis que les lymphocytes appartiennent à la lignée lymphoïde. Le système hématopoïétique est organisé de façon hiérarchique avec de différents niveaux de différenciation cellulaire coexistant (Figure 12).

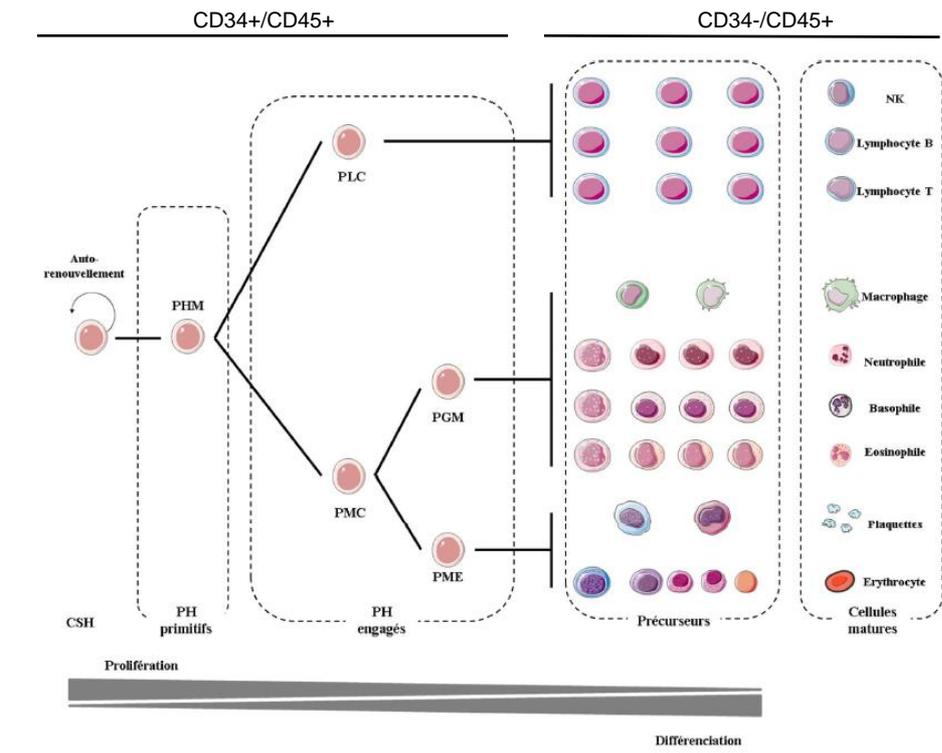


Figure 12. Schéma général des étapes de l'hématopoïèse

D'après A. Bourdieu, *Approche fonctionnelle et métabolique des cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques du sang périphérique en homéostasie à travers le modèle side-population. Vers une nouvelle source de greffon hématopoïétique?*, thèse en Sciences de la Vie et de la Santé, sous la direction de Philippe Brunet de la Grange, Université de Bordeaux, 2017

CSH : Cellule souche hématopoïétique – PH : Progéniteur Hématopoïétique – PHM : Progéniteur Hématopoïétique Multipotent – PMC : Progéniteur Myéloïde Commun – PLC : Progéniteur Lymphoïde Commun – PME : Progéniteur Mégacaryocyte Erythroïde – PGM : Progéniteur Granulocyte Macrophage – NK : Natural Killer

Les cellules souches hématopoïétiques, capable de s'auto-renouveler pour maintenir l'intégrité de leur pool, peuvent également se différencier et donner naissance aux progéniteurs hématopoïétiques, premier stade de différenciation cellulaire dans l'hématopoïèse. Ces progéniteurs constituent une population hétérogène et sont composés de deux pools cellulaires : le premier dit « primitif », comprend les progéniteurs hématopoïétiques multipotents, et est à l'origine du second dit « engagé », regroupant les progéniteurs lymphoïde commun et myéloïde commun. Les progéniteurs myéloïdes communs donnent eux-mêmes naissance aux progéniteurs Granulocyte-Macrophage et Mégacaryocyte-Erythroïde, composant également le pool dit « engagé ». Les précurseurs hématopoïétiques sont à leur tour issus de la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques, et les cellules matures, ayant chacune une fonction spécifique, sont le produit final du processus d'hématopoïèse.

Les cellules CD34+

Les cellules souches hématopoïétiques sont des cellules multipotentes, les plus immatures, caractérisées par des capacités d'auto-renouvellement. Leur production commence lors de la vie embryonnaire pour ensuite coloniser le foie puis la moelle osseuse chez l'adulte (127).

Les progéniteurs hématopoïétiques représentent le premier stade de différenciation cellulaire dans l'hématopoïèse. Ils se caractérisent fonctionnellement par une perte totale des capacités d'auto-renouvellement et de greffe. Ils constituent une population

hétérogène et sont composés d'un pool cellulaire dit « primitif », comprenant les progéniteurs hématopoïétiques multipotents, à l'origine d'un autre pool dit « engagé », regroupant les progéniteurs lymphoïde commun et myéloïde commun. Les progéniteurs myéloïdes communs donnent eux-mêmes naissance aux progéniteurs Granulocyte-Macrophage et Mégacaryocyte-Erythroïde, composant également le pool dit « engagé ».

Les précurseurs hématopoïétiques sont à leur tour issus de la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques, et les cellules matures, ayant chacune une fonction spécifique, sont le produit final du processus d'hématopoïèse.

L'identification des cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques sur des critères morphologiques est impossible, et il n'existe pas de marqueurs phénotypiques parfaitement spécifiques. Classiquement, ces cellules sont repérées grâce à l'expression d'une protéine membranaire CD34. Sa fonction au niveau cellulaire reste à ce jour mal connue mais elle pourrait être impliquée dans l'adhésion cellulaire. Les cellules souches hématopoïétiques ne représentent qu'un faible pourcentage des cellules CD34+, représentées à plus de 90% par les progéniteurs hématopoïétiques. En dehors des cellules hématopoïétiques, seules les cellules endothéliales expriment le marqueur CD34+, et elles représentent un pourcentage plus faible encore que les cellules souches hématopoïétiques.

Les précurseurs hématopoïétiques et les cellules matures sont, à l'inverse, tous identifiables morphologiquement en microscopie optique. Cette différenciation morphologique s'accompagne d'une différenciation phénotypique, avec perte de la protéine membranaire CD34+, en parallèle de l'acquisition de marqueurs antigéniques spécifiques. La protéine membranaire CD45 est spécifique des cellules hématopoïétiques et elle est présente sur l'ensemble de ces cellules. L'utilisation

combinée des marqueurs CD34 et CD45 permet donc de distinguer 3 populations cellulaires : les cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques CD34+/CD45+ (que nous allons appeler par la suite CD34+), les cellules endothéliales CD34+/CD45-, et les précurseurs et cellules matures hématopoïétiques CD34-/CD45+ (Figure 12).

Caractérisation des cellules CD34 + issues du sang de cordon

Le sang de cordon a été recueilli au sein de la maternité de l'hôpital Tenon. La méthodologie clinique et éthique est décrite en détail dans l'article 1 ci-dessous.

L'isolement, l'évaluation de la pureté des recueils cellulaires, des niveaux de survie et de différenciation, ainsi que l'évaluation du sécrétome cytokinique ont été réalisés au sein de l'UMR S_938, la méthodologie et les résultats sont également décrits dans l'article 1 ci-dessous.

Lignées cellulaires du cancer du sein

Quatre lignées de cellules, représentatives des principaux sous-types moléculaires de cancer du sein, ont été initialement choisies. Les différentes lignées, leurs caractéristiques moléculaires, et leur milieu de culture sont décrits dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Caractéristiques des lignées cellulaires tumorales

Lignée	MCF-7	MDA-MB-231	BT474	SK-BR-3
Statut ER	+++	-	+	-
Statut PR	+/-	-	+	-
HER2	-	-	+	++
Classification clinique	LumA	TN	LumB HER2	HER2+
Milieu	DMEM		RPMI 1640	
Sérum	SVF 10%			
Pen Strep	1%			

ER- Récepteur aux estrogènes ; PR- Récepteur à la progestérone ; HER2- Récepteur à l'Epidermal Growth Factor

Lum- Luminal ; TN- Triple négatif

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium (ThermoFisher Scientific, Ref. 61965-026)

RPMI 1640 - Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 (ThermoFisher Scientific, Ref. 61870-010)

SVF - Sérum de veau fœtal (Corning, Ref. 35-0796CV) ; Pen Strep - Penicillin Streptomycin (ThermoFisher Scientific, Ref. 15140122)

Les techniques d'analyse fonctionnelle se sont avérées inadaptées pour l'interprétation de données concernant les lignées BT474 et SK-BR-3. Ces lignées se caractérisent par une plus grande fragilité lors de la culture cellulaire et par une prolifération en 3 dimensions ce qui pourrait sous-estimer les résultats de l'analyse par la technique de xCELLigence. Après plusieurs tentatives de mise au point, nous avons décidé de sursoir à l'utilisation de ces deux lignées.

ARTICLE 1 (soumis)

Impact of fetal umbilical cord blood CD34⁺ cells on breast cancer cell lines: a mechanism of fetal microchimerism?

Kamila Kolanska^{1,2}, Merwane Roche², Camille Carrière^{1,2}, Marjolaine Le Gac^{1,2}, Nathalie Ferrand², Maurice Zaoui², Morgane Le Gall³, Joseph Gligorov^{2,4}, Michèle Sabbah², Selim Aractingi⁵, Nathalie Chabbert-Buffet^{1,2}

¹ Service de gynécologie obstétrique et médecine de la reproduction, Hôpital Tenon, AP-HP, Sorbonne Université, 4 rue de la Chine, 75020 Paris, France

² INSERM UMRS 938, Centre de Recherche Saint-Antoine, 27 rue Chaligny, 75571 PARIS cedex 12, France

³ Plateforme Proteom'IC, Université de Paris Cité, Institut Cochin, INSERM, CNRS, F-75014 Paris, France

⁴ Assistance-Publique Hôpitaux de Paris-Tenon, Institut Universitaire de Cancerologie Université Pierre et Marie Curie, Sorbonne Université, Paris, France

⁵ Institut Cochin, Inserm, UMRS1016, Faculté de médecine, Université de Paris Cité, Paris, France

Corresponding author:

Kamila Kolanska

Service de Gynécologie Obstétrique et Médecine de la Reproduction

Hôpital Tenon, 4 rue de la Chine

75020 Paris, France

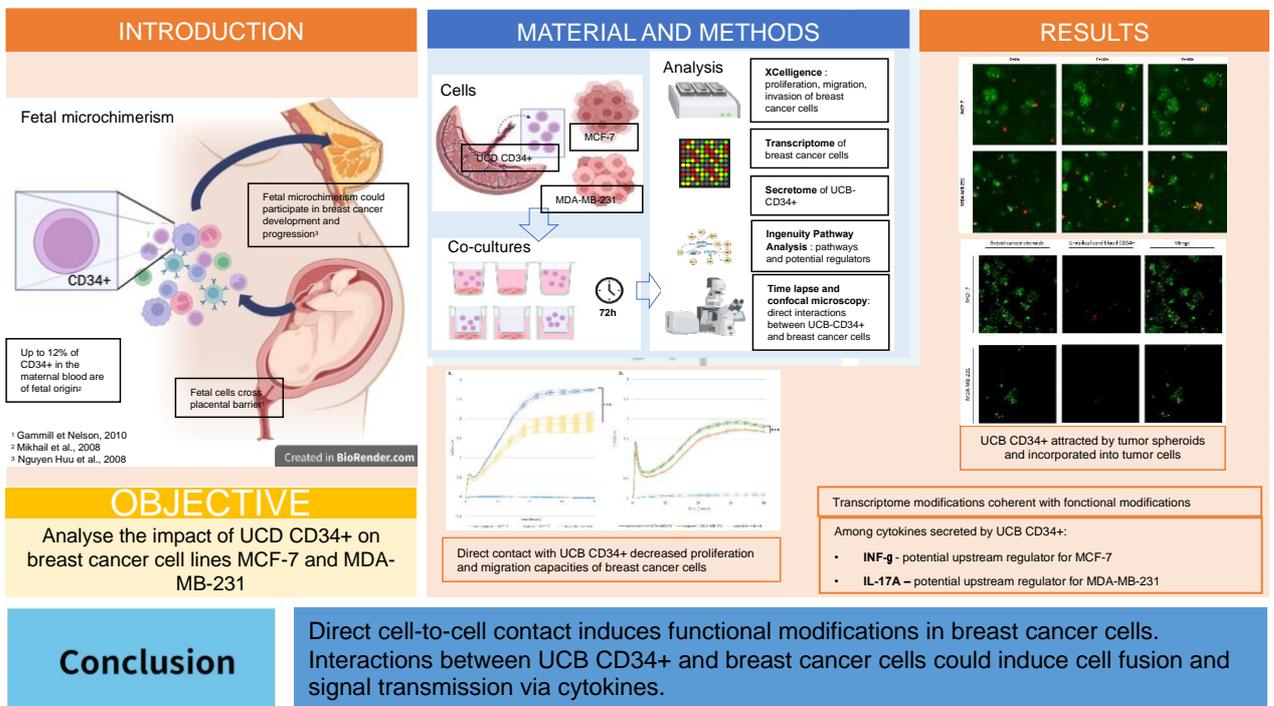
Email: kamila.kolanska@aphp.fr

GRAPHICAL ABSTRACT (demandé pour la soumission par la revue JGO et également présenté comme poster Paris Santé Femmes 2023, Lille :

EP_289 « Les cellules CD34+ dérivées du sang de cordon modifient les capacités prolifératives et migratoires des lignées cellulaires de cancer du sein par contact intercellulaire direct : mécanisme de microchimérisme foetal ?»)



Impact of fetal umbilical cord blood CD34+ cells on breast cancer cell lines: a mechanism of fetal microchimerism?



ABSTRACT

Introduction

Fetal microchimerism could be involved in the regulation of breast cancer oncogenesis. CD34⁺ cells could be of a particular interest as up to 12% of the CD34⁺ population in maternal blood are of fetal origin.

The aim of this research was to analyze the impact of umbilical cord blood (UCB) CD34⁺ on MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines.

Material and Methods

UCB CD34⁺ cells were obtained from healthy women at full-term delivery. Direct and indirect cultures were grown with MCF-7 and MDA-MB-231 cells. Proliferation, migration, invasion, and transcriptomic analysis of breast cancer cell lines were compared between cultures exposed and non-exposed to UCB CD34⁺ cells. Interactions between UCB CD34⁺ and breast cancer cells were analyzed under fluorescent microscopy. Functional analyses were generated with QIAGEN's Ingenuity Pathway Analysis (IPA) and Gene Set Enrichment Analysis (GSEA).

Results

Direct contact between UCB CD34⁺ and breast cancer cell lines induced a reduction in the proliferative capacities of MCF-7 and MDA-MB-231 and diminished the migration abilities of MDA-MB-231 cells. In 3D co-culture, UCB CD34⁺ cells were attracted by tumor spheroids and incorporated into tumor cells. These cell-to-cell interactions were responsible for transcriptome modifications coherent with observed functional modifications. Among the cytokines secreted by UCB CD34⁺, IFN γ was identified as a potential upstream regulator responsible for the

molecular modifications observed in transcriptomic analysis of MCF-7 breast cancer cells exposed to UCB CD34⁺ cells, as was IL-17A in MDA-MB-231 cells.

Conclusion

Direct cell-to-cell contact induces functional modifications in breast cancer cells. Interactions between UCB CD34⁺ and breast cancer cells could induce cell fusion and signal transmission via cytokines. Further analysis of direct cell-to-cell interactions should be performed at a molecular level to further understand the potential role of fetal CD34⁺ cells in breast cancer.

KEY WORDS

Fetal hematopoietic stem cells; micro-chimerism; breast cancer; cell proliferation; cell migration; cell invasion

INTRODUCTION

Breast cancer is the most common malignancy in European women with about 60 000 new cases and 12 000 deaths from the disease per year in France (1). Parity and an early age at first pregnancy have been suggested to play a protective role in cancer development (2–5). This protective role could be even greater in women with multiple pregnancies (6) or giving birth to a boy (7). Despite the long-term protective role of pregnancy on breast cancer, a transitory increase in the incidence of breast cancer has been observed in the first 3 to 4 years after delivery (5).

Although the physiopathologic mechanisms of the protective role of parity has not been completely elucidated, it is thought that fetal microchimerism may be involved (8,9). Fetal microchimerism is defined as the presence of fetal cells in the maternal organism resulting from the transfer of cells through the placental barrier during pregnancy (10). The types of fetal cells detected in maternal blood include mature immune cells, and hematopoietic (CD34⁺ cells) (11) and mesenchymal progenitors (12). During pregnancy as much as 12% of the CD34⁺ cells in the maternal blood may be of fetal origin (13). Fetal cells can be detected in maternal blood for several years (14): CD34⁺ cells of fetal origin have been found in maternal peripheral blood up to 27 years after delivery (15).

Fetal cells can participate in wound healing (16,17), angiogenesis (18,19), and carcinogenesis (20). They can migrate from their niche to the target tissue and differentiate in the appropriate cell types (11,21).

An inverse association between the incidence of breast cancer and circulating fetal cells has been demonstrated (22): fetal cells have been found in tumor samples in nine out of ten pregnancy-associated carcinomas (23). This suggests that fetal cells may have a potential regulatory action on tumor cells. Furthermore, fetal microchimerism may induce an immune mechanism as allogenic grafting of hematopoietic stem cells has been shown to improve immune surveillance in hematologic diseases (24).

Thus, the aim of this study was to analyze the impact of umbilical cord blood (UCB) CD34⁺ cells on breast cancer cell lines.

RESULTS

Purity, survival and cytokine production by umbilical cord blood CD34⁺

The presence of maternal cells in umbilical cord blood was evaluated in 3 male babies at birth. The analysis has revealed the presence of 1 maternal cell over 1500 cells in one sample. The analysis of two other samples did not show the presence of XX cells.

The purity of the viable isolated UCB CD34⁺ cells was evaluated by flow cytometric analysis of surface CD34 and CD45 markers. The mean purity of the cells was 99% after two passages on the magnetic columns (**Fig. 1**). Among CD34⁺ cells 1% of cells were CD45⁻ which were most likely endothelial cells. The mean survival rate of UCB CD34⁺ cells after 3 days of the cell culture was $82.2 \pm 1.0\%$. UCB CD34⁺ cells maintained the expression of CD34 and CD45 surface markers during the experimental period (**Fig. 2**).

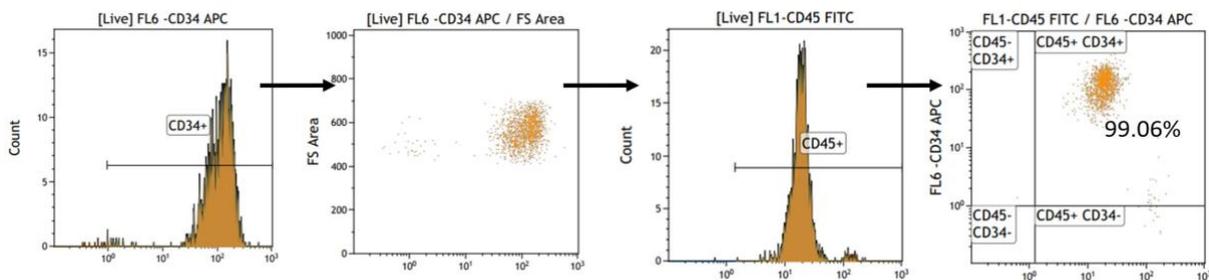


Figure 1. Evaluation of the purity of UCB CD34 by flow cytometry.

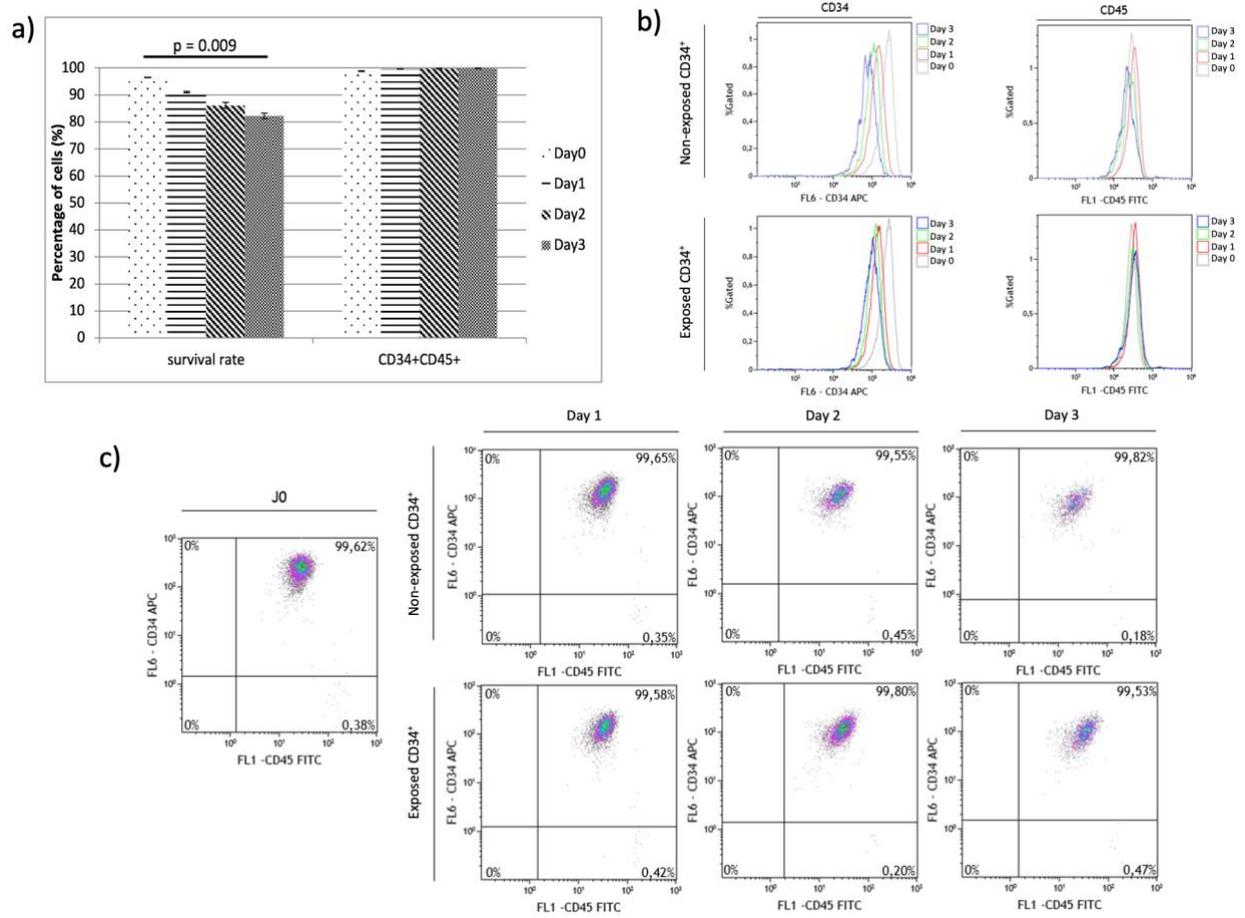


Figure 2. Survival and differentiation evaluation of UCB CD34+ cells in cell culture.

The differentiation of CD34⁺ cells was not statistically significant between Day 0, 1, 2 and 3 cultivated alone (A) or in contact with MCF-7 cells (B and C).

Among the 106 analysed cytokines tested with cytokine antibody array membrane, high levels of expression were found for: angiopoietin-2, CD40 ligand, complement factor D, fibroblast growth factor (FGF)-19, granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), interferon (INF)- γ , interleukin (IL)-8, IL-11, IL-17A, kallikrein 3, lipocalin-2, osteopontin, pentraxin 3, resistin, stromal cell-derived factor (SDF)-1 α , serpin E1, and vitamin D BP (**Fig. 3** and **Supp Fig. 1**). The maximum expression of most cytokines was observed on the 3rd day of cell culture.

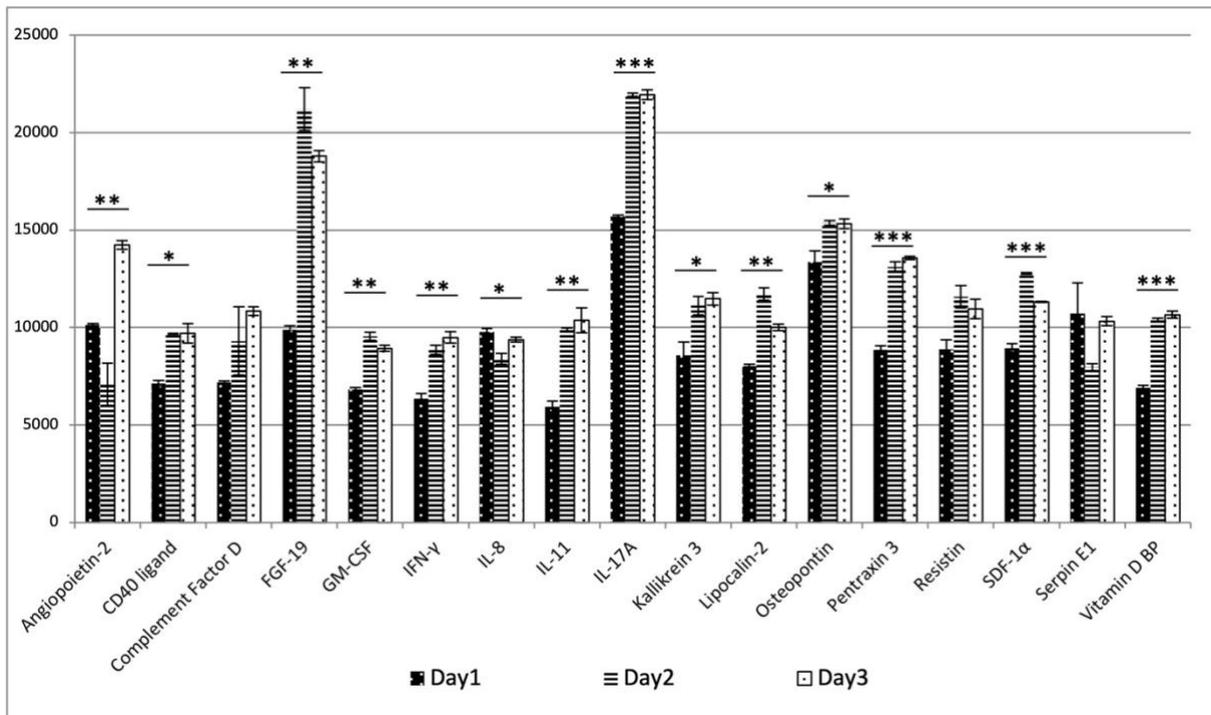
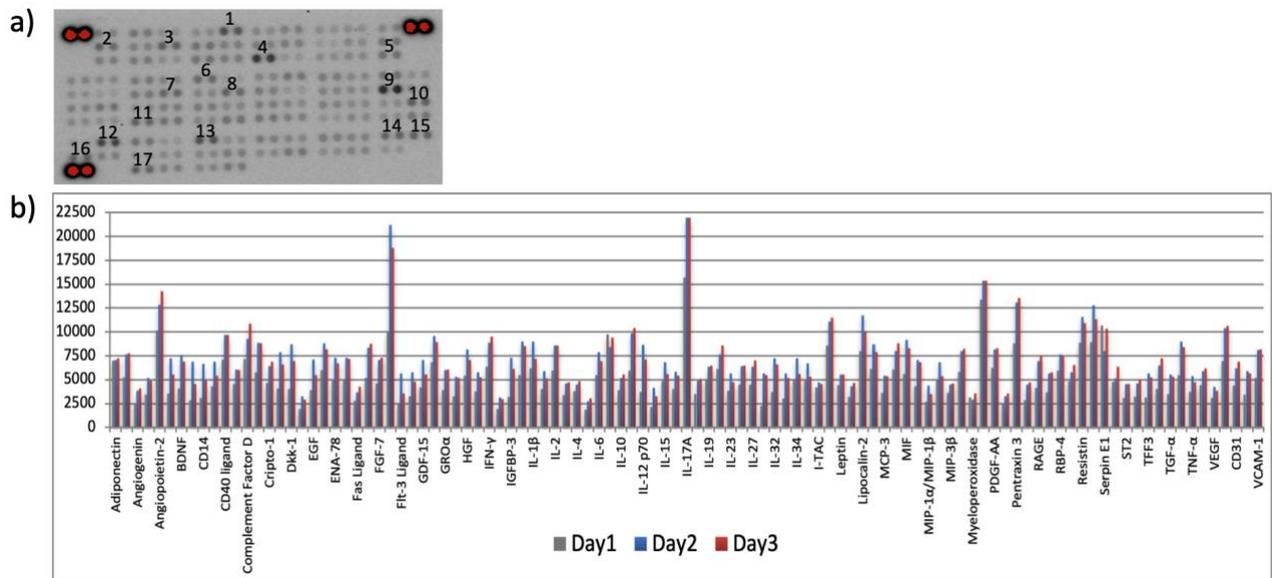


Figure 3. Selection of cytokines showing the most important level of expression by cultured umbilical cord blood CD34⁺ cells.



Supplemental Figure 1. Cytokine array analysis of UCB CD34⁺ cell secretome.

- | | | | |
|------------------------|------------------|--------------------|------------------|
| 1: angiopoietin-2 | 6: IFN γ | 11: lipocalin-2 | 16: serpin E1 |
| 2: CD40 ligand | 7: IL-8 | 12: osteopontin | 17: vitamin D BP |
| 3: complement factor D | 8: IL-11 | 13: pentraxin 3 | |
| 4: FGF-19 | 9: IL-17A | 14: resistin | |
| 5: GM-CSF | 10: kallikrein 3 | 15: SDF-1 α | |

Among them, angiopoietin-2, CD40 ligand, complement factor D, FGF-19, GM-CSF, IFN γ , IL-8, IL-11, IL-17A, kallikrein 3, lipocalin-2, osteopontin, pentraxin 3, resistin, SDF-1 α , serpin E1, and vitamin D BP were retained for molecular analysis of intercellular interactions.

Functional characteristics of breast cancer cell lines after exposure to UCB CD34⁺ cells

UCB CD34⁺ cells reduce proliferation of MCF-7 and MDA-MB-231

To evaluate the effect of UCB CD34⁺ on the proliferative capacities of the breast cancer cell lines, MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines were used. MCF-7 cells are characterized by the expression of estrogen receptors (ER) and the absence of HER2/neu receptor expression corresponding to luminal A breast cancers. MDA-MB-231 cells are characterized by the absence of the expression of estrogen, progesterone and HER2/neu receptors corresponding to triple-negative breast cancers of poor prognosis (25). While MCF-7 cells are known to be non-invasive, MDA-MB-231 have a high lung tropism. In fact they have been isolated from the pleural effusion of a 51 years old woman with mammary adenocarcinoma.

MCF-7 and MDA-MB-231 were co-cultured in media containing UCB CD34⁺ cells for 3 days before assessment of proliferative capacities using the impedance based technique of xCELLigence. Direct exposure to UCB CD34⁺ cells induced a significant decrease in the proliferative capacities of tumor cells (**Fig. 4**).

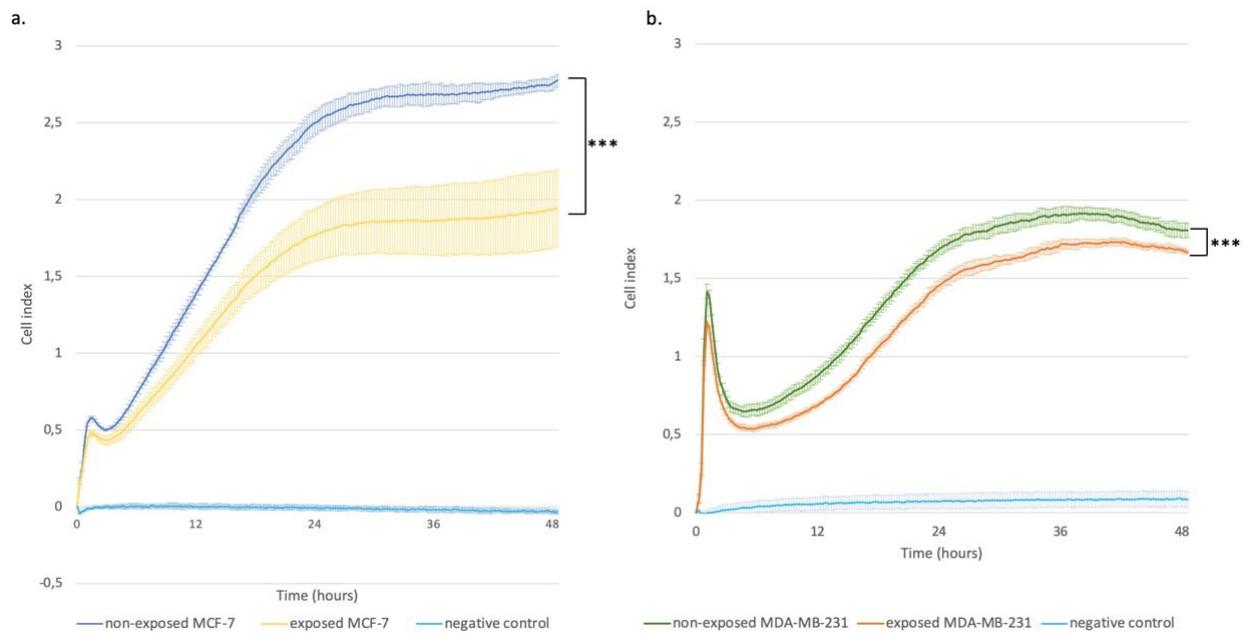


Figure 4. Impact of direct exposure to umbilical cord blood (UCB) CD34⁺ cells on breast cancer cell line proliferation. Graphs represent the proliferation of MCF-7 (a) and MDA-MB-231 (b) cells, exposed or non-exposed to UCB CD34⁺ cells. Proliferation was assessed by the xCELLigence RTCA system. Data are displayed as mean \pm SD and are representative of three individual samples, each run in triplicate. *** $p < 0.001$

The same experiments were conducted after 3-day indirect exposure of breast cancer cell lines to UCB CD34⁺ in a Transwell membrane setting. No statistical modification of the morphology or proliferative capacities was observed for either of the cell lines (**Fig. 5**).

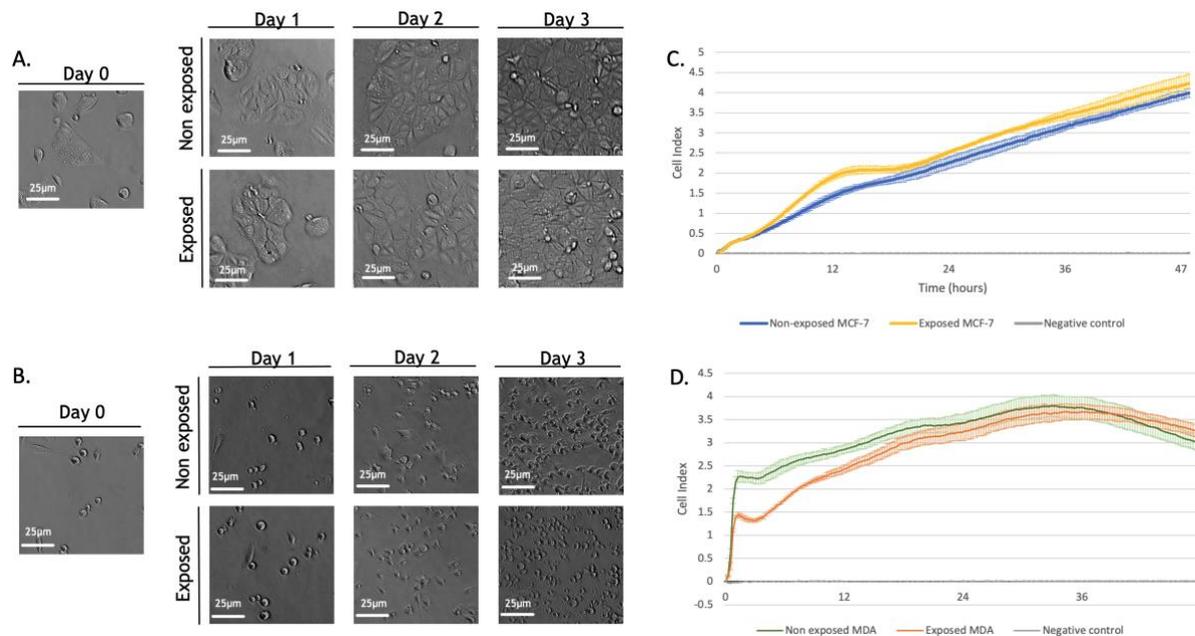


Figure 5. Morphology and proliferation of MCF-7 and MDA-MB-231 cells after indirect coculture with umbilical cord blood CD34⁺.

The morphology of MCF-7 (A) and MDA-MB-231 (B) cells did not change after the indirect coculture with umbilical cord blood CD34⁺ (x10). The proliferative capacities assessed by the xCELLigence RTCA system did not show any modification for MCF-7 (C) and MDA-MB-231 (D) cells after indirect coculture with umbilical cord blood CD34⁺.

Data are displayed as mean ± SD and are representative of three individual samples, each run in triplicate. ns = non significant

UCB CD34⁺ cells reduce migration and invasion of MDA-MB-231

To evaluate the effect of UCB CD34⁺ on migration and invasion of breast cancer cells, MCF-7 and MDA-MB-231 were co-cultured in medium containing UCB CD34⁺ cells for 3 days before xCELLigence assays.

There was an absence of migration and invasion in the MCF-7 cell culture even after exposure to UCB CD34⁺ cells (**Fig. 6**).

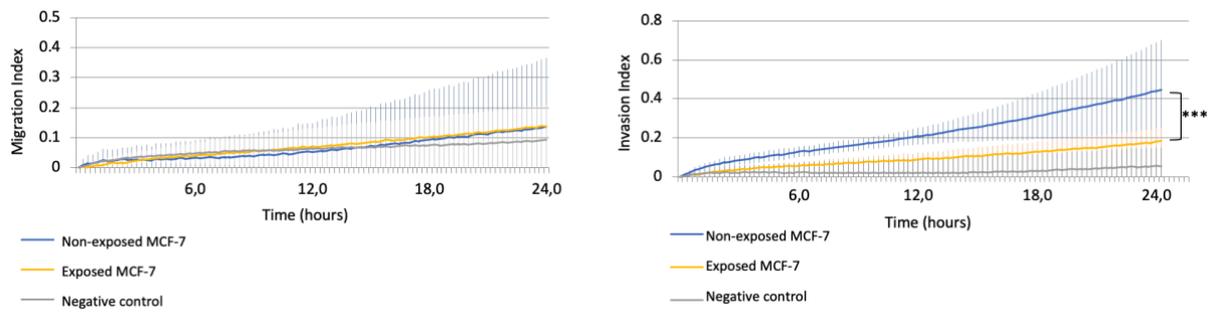


Figure 6. MCF-7 cell migration (A) and invasion (B) after direct exposure to umbilical cord blood CD34⁺ cells was equivalent to the background noise.

MDA-MB-231 cells directly exposed to UCB CD34⁺ cells showed a reduced migration potential compared to non-exposed MDA-MB-231 cells (**Fig. 7a**). No detectable change in the invasive capacity was observed (**Fig. 7b**).

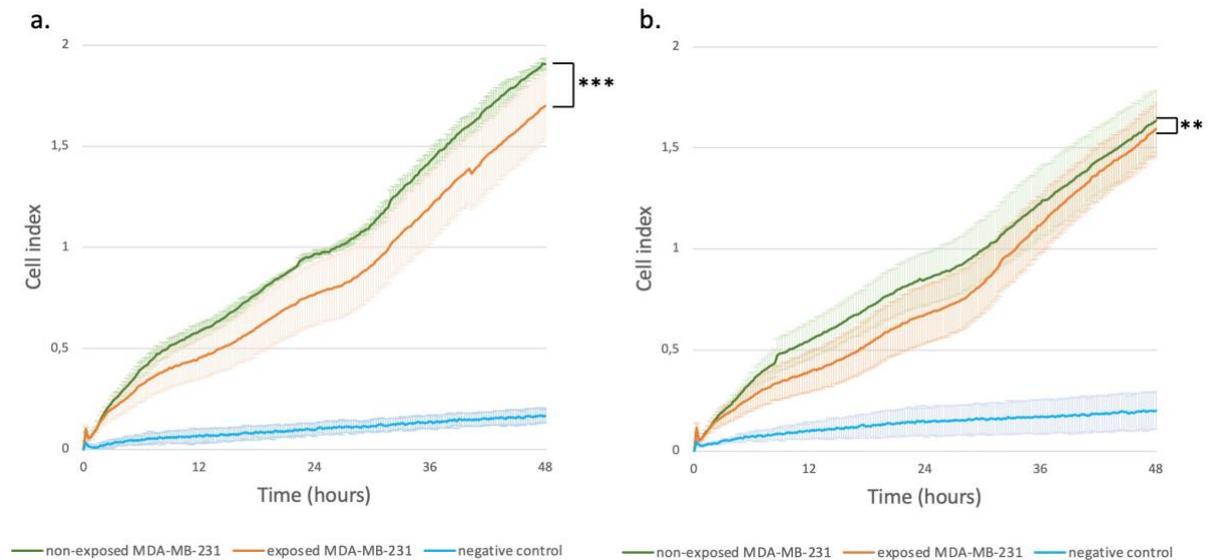


Figure 7. Impact of direct exposure to umbilical cord blood (UCB) CD34⁺ cells on tumor cell migration and invasion.

Graphs represent the migration (a) and invasion (b) of MDA-MB-231 cells, alone or exposed to UCB CD34⁺ cells.

Migration and invasion were assessed by the xCELLigence RTCA system. Data are displayed as mean \pm SD and are representative of three individual samples, each run in triplicate.

** $p < 0.01$

*** $p < 0.001$

The same experiments were conducted after 3-day indirect exposure of breast cancer cells to UCB CD34⁺ in a Transwell membrane setting. No statistical modification of migration or invasion was observed for either of the cell lines (**Fig. 8**).

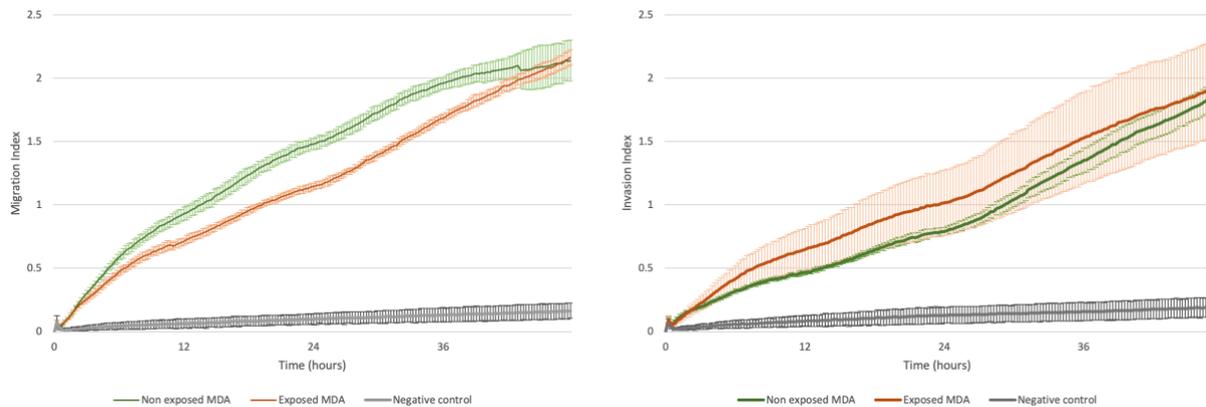


Figure 8. Impact of indirect exposure to umbilical cord blood (UCB) CD34⁺ cells on MDA-MB-231 cell migration and invasion.

Graphs represent the migration (a) and invasion (b) of MDA-MB-231 cells, alone or exposed indirectly to UCB CD34⁺ cells.

Migration and invasion were assessed by the xCELLigence RTCA system. Data are displayed as mean \pm SD and are representative of three individual samples.

Analysis of interactions between breast cancer cell lines and UCB CD34⁺ cells

To determine whether UCB CD34⁺ cells interact with breast cancer cells, a 3D culture of spheroids was grown after fluorescent marking.

MCF-7 spheroids were larger and more regular than those formed by the MDA-MB-231 cells. The UCB CD34⁺ cells were initially randomly distributed across the hydrogel. However, they quickly co-localized and integrated the MCF-7 and MDA-MB-231 spheroids (**Fig. 9**), and remained embedded even when the spheroids migrated. No structural changes were observed in the spheroids that integrated the UCB CD34⁺ cells and those that did not.

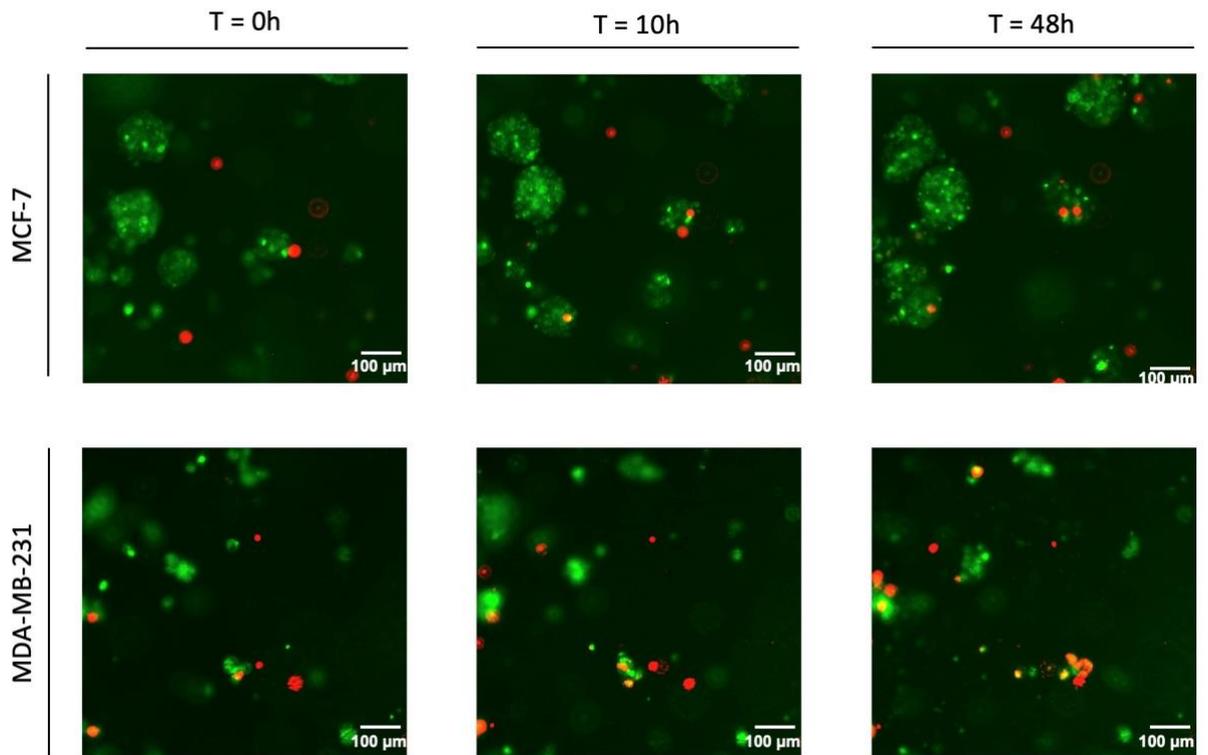


Figure 9. Tumor spheroid – UCB CD34⁺ cell interactions.

Fluorescopic images from time-lapse analysis after co-culture showing interactions between MCF-7 and MDA-MB-231 3D-spheroids (green) and UCB CD34⁺ cells (red) (x10). (n=2 experiments)

To evaluate the reaction between tumor cells and UCB CD34⁺ cells, samples were fixed after 60h of time-lapse analysis and the spheroids were analyzed with a confocal microscope (**Fig. 10**). Some cells in the spheroids showed a double staining that could be explained by the fusion of tumor (green marked) and UCB CD34⁺ (red marked) cells.

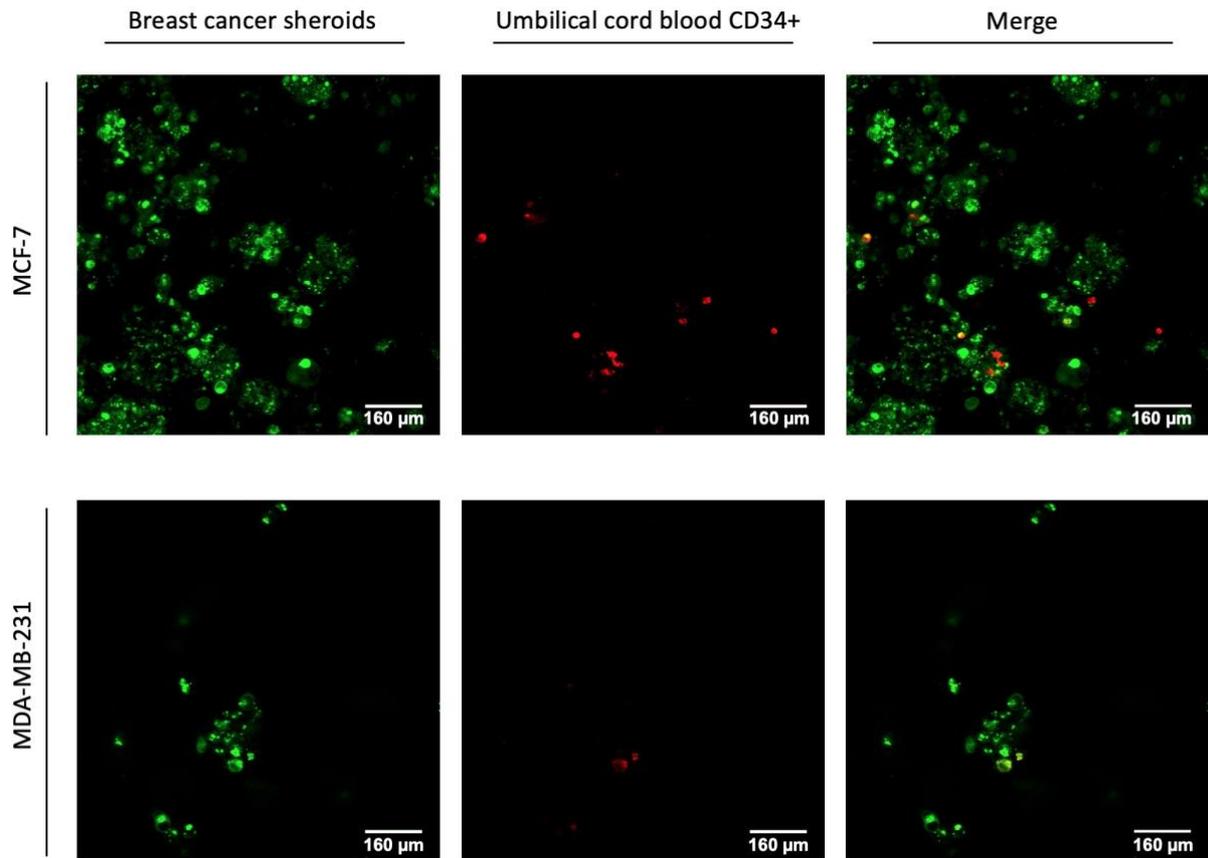


Figure 10. Fluorescent confocal microscopy.

Fluorescent confocal microscopy showing the integration of UCB CS34⁺ cells (red) into MCF-7 and MDA-MB231 3D-spheroids (green) (x10).

Transcriptomic profile of breast cancer cell lines after exposure to UCB CD34⁺ cells

To assess the impact of exposure to UCB CD34⁺ on the MCF-7 and MDA-MB-231 cells, transcriptomic analysis of exposed and non-exposed MCF-7 and MDA-MB-231 cells was performed.

Significantly up- or downregulated transcripts were identified by supervised analysis. Transcripts were considered as differential when the p-value < 0.01. We identified 252 transcripts for MDA-MB-231 (122 upregulated and 130 downregulated in exposed cells), and 570 for MCF-7 (348 upregulated and 222 downregulated in exposed cells). In the MCF-7 cells, among the 10 most differentially expressed genes, HELZ2, IFI6, PARP14, CMPK2, STAT1,

XAF1, OAS1, RSAD2, IFI44 and MALAT1 were all overexpressed in exposed cells (**Fig. 13**). In the MDA-MB-231 cells, among the most differentially expressed genes, IL7R, HMGCS1, ADAMTS12, ZBTB20 and MAP3K7CL were downregulated, and MT2A, TIMP1, ID3, and ID1 were upregulated in exposed cells (**Fig. 11**).

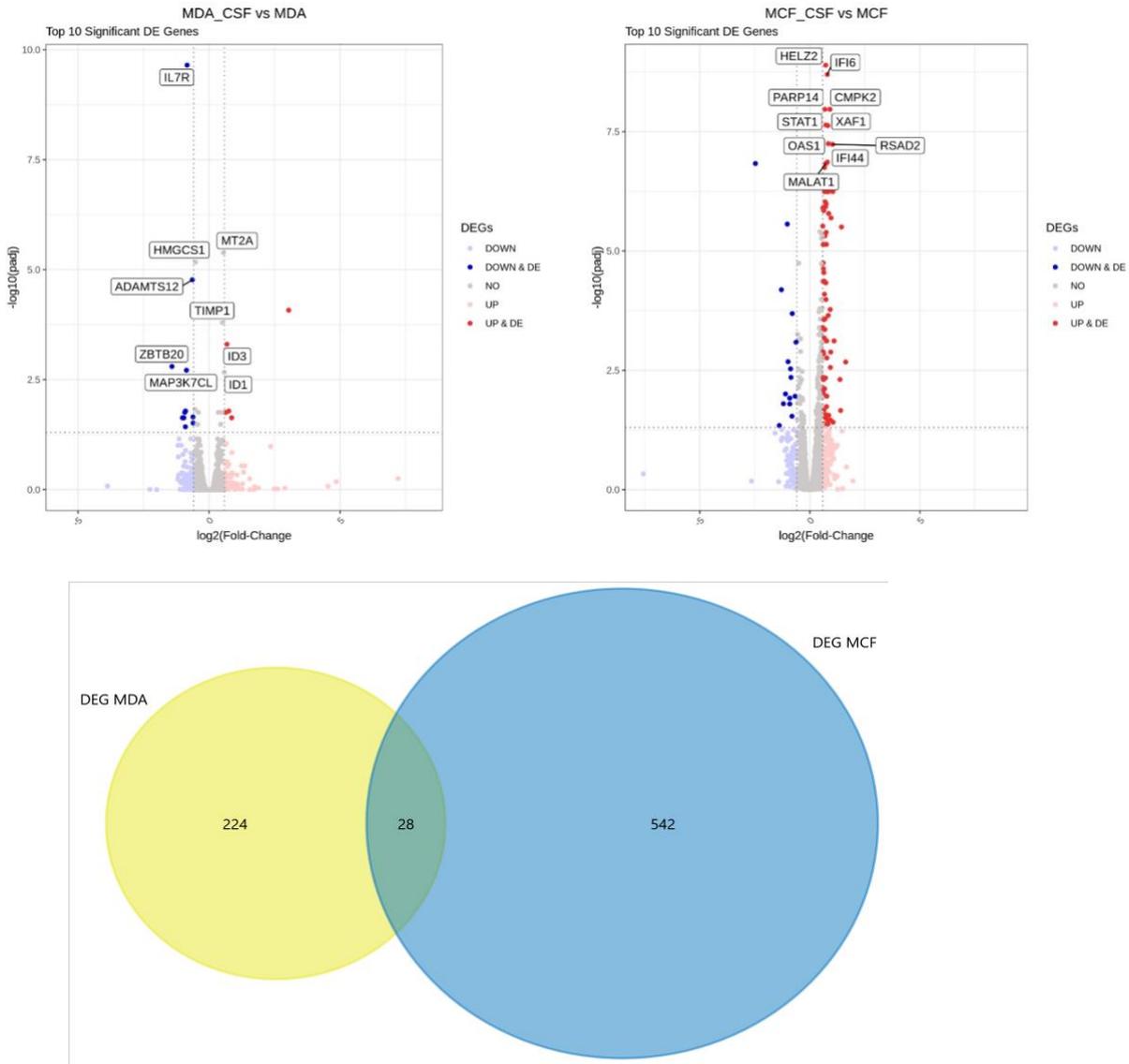


Figure 11. Volcano plots and Venn's diagram representing mRNA expression in MCF-7 (a) and MDA-MB-231 (b) cells exposed or not to fetal hematopoietic stem cells.

Functional analysis was performed using over-representation analysis with IPA and enrichment analysis with GSEA.

IPA analysis related to diseases and functions in exposed MCF-7 cells found an inhibition of cell proliferation of breast cancer cell lines (z-score = -2.314) and an activation of the following: epithelial cell death (z-score = 2.555), cancer cell death (z-score = 2.380), tumor cell death (z-score = 2.228), and apoptosis of tumor cell lines (z-score = 2.057).

Similar analysis found decreased cell proliferation of tumor cell lines (z-score = -2.220) in MDA-MB-231. Cell death of breast cancer cell lines showed less activation (z-score = 1.129) supported by a significant p-value = 3.39E-05.

GSEA analysis showed that downregulated transcripts in exposed MCF-7 and MDA-MB-231 cells were related to DNA replication which could correspond to a diminished proliferation observed in the functional analysis of cell-to-cell interactions (**Fig. 12**).

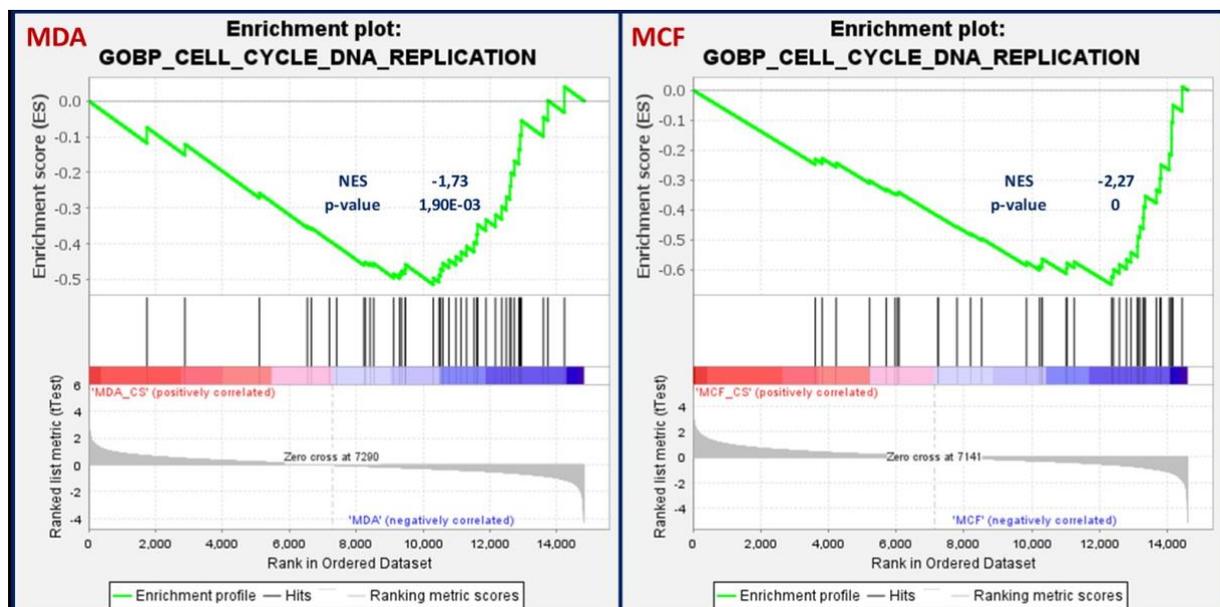
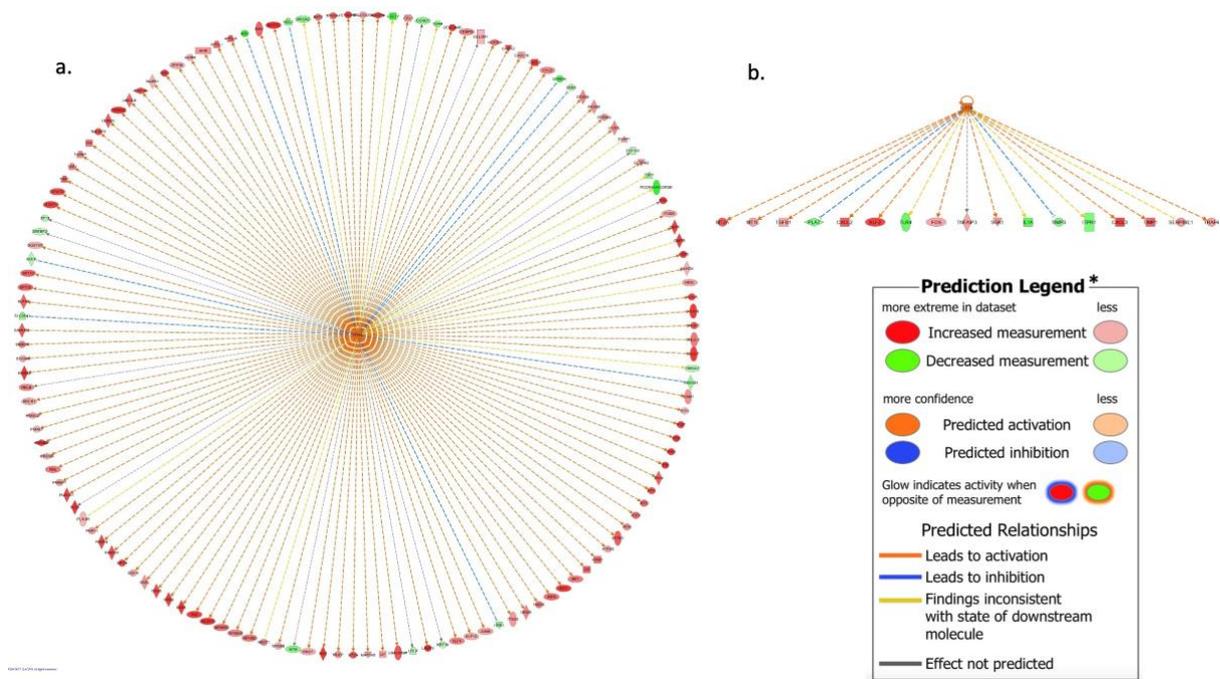


Figure 12. GSEA analysis of transcriptomic data.

A decreased DNA replication suggesting the diminution of cell proliferation in exposed MCF-7 and MDA-MB-231 cells has been identified with GSEA.

We have identified 17 cytokines expressed by UCB CD34⁺ cells: angiopoietin-2, CD40 ligand, complement factor D, fibroblast growth factor (FGF)-19, granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), interferon (INF)- γ , IL-8, interleukin (IL)-11, IL-17A, kallikrein 3, lipocalin-2, osteopontin, pentraxin 3, resistin, stromal cell-derived factor (SDF)-1 α , serpin E1, and vitamin D BP. We performed IPA analysis to evaluate their potential role as upstream regulators, i.e., molecules able to modulate a significant number of targets among the differential transcripts. To be consistent with potential exposure, upstream regulators must be associated with a significant positive z-score. IFN γ was identified as a potential upstream regulator in exposed MCF-7 cells (140 targets among the differential transcripts, activation z-score = 9.716), and IL-17A in exposed MDA-MB-231 cells (17 targets, activation z-score = 2.055) (**Supp. Fig. 2**). Whereas IFN γ was identified as a factor decreasing proliferation and migration of breast cancer cell lines, IL-17A was identified as a factor increasing those processes.



Supplemental Figure 2. IPA up-stream regulator analysis.

Among cytokines secreted by UCB CD34⁺ cells, IFN γ could be a potential upstream regulator in MCF-7 cells as it controls the expression of several genes differentially expressed in MCF-7 cells exposed versus non-exposed to UCB CD34⁺ with a z-score = 9.716 (a). For MDA-MB-231 cells, a potential upstream regulator could be IL-17A with a z-score = 2.055 (b).

* legend from:

https://qiagen.my.salesforce-sites.com/KnowledgeBase/articles/Basic_Technical_Q_A/Legend, date 7.09.2022

DISCUSSION

In this study we demonstrated that direct contact between UCB CD34⁺ and breast cancer cell lines induced a reduction in the proliferative capacities of MCF-7 and MDA-MB-231, and diminished the migration abilities of MDA-MB-231 cells. Cell-to-cell interactions were confirmed in 3D co-culture where UCB CD34⁺ cells were attracted by tumor spheroids and incorporated into tumor cells. These cell-to-cell interactions were responsible for transcriptome modifications coherent with observed functional modifications. Among the cytokines secreted

by UCB CD34⁺, IFN γ was identified as a potential upstream regulator responsible for the molecular modifications observed in transcriptomic analysis of MCF-7 breast cancer cells exposed to UCB CD34⁺ cells, as was IL-17A for MDA-MB-231 cells.

We evaluated MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines which are commonly used breast cancer cell lines for *in vitro* research (25). They are relatively easy to harvest and analyze and, from a molecular point of view, they correspond to the most frequently represented breast cancer subtypes. MCF-7 corresponds to the luminal A breast cancer subtype characterized by the expression of ER, slow growth, and the absence of migratory capacities (26). In contrast, MDA-MB-231 corresponds to the triple-negative phenotype, a claudin-low aggressive breast cancer subtype with invasive and migratory capacities (25). These characteristics might be responsible for the difference in the observed impact of UCB CD34⁺ cells.

Stem cells seem to play a significant role in breast cancer oncogenesis and may be of potential therapeutic use (27). However, little is known about the impact of CD34⁺ hematopoietic cells on breast cancer cell development. A recent publication identified a correlation between CD34⁺ expression and the ultrasonographic features of breast cancer (28). However, the authors stated that CD34⁺ staining corresponded to endothelial cells.

Hematopoietic CD34⁺ autologous cell transplantation in patients with metastatic breast cancer receiving high-dose chemotherapy can reduce chemotoxicity (29–32). However, relapse or overall survival in these high-risk primary breast cancer patients is variable (29,33), and improvement in clinical outcomes, when observed, might be attributed to the high-dose chemotherapy rather than to the potentially positive effect of hematopoietic CD34⁺ cells on immunological defense against cancer cells.

Since the discovery of fetal microchimerism in breast cancer tissue, fetal cells have been thought to play a role in breast cancer (23). Studies suggest that the protective role of the circulating fetal cells acts via immune mechanisms (22). A high percentage of the CD34⁺ cells in maternal blood are of fetal origin (13).

The impact of fetal UCB CD34⁺ hematopoietic cells on breast cancer cells has not been documented to date. However, indirect and direct co-culture effects of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (hUC-MS) have been already described (34–36). The effect of indirect contact between hUC-MS and breast cancer cells are controversial. Both pro- and anti-tumorigenic effects of breast cancer cell lines cultured in conditioned media from hUC-MS has been described (34,35). MS-derived extracellular vesicles showed an induction of breast cancer cell proliferation and migration (34). In contrast to those findings, in our study UCB CD34⁺ cells exerted an effect on breast cancer cell lines only when direct contact was possible in a direct co-culture.

Chao et al. reported that direct contact with hUC-MS induced an anti-tumorigenic effect on MDA-MB-231 cells via cell-to-cell contact and internalization of hUC-MS into the MDA-MB-231 cells (36). Similarly, we observed that UCB CD34⁺ cells were attracted by tumor spheroids to merge with breast cancer cells after 60h of 3D-coculture. However, in contrast to the observations with hUC-MS, where hUC-MS were internalized and then released to interact with other breast cancer cells, we found that UCB CD34⁺ seemed to definitively merge with MCF-7 and MDA-MB-231. In our experiments a fluorescent marker of UCB CD34⁺ spread in a diffuse way in the cancer cell line membrane suggesting cell fusion rather than internalization of UCB CD34⁺ cells in breast cancer cells. In addition, 60h images showed the persistence of the colocalization of fluorescent marking suggesting its definitive character. We also investigated cytokine production of hematopoietic UCB CD34⁺ cells and their impact on functional characteristics of tumor cells.

Direct exposure to UCB CD34⁺ cells induced a decrease in cancer cell proliferation in both cell lines, and a reduction in the migration capacities of MDA-MB-231 cells. Transcriptomic analysis confirmed these modifications at a molecular level.

Upstream regulator analysis of transcriptomic data taking into consideration cytokines secreted by UCB CD34⁺, identified IFN γ as a potential regulator of the proliferative capacities of MCF-7. The impact of IFN γ on breast cancer cells seems to be cancer type dependent (37). Indeed, *in vitro* evaluation of IFN γ impact showed an antiproliferative effect on ZR75-1 cells (a cell line expressing ER) by modifying estradiol signaling (38). A positive correlation between IFN γ expression in breast tumors and metastasis-free survival has been observed (39).

IL-17A might be another mediator of UCB CD34⁺ and tumor cell interactions. Analysis of our transcriptomic data of MDA-MB-231 showed modifications in mRNA coding for breast cancer proliferation and invasion promoting factors. The pro-proliferative impact of IL-17A has been widely described in the literature (40–43). However, this contrasts with our functional findings showing decreased proliferation and migration capacities of MDA-MB-231 exposed to UCB CD34⁺ cells. Thus, other mechanisms are probably involved in the interactions between UCB CD34⁺ and MDA-MB-231 leading to the reduction of cell proliferation.

The inhibitory effect of IL-17A on the migratory and invasive capacities of MDA-MB-231 cells has already been described in the literature (44). Our functional analysis of the migratory capacities of MDA-MB-231 are aligned with previous results and was confirmed by transcriptomic analysis identifying 25 differentially expressed target genes responsible for cell migration in exposed MDA-MB-231 cells.

The impact of IL-17A on MCF-7 cells has not been described in the literature to date. Our IPA analysis of transcriptomic data for MCF-7 did not identify this cytokine as a potential upstream regulator.

Our study investigated a potential impact of fetal microchimerism and focused on CD34⁺, but it would be worth exploring other stem cell populations. Moreover, direct cell-to-cell interactions should be analyzed at a molecular level to further understand the potential role of fetal CD34⁺ cells in breast cancer.

CONCLUSION

Direct contact between UCB CD34⁺ and breast cancer cell lines induced a reduction in the proliferative capacities of MCF-7 and MDA-MB-231 and diminished the migratory abilities of MDA-MB-231 cells. In 3D co-culture, UCB CD34⁺ cells were attracted by tumor spheroids and incorporated into tumor cells. These cell-to-cell interactions were responsible for transcriptome modifications coherent with observed functional modifications. Among the cytokines secreted by UCB CD34⁺, we identified IFN γ as a potential upstream regulator responsible for the molecular modifications observed in transcriptomic analysis of MCF-7 breast cancer cells exposed to UCB CD34⁺ cells, and IL-17A as a regulator in MDA-MB-231 cells.

MATERIAL AND METHODS

Umbilical cord blood collection

UCB samples were collected at full-term vaginal deliveries of healthy infants from healthy mothers without a medical history in the Gynecology and Obstetrics department of Tenon Hospital, Paris, between January and June 2021. The samples were collected in blood bags

(Macopharma, Tourcoing, France, ref. MSC1200PU) before placental detachment and after disinfection of the umbilical cord. The blood bags were processed in the laboratory within 24h after collection.

The study was approved by the local ethics committee (Comité de Protection des Personnes, approval number 2019-A00705-52) and ²⁴all the patients gave written informed consent.

Cytogenetic evaluation of cord blood

The analysis of the presence of maternal cells in fetal circulation was performed in three samples of boys at birth by molecular cytogenetic evaluation performed on metaphase chromosome preparations using standard procedures. Karyotyping was performed on RHG, GBG-banded metaphases. Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis was performed according to the manufacturer's protocol, using commercially available X and Y specific diagnostic probes (DXZ1, DYZ1, DYZ3, SRY, Locus Amely, Yp11.2, SHOX, PAR1) (Vysis, Downers Grove, IL, USA).

Umbilical cord blood CD34 cells

The UCB CD34 cells were isolated by immunomagnetic separation Magnet Activated Cell Sorting (MACS CD34 Isolation kit; Miltenyi, BergischGladbach, Germany, ref. 130-042-201). Briefly, whole UCB samples underwent red blood cell sedimentation. The supernatant was collected and centrifuged. The pellet was resuspended in pure Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM). Mononucleated cells were separated on Ficoll-Paque 1.077 g/cm³ gradient (Gibco-Invitrogen, Paisley, UK). The cells were washed and counted. CD34⁺ cells were isolated using the MACS separation technique according to the manufacturer's instructions with two passages on magnetic columns. The purity of the CD34⁺ cells was assessed using

flow cytometry and the cells were stored at 80°C in 70% Fetal Calf Serum (FCS), 20% sterile water, and 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) until use.

Evaluation of the purity of umbilical cord blood CD34⁺ cells

CD34⁺ purity was evaluated with flow cytometry. 50 000 cells were resuspended in 100 µL phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 0.4% serum. The cells were then stained with allophycocyanin (APC)-conjugated anti-CD34, and fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD45 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) before being washed with PBS/Serum (0.4%) and analyzed by flow cytometry (Gallios Analyzer, Beckman Coulter).

Evaluation of the umbilical cord blood CD34⁺ cytokine profile

Culture media deprived of UCB CD34⁺ cells were obtained on days 1, 2 and 3 of the cell culture. Briefly, 500 000 UCB CD34⁺ cells were seeded in 4 mL of IMDM supplemented with 10% FCS (FCS, Gibco, Illkirch, France) and 1% penicillin-streptomycin (Gibco, Illkirch, France) for 24, 48 and 72 hours. The medium was then deprived, and the culture supernatant collected 12h later.

The protein concentration was evaluated by chromometry, and the cytokine profile was evaluated using cytokine antibody array membrane (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA, ref. ARY022B), according to the manufacturer's instructions. Images were acquired on the Chemidoc system (Bio-Rad), and ImageJ was used for densitometric analysis.

Culture of breast cancer cell lines

MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines were used for this study. MCF-7 cells are characterized by the expression of estrogen receptors (ER) and the absence of HER2/neu

receptor expression corresponding to luminal A breast cancers. MDA-MB-231 cells are characterized by the absence of the expression of estrogen, progesterone and HER2/neu receptors corresponding to triple-negative breast cancers of poor prognosis (25).

The cell lines were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Illkirch, France), supplemented with 10% FCS and 1% penicillin-streptomycin. The cultures were maintained at 37°C in a humidified 5% CO₂ / 95% air incubator until the cells reached 80% confluence. They were then harvested by trypsinization and centrifugated at 500 xg for 10 minutes.

Direct cell co-culture

Direct co-cultures were grown by seeding 200 000 MCF-7 cells or 150 000 MDA-MB-231 cells in 2 mL of DMEM in a 6-well plate (Falcon®) and incubated for 24h at 37°C for cell adhesion. The culture medium was then discarded and replaced by 2 mL of IMDM supplemented with 10% FCS and 1% penicillin-streptomycin containing 50 000 UCB CD34⁺ cells (exposed cells). Breast cancer cell lines cultivated in 2 mL of IMDM supplemented with 10% FCS and 1% penicillin-streptomycin without UCB CD34⁺ cells were used as a control (non-exposed cells). The plate was incubated at 37°C for 72h.

After 72h of incubation the culture medium was discarded, and adherent breast cancer cells were washed twice to eliminate the CD34⁺ cells. The non-exposed breast cancer cells were also washed twice. The cells were then harvested by trypsinization and used for further analysis.

Indirect cell culture by Transwell membrane assay

Indirect cultures were grown in Transwell setting by seeding 50 000 MCF-7 or MDA-MB-231 cells in the bottom chamber of a 24-well plate containing 1 mL of DMEM supplemented with

10% FCS and 1% penicillin-streptomycin. The cells were then incubated for 24h at 37°C for cell adhesion. A cell culture insert of 0.4 µm pore size (Corning, Durham, NC, USA, ref. 353095) was placed over the wells and 600 µL of IMDM supplemented with 10% FCS and 1% penicillin-streptomycin containing 50 000 CD34⁺ cells was placed in the insert. The plate was incubated at 37°C for 72h. MCF-7 and MDA-MB-231 cells were harvested by trypsinization and used for further analysis.

Cell proliferation, migration, and invasion

Proliferation and migration were assessed using xCELLigence Real-Time Cell Analysis (RTCA) technology (Agilent, Santa Clara, CA, USA) with an E-Plate and CIM-Plate, respectively, according to the manufacturer's instructions.

In the proliferation assays, 30 000 exposed or non-exposed MCF-7 or MDA-MB-231 cells were seeded in an E-plate in 100 µL of culture media supplemented with 10% FCS.

In the migration assays the lower chamber wells were filled with 160 µL of culture media supplemented with 10% FCS. In the top chamber wells 30 000 exposed or non-exposed MCF-7 or MDA-MB-231 cells were seeded in 100 µL of serum-free culture media.

Wells with culture media alone served as a negative control. All assays were performed in triplicate. Cell proliferation and migration were measured for 48h. All data were recorded and analyzed using the RTCA software.

Evaluation of the cell interactions in 3D culture

The cellular membrane of the MCF-7 and MDA-MB-231 cells was labelled using PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Mini Kit for General Cell Membrane Labelling (Sigma, St Louis, MO, USA, ref. MINI67-1KT) according to the manufacturer's instructions. The membrane of the UCB CD34⁺ cells was labelled using PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Mini Kit for General

Cell Membrane Labelling (Sigma, St Louis, MO, USA, ref. MINI67-1KT) according to the manufacturer's instructions.

For sphere formation, a suspension of 50 000 green-labelled MCF-7 or MDA-MB-231 cells was seeded in 3D culture 96-well Biomimesys® plates containing a hyaluronic acid matrix (HCS Pharma, Loos, France) and left for 24h. The medium was then replaced with a suspension containing 50 000 red-labelled UCB CD34⁺ cells.

The plate was incubated at 37°C in 5% CO₂ for 60h under Olympus IX83 microscope (Cytometry-Imaging Saint-Antoine platform). Images of the plate were acquired on time-lapse every 2h after which the samples were fixed and images acquired with confocal microscope.

All images were analyzed using ImageJ software.

Transcriptomic Analysis

After 72h of co-culture assay, RNA was extracted from the breast cancer cells with QIAGEN RNeasy® Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instruction.

The RNA samples were stored at -80°C. Sequencing and primary analysis was performed by the GENOM'IC platform (Institut Cochin, Inserm 1016-CNRS 8104- Université Paris Cité).

Briefly, the quantity and quality of the RNA was validated with the Bioanalyzer 2100 (using Agilent RNA6000 nano chip kit). Then 10 ng of total RNA was reverse-transcribed following the Ovation PicoSL V2 system (Tecan).

The resulting double-strand cDNA was used for amplification based on SPIA technology. After purification according to the Tecan protocol, 3.6 ug of Sens Target DNA were fragmented and biotin labelled using the Encore Biotin Module kit (Tecan). After checking fragmentation using Bioanalyzer 2100, the cDNA was then hybridized to GeneChip® HumanGene 2.0 ST (Affymetrix) at 45 °C for 17 h. The chips were washed on the fluidic station FS450 following specific protocols (Affymetrix) and scanned using the GCS3000 7G. The scanned images were

then analyzed with Expression Console software (Affymetrix) to obtain raw data (.cel files) and metrics for quality controls. Robust Multichip Average (RMA) normalization was performed using TAC4.0 software (Thermo Fisher) with default parameters.

Supervised analyses were performed using TAC4.0 software to identify transcripts specifically up- or downregulated in each pairwise cell population comparison. For each cell population, a Tukey's biweight robust mean was calculated from log₂ expression values. Mean ratios were then calculated from unlogged mean values. For ratios ≥ 1 , the Fold Change = ratio, and for ratios < 1 the Fold Change = $-1/\text{ratio}$. Statistical p-Value was calculated after ANOVA test using the eBayes model.

The datasets generated and analyzed for the transcriptomic study are available in GEO (accession number GSE224410).

Functional analyses

The functional analyses of the transcriptomic data were generated by Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (QIAGEN Inc., <https://www.qiagenbioinformatics.com/products/ingenuity-pathway-analysis>, v:49932394, Release Date: 2019-11-14). Significantly over-represented biological terms (functions and upstream-regulators) were identified with a right-tailed Fisher's Exact Test that calculates an overlap p-value determining the probability that each term associated with our lists of differential transcripts was due to chance alone. The z-score is a statistical measure of correlation between relationship direction and experimental transcript expression. Its calculation assessed the activation (positive z-score) or repression (negative one) of each term. To be considered significant the z-score has to be > 2 in absolute value.

Enrichments were also explored using Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) v4.1.0 software (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/>). GSEA determined whether gene sets from the Molecular Signatures Database (MSigDB) Gene Ontology Biological Process collection (c5.go.bp.v7.4) were randomly distributed throughout our ranked transcript lists or if they were

located at the top or bottom. The selected parameters were: Ttest metric, and gene set permutation (n=1000).

Statistical analysis

Data from the replicates are presented as means \pm standard deviation (SD). All experiments were run in triplicate unless stated otherwise.

Unless otherwise specified, data were managed using an Excel database and analyzed using R 3.1.3 software, available online. Differences were considered significant if $p < 0.05$.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Felicity Neilson for editing the English of our paper.

We would like to thank the midwives from Tenon Hospital for their collaboration in the collection of cord blood.

We would like to thank Annie Munier-Godebert and Romain Morichon from CISA Cytometry Facility at Saint Antoine Research Center with financial support from Sorbonne Université and from ITMO Cancer of Aviesan and INCa on funds administered by Inserm.

We would like to thank Franck Letourneur, Sébastien Jacques and Benjamin Saintpierre from GENOM'IC Facility at Cochin Institute.

FUNDING

This research was funded with a Ruban Rose Grant 2018

BIBLIOGRAPHY

1. UNICANCER - Les chiffres du cancer en France. <http://www.unicancer.fr/le-groupeunicancer/les-chiffres-cles/les-chiffres-du-cancer-en-france>. 2021.
2. Migliavacca Zucchetti B, Peccatori FA, Codacci-Pisanelli G. Pregnancy and Lactation: Risk or Protective Factors for Breast Cancer? *Adv Exp Med Biol*. 2020;1252:195–7.
3. Froehlich K, Schmidt A, Heger JI, Al-Kawlani B, Aberl CA, Jeschke U, et al. Breast cancer, placenta and pregnancy. *Eur J Cancer*. 2019 Jul;115:68–78.
4. Husby A, Wohlfahrt J, Øyen N, Melbye M. Pregnancy duration and breast cancer risk. *Nat Commun*. 2018 Oct 23;9(1):4255.
5. Mathelin C, Youssef C, Brettes JP, Rio MC. [Paradoxical interactions between pregnancy and breast cancer]. *Gynecol Obstet Fertil*. 2007 May;35(5):449–56.
6. Lambe M, Hsieh C, Tsaih S, Ekblom A, Adami HO, Trichopoulos D. Maternal risk of breast cancer following multiple births: a nationwide study in Sweden. *Cancer Causes Control*. 1996 Sep;7(5):533–8.
7. Hsieh C, Wu J, Trichopoulos D, Adami HO, Ekblom A. Gender of offspring and maternal breast cancer risk. *Int J Cancer*. 1999 May 5;81(3):335–8.
8. Gadi VK, Nelson JL. Fetal microchimerism in women with breast cancer. *Cancer Res*. 2007 Oct 1;67(19):9035–8.
9. Gadi VK, Malone KE, Guthrie KA, Porter PL, Nelson JL. Case-control study of fetal microchimerism and breast cancer. *PLoS ONE*. 2008 Mar 5;3(3):e1706.
10. GAMMILL HS, NELSON JL. Naturally acquired microchimerism. *Int J Dev Biol*. 2010;54(2–3):531–43.
11. Khosrotehrani K, Bianchi DW. Multi-lineage potential of fetal cells in maternal tissue: a legacy in reverse. *J Cell Sci*. 2005 Apr 15;118(Pt 8):1559–63.
12. O'Donoghue K, Chan J, de la Fuente J, Kennea N, Sandison A, Anderson JR, et al. Microchimerism in female bone marrow and bone decades after fetal mesenchymal stem-cell trafficking in pregnancy. *Lancet*. 2004 Jul 10;364(9429):179–82.
13. Mikhail MA, M'Hamdi H, Welsh J, Levicar N, Marley SB, Nicholls JP, et al. High frequency of fetal cells within a primitive stem cell population in maternal blood. *Hum Reprod*. 2008 Apr;23(4):928–33.
14. Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996 Jan 23;93(2):705–8.
15. Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jan 23;93(2):705–8.
16. Khosrotehrani K, Reyes RR, Johnson KL, Freeman RB, Salomon RN, Peter I, et al. Fetal cells participate over time in the response to specific types of murine maternal hepatic injury. *Hum Reprod*. 2007 Mar 1;22(3):654–61.
17. Nassar D, Khosrotehrani K, Aractingi S. Fetal microchimerism in skin wound healing. *Chimerism*. 2012 Jun;3(2):45–7.
18. Nassar D, Droitcourt C, Mathieu-d'Argent E, Kim MJ, Khosrotehrani K, Aractingi S.

Fetal progenitor cells naturally transferred through pregnancy participate in inflammation and angiogenesis during wound healing. *FASEB J.* 2012 Jan;26(1):149–57.

19. Nguyen Huu S, Oster M, Uzan S, Chareyre F, Aractingi S, Khosrotehrani K. Maternal neoangiogenesis during pregnancy partly derives from fetal endothelial progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007 Feb 6;104(6):1871–6.

20. Nguyen Huu S, Khosrotehrani K, Oster M, Moguelet P, Espié MJ, Aractingi S. Early phase of maternal skin carcinogenesis recruits long-term engrafted fetal cells. *Int J Cancer.* 2008 Dec 1;123(11):2512–7.

21. Khosrotehrani K, Johnson KL, Cha DH, Salomon RN, Bianchi DW. Transfer of fetal cells with multilineage potential to maternal tissue. *JAMA.* 2004 Jul 7;292(1):75–80.

22. Gadi VK, Nelson JL. Fetal microchimerism in women with breast cancer. *Cancer Res.* 2007 Oct 1;67(19):9035–8.

23. Dubernard G, Aractingi S, Oster M, Rouzier R, Mathieu MC, Uzan S, et al. Breast cancer stroma frequently recruits fetal derived cells during pregnancy. *Breast Cancer Res.* 2008 Dec 20;10(1):R14.

24. Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, Prentice R, Fefer A, Buckner CD, et al. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med.* 1979 May 10;300(19):1068–73.

25. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res.* 2011 Aug 12;13(4):215.

26. Comşa Ş, Cîmpean AM, Raica M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Res.* 2015 Jun;35(6):3147–54.

27. Li Z, Liu Y, Tuve S, Xun Y, Fan X, Min L, et al. Toward a stem cell gene therapy for breast cancer. *Blood.* 2009 May 28;113(22):5423–33.

28. Zhao X, Li J. Research on the correlation between ultrasonographic features of breast cancer and expressions of ER, CD34 and p53. *J BUON.* 2018 Apr;23(2):372–7.

29. Montemurro F, Ueno NT, Rondón G, Aglietta M, Champlin RE. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell transplantation for breast cancer: current status, future trends. *Clin Breast Cancer.* 2000 Oct;1(3):197–209; discussion 210.

30. Vredenburgh JJ, Madan B, Coniglio D, Ross M, Broadwater G, Niedzwiecki D, et al. A randomized phase III comparative trial of immediate consolidation with high-dose chemotherapy and autologous peripheral blood progenitor cell support compared to observation with delayed consolidation in women with metastatic breast cancer and only bone metastases following intensive induction chemotherapy. *Bone Marrow Transplant.* 2006 Jun;37(11):1009–15.

31. Cancelas JA, Querol S, Canals C, Picón M, Azqueta C, Solà C, et al. Peripheral blood CD34⁺ cell immunomagnetic selection in breast cancer patients: effect on hematopoietic progenitor content and hematologic recovery after high-dose chemotherapy and autotransplantation. *Transfusion.* 1998 Dec;38(11–12):1063–70.

32. Mohr M, Hilgenfeld E, Fietz T, Hoppe B, Koenigsmann M, Hoffmann M, et al. Efficacy and safety of simultaneous immunomagnetic CD34⁺ cell selection and breast cancer cell purging in peripheral blood progenitor cell samples used for hematopoietic rescue after high-dose therapy. *Clin Cancer Res.* 1999 May;5(5):1035–40.

33. Nieto Y, Shpall EJ, McNiece IK, Nawaz S, Beaudet J, Rosinski S, et al. Prognostic analysis of early lymphocyte recovery in patients with advanced breast cancer receiving

high-dose chemotherapy with an autologous hematopoietic progenitor cell transplant. *Clin Cancer Res.* 2004 Aug 1;10(15):5076–86.

34. Li T, Zhang C, Ding Y, Zhai W, Liu K, Bu F, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells promote proliferation and migration in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells through activation of the ERK pathway. *Oncology Reports.* 2015 Sep 1;34(3):1469–77.
35. Mirabdollahi M, Haghjooyjavanmard S, Sadeghi-Aliabadi H. An anticancer effect of umbilical cord-derived mesenchymal stem cell secretome on the breast cancer cell line. *Cell Tissue Bank.* 2019 Sep;20(3):423–34.
36. Chao KC, Yang HT, Chen MW. Human umbilical cord mesenchymal stem cells suppress breast cancer tumorigenesis through direct cell–cell contact and internalization. *J Cell Mol Med.* 2012 Aug;16(8):1803–15.
37. Fu X, De Angelis C, Schiff R. Interferon Signaling in Estrogen Receptor-positive Breast Cancer: A Revitalized Topic. *Endocrinology.* 2022 Jan 1;163(1):bqab235.
38. Solary E, Prud'homme JF, Gauville C, Magdelenat H, Calvo F. Modulation of proliferation, estradiol receptors and estrogen regulated protein PS2/BCE1 in human breast cancer cell lines by gamma interferon. *J Biol Regul Homeost Agents.* 1991 Sep;5(3):98–106.
39. Heimes AS, Härtner F, Almstedt K, Krajnak S, Lebrecht A, Battista MJ, et al. Prognostic Significance of Interferon- γ and Its Signaling Pathway in Early Breast Cancer Depends on the Molecular Subtypes. *Int J Mol Sci.* 2020 Sep 29;21(19):E7178.
40. Welte T, Zhang XHF. Interleukin-17 Could Promote Breast Cancer Progression at Several Stages of the Disease. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:804347.
41. Tsai YF, Huang CC, Lin YS, Hsu CY, Huang CP, Liu CY, et al. Interleukin 17A promotes cell migration, enhances anoikis resistance, and creates a microenvironment suitable for triple negative breast cancer tumor metastasis. *Cancer Immunol Immunother.* 2021 Aug;70(8):2339–51.
42. Chen WC, Lai YH, Chen HY, Guo HR, Su IJ, Chen HHW. Interleukin-17-producing cell infiltration in the breast cancer tumour microenvironment is a poor prognostic factor. *Histopathology.* 2013 Aug;63(2):225–33.
43. Cochaud S, Giustiniani J, Thomas C, Laprevotte E, Garbar C, Savoye AM, et al. IL-17A is produced by breast cancer TILs and promotes chemoresistance and proliferation through ERK1/2. *Sci Rep.* 2013 Dec 9;3:3456.
44. Koslawsky D, Zaretsky M, Alcalay R, Mazor O, Aharoni A, Papo N. A bi-specific inhibitor targeting IL-17A and MMP-9 reduces invasion and motility in MDA-MB-231 cells. *Oncotarget.* 2018 Jun 19;9(47):28500–13.

2- CORRELATION ENTRE LE MICROCHIMERISME FOETAL ET LE MICROENVIRONNEMENT IMMUNOLOGIQUE DANS LE CANCER DU SEIN CHEZ LES FEMMES NON-MENOPAUSEES (Article 2, soumis)

Introduction

La partie translationnelle du travail a consisté à évaluer l'environnement immunologique de tumeurs malignes du sein à partir d'une bio banque de tissus tumoraux mammaires inclus en paraffine, et sa relation avec le microchimérisme foetal évalué par hybridation in situ en fluorescence du chromosome Y décrite dans l'article 3.

L'étude a été validée par le Comité d'éthique de la recherche en Obstétrique et Gynécologie (CEROG, autorisation N° 2019-GYN-0202) permettant l'analyse rétrospective des échantillons (MR004 en recherche non interventionnelle). Par ailleurs toutes les femmes prises en charge dans le centre donnent un consentement écrit à la recherche.

Parmi 127 femmes non ménopausées opérées d'un cancer du sein dans notre centre entre 2004 et 2010, 92 femmes ayant eu au moins un enfant ont été sélectionnées. Parmi celles-ci 25 ont confirmé avoir eu au moins un fils et ont accepté de participer à l'étude, 23 échantillons tumoraux ont pu être analysés.

Ce travail a été conduit en collaboration avec le Service d'Anatomopathologie de l'Hôpital Tenon (Dr Justine Varinot, Pr D Buob), le Département de Biologie et Pathologie Médicales, Gustave-Roussy Cancer Campus (Dr Alexander Valent) et le Service de Biochimie Endocrinienne et Oncologie de l'Hôpital la Pitié Salpêtrière (Dr Jérôme Denis).

Correlation between fetal microchimerism and immune microenvironment in premenopausal breast cancer

Kamila Kolanska^{1,2,3}, Alexander Valent⁴, Jerome Denis^{2,5}, Marjolaine Le Gac^{1,2,3}, Guillaume Clair³, Lise Selleret^{1,3}, Joseph Gligorov^{3,5,6}, Cyril Touboul^{1,2,3}, Michèle Sabbah², Selim Aractingi⁷, Justine Varinot^{3,8}, Nathalie Chabbert-Buffet^{1,2,3}

¹ Service de gynécologie obstétrique et médecine de la reproduction, Hôpital Tenon, AP-HP, Sorbonne Université, 4 rue de la Chine, 75020 Paris, France

² INSERM UMRS 938, Centre de Recherche Saint-Antoine, 27 rue Chaligny, 75571 PARIS cedex 12, France

³ Cancer Associé à La Grossesse (CALG), French CALG Network, France

⁴ Laboratoire de Cytogénétique, Département de Biologie et de Pathologie Médicales Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France

⁵ Department of Endocrinology and Oncology Biochemistry, Pitié-Salpêtrière Hospital, 75013 Paris, France

⁶ Assistance-Publique Hôpitaux de Paris-Tenon, Institut Universitaire de Cancerologie Université Pierre et Marie Curie, Sorbonne Université, Paris, France

⁷ Institut Cochin, Inserm, UMRS1016, Faculté de médecine, Université de Paris Cité, Paris, France

⁸ Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Hôpital Tenon, HUEP, 4 rue de la Chine, 75020 Paris, UPMC Paris VI, Sorbonne Universities, France

Corresponding author:

Kamila Kolanska

Service de Gynécologie Obstétrique et Médecine de la Reproduction

Hôpital Tenon, 4 rue de la Chine

75020 Paris, France

Tel: + +33(1) 56 01 68 69 ; Email: kamila.kolanska@aphp.fr

1 **ABSTRACT**

2 Fetal microchimerism could influence the prognosis of breast cancers possibly by modifying
3 the immune microenvironment. The aim of this study was to analyze the impact of fetal
4 microchimerism on the immune microenvironment in breast cancer.

5 Tumor-containing blocks of breast cancer samples from women having had a male child were
6 included in the analysis. The tumor immune microenvironment profile was evaluated and
7 correlated to the presence of fetal cells detected by fluorescence in situ hybridization of the Y
8 chromosome.

9 Fetal XY cells were detected in five of 23 post-partum breast carcinomas. The phenotype of
10 microchimeric cells was identified as lymphocytes in three samples, fibroblasts in one sample,
11 and epithelial cells in one sample. The presence of XY cells did not affect the immune or
12 molecular characteristics of the tumors.

13 Fetal microchimerism detected in our study did not influence the molecular characteristics of
14 the immune profile of breast cancer. Further studies are necessary to evaluate the role of fetal
15 cells in breast cancer.

16

17 **KEY WORDS**

18 Fetal microchimerism; breast cancer; microenvironment; immunology

19 INTRODUCTION

20 With about 60 000 new cases each year, breast cancer is the most common malignancy in
21 European women, and causes around 12 000 deaths per year in France ¹. Similarly to other
22 cancers, such as non-Hodgkin's lymphoma ² or colorectal cancer ³, it has been suggested that
23 parity could reduce the incidence of breast cancer ⁴⁻⁷. The impact of pregnancy on the
24 prognosis of breast cancer has recently been reevaluated. While breast cancers occurring
25 during pregnancy (Pregnancy Associated Breast Cancer - PABC) could have a better
26 prognosis, those occurring between 1 and 10 years after pregnancy (Post-Partum Breast
27 Cancer – PPBC) appear to have a more unfavorable prognosis ⁸⁻¹⁰.

28 While the mechanism explaining of the role of pregnancy in breast cancer development has
29 not been completely elucidated, the impact of fetal microchimerism has been suggested ^{11,12}.
30 Fetal microchimerism is defined as the presence of fetal cells in the maternal organism as a
31 result of the transfer of fetal cells through the placental barrier during pregnancy ¹³. Fetal cell
32 types detected in maternal blood include lymphocytes, erythroblasts or nucleated red blood
33 cells, hematopoietic progenitors ¹⁴, and mesenchymal progenitors ¹⁵. These cells can be
34 detected in maternal blood up to 30 years after delivery ¹⁶. Fetal cells could participate in wound
35 healing ^{17,18}, angiogenesis ^{19,20} and carcinogenesis ²¹ as they may migrate from their niche to
36 the target tissue and differentiate in appropriate cell types ^{14,22}.

37 An inverse association between breast cancer incidence and circulating fetal cells has been
38 demonstrated ²³ and fetal cells have been found in the tissue of nine out of ten cases of PABC
39 ²⁴ suggesting a regulatory action on tumor cells. Fetal microchimerism could induce an immune
40 response as allogenic grafting of hematopoietic stem cells have demonstrated better immune
41 control in hematological diseases ²⁵. Thus, the percentage of tumor infiltrating lymphocytes
42 (TILs) could be modified by the presence of fetal cells.

43 The aim of this study was to analyze the impact of fetal microchimerism on the immune
44 microenvironment in breast cancer.

45 **MATERIAL AND METHODS**

46 **Patients and sample collection**

47 Tumor-containing blocks of breast cancer samples were retrospectively collected in the
48 Department of Anatomy and Pathologic Cytology of Tenon Hospital, Paris, France. Clinical
49 variables such as age, parity, time from the last birth of a male child, treatment and progression
50 of breast cancer (including recurrence or death), as well as tumor histologic and biological
51 characteristics were collected.

52 Fluorescence in situ hybridization (FISH) for the Y-chromosome was performed (with XY
53 probe, Abbott, USA) to detect fetal cells. Thus, only women with a history of at least one live
54 birth of a male child were included in the analysis.

55 The study, including retrospective sample analysis, was approved by the Institutional Review
56 Board (CEROG – Comité d'éthique de la recherche en Obstétrique et Gynécologie, Approval
57 N° 2019-GYN-0202). All women gave pre-operative written informed consent.

58

59 **Histologic analysis**

60 Paraffin-embedded tissue sample sections of 3 µm were processed and stained with
61 hematoxylin and eosin by standard methods. The tumoral subtype (invasive ductal or lobular
62 adenocarcinoma) and Elston-Ellis histologic grading were determined.

63 The TILs were evaluated according to a standard method recommended by the International
64 Immuno-Oncology Working Group (5). In brief, the samples were evaluated after standard
65 hematoxylin and eosin staining. Lymphocytes, plasma cells, and macrophages were
66 considered as immune infiltrate. The TILs were expressed as the percentage of the tumoral
67 stroma surface occupied by the immune infiltrate.

68 Additionally, tertiary lymphoid structures (TLSs) and peripheral germinal centers were
69 evaluated.

70 **Immunostaining**

71 To determine the presence of leucocytes (CD45), lymphocytes and their T subpopulation
72 (CD5, CD4 and CD8), and macrophages and dendritic cells (CD163), we performed
73 immunostaining using the automated method Automate BenchMark XT, Roche Ventana®,
74 (Ventana Medical Systems, Inc., Rotkreuz, Switzerland) (Table 1).

75

76 **Table 1.** Primary antibodies used in the study

Protein	Antibody reference	Species	Pre-treatment	Dilution
CD45 ^a	M701	mouse	ER1 20 min.	1:1200
CD4 ^b	NCL-CD4-1F6	mouse	ER2 30 min.	1:200
CD5 ^b	CD4-4C7-L-CE	rabbit	ER1 40 min.	1:100
CD8 ^a	M 7103	mouse	ER2 20 min.	1:50
CD163 ^b	NCL-CD163	mouse	ER1 10 min.	1:400

77 ^a DAKO

78 ^b Novocastra/ LEICA

79 ER1: Epitope Retrieval 1 (citric acid, pH 6); ER2: EDTA (pH 8.8)

80

81 For PR, ER and Ki67 staining, antigen retrieval was performed by heating the slides at pH 8.8.

82 The slides were then incubated for 24h with pre-diluted anti-PR and anti-ER antibodies and for
83 32h with an anti-Ki67 antibody (dilution 1/150) followed by incubation with anti-rabbit and anti-
84 mouse antibodies and revelation by UltraView Universal DAB (ref. 760-500, Ventana Medical
85 Systems, Inc.). Representative images were captured using a Nikon Eclipse 90i microscope
86 equipped with a Nikon DSFi1 camera (Nikon Ltd, UK).

87 Blinded interpretation of immunostained sections was performed by expert pathologists (JV
88 and GC). The percentage of stained cells was evaluated at 200x magnification. The ratio of
89 CD4 / CD8 lymphocytes was evaluated.

90

91

92 **Fluorescence in situ hybridization for the Y chromosome**

93 Fetal cells were detected by FISH using the Abbott™ protocol (Abbott France S.A.S., Rungis,
94 France) with Vysis™ probes detecting centromeres of X- and Y-chromosomes (reference
95 07J20-050; Abbott France S.A.S., Rungis, France) in accordance with the manufacturer's
96 instructions.

97 In brief, paraffin-embedded tissue sample sections of 4-6 µm were obtained and stored at 4°C.
98 After deparaffinization the sections were treated with protease and dehydrated in successive
99 alcohol baths. The probes were disposed and hybridized according to the Abbott protocol with
100 a mix of XY probes (denaturation at 80°C for 5 minutes then hybridization at 37°C for 18h).
101 The samples were washed with post-hybridization solution and dehydrated in successive
102 alcohol baths. They were then treated with Vectashield® Antifade Mounting Medium with 4',6-
103 diamidino-2-phenylindole (DAPI; Vector Laboratories, Burlingame, CA).

104 The analysis was performed by fluorescence microscopy (Leica Biosystems, France) under
105 x100 and x200 objective lenses. Images were obtained with Cytovision® software (Leica
106 Biosystems, France). The samples were considered as non-contributive if <80% of cells
107 showed a double X chromosome control signal.

108

109 **Statistical analysis**

110 The data are presented as a mean with standard deviation or median with interquartile range.
111 The clinical and immunological characteristics of the two groups of samples (with and without
112 the Y chromosome) were compared using the Student's t-test or Mann-Whitney test.

113 Unless otherwise specified, the data were managed using an Excel database and analyzed
114 using R 3.1.3 software, available online.

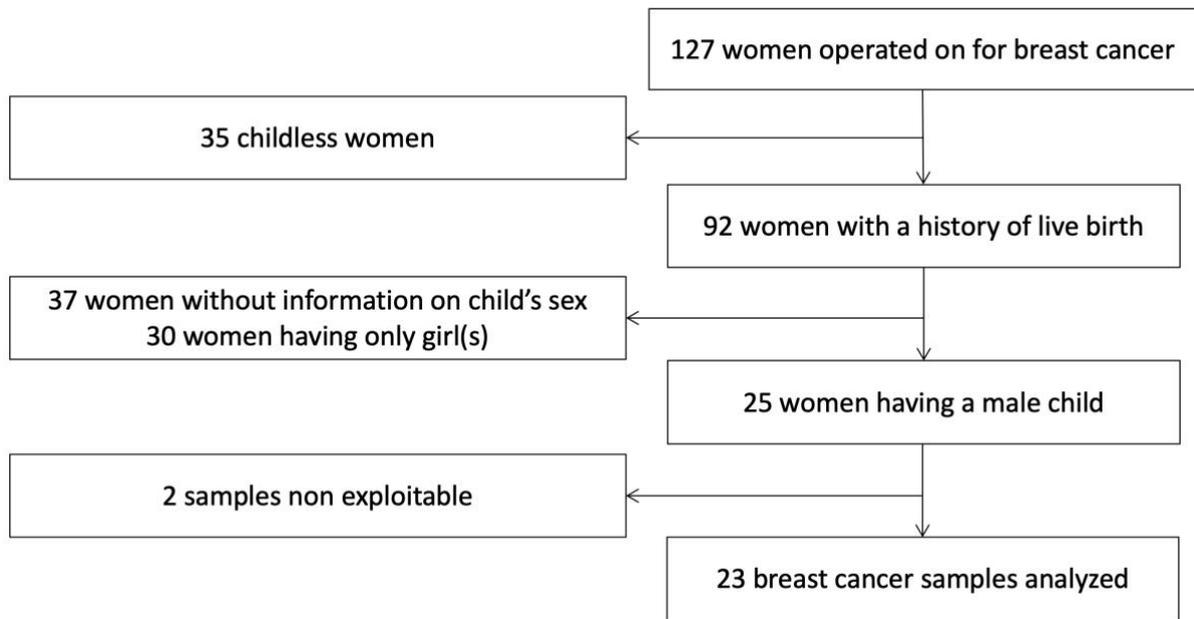
115

116

117 **RESULTS**

118 **Study population**

119 Among 127 premenopausal women operated on for a breast cancer and managed in our
120 department between 2004 and 2010, 92 had at least one child. Among them, 25 women had
121 at least one male child and were included in the study. Finally, 23 samples were suitable for
122 analysis (Figure 1).



123

124 **Figure 1.** Flow chart.

125

126 The clinical and histologic characteristics of the women included in the study are presented in
127 Table 2. The mean age at breast cancer diagnosis was 38 ± 4 years with the mean time from
128 the last male birth of 7 ± 5 years. The women had a mean of 1.26 ± 0.53 male children. The
129 mean breast tumor size at diagnosis was 30 ± 17 mm.

130 **Table 2.** Clinical characteristics, obstetric history and histologic tumoral characteristics of the study
 131 population

	N = 23
Age at diagnosis (years), n (%)	
25 – 30	2 (9)
31 – 35	2 (9)
36 – 40	12 (52)
41 – 45	7 (30)
Time from the last live birth of a male child (years), n (%)	
< 5	8 (35)
5 – 10	6 (25)
11 – 15	4 (18)
> 15	1 (4)
Unknown	4 (18)
Number of male children, n (%)	
1 male child	18 (78)
2 male children	4 (18)
3 male children	1 (4)
Neoadjuvant chemotherapy, n (%)	
Yes	6 (26)
No	17 (74)
Stage pT, n (%)	
pTis	1 (4)
pT1a (1-5 mm)	1 (4)
pT1b (6-10 mm)	1 (4)
pT1c (11-20 mm)	6 (26)
pT2 (20-50 mm)	12 (53)
pT3 (> 50 mm)	2 (9)
Stage pN, n (%)	
pN0	8 (35)
pN1	9 (39)
pN2	4 (17)
pN3	2 (9)
Histology, n (%)	
DCIS	1 (4)
IDC G1	3 (13)
IDC G2	8 (35)
IDC G3	9 (39)
ILC G2	2 (9)
Molecular subtype, n (%)	
Luminal A	12 (52)
Luminal B HER2+	4 (18)
Luminal B HER2-	1 (4)
HER2+/neu	2 (9)
Triple negative	3 (13)
CCIS	1 (4)
Immune score (TILs), n (%)	
< 5%	5 (23)
5-10%	7 (32)
11-15%	3 (14)
16-20%	2 (9)
21-25%	1 (4)
26-50%	1 (4)
> 50%	3 (14)

132 DCIS – ductal carcinoma in situ
 133 IDC – invasive ductal carcinoma
 134 ILC – invasive lobular carcinoma
 135

136 The association between the tumor and the immune characteristics are presented in
 137 Supplementary Table 1.

138 **Supplementary Table 1.** Association between tumor and immune characteristics

	N	TILs (%). mean (SD)	TILs (<i>p</i> -value)	CD4+ / 0.25 mm ² . (mean (SD)	CD4+ (<i>p</i> - value)	CD8+ / 0.25 mm ² . (mean (SD)	CD8+ (<i>p</i> - value)	Ratio CD4 / CD8 mean (SD)	Ratio CD4 / CD8 (<i>p</i> - value)	CD163+ / 0.25 mm ² . (mean (SD)	CD163+ (<i>p</i> -value)
Tumor size											
≤ 20 mm	8	18.9 (24.9)	0.973	71 (134)	0.505	154 (230)	0.725	0.26 (0.26)	0.982	32.5 (38.1)	0.640
> 20 mm	14	19.2 (20.2)		41 (73)		124 (167)		0.26 (0.18)		39.9 (33.7)	
Lymph node involvement											
Negative (N0)	7	15.6 (13.5)	0.611	29 (47)	0.465	118 (197)	0.787	0.19 (0.15)	0.307	35.6 (39.7)	0.883
Positive (N+)	15	20.7 (24.6)		62 (114)		142 (189)		0.29 (0.22)		38.0 (33.5)	
Neoadjuvant chemotherapy											
Yes	6	12.3 (14.5)	0.378	26 (51)	0.460	118 (217)	0.804	0.14 (0.16)	0.107	38.2 (41.3)	0.940
No	16	21.6 (23.4)		61 (110)		141 (183)		0.30 (0.20)		36.9 (33.3)	
Grade (EE)											
I / II	13	13.3 (18.2)	0.131	39 (105)	0.496	72 (126)	0.059	0.25 (0.24)	0.897	21.9 (14.7)	0.009
III	9	27.4 (24.0)		69 (90)		225 (230)		0.26 (0.14)		59.3 (43.5)	
Ki67											
≤ 15%	7	7.0 (3.9)	0.069	6 (5)	0.136	35 (13)	0.090	0.13 (0.11)	0.052	19.3 (11.5)	0.097
> 15%	15	24.7 (24.0)		73 (113)		181 (213)		0.31 (0.21)		45.6 (38.8)	
Molecular subtype											
Luminal A	12	8.8 (6.6)	0.043	11 (11)	0.024	42 (24)	0.021	0.20 (0.15)	0.007	22.3 (13.6)	0.005
Luminal B HER2-	1	2.0 (0.0)		2 (0)		13 (0)		0.15 (0.00)		7.0 (0.0)	
Luminal B HER2+	4	28.0 (29.3)		44 (46)		189 (186)		0.23 (0.05)		41.5 (30.5)	
Non luminal HER2+	2	42.5 (38.9)		210 (248)		270 (304)		0.72 (0.11)		45.0 (0.0)	
Triple negative	3	38.3 (22.6)		135 (138)		382 (304)		0.24 (0.25)		96.0 (56.0)	

140 **Identification of the Y chromosome**

141 Among the 23 analyzed samples, FISH analysis was possible in 21 and XY cells were detected
 142 in five. They were localized on a small surface with 1-3 spots of < 1 mm² with < 10 cells per
 143 spot. In three cases, XY cells were identified as lymphocytes, in one as fibroblasts, and in one
 144 as epithelial cells (Table 3, Figure 2 and 3).

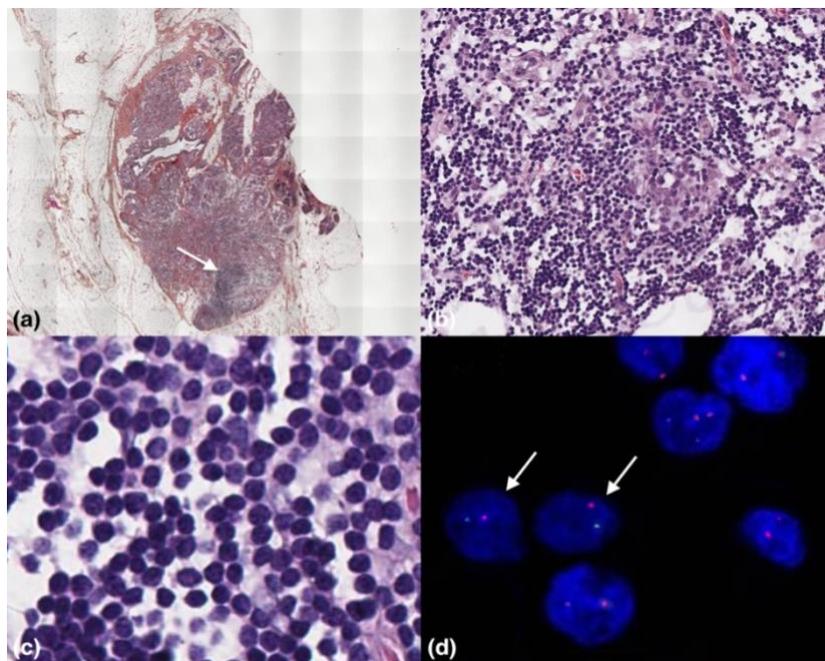
145

146 **Table 3.** Clinical and tumor characteristics of women with the presence of the Y chromosome in tumor
 147 specimens.

XY cells	Time after delivery of male child (years)	Neoadjuvant chemotherapy	pTN	Histologic type	Molecular classification	TILs (%)
Lymphocyte	1	No	pT3N2	IDC G2	Non luminal HER2+	50
Lymphocyte	3	No	pT1aN0	IDC G1	Luminal A (HER2-)	25
Lymphocyte	2	No	pT2N2	IDC G3	Luminal B HER2+	20
Fibroblast	11	No	pTis	DCIS	-	-
Epithelial	unknown	Yes	pT1cN1	IDC G3	Luminal A (HER2-)	5

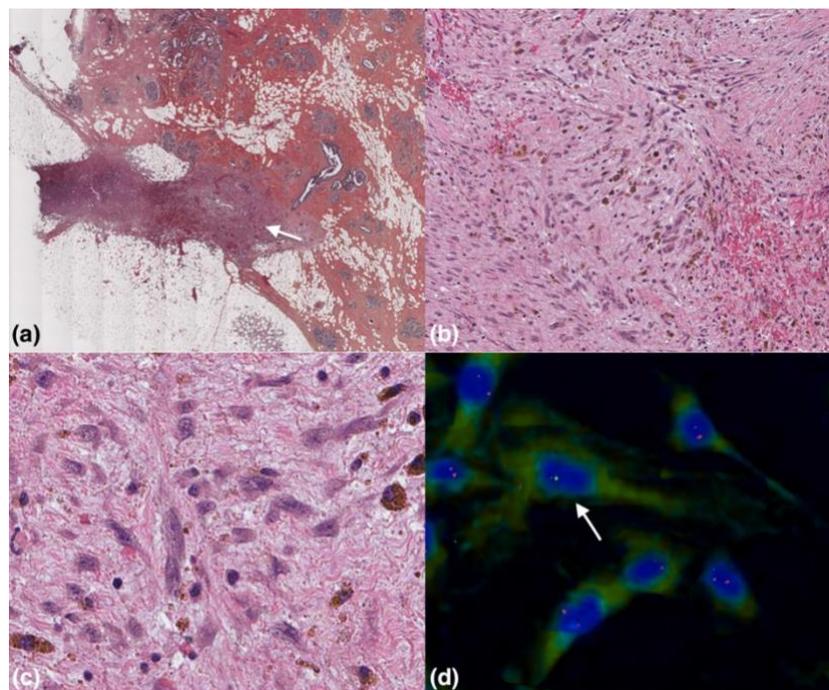
148 DCIS – ductal carcinoma in situ
 149 IDC – invasive ductal carcinoma

150



151
 152 **Figure 2.** Lymphocytes from invasive ductal carcinoma with the presence of Y chromosome.

153 (a) Invasive ductal carcinoma of 2 mm with 25% of TILs (HES, x40). (b, c) Lymphocyte and histiocyte
 154 infiltrate in tumoral stroma (HES, x100 and x200). (d) FISH revealing two lymphocytes in infiltrate from
 155 adjacent tumoral stroma showing X (red) and Y chromosomes (green). Other lymphocytes show XX
 156 formula (DAPI, x800).



157

158 **Figure 3.** Fibroblasts from ductal carcinoma in situ with the presence of Y chromosome.

159 (a) Biopsy scar close to a lactiferous duct with a lesion of ductal carcinoma in situ (HES, x40). (b, c)
 160 Activated fibroblasts, siderophages and rare lymphocytes in the cicatricial lesion (HES, x100 and x 200).
 161 (d) FISH revealing a fibroblast with X (red) and Y (green) chromosomes centromeric probes. Other
 162 fibroblasts show XX formula (DAPI, x800).

163

164 **Correlation between the presence of fetal cells and clinical characteristics**

165 No difference in clinical characteristics was observed between samples with or without XY cells
 166 (Table 4).

167

168 **Table 4.** Association between the clinical and histologic characteristics and the presence of Y
 169 chromosome in tumor samples.

	Y chromosome present n = 5	No Y chromosome n = 16	p-value
Age at cancer diagnosis (years), mean (SD)	37.5 (4.3)	37.8 (4.3)	0.926
Number of male children, median (IQR)	1 (1 - 1)	1 (1 - 1)	0.856
Time from the last male child birth, median (IQR)	3.0 (2.0 - 11.0)	6.5 (4.0 - 10.8)	0.534
Tumor size (mm), mean (SD)	22.2 (24.0)	32.6 (15.6)	0.406
Stage pT			
Tis	1 (20)	0 (0)	0.147
1	2 (40)	5 (31)	
2	1 (20)	10 (63)	
3	1 (20)	1 (6)	
N° of lymph nodes involved, median (IQR)	6 (0 - 7)	1 (0 - 2)	0.495
Neoadjuvant chemotherapy, n (%)	1 (20)	4 (25)	0.819

Positive estrogen receptors, n (%)	3 (60)	13 (81)	0.330
Positive progesterone receptors, n (%)	3 (60)	11 (69)	0.717
Positive HER2, n (%)	2 (40)	3 (19)	0.330
Ki67 (% of marked cells), median (IQR)	35 (27.5-40)	27.5 (15.0-47.5)	0.634

170

171

172 Correlation between the presence of fetal cells and immune characteristics

173 In line with our center's protocol, immunological analysis was not performed in one of the
174 samples with the Y chromosome as it was a ductal carcinoma in situ.

175 No difference in immunological characteristics was observed between samples with or without
176 the presence of XY cells (Table 5).

177

178 **Table 5.** Association between the immune characteristics of tumor stroma and the presence of XY cells.

	Y chromosome present n = 4	No Y chromosome n = 16	<i>p</i> -value
TILs (%), median (IQR)	17.5 (7.5-23.75)	10 (2.75-18.75)	0.406
CD45 (% of marked cells), median (IQR)	10 (5-18.75)	13.5 (3.25 – 38.75)	0.770
CD5 (% of marked cells), median (IQR)	15 (7.5-18.75)	7.5 (2.25 – 53.75)	0.479
CD4+ cells / 0.25mm ² (n), median (IQR)	25 (14-30)	7.5 (2.75-37.5)	0.314
CD8+ cells / 0.25mm ² (n), median (IQR)	57.5 (32.25-85)	37.5 (15-72.5)	0.427
CD4 / CD8 ratio, median (IQR)	0.43 (0.38-0.49)	0.28 (0.13-0.38)	0.201
CD163+ cells / 0.25mm ² , median (IQR)	30 (17.5-53.75)	17.5 (10-30)	0.202

179

180

181 DISCUSSION

182 This study analyzed the link between fetal microchimerism and the immune characteristics of
183 breast cancer. Among 23 samples of breast cancer, XY cells were detected in five. These cells
184 were lymphocytes in three samples, fibroblasts in one sample, and epithelial cells in one
185 sample. The presence of XY cells was not found to affect the immune or molecular
186 characteristics of the tumors.

187 The analyzed samples were obtained from young women (38 ± 4 years) who had been
188 diagnosed with a breast cancer mainly within 10 years after the birth of a male child (7 ± 5
189 years). Data from the literature report less favorable outcomes for breast cancers diagnosed

190 within 10 years following a pregnancy (known as PPBC) ⁸⁻¹⁰. The analyzed tumors were mostly
191 T2 and T3 stage tumors (61%), with lymph node involvement (65%), and with grade I, II and
192 III representing 13%, 44%, 39% of the cases, respectively. This is in accordance with cases of
193 PPBC reported in the literature ¹⁰. Over half of the analyzed tumors were luminal A (55%).
194 Triple negative tumors represented 14% of the cases. The distribution of the molecular profile
195 of the tumors analyzed in our study is also in accordance with the literature data for PPBC ¹⁰.

196 The mean value of TILs in the analyzed samples was $19 \pm 21\%$ and the correlation between
197 the molecular and immune characteristics is concordant with the data reported in the literature
198 ²⁶. The triple negative tumors were more likely to be characterized by a higher TILs proportion
199 ($33.8\% \pm 22.6$) rather than a luminal A tumor ($8.8\% \pm 6.6$).

200 The majority of lymphocytes from the analyzed tumors were lymphocyte T cells (CD45+ CD5+)
201 mostly represented by a cytotoxic subpopulation (CD8+). The CD4/CD8 ratio was significantly
202 higher in HER2/neu tumors, as described in the literature ²⁷.

203 In contrast to the study by Dubernard et al. ²⁴, showing the presence of the Y chromosome
204 detected by FISH in nine out of ten stromal compartments of cases of PABC, our study
205 revealed the presence of the Y chromosome in only five of the 23 analyzed samples (22%).
206 The stage and histologic grade of the tumors in our study was comparable to those presented
207 by Dubernard et al.. However, the women included in our study mainly presented PPBC, at
208 distance from the delivery, which could explain the lower rate of fetal blood cells in our samples.

209 Another study, by Nemescu et al. ²⁸, evaluating the presence of fetal microchimeric cells in the
210 stroma of breast cancers diagnosed independently of the pregnancy or postpartum period
211 showed the presence of the Y chromosome in 100% of analyzed samples. The analysis was
212 performed by polymerase chain reaction (PCR) of the sex-determining region Y (SRY) gene
213 and the Y chromosome was found to be present in the tumors and the neighboring tissues.
214 However, the SRY-signal detected in this study was very low and close to the background
215 noise. Thus, the results should be interpreted with caution.

216 We identified the cells with the XY formula as lymphocytes, fibroblasts and epithelial cells. This
217 observation contrasts with the analysis of Dubernard et al. where the identified microchimeric
218 cells presented epithelial and stromal phenotypes ²⁴. The authors did not find any CD45+
219 microchimeric cells. Once more, this discrepancy could be explained by a difference between
220 the PABC tumors analyzed in their study, and the mainly PPBC tumors of our population.
221 During pregnancy various populations of fetal cells, including umbilical cord mesenchymal or
222 hematopoietic stem cells, can cross the placental barrier ^{29,30} and migrate to the cancer niche
223 to participate in tumor development ^{31,32}. Thus, different cell subpopulations could have been
224 available for mobilization by tumor niches in the two studies.

225 Gadi et al. have suggested a physiopathologic mechanism to explain the regulation of
226 carcinogenesis in this context. They put forward that fetal cells may modify the immune control
227 of cancer ³³. We therefore analyzed the link between the presence of microchimeric cells and
228 immune markers in the tumors. No statistical difference was found in TILs score, the
229 mobilization of CD4+ and CD8+ lymphocytes, or the percentage of CD168+ cells in the groups
230 of samples with or without detected Y chromosome. Similarly, no statistical difference was
231 found between the clinical characteristics and the presence of the Y chromosome.

232 This is the first study evaluating the link between the presence of fetal microchimeric cells and
233 the immune environment of breast cancer tumors. However, our observations should be
234 interpreted with caution as the Y chromosome was found in only five samples, which could
235 have limited the statistical interpretation. Moreover, FISH analysis could have been limited by
236 the size of the analyzed area. The FISH marking was performed in selected sample sections,
237 which does entirely rule out the presence or absence of the Y chromosome in the whole
238 sample. However, immune analysis was also performed in the neighboring tissue, thus,
239 responding to the question on the impact of microchimeric cells on local immune response.
240 More robust analysis by digital PCR could provide more precise results.

241 Finally, the impact of female pregnancies was not evaluated in this study as the detection of
242 microchimerism would require genetic analysis of the offspring to distinguish maternal from
243 fetal cells.

244

245 **CONCLUSION**

246 Fetal microchimerism was detected in five out of 23 cases of PPBC. The presence of XY cells
247 did not show any impact on the immune or molecular characteristics of the tumors.

248

249 **ACKNOWLEDGEMENTS**

250 We would like to thank Felicity Neilson for editing the English of our paper.

251

252 **DECLARATION OF INTEREST**

253 None

254

255 **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

256 K.K., A.V., M.LG., G.C., M.S., S.A, J.V. and N.C-B. performed study concept and design; K.K.,
257 A.V., J.D, G.C., L.S., J.G., C.T., M.S., S.A., J.V. and N.C-B. performed development of
258 methodology and writing, review and revision of the paper; K.K., A.V., J.D., M.LG., G.C., C.T.,
259 M.S., S.A., J.V., and N.C-B. provided acquisition, analysis and interpretation of data, and
260 statistical analysis; K.K., A.V., G.C., L.S., J.G., C.T., J.V., N.C-B.. provided technical and
261 material support. All authors read and approved the final paper.

262

263

264 **FUNDING**

265 This research has been founded by Prix *Ruban Rose* 2018

266

267 **AVAILABILITY STATEMENT**

268 The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the
269 corresponding author on reasonable request.

270

271 **REFERENCES**

- 272 1. UNICANCER - Les chiffres du cancer en France. [http://www.unicancer.fr/le-](http://www.unicancer.fr/le-groupeunicancer/les-chiffres-cles/les-chiffres-du-cancer-en-france)
273 [groupeunicancer/ les-chiffres-cles/les-chiffres-du-cancer-en-france](http://www.unicancer.fr/le-groupeunicancer/les-chiffres-cles/les-chiffres-du-cancer-en-france). (2021).
- 274 2. Zhang, Y., Holford, T. R., Leaderer, B., Boyle, P., Zahm, S. H., Zhang, B. et al.
275 Menstrual and reproductive factors and risk of non-Hodgkin's lymphoma among
276 Connecticut women. *American Journal of Epidemiology* 160, 766–773 (2004).
- 277 3. Nichols, H. B., Trentham-Dietz, A., Hampton, J. M. & Newcomb, P. A. Oral
278 contraceptive use, reproductive factors, and colorectal cancer risk: findings from
279 Wisconsin. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the*
280 *American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society*
281 *of Preventive Oncology* 14, 1212–1218 (2005).
- 282 4. Migliavacca Zucchetti, B., Peccatori, F. A. & Codacci-Pisanelli, G. Pregnancy and
283 Lactation: Risk or Protective Factors for Breast Cancer? *Adv Exp Med Biol* 1252,
284 195–197 (2020).
- 285 5. Froehlich, K., Schmidt, A., Heger, J. I., Al-Kawlani, B., Aberl, C. A., Jeschke, U. et
286 al. Breast cancer, placenta and pregnancy. *Eur J Cancer* 115, 68–78 (2019).
- 287 6. Husby, A., Wohlfahrt, J., Øyen, N. & Melbye, M. Pregnancy duration and breast
288 cancer risk. *Nat Commun* 9, 4255 (2018).
- 289 7. Russo, J., Moral, R., Balogh, G. A., Mailo, D. & Russo, I. H. The protective role of
290 pregnancy in breast cancer. *Breast Cancer Res* 7, 131–142 (2005).
- 291 8. Lefrère, H., Floris, G., Schmidt, M. K., Neven, P., Warner, E., Cardonick, E. et al.
292 Breast cancer diagnosed in the post-weaning period is indicative for a poor
293 outcome. *Eur J Cancer* 155, 13–24 (2021).
- 294 9. Amant, F., Lefrère, H., Borges, V. F., Cardonick, E., Lambertini, M., Loibl, S. et al.
295 The definition of pregnancy-associated breast cancer is outdated and should no
296 longer be used. *Lancet Oncol* 22, 753–754 (2021).

- 297 10. Goddard, E. T., Bassale, S., Schedin, T., Jindal, S., Johnston, J., Cabral, E. et al.
298 Association Between Postpartum Breast Cancer Diagnosis and Metastasis and the
299 Clinical Features Underlying Risk. *JAMA Netw Open* 2, e186997 (2019).
- 300 11. Gadi, V. K. & Nelson, J. L. Fetal microchimerism in women with breast cancer.
301 *Cancer Res.* 67, 9035–9038 (2007).
- 302 12. Gadi, V. K., Malone, K. E., Guthrie, K. A., Porter, P. L. & Nelson, J. L. Case-control
303 study of fetal microchimerism and breast cancer. *PLoS ONE* 3, e1706 (2008).
- 304 13. GAMMILL, H. S. & NELSON, J. L. Naturally acquired microchimerism. *Int J Dev*
305 *Biol* 54, 531–543 (2010).
- 306 14. Khosrotehrani, K. & Bianchi, D. W. Multi-lineage potential of fetal cells in maternal
307 tissue: a legacy in reverse. *J. Cell. Sci.* 118, 1559–1563 (2005).
- 308 15. O'Donoghue, K., Chan, J., de la Fuente, J., Kennea, N., Sandison, A., Anderson,
309 J. R. et al. Microchimerism in female bone marrow and bone decades after fetal
310 mesenchymal stem-cell trafficking in pregnancy. *Lancet* 364, 179–182 (2004).
- 311 16. Bianchi, D. W., Zickwolf, G. K., Weil, G. J., Sylvester, S. & DeMaria, M. A. Male
312 fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum.
313 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 705–708 (1996).
- 314 17. Khosrotehrani, K., Reyes, R. R., Johnson, K. L., Freeman, R. B., Salomon, R. N.,
315 Peter, I. et al. Fetal cells participate over time in the response to specific types of
316 murine maternal hepatic injury. *Hum Reprod* 22, 654–661 (2007).
- 317 18. Nassar, D., Khosrotehrani, K. & Aractingi, S. Fetal microchimerism in skin wound
318 healing. *Chimerism* 3, 45–47 (2012).
- 319 19. Nassar, D., Droitcourt, C., Mathieu-d'Argent, E., Kim, M. J., Khosrotehrani, K. &
320 Aractingi, S. Fetal progenitor cells naturally transferred through pregnancy
321 participate in inflammation and angiogenesis during wound healing. *FASEB J.* 26,
322 149–157 (2012).
- 323 20. Nguyen Huu, S., Oster, M., Uzan, S., Chareyre, F., Aractingi, S. & Khosrotehrani,
324 K. Maternal neoangiogenesis during pregnancy partly derives from fetal endothelial
325 progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 1871–1876 (2007).
- 326 21. Nguyen Huu, S., Khosrotehrani, K., Oster, M., Moguelet, P., Espié, M.-J. &
327 Aractingi, S. Early phase of maternal skin carcinogenesis recruits long-term
328 engrafted fetal cells. *Int. J. Cancer* 123, 2512–2517 (2008).
- 329 22. Khosrotehrani, K., Johnson, K. L., Cha, D. H., Salomon, R. N. & Bianchi, D. W.
330 Transfer of fetal cells with multilineage potential to maternal tissue. *JAMA* 292, 75–
331 80 (2004).
- 332 23. Gadi, V. K. & Nelson, J. L. Fetal microchimerism in women with breast cancer.
333 *Cancer Res* 67, 9035–9038 (2007).

- 334 24. Dubernard, G., Aractingi, S., Oster, M., Rouzier, R., Mathieu, M.-C., Uzan, S. et al.
335 Breast cancer stroma frequently recruits fetal derived cells during pregnancy.
336 *Breast Cancer Res* 10, R14 (2008).
- 337 25. Weiden, P. L., Flournoy, N., Thomas, E. D., Prentice, R., Fefer, A., Buckner, C. D.
338 et al. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of
339 allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med* 300, 1068–1073 (1979).
- 340 26. Lee, H. J., Kim, J. Y., Park, I. A., Song, I. H., Yu, J. H., Ahn, J.-H. et al. Prognostic
341 Significance of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and the Tertiary Lymphoid
342 Structures in HER2-Positive Breast Cancer Treated With Adjuvant Trastuzumab.
343 *Am J Clin Pathol* 144, 278–288 (2015).
- 344 27. Wang, K., Shen, T., Siegal, G. P. & Wei, S. The CD4/CD8 ratio of tumor-infiltrating
345 lymphocytes at the tumor-host interface has prognostic value in triple-negative
346 breast cancer. *Hum Pathol* 69, 110–117 (2017).
- 347 28. Nemescu, D., Ursu, R. G., Nemescu, E. R. & Negura, L. Heterogeneous
348 Distribution of Fetal Microchimerism in Local Breast Cancer Environment. *PLoS*
349 *One* 11, e0147675 (2016).
- 350 29. Rosner, M., Kolbe, T. & Hengstschläger, M. Fetomaternal microchimerism and
351 genetic diagnosis: On the origins of fetal cells and cell-free fetal DNA in the
352 pregnant woman. *Mutat Res Rev Mutat Res* 788, 108399 (2021).
- 353 30. Klonisch, T. & Drouin, R. Fetal-maternal exchange of multipotent stem/progenitor
354 cells: microchimerism in diagnosis and disease. *Trends Mol Med* 15, 510–518
355 (2009).
- 356 31. Karnoub, A. E., Dash, A. B., Vo, A. P., Sullivan, A., Brooks, M. W., Bell, G. W. et
357 al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer
358 metastasis. *Nature* 449, 557–563 (2007).
- 359 32. Bryukhovetskiy, I. S., Dyuizen, I. V., Shevchenko, V. E., Bryukhovetskiy, A. S.,
360 Mischenko, P. V., Milkina, E. V. et al. Hematopoietic stem cells as a tool for the
361 treatment of glioblastoma multiforme. *Mol Med Rep* 14, 4511–4520 (2016).
- 362 33. Gadi, V. K. Fetal microchimerism and cancer. *Cancer Lett* 276, 8–13 (2009)

DISCUSSION GENERALE

L'impact des grossesses sur le risque de survenue d'un cancer du sein a été largement décrit sur le plan épidémiologique, avec des données contrastées en fonction notamment de la temporalité de survenue du cancer par rapport à la grossesse (93–95). Les mécanismes d'interaction entre grossesse et cancer du sein restent quant à eux très mal connus. Ce travail de thèse a analysé l'impact du microchimerisme fœtal dans le cancer du sein dans une démarche mixte, translationnelle et *in vitro*. Notre hypothèse était que le microchimerisme fœtal pouvait influencer le comportement tumoral par le biais de la population hématopoïétique des cellules fœtales, en interagissant avec les cellules tumorales mais également avec l'environnement immunologique au sein de la niche tumorale.

Nous avons donc étudié la présence de cellules fœtales dans le tissu tumoral de cancers du sein diagnostiqués à distance de la grossesse à partir d'une bio banque d'une part et d'autre part l'interaction *in vitro* entre les cellules fœtales CD34+ dérivées du sang de cordon et des lignées cellulaires du cancer du sein.

Au niveau du tissu tumoral du cancer du sein les cellules fœtales masculines ont été retrouvées dans 5 échantillons sur 23. Ces cellules étaient peu nombreuses et étaient représentées par des lymphocytes dans 3 échantillons, par des fibroblastes dans un échantillon et par des cellules épithéliales dans un échantillon.

Dans la partie *in vitro*, nous avons démontré que les cellules fœtales CD34+ dérivées du sang de cordon interagissent avec les cellules du cancer du sein en provoquant une diminution de la prolifération des cellules MDA-MB-231 et MCF-7 ainsi que la diminution de la migration et l'invasion des cellules MDA-MB-231. L'analyse spatiale des interactions entre les cellules a permis d'émettre l'hypothèse d'une fusion des

cellules CD34+ avec les cellules tumorales. L'analyse transcriptomique des cellules tumorales en corrélation avec l'analyse du sécrétome des cellules fœtales CD34+ a permis d'identifier l'IL-17A et l'INF- γ comme potentiels régulateurs d'amont des modifications fonctionnelles observées dans les cellules tumorales.

Pendant la grossesse différentes populations cellulaires fœtales traversent la barrière placentaire. Parmi elles, les cellules précurseurs hématopoïétiques (5,6) ont été mises en évidence par l'identification du chromosome Y par FISH sur les cellules CD34+ chez près de 50% de femmes multipares en bonne santé (9–12). Les cellules CD34+ sont à l'origine de toutes les populations de cellules immunitaires (128) jouant un rôle important dans la cancérogénèse du cancer du sein (91). C'est pourquoi le travail de recherche fondamentale de cette thèse s'est intéressé aux interactions de cellules CD34+ dérivées du sang de cordon avec les cellules tumorales en co-culture in vitro.

Les cellules CD34+ dérivées du sang de cordon se caractérisent par des capacités de régénération et d'autorenouveaulement plus importantes comparé aux cellules CD34+ périphériques adultes du fait de leurs immaturité hématopoïétique plus importante (129–131). Leur implication dans la cancérogénèse a été peu étudiée et les informations concernant le profil de cytokines sécrétés par les cellules CD34+ dérivées du sang de cordon ne sont pas disponibles dans la littérature.

La mise au point des protocoles utilisés dans cette thèse ont permis d'identifier le profil de cytokines sécrétés par les cellules CD34+ dérivées du sang de cordon. L'angiopoietine-2, le ligand du CD40, le facteur D du complément, le facteur de croissance de fibroblastes (FGF)-19, le facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF), l'interféron (INF)- γ , l'interleukine (IL)-8, IL-11, IL-17A, kallikréine 3, lipocalin-2, ostéopontine, pentraxine 3, résistine, facteur 1

alpha dérivé des cellules stromales (SDF)-1 α , serpine E1, et vitamine D BP ont montré les taux d'expression les plus élevés dans nos analyses. Cette information n'a jamais été décrite auparavant dans des cellules fœtales. Concernant les CD34+ périphériques adultes, seules l'IL-8, TNF- α et l'IL-1 β ont été précédemment identifiées dans la littérature (132). L'IL-8 pourrait promouvoir la migration des cellules tumorales mammaires triple négatives dans le travail de Deng et al. (133). L'exposition des cellules tumorales avec des récepteurs hormonaux négatifs (MDA-MB-231 et MCF-7) aux cellules fœtales n'a pas entraîné d'augmentation de la migration cellulaire tumorale. À l'inverse, cette interaction a provoqué une baisse de la migration des cellules MDA-MB-231. Cependant dans le travail de Deng les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 n'étaient pas concernées par cette augmentation de migration induite par l'IL8, et il n'a pas non plus été montré de baisse de la migration. Notre analyse a retrouvé des taux d'expression relativement modérés d'IL8 avec une diminution de son expression entre le J1 et J3 dans le milieu de culture des cellules fœtales issues du sang du cordon. Enfin, nous n'avons pas évalué l'exposition spécifique à l'IL8 mais l'interaction avec des cellules hématopoïétiques sécrétant un grand nombre de cytokines, chacune pouvant moduler les effets fonctionnels.

L'IL-17A dans notre analyse a démontré le taux d'expression le plus élevé parmi toutes les cytokines analysées. Cette cytokine joue un rôle dans la communication avec les cellules hématopoïétiques induisant leur différenciation (134). Son rôle dans la pathogénèse du cancer du sein est controversé. Elle pourrait avoir un effet pro-prolifératif *in vitro* (135–137). Néanmoins, un effet de diminution des capacités migratoires des cellules tumorales a également été décrit (138), ce qui pourrait être en accord avec nos observations.

Malgré la détection de cytokines dans le milieu de culture des cellules CD34+ dérivées du sang de cordon, l'analyse fonctionnelle après une culture indirecte avec les cellules tumorales du cancer du sein à travers une membrane permettant un échange au niveau moléculaire n'a pas révélé de modifications de capacités prolifératives, migratoires et de l'invasion de cellules tumorales. L'absence de modifications pourrait être expliquée par des concentrations trop faibles de cytokines dans le milieu de co-culture. Néanmoins, les quantités de cellules CD34+ utilisées dans les co-cultures étaient similaires aux quantités utilisées dans l'évaluation du sécrétome. Une autre explication pourrait être l'absence de cible de cytokines dans les cellules tumorales. Néanmoins, l'action des cytokines sur la migration et la prolifération des cellules tumorales ont été décrites dans la littérature notamment pour l'IL-17A (135,137,139).

L'analyse fonctionnelle après la co-culture directe de cellules CD34+ dérivées du sang de cordon avec les cellules tumorales a démontré une diminution de la prolifération des deux lignées cellulaires MCF-7 et MDA-MB-231 et une diminution de la migration et de l'invasion des cellules MDA-MB-231. L'analyse des interactions cellulaires en 3D en time-lapse et en microscopie confocale a permis de mettre en évidence une attraction des cellules CD34+ par des cellules tumorales menant à une fusion du marquage cellulaire pouvant traduire une fusion cellulaire. Des observations similaires ont été décrites pour les cellules CD34+ dérivées de la moelle osseuse en interaction avec les cellules du glioblastome où un échange de marquage de la surface cellulaire a été observé (118). Cette interaction résultait en l'inhibition de la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules du glioblastome. Des interactions semblables entre les cellules MDA-MB-231 et les cellules mésenchymateuses dérivées du cordon ont également été décrites dans la littérature (140). Le contact entre les cellules

mésenchymateuses dérivées du cordon et les cellules tumorales résultait en l'internalisation des cellules mésenchymateuses au sein des cellules tumorales.

L'analyse transcriptomique des cellules tumorales exposées aux cellules CD34+ dérivées du sang de cordon a permis d'identifier les modifications d'expression de gènes compatibles avec les modifications fonctionnelles que nous avons observées. L'analyse de potentiels régulateurs d'amont en prenant en compte les résultats de l'analyse du sécrétome des cellules CD34+ dérivées du sang de cordon a permis d'identifier l'IL-17A comme potentiel régulateur d'amont pour les cellules MDA-MB-231 et l'INF- γ comme potentiel régulateur pour les cellules MCF-7. L'effet pro-prolifératif de l'IL17A sur les cellules tumorales MDA-MB-231 a été décrit dans la littérature (135–137), ce qui contraste avec les résultats de nos analyses fonctionnelles. Cette discordance pourrait s'expliquer par d'autres mécanismes parallèles impliqués dans la communication intercellulaire, ce d'autant qu'aucun effet n'a été observé en culture indirecte. Concernant la diminution de la migration et de l'invasion des cellules MDA-MB-231, l'impact de l'IL17A sur ces processus a déjà été décrits précédemment dans la littérature (138).

En ce qui concerne l'analyse des cellules MCF-7, une corrélation entre l'expression de l'INF- γ et la survie sans métastases a été observée dans la littérature (141).

L'attraction de cellules CD34+ par la niche tumorale a été décrite pour les tumeurs de glioblastome *in vivo* où les cellules CD34+ injectées par voie intraveineuse étaient attirées par les nids tumoraux (117). Néanmoins, la présence de cellules CD34+ n'a jamais été démontrée dans le tissu tumoral mammaire. L'étude du microchimerisme foetal par la FISH XY dans le cancer du sein diagnostiqué pendant la grossesse a identifié les cellules XY mésenchymateuses endothéliales et épithéliales (142). Le

marquage CD34 n'a pas été effectué dans cette étude. Néanmoins aucune cellule identifiée n'exprimait le marquage CD45+. Notre analyse histologique a permis de caractériser les cellules fœtales dans nos échantillons comme étant des lymphocytes, des fibroblastes et des cellules endothéliales. Ces différences dans les populations de cellules microchimériques pourraient être expliquées par le délai entre la grossesse et le diagnostic du cancer. Dans notre étude le diagnostic du cancer du sein a été posé en moyenne 7 (± 5) ans après un dernier accouchement, alors que dans le travail de Dubernard (142) le cancer était concomitant à la grossesse. La mobilisation de cellules fœtales persistantes après un accouchement pourrait être différente à distance d'une grossesse comparée à la période du péripartum.

De la même manière notre étude de la prévalence du microchimerisme par FISH XY retrouvait la présence de cellules fœtales dans 5 échantillons sur 23 échantillons analysés, essentiellement au sein de carcinomes canaux. Cette prévalence détecté par la FISH sur les cancers diagnostiqués pendant la grossesse a été rapporté dans 90% des cas de cancers canaux (142). En dehors de la grossesse l'analyse par PCR du gène SRY retrouvait la présence du signal sur 100% d'échantillons des carcinomes canaux diagnostiqués à distance de la grossesse (46). Néanmoins, les taux de détection du signal du gène SRY était proche du seuil du bruit de fond. Il est alors nécessaire d'interpréter ces résultats avec prudence.

Suivant l'hypothèse où la présence de cellules microchimériques pourraient modifier les mécanismes immunologiques au sein des tumeurs du cancer du sein, nous avons évalué le profil immunitaire des tumeurs présentant un microchimerisme fœtal en comparant aux tumeurs sans microchimerisme fœtal. Aucune corrélation n'a été retrouvée. Néanmoins, le nombre d'échantillons présentant un microchimerisme fœtal était faible et les échantillons représentaient des types moléculaires variés ce qui a pu

influencer l'aspect immunitaire du microenvironnement tumoral per se. Un travail complémentaire par PCR pour augmenter la sensibilité de détection du chromosome Y est en cours d'évaluation en termes de faisabilité.

Ce travail de thèse présente des points faibles. Globalement nos données concernent uniquement le carcinome canalaire. Les analyses *in vitro* ont été réalisées sur des lignées cellulaires représentatives de carcinomes canaux. De la même manière dans la partie translationnelle la quasi-totalité des échantillons analysés par FISH était des carcinomes canaux. Il est alors difficile d'extrapoler les résultats au cancer lobulaire. Toutefois les carcinomes canaux représentent environ 80 % des cancers du sein.

L'analyse du microchimérisme foetal dans la partie translationnelle a été reposé sur la détection en FISH du chromosome Y, moins sensible par exemple que la technique de PCR. De plus l'observation du signal Y en FISH a porté sur un champs donné de la tumeur. L'absence du signal Y détecté en FISH n'exclut donc pas l'absence de signal Y dans l'ensemble de l'échantillon. Néanmoins, la lecture des résultats de FISH est simple et reproductible. De plus, l'analyse du microenvironnement immunitaire a été réalisée à proximité du champ analysé par FISH ce qui reflète bien la réaction des cellules immunitaires à la présence des cellules microchimériques. L'analyse par digital PCR pourrait apporter des informations supplémentaires, mais avec une fiabilité plus réduite. La mise au point de cette technique est en cours. Enfin, le nombre de patientes éligibles à l'inclusion était limité par la nécessité d'un antécédent de grossesse avec un foetus masculin. Ainsi, un nombre limité d'échantillon a pu être analysé. De plus, l'impact du microchimérisme consécutif à une grossesse avec un foetus féminin n'a pas pu être évalué.

Concernant les résultats des interactions *in vitro*, la mise au point des techniques a été impactée par les faibles quantités de cellules CD34+ récupérées du sang de cordon (rendement proche de 1% des cellules mononuclées). De plus, les analyses fonctionnelles par xCELLigence des quatre lignées initialement sélectionnées se sont avérées impossibles pour deux de ces lignées du fait de la prolifération tridimensionnelle des cellules BT474 et SkBr-3. Nous avons alors décidé de poursuivre les analyses en utilisant uniquement les lignées MDA-MB-231 et MCF-7, avec une représentation plus limitée des sous types moléculaires de cancer du sein.

Les résultats des cocultures indirectes n'ont pas démontré de modifications fonctionnelles au niveau des cellules MDA-MB-231 et MCF-7 après exposition aux cellules CD34+. Ce résultat n'était pas attendu compte tenu du fait que nous avons observé que les cellules CD34+ dérivées du sang de cordon sécrètent des cytokines avec un potentiel impact sur la cancérogénèse. L'analyse du sécrétome pourrait nécessiter une confirmation par une autre technique, telle que le Western Blot. De plus, l'analyse des interactions cellulaires sous microscope fluorescent retrouvait des interactions pouvant correspondre à la fusion cellulaire, ce qui souligne l'importance des interactions directes dans la transmission du signal dans ce modèle.

Enfin dans cette analyse *in vitro* un biais important concerne de potentielles réactions immunologiques allogéniques, car les cellules CD34+ dérivées du sang de cordon ne sont pas proches génétiquement des lignées tumorales du cancer du sein.

Conclusions et perspectives

La prévalence du microchimérisme fœtal au niveau du tissu tumoral mammaire à distance de la grossesse est probablement plus faible que décrit précédemment dans

la littérature. En cas de cancer du sein diagnostiqué à distance de la grossesse les cellules fœtales représentent principalement des populations lymphocytaires, fibroblastiques et endothéliales. Le rôle des cellules CD34+ d'origine fœtale dans le cancer du sein reste à prouver. Néanmoins, les interactions directes de cellules CD34+ dérivées du sang de cordon avec les cellules du cancer du sein *in vitro* ont provoqué des modifications fonctionnelles et moléculaires.

Les analyses d'interactions d'autres lignées cellulaires d'origine fœtale avec les cellules tumorales pourraient apporter plus de précisions sur l'impact du microchimérisme fœtal.

Afin de s'affranchir de biais en lien avec les réactions immunitaires liées aux différences allogéniques, il serait intéressant d'utiliser le sang de cordon obtenu chez les femmes atteintes d'un cancer du sein pendant la grossesse, en mettant en contact les cellules fœtales avec des cultures primaires de cellules tumorales mammaires obtenues lors de la prise en charge chirurgicale du cancer chez la même patiente. Cette approche pourrait limiter les réactions intercellulaires aspécifiques, en lien avec les incompatibilités allogéniques. Ces résultats pourraient être également être comparés aux effets induits par les interactions des cellules tumorales mammaires avec les mêmes populations de cellules maternelles hématopoïétiques par exemple. Néanmoins, les limites techniques de cette approche seraient très importantes, notamment la durée de vie limitée des cultures primaires de cellules tumorales.

L'analyse du tissu tumoral par digital PCR (dPCR) pourrait s'avérer plus sensible dans l'évaluation de la prévalence du microchimérisme fœtal dans le cancer du sein. La caractérisation des populations de cellules fœtales circulantes pourrait également apporter de la lumière sur la mobilisation de cellules d'origine fœtale dans la circulation lors d'un processus carcinologique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Liégeois A, Escourrou J, Ouvré E, Charreire J. Microchimerism: a stable state of low-ratio proliferation of allogeneic bone marrow. *Transplant Proc.* 1977 Mar;9(1):273–6.
2. Khosrotehrani K, Bianchi DW. Fetal cell microchimerism: helpful or harmful to the parous woman? *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2003 Apr;15(2):195–9.
3. Lo YM, Lau TK, Chan LY, Leung TN, Chang AM. Quantitative analysis of the bidirectional fetomaternal transfer of nucleated cells and plasma DNA. *Clin Chem.* 2000 Sep;46(9):1301–9.
4. Guettier C, Sebah M, Buard J, Feneux D, Ortin-Serrano M, Gigou M, et al. Male cell microchimerism in normal and diseased female livers from fetal life to adulthood. *Hepatology.* 2005 Jul;42(1):35–43.
5. Osada H, Doi S, Fukushima T, Nakauchi H, Seki K, Sekiya S. Detection of fetal HPCs in maternal circulation after delivery. *Transfusion.* 2001 Apr;41(4):499–503.
6. Guetta E, Gordon D, Simchen MJ, Goldman B, Barkai G. Hematopoietic progenitor cells as targets for non-invasive prenatal diagnosis: detection of fetal CD34+ cells and assessment of post-delivery persistence in the maternal circulation. *Blood Cells Mol Dis.* 2003 Feb;30(1):13–21.
7. Evans PC, Lambert N, Maloney S, Furst DE, Moore JM, Nelson JL. Long-term fetal microchimerism in peripheral blood mononuclear cell subsets in healthy women and women with scleroderma. *Blood.* 1999 Mar 15;93(6):2033–7.
8. Loubière LS, Lambert NC, Flinn LJ, Erickson TD, Yan Z, Guthrie KA, et al. Maternal microchimerism in healthy adults in lymphocytes, monocyte/macrophages and NK cells. *Lab Invest.* 2006 Nov;86(11):1185–92.
9. Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996 Jan 23;93(2):705–8.
10. Guetta E, Gordon D, Simchen MJ, Goldman B, Barkai G. Hematopoietic progenitor cells as targets for non-invasive prenatal diagnosis: detection of fetal CD34+ cells and assessment of post-delivery persistence in the maternal circulation. *Blood Cells Mol Dis.* 2003 Feb;30(1):13–21.
11. Adams KM, Lambert NC, Heimfeld S, Tylee TS, Pang JM, Erickson TD, et al. Male DNA in female donor apheresis and CD34-enriched products. *Blood.* 2003 Nov 15;102(10):3845–7.
12. Mikhail MA, M'Hamdi H, Welsh J, Levicar N, Marley SB, Nicholls JP, et al. High frequency of fetal cells within a primitive stem cell population in maternal blood. *Hum Reprod.* 2008 Apr;23(4):928–33.
13. O'Donoghue K, Chan J, de la Fuente J, Kennea N, Sandison A, Anderson JR, et al. Microchimerism in female bone marrow and bone decades after fetal mesenchymal stem-cell trafficking in pregnancy. *Lancet.* 2004 Jul 10;364(9429):179–82.
14. Khosrotehrani K, Johnson KL, Cha DH, Salomon RN, Bianchi DW. Transfer of fetal cells with multilineage potential to maternal tissue. *JAMA.* 2004 Jul 7;292(1):75–80.
15. Tran SD, Pillemer SR, Dutra A, Barrett AJ, Brownstein MJ, Key S, et al. Differentiation of human bone marrow-derived cells into buccal epithelial cells in vivo: a molecular analytical study. *Lancet.* 2003 Mar 29;361(9363):1084–8.

16. Lepez T, Vandewoestyne M, Deforce D. Fetal microchimeric cells in autoimmune thyroid diseases: harmful, beneficial or innocent for the thyroid gland? *Chimerism*. 2013;4(4):111–8.
17. Johnson KL, Bianchi DW. Fetal cells in maternal tissue following pregnancy: what are the consequences? *Hum Reprod Update*. 2004;10(6):497–502.
18. Gadi VK. Fetal microchimerism and cancer. *Cancer Lett*. 2009 Apr 8;276(1):8–13.
19. Nelson JL. Microchimerism and autoimmune disease. *N Engl J Med*. 1998 Apr 23;338(17):1224–5.
20. Nelson JL, Furst DE, Maloney S, Gooley T, Evans PC, Smith A, et al. Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in scleroderma. *The Lancet*. 1998 Feb;351(9102):559–62.
21. Artlett CM, Smith JB, Jimenez SA. Identification of Fetal DNA and Cells in Skin Lesions from Women with Systemic Sclerosis. *N Engl J Med*. 1998 Apr 23;338(17):1186–91.
22. Evans PC, Lambert N, Maloney S, Furst DE, Moore JM, Nelson JL. Long-Term Fetal Microchimerism in Peripheral Blood Mononuclear Cell Subsets in Healthy Women and Women With Scleroderma. *Blood*. 1999 Mar 15;93(6):2033–7.
23. Murata H, Nakauchi H, Sumida T. Microchimerism in Japanese women patients with systemic sclerosis. *The Lancet*. 1999 Jul;354(9174):220.
24. Lambert NC, Lo YMD, Erickson TD, Tylee TS, Guthrie KA, Furst DE, et al. Male microchimerism in healthy women and women with scleroderma: cells or circulating DNA? A quantitative answer. *Blood*. 2002 Oct 15;100(8):2845–51.
25. Gannag M, Amoura Z, Lantz O, Piette JC, Caillat-Zucman S. Feto-maternal microchimerism in connective tissue diseases. *Eur J Immunol*. 2002 Dec;32(12):3405–13.
26. Selva-O’Callaghan A, Mijares-Boeckh-Behrens T, Prades EB, Solans-Laqué R, Simeón-Aznar CP, Fonollosa-Pla V, et al. Lack of evidence of foetal microchimerism in female Spanish patients with systemic sclerosis. *Lupus*. 2003 Jan;12(1):15–20.
27. Invernizzi P, De Andreis C, Sirchia SM, Battezzati PM, Zuin M, Rossella F, et al. Blood fetal microchimerism in primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol*. 2000 Dec;122(3):418–22.
28. Tanaka A, Lindor K, Gish R, Batts K, Shiratori Y, Omata M, et al. Fetal microchimerism alone does not contribute to the induction of primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 1999 Oct;30(4):833–8.
29. Bos EMJ, Rijnink EC, Zandbergen M, Diaz de Pool JDN, Almekinders MM, Berden JHM, et al. Increased microchimerism in peripheral blood of women with systemic lupus erythematosus: relation with pregnancy. *Clin Exp Rheumatol*. 2022 Nov;40(11):2153–60.
30. da Silva Florim GM, Caldas HC, Pavarino EC, Bertollo EMG, Fernandes IMM, Abbud-Filho M. Variables associated to fetal microchimerism in systemic lupus erythematosus patients. *Clin Rheumatol*. 2016 Jan;35(1):107–11.
31. Carlucci F, Priori R, Alessandri C, Valesini G, Stoppacciaro A. Y chromosome microchimerism in Sjögren’s syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2001 Nov;60(11):1078–9.
32. Srivatsa B, Srivatsa S, Johnson KL, Samura O, Lee SL, Bianchi DW. Microchimerism of presumed fetal origin in thyroid specimens from women: a case-control study. *Lancet*. 2001 Dec 15;358(9298):2034–8.
33. Nassar D, Khosrotehrani K, Aractingi S. Fetal microchimerism in skin wound healing.

Chimerism. 2012;3(2):45–7.

34. Khosrotehrani K, Bianchi DW. Multi-lineage potential of fetal cells in maternal tissue: a legacy in reverse. *J Cell Sci.* 2005 Apr 15;118(Pt 8):1559–63.
35. Khosrotehrani K, Reyes RR, Johnson KL, Freeman RB, Salomon RN, Peter I, et al. Fetal cells participate over time in the response to specific types of murine maternal hepatic injury. *Hum Reprod.* 2007 Mar;22(3):654–61.
36. Tan XW, Liao H, Sun L, Okabe M, Xiao ZC, Dawe GS. Fetal microchimerism in the maternal mouse brain: a novel population of fetal progenitor or stem cells able to cross the blood-brain barrier? *Stem Cells.* 2005;23(10):1443–52.
37. Kara RJ, Bolli P, Matsunaga I, Tanweer O, Altman P, Chaudhry HW. A mouse model for fetal maternal stem cell transfer during ischemic cardiac injury. *Clin Transl Sci.* 2012 Aug;5(4):321–8.
38. Yu J, Ren X, Cao S, Li H, Hao X. Beneficial effects of fetal-maternal microchimerism on the activated haplo-identical peripheral blood stem cell treatment for cancer. *Cytotherapy.* 2008;10(4):331–9.
39. Kawai T, Cosimi AB, Colvin RB, Powelson J, Eason J, Kozlowski T, et al. Mixed allogeneic chimerism and renal allograft tolerance in cynomolgus monkeys. *Transplantation.* 1995 Jan 27;59(2):256–62.
40. Teshima T, Matsuoka KI, Ichinohe T. Impact of fetal-maternal tolerance in hematopoietic stem cell transplantation. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2006;54(3):165–72.
41. Fjeldstad HE, Johnsen GM, Staff AC. Fetal microchimerism and implications for maternal health. *Obstet Med.* 2020 Sep;13(3):112–9.
42. Cha D, Khosrotehrani K, Kim Y, Stroh H, Bianchi DW, Johnson KL. Cervical cancer and microchimerism. *Obstet Gynecol.* 2003 Oct;102(4):774–81.
43. Cirello V, Recalcati MP, Muzza M, Rossi S, Perrino M, Vicentini L, et al. Fetal cell microchimerism in papillary thyroid cancer: a possible role in tumor damage and tissue repair. *Cancer Res.* 2008 Oct 15;68(20):8482–8.
44. Nguyen Huu S, Oster M, Avril MF, Boitier F, Mortier L, Richard MA, et al. Fetal microchimeric cells participate in tumour angiogenesis in melanomas occurring during pregnancy. *Am J Pathol.* 2009 Feb;174(2):630–7.
45. O'Donoghue K, Sultan HA, Al-Allaf FA, Anderson JR, Wyatt-Ashmead J, Fisk NM. Microchimeric fetal cells cluster at sites of tissue injury in lung decades after pregnancy. *Reprod Biomed Online.* 2008 Mar;16(3):382–90.
46. Nemescu D, Ursu RG, Nemescu ER, Negura L. Heterogeneous Distribution of Fetal Microchimerism in Local Breast Cancer Environment. *PLoS One.* 2016;11(1):e0147675.
47. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians.* 2021;71(3):209–49.
48. Le cancer du sein - Les cancers les plus fréquents [Internet]. [cited 2020 Apr 5]. Available from: <https://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-chiffres-du-cancer-en-France/Epidemiologie-des-cancers/Les-cancers-les-plus-frequents/Cancer-du-sein>
49. UNICANCER - Les chiffres du cancer en France [Internet]. [cited 2020 Mar 20]. Available

from: <http://www.unicancer.fr/le-groupe-unicancer/les-chiffres-cles/les-chiffres-du-cancer-en-france>

50. Wolter's Kluwer. Rosen's Breast Pathology, 4th Edition. 2015.
51. Berg JW. The significance of axillary node levels in the study of breast carcinoma. *Cancer*. 1955 Aug;8(4):776–8.
52. Le cancer du sein : points clés - Cancer du sein [Internet]. [cited 2020 Mar 20]. Available from: <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Les-points-cles>
53. Tattou A. Haute Autorité de santé. 2012;112.
54. Clavel-Chapelon F, E3N Group. Cumulative number of menstrual cycles and breast cancer risk: results from the E3N cohort study of French women. *Cancer Causes Control*. 2002 Nov;13(9):831–8.
55. Neuhauser ML, Aragaki AK, Prentice RL, Manson JE, Chlebowski R, Carty CL, et al. Overweight, Obesity, and Postmenopausal Invasive Breast Cancer Risk: A Secondary Analysis of the Women's Health Initiative Randomized Clinical Trials. *JAMA Oncol*. 2015 Aug;1(5):611–21.
56. Carmichael AR, Bates T. Obesity and breast cancer: a review of the literature. *Breast*. 2004 Apr;13(2):85–92.
57. Ferrari P, Licaj I, Muller DC, Kragh Andersen P, Johansson M, Boeing H, et al. Lifetime alcohol use and overall and cause-specific mortality in the European Prospective Investigation into Cancer and nutrition (EPIC) study. *BMJ Open*. 2014 Jul 3;4(7):e005245.
58. Renehan AG, Zwahlen M, Egger M. Adiposity and cancer risk: new mechanistic insights from epidemiology. *Nat Rev Cancer*. 2015 Aug;15(8):484–98.
59. Larsson SC, Mantzoros CS, Wolk A. Diabetes mellitus and risk of breast cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer*. 2007 Aug 15;121(4):856–62.
60. Bernard L, Reix N, Benabu JC, Gabriele V, Mathelin C. Cancer du sein et diabète de type 2 : des interactions complexes. /data/revues/12979589/v44i12/S1297958916302478/ [Internet]. 2016 Dec 5 [cited 2020 Apr 8]; Available from: <https://www.em-consulte.com/en/article/1097137>
61. Haute Autorité de Santé [Internet]. [cited 2020 Aug 23]. Cancer du sein : modalités spécifiques de dépistage pour les femmes à haut risque. Available from: https://www.has-sante.fr/jcms/pprd_2974673/fr/cancer-du-sein-modalites-specifiques-de-depistage-pour-les-femmes-a-haut-risque
62. Kerlikowske K, Cook AJ, Buist DSM, Cummings SR, Vachon C, Vacek P, et al. Breast cancer risk by breast density, menopause, and postmenopausal hormone therapy use. *J Clin Oncol*. 2010 Aug 20;28(24):3830–7.
63. Hartmann LC, Degenim AC, Santen RJ, Dupont WD, Ghosh K. Atypical hyperplasia of the breast--risk assessment and management options. *N Engl J Med*. 2015 Jan 1;372(1):78–89.
64. Thomas PS. Diagnosis and Management of High-Risk Breast Lesions. *J Natl Compr Canc Netw*. 2018;16(11):1391–6.
65. Haute Autorité de Santé [Internet]. [cited 2020 Mar 20]. Dépistage et prévention du cancer du sein. Available from: https://www.has-sante.fr/jcms/c_2024559/fr/depistage-et-prevention-du-cancer-du-sein
66. Key J, Hodgson S, Omar RZ, Jensen TK, Thompson SG, Boobis AR, et al. Meta-analysis of Studies of Alcohol and Breast Cancer with Consideration of the Methodological Issues. *Cancer Causes*

Control. 2006 Aug 1;17(6):759–70.

67. Hamajima N, Hirose K, Tajima K, Rohan T, Calle EE, Heath CW, et al. Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Br J Cancer*. 2002 Nov 18;87(11):1234–45.
68. Tehard B, Friedenreich CM, Oppert JM, Clavel-Chapelon F. Effect of physical activity on women at increased risk of breast cancer: results from the E3N cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006 Jan;15(1):57–64.
69. Cutuli B, Kanoun S, Tunon De Lara C, Baron M, Livi L, Levy C, et al. Breast cancer occurred after Hodgkin's disease: clinico-pathological features, treatments and outcome: analysis of 214 cases. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012 Jan;81(1):29–37.
70. Del Pup L, Codacci-Pisanelli G, Peccatori F. Breast cancer risk of hormonal contraception: Counselling considering new evidence. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2019 May 1;137:123–30.
71. Mørch LS, Skovlund CW, Hannaford PC, Iversen L, Fielding S, Lidegaard Ø. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1700732>. Massachusetts Medical Society; 2017 [cited 2020 Mar 30]. Contemporary Hormonal Contraception and the Risk of Breast Cancer. Available from: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1700732>
72. Pragout D, Laurence V, Baffet H, Raccach-Tebeka B, Rousset-Jablonski C. [Contraception and cancer: CNGOF Contraception Guidelines]. *Gynecol Obstet Fertil Senol*. 2018;46(12):834–44.
73. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2002 Jul 17;288(3):321–33.
74. Beral V, Million Women Study Collaborators. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*. 2003 Aug 9;362(9382):419–27.
75. Fournier A, Berrino F, Clavel-Chapelon F. Unequal risks for breast cancer associated with different hormone replacement therapies: results from the E3N cohort study. *Breast Cancer Res Treat*. 2008 Jan;107(1):103–11.
76. L'oncogénétique en 2017 : état des lieux - Actualités [Internet]. [cited 2020 Apr 6]. Available from: <https://www.e-cancer.fr/Actualites-et-evenements/Actualites/L-oncogenetique-en-2017-etat-des-lieux>
77. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet*. 2001 Oct 27;358(9291):1389–99.
78. De Pauw A, Stoppa-Lyonnet D, Andrieu N, Asselain B. [Estimation of individual breast cancer risk: relevance and limits of risk estimation models]. *Bull Cancer*. 2009 Oct;96(10):979–88.
79. Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet*. 1998 Mar;62(3):676–89.
80. Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet*. 2003 May;72(5):1117–30.

81. Rojas K, Stuckey A. Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. *Clin Obstet Gynecol*. 2016 Dec;59(4):651–72.
82. Ahmad A. Breast Cancer Statistics: Recent Trends. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1152:1–7.
83. Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, Phillips KA, Mooij TM, Roos-Blom MJ, et al. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA*. 2017 Jun 20;317(23):2402–16.
84. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747–52.
85. Fan C, Oh DS, Wessels L, Weigelt B, Nuyten DSA, Nobel AB, et al. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med*. 2006 Aug 10;355(6):560–9.
86. Voduc KD, Cheang MCU, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol*. 2010 Apr 1;28(10):1684–91.
87. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol*. 2014 Apr;27:16–25.
88. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol*. 2015 Feb;26(2):259–71.
89. Wang K, Shen T, Siegal GP, Wei S. The CD4/CD8 ratio of tumor-infiltrating lymphocytes at the tumor-host interface has prognostic value in triple-negative breast cancer. *Hum Pathol*. 2017 Nov;69:110–7.
90. Ono M, Tsuda H, Shimizu C, Yamamoto S, Shibata T, Yamamoto H, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Apr;132(3):793–805.
91. Lee HJ, Kim JY, Park IA, Song IH, Yu JH, Ahn JH, et al. Prognostic Significance of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and the Tertiary Lymphoid Structures in HER2-Positive Breast Cancer Treated With Adjuvant Trastuzumab. *Am J Clin Pathol*. 2015 Aug;144(2):278–88.
92. Sautès-Fridman C, Petitprez F, Calderaro J, Fridman WH. Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2019 Jun;19(6):307–25.
93. Amant F, Lefrère H, Borges VF, Cardonick E, Lambertini M, Loibl S, et al. The definition of pregnancy-associated breast cancer is outdated and should no longer be used. *Lancet Oncol*. 2021 Jun;22(6):753–4.
94. Lefrère H, Floris G, Schmidt MK, Neven P, Warner E, Cardonick E, et al. Breast cancer diagnosed in the post-weaning period is indicative for a poor outcome. *Eur J Cancer*. 2021 Sep;155:13–24.
95. Goddard ET, Bassale S, Schedin T, Jindal S, Johnston J, Cabral E, et al. Association Between Postpartum Breast Cancer Diagnosis and Metastasis and the Clinical Features Underlying Risk. *JAMA Netw Open*. 2019 Jan 4;2(1):e186997.
96. Shao C, Yu Z, Xiao J, Liu L, Hong F, Zhang Y, et al. Prognosis of pregnancy-associated breast cancer: a meta-analysis. *BMC Cancer*. 2020 Aug 10;20(1):746.
97. Cancer et grossesse, Ligue Contre le Cancer (2010).

98. Tretli S, Kvalheim G, Thoresen S, Høst H. Survival of breast cancer patients diagnosed during pregnancy or lactation. *Br J Cancer*. 1988 Sep;58(3):382–4.
99. Boudy AS, Naoura I, Selleret L, Zilberman S, Gligorov J, Richard S, et al. Propensity score to evaluate prognosis in pregnancy-associated breast cancer: Analysis from a French cancer network. *Breast*. 2018 Aug;40:10–5.
100. Johansson ALV, Stensheim H. Epidemiology of Pregnancy-Associated Breast Cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1252:75–9.
101. Keller PJ, Arendt LM, Kuperwasser C. Stem cell maintenance of the mammary gland: it takes two. *Cell Stem Cell*. 2011 Dec 2;9(6):496–7.
102. Van Keymeulen A, Rocha AS, Ousset M, Beck B, Bouvencourt G, Rock J, et al. Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance. *Nature*. 2011 Oct 9;479(7372):189–93.
103. Nolan E, Lindeman GJ, Visvader JE. Deciphering breast cancer: from biology to the clinic. *Cell*. 2023 Apr 13;186(8):1708–28.
104. Yang X, Wang H, Jiao B. Mammary gland stem cells and their application in breast cancer. *Oncotarget*. 2017 Feb 7;8(6):10675–91.
105. Polyak K. Pregnancy and breast cancer: the other side of the coin. *Cancer Cell*. 2006 Mar;9(3):151–3.
106. Makrigiannakis A, Karamouti M, Drakakis P, Loutradis D, Antsaklis A. Fetomaternal immunotolerance. *Am J Reprod Immunol*. 2008 Dec;60(6):482–96.
107. Lefebvre S, Antoine M, Uzan S, McMaster M, Dausset J, Carosella ED, et al. Specific activation of the non-classical class I histocompatibility HLA-G antigen and expression of the ILT2 inhibitory receptor in human breast cancer. *J Pathol*. 2002 Mar;196(3):266–74.
108. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 Apr 2;284(5411):143–7.
109. Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K, et al. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec*. 2001 Sep 1;264(1):51–62.
110. Gregory CA, Prockop DJ, Spees JL. Non-hematopoietic bone marrow stem cells: molecular control of expansion and differentiation. *Exp Cell Res*. 2005 Jun 10;306(2):330–5.
111. Jing Y, Han Z, Liu Y, Sun K, Zhang S, Jiang G, et al. Mesenchymal stem cells in inflammation microenvironment accelerates hepatocellular carcinoma metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*. 2012;7(8):e43272.
112. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*. 2007 Oct 4;449(7162):557–63.
113. Rattigan Y, Hsu JM, Mishra PJ, Glod J, Banerjee D. Interleukin 6 mediated recruitment of mesenchymal stem cells to the hypoxic tumor milieu. *Exp Cell Res*. 2010 Dec 10;316(20):3417–24.
114. Li T, Zhang C, Ding Y, Zhai W, Liu K, Bu F, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells promote proliferation and migration in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells through activation of the ERK pathway. *Oncol Rep*. 2015 Sep;34(3):1469–77.
115. Sun B, Roh KH, Park JR, Lee SR, Park SB, Jung JW, et al. Therapeutic potential of

mesenchymal stromal cells in a mouse breast cancer metastasis model. *Cytotherapy*. 2009;11(3):289–98, 1 p following 298.

116. Sherif RN, Abdellatif H, Hazem N, Ebrahim NA, Saleh D, Shiha G, et al. Effect of human umbilical cord blood derived CD34+ hematopoietic stem cell on the expression of Wnt4 and P53 genes in a rat model of hepatocellular carcinoma. *Tissue Cell*. 2018 Feb;50:125–32.

117. Bryukhovetskiy IS, Dyuzhen IV, Shevchenko VE, Bryukhovetskiy AS, Mischenko PV, Milkina EV, et al. Hematopoietic stem cells as a tool for the treatment of glioblastoma multiforme. *Mol Med Rep*. 2016 Nov;14(5):4511–20.

118. Milkina E, Ponomarenko A, Korneyko M, Lyakhova I, Zayats Y, Zaitsev S, et al. Interaction of hematopoietic CD34+ CD45+ stem cells and cancer cells stimulated by TGF- β 1 in a model of glioblastoma in vitro. *Oncol Rep*. 2018 Nov;40(5):2595–607.

119. Dubernard G, Aractingi S, Oster M, Rouzier R, Mathieu MC, Uzan S, et al. Breast cancer stroma frequently recruits fetal derived cells during pregnancy. *Breast Cancer Res*. 2008;10(1):R14.

120. Nemescu D, Ursu RG, Nemescu ER, Negura L. Heterogeneous Distribution of Fetal Microchimerism in Local Breast Cancer Environment. *PLoS ONE*. 2016;11(1):e0147675.

121. Nguyen Huu S, Khosrotehrani K, Oster M, Moguelet P, Espié MJ, Aractingi S. Early phase of maternal skin carcinogenesis recruits long-term engrafted fetal cells. *Int J Cancer*. 2008 Dec 1;123(11):2512–7.

122. Dubernard G, Oster M, Chareyre F, Antoine M, Rouzier R, Uzan S, et al. Increased fetal cell microchimerism in high grade breast carcinomas occurring during pregnancy. *Int J Cancer*. 2009 Mar 1;124(5):1054–9.

123. Gadi VK, Malone KE, Guthrie KA, Porter PL, Nelson JL. Case-control study of fetal microchimerism and breast cancer. *PLoS One*. 2008 Mar 5;3(3):e1706.

124. Gadi VK. Fetal microchimerism in breast from women with and without breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 May;121(1):241–4.

125. Kamper-Jørgensen M, Biggar RJ, Tjønneland A, Hjalgrim H, Kroman N, Rostgaard K, et al. Opposite effects of microchimerism on breast and colon cancer. *Eur J Cancer*. 2012 Sep;48(14):2227–35.

126. Ma F, Chen D, Chen F, Chi Y, Han Z, Feng X, et al. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Promote Breast Cancer Metastasis by Interleukin-8- and Interleukin-6-Dependent Induction of CD44(+)/CD24(-) Cells. *Cell Transplant*. 2015;24(12):2585–99.

127. Approche fonctionnelle et métabolique des cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques du sang périphérique en homéostasie à travers le modèle side-population. Vers une nouvelle source de greffon hématopoïétique?, A. Bourdieu, thèse en Sciences de la Vie et de la Santé, sous la direction de P. Brunet de la Grange, Université de Bordeaux, 2017.

128. Doulatov S, Notta F, Laurenti E, Dick JE. Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell*. 2012 Feb 3;10(2):120–36.

129. Ueda T, Yoshida M, Yoshino H, Kobayashi K, Kawahata M, Ebihara Y, et al. Hematopoietic capability of CD34+ cord blood cells: a comparison with CD34+ adult bone marrow cells. *Int J Hematol*. 2001 Jun;73(4):457–62.

130. de Wynter EA, Emmerson AJ, Testa NG. Properties of peripheral blood and cord blood stem cells. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*. 1999 Jun;12(1–2):1–17.

131. Belvedere O, Feruglio C, Malangone W, Bonora ML, Donini A, Dorotea L, et al. Phenotypic characterization of immunomagnetically purified umbilical cord blood CD34+ cells. *Blood Cells Mol Dis.* 1999 Aug;25(3–4):141–6.
132. Behringer D, Kresin V, Henschler R, Mertelsmann R, Lindemann A. Cytokine and chemokine production by CD34+ haemopoietic progenitor cells: detection in single cells. *Br J Haematol.* 1997 Apr;97(1):9–14.
133. Deng F, Weng Y, Li X, Wang T, Fan M, Shi Q. Overexpression of IL-8 promotes cell migration via PI3K-Akt signaling pathway and EMT in triple-negative breast cancer. *Pathol Res Pract.* 2021 Jul;223:152824.
134. Chen K, Kolls JK. Interleukin-17A (IL17A). *Gene.* 2017 May 30;614:8–14.
135. Tsai YF, Huang CC, Lin YS, Hsu CY, Huang CP, Liu CY, et al. Interleukin 17A promotes cell migration, enhances anoikis resistance, and creates a microenvironment suitable for triple negative breast cancer tumor metastasis. *Cancer Immunol Immunother.* 2021 Aug;70(8):2339–51.
136. Chen WC, Lai YH, Chen HY, Guo HR, Su IJ, Chen HHW. Interleukin-17-producing cell infiltration in the breast cancer tumour microenvironment is a poor prognostic factor. *Histopathology.* 2013 Aug;63(2):225–33.
137. Cochaud S, Giustiniani J, Thomas C, Laprevotte E, Garbar C, Savoye AM, et al. IL-17A is produced by breast cancer TILs and promotes chemoresistance and proliferation through ERK1/2. *Sci Rep.* 2013 Dec 9;3:3456.
138. Koslowsky D, Zaretsky M, Alcalay R, Mazor O, Aharoni A, Papo N. A bi-specific inhibitor targeting IL-17A and MMP-9 reduces invasion and motility in MDA-MB-231 cells. *Oncotarget.* 2018 Jun 19;9(47):28500–13.
139. Huang CK, Yang CY, Jeng YM, Chen CL, Wu HH, Chang YC, et al. Autocrine/paracrine mechanism of interleukin-17B receptor promotes breast tumorigenesis through NF- κ B-mediated antiapoptotic pathway. *Oncogene.* 2014 Jun 5;33(23):2968–77.
140. Chao KC, Yang HT, Chen MW. Human umbilical cord mesenchymal stem cells suppress breast cancer tumorigenesis through direct cell–cell contact and internalization. *J Cell Mol Med.* 2012 Aug;16(8):1803–15.
141. Heimes AS, Härtner F, Almstedt K, Krajnak S, Lebrecht A, Battista MJ, et al. Prognostic Significance of Interferon- γ and Its Signaling Pathway in Early Breast Cancer Depends on the Molecular Subtypes. *Int J Mol Sci.* 2020 Sep 29;21(19):E7178.
142. Dubernard G, Aractingi S, Oster M, Rouzier R, Mathieu MC, Uzan S, et al. Breast cancer stroma frequently recruits fetal derived cells during pregnancy. *Breast Cancer Res.* 2008 Dec 20;10(1):R14.

VALORISATION DE LA RECHERCHE

1- Publications

Kamila Kolanska^{1,2}, Merwane Roche², Camille Carrière^{1,2}, Marjolaine Le Gac^{1,2}, Nathalie Ferrand², Maurice Zaoui², Morgane Le Gall³, Joseph Gligorov^{2,4}, Michèle Sabbah², Selim Aractingi⁵, Nathalie Chabbert-Buffet^{1,2}. *Impact of fetal umbilical cord blood CD34+ cells on breast cancer cell lines: a mechanism of fetal microchimerism?*

Kamila Kolanska^{1,2,3}, Alexander Valent⁴, Jerome Denis^{2,5}, Marjolaine Le Gac^{1,2,3}, Guillaume Clair³, Lise Selleret^{1,3}, Joseph Gligorov^{3,5,6}, Cyril Touboul^{1,2,3}, Michèle Sabbah², Selim Aractingi⁷, Justine Varinot^{3,8}, Nathalie Chabbert-Buffet^{1,2,3}. *Correlation between fetal microchimerism and immune microenvironment in premenopausal breast cancer*

Publications annexes, vulgarisation

Kolanska K, Rousset-Jablonski C, Robin G, Selleret L, Johnson N, Thomassin-Naggara I, Chabbert-Buffet N. *Sein et hormones*. EMC 2022

Marjolaine Le Gac, Emile Daraï, NCB, KK. *Seins et hormones : et la progestérone ?* Reflexions en Gynécologie Obstétrique 2019 ; 55 : 115-118

2- Présentations

Paris Santé Femmes 2023, Lille :

EP_289 « Les cellules CD34+ dérivées du sang de cordon modifient les capacités prolifératives et migratoires des lignées cellulaires de cancer du sein par contact intercellulaire direct : mécanisme de microchimérisme foetal ?»

3- Encadrement

Etudiants		Soutenance
Camille Carrière	Mémoire de Master 2 Reprodev	Juin 2019
Marjolaine Le Gac	Mémoire de Master 2 Reprodev	Septembre 2020
Merwane Roche	Mémoire de Master 2 Cellules Souches	Juin 2021