



HAL
open science

Rôle de la voie BMP dans l'émergence des cellules souches cancéreuses mammaires et l'initiation du cancer du sein basal-like

Simon Aho

► **To cite this version:**

Simon Aho. Rôle de la voie BMP dans l'émergence des cellules souches cancéreuses mammaires et l'initiation du cancer du sein basal-like. Cancer. Université Claude Bernard - Lyon I, 2024. Français. NNT : 2024LYO10182 . tel-04811400

HAL Id: tel-04811400

<https://theses.hal.science/tel-04811400v1>

Submitted on 29 Nov 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
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

**Ecole Doctorale 340
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire**

Spécialité de doctorat : Cancérologie
Discipline : Biologie moléculaire et cellulaire

Soutenue publiquement le 14/10/2024, par :

Simon AHO

**Rôle de la voie BMP dans l'émergence des
cellules souches cancéreuses mammaires et
l'initiation du cancer du sein basal-like**

Devant le jury composé de :

Pr Ray-Coquard, Isabelle	Professeure des Universités Praticienne Hospitalière	Présidente
Dr Marangoni, Elisabetta	Directrice de Recherche	Rapporteure
Dr Charafe-Jauffret, Emmanuelle	Professeure des Universités Praticienne Hospitalière	Rapporteure
Dr Lopez, Bernard	Directeur de Recherche	Examineur
Dr Lafanechere, Laurence	Directrice de Recherche	Examinatrice
Dr Delay, Emmanuel	Praticien Hospitalier	Directeur de thèse
Dr Guyot, Boris	Chargé de Recherche	Co-directeur de thèse



UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON I

Président de l'Université	Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique et de la Commission Recherche	Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	Didier REVEL
Vice-Présidente de la Commission Formation	Céline BROCHIER
Vice-Président Relations Hospitalo-Universitaires	Jean François MORNEX
Directeur général des services	Pierre ROLLAND

SECTEUR SANTE

Doyen de l'UFR de Médecine Lyon-Est	Gilles RODE
Doyen de l'UFR de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Philippe PAPAREL
Doyen de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISPB)	Claude DUSSART
Doyen de l'UFR d'Odontologie	Jean-Christophe MAURIN
Directeur de l'Institut des Sciences & Techniques de Réadaptation (ISTR)	Jacques LUAUTÉ
Présidente du Comité de Coordination des Études Médicales	Carole BURILLON

SECTEUR SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Directrice de l'UFR Biosciences	Kathrin GIESELER
Directeur de l'UFR Faculté des Sciences	Bruno ANDRIOLETTI
Directeur de l'UFR Sciences & Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Guillaume BODET
Directeur de Polytech Lyon	Emmanuel PERRIN
Directeur de l'Institut Universitaire de Technologie Lyon 1 (IUT)	Michel MASSENZIO
Directeur de l'Institut des Science Financière & Assurances (ISFA)	Nicolas LEBOISNE
Directeur de l'Observatoire de Lyon	Bruno GUIDERDONI
Directeur de l'Institut National Supérieur du Professorat & de l'Éducation (INSPÉ)	Pierre CHAREYRON
Directrice du Département-composante Génie Électrique & des Procédés (GEP)	Rosaria FERRIGNO
Directrice du Département-composante Informatique	Saida BOUAZAK BRONDEL
Directeur du Département-composante Mécanique	Marc BUFFAT

Remerciements

A ma femme Pauline.

Qui d'autre que toi pour débiter ces remerciements ? Je te remercie pour ton soutien sans failles pendant toutes ces années, ta patience, ton écoute, ta bienveillance, ta confiance. J'ai hâte de découvrir avec toi ce que la suite nous réserve, avec nos merveilleux enfants.

A mes enfants, Gaspard et Adèle.

J'espère que plus tard, en lisant ces pages, vous serez fiers de votre papa.

Je vous aime tous les 3.

A ma famille notamment mon père, ma mère et ma sœur.

Papa, maman, merci pour tout ce que vous faites et avez fait pour moi depuis ma naissance. L'éducation et les valeurs que vous m'avez transmises me guident au quotidien et en toutes circonstances, votre exemple m'accompagne.

Gladys, je me suis construit avec et grâce à toi, merci d'être là.

Je vous aime tous les 3.

Aux membres du jury, rapporteurs et examinateurs.

Dr Charafe-Jauffret, Dr Marangoni, Dr Lafanechere, Dr Lopez, je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer mon travail. La qualité de vos multiples travaux vous accompagne et c'est un honneur pour moi de vous compter parmi mes juges.

Au Pr Ray-Coquard, merci d'avoir accepté de présider ce jury. Votre carrière et votre rayonnement sont un exemple pour les jeunes oncologues dont je fais partie.

A mes formateurs, Dr Maguer-Satta, Dr Delay, Dr Guyot.

Véronique, merci de m'avoir accueilli de manière aussi bienveillante dans ton laboratoire. Merci pour ta formation, ta rigueur scientifique mais également ton humanité. Nous sommes chanceux d'avoir au laboratoire une directrice d'unité comme toi.

Emmanuel, merci d'avoir accepté de diriger mon travail. Merci pour votre disponibilité, votre bienveillance à mon égard, vos encouragements, votre suivi, votre confiance.

Boris, merci de m'avoir accompagné dans le quotidien du laboratoire. Je ne connaissais rien de la vie de laboratoire lorsque je suis arrivé dans l'équipe et tu as dû tout me montrer de A à Z. Tu l'as fait avec patience et bienveillance et je t'en remercie profondément. Merci pour nos (interminables) discussions de fond, merci pour ton suivi, merci pour ta gentillesse.

Je me réjouis de pouvoir continuer à collaborer avec vous dans le futur.

Aux membres de mon comité de suivi de thèse.

Dr Dalla-Venezia, Dr Guiu, je vous remercie pour vos conseils et commentaires, pour votre gentillesse et votre bienveillance.

A mon chef de service.

Dr Tredan, je souhaite vous adresser ici mes sincères remerciements pour votre confiance et votre accompagnement.

A mes collègues au laboratoire, actuels ou passés.

Merci pour votre accueil au laboratoire, votre bonne humeur, votre bienveillance, votre aide quotidienne.

A mes collègues à l'hôpital, notamment l'équipe du groupe gynéco-sarcomes et bien évidemment mes co-assistants ainsi que les Dr Junior, vous êtes des personnes incroyables capables d'éclairer même les journées les plus sombres et c'est une chance que de pouvoir travailler à vos côtés.

A mes amis que je n'ai pas beaucoup vu ces derniers temps, merci d'être là, en toutes circonstances, merci d'être ce que vous êtes, j'ai hâte de vous retrouver.

Avant-propos

En France en 2024, 1 femme sur 8 risque d'être diagnostiquée d'un cancer du sein au cours de sa vie. Quoi de plus éloquent que cette statistique pour mesurer l'impact prépondérant de cette maladie sur la santé publique à l'échelle nationale, continentale et internationale ? Pourtant, derrière ce constat se cachent plusieurs phénomènes distincts. En effet le cancer du sein ne peut être restreint à une seule entité. Il s'agit d'une maladie hétérogène dont il existe plusieurs sous-types moléculaires, associés à des mécanismes de carcinogenèse et des pronostics sensiblement différents. Parmi ces différents sous-types, le cancer basal-like, qui compte pour environ 15% des cas, apparaît comme étant le plus agressif puisqu'il touche des femmes plus jeunes et rechute plus fréquemment, ceci étant associé à des données de survie plus défavorables qui ne manquent pas d'interpeller la communauté médico-scientifique comme le grand public depuis de nombreuses années. L'amélioration de la prise en charge de ces tumeurs constitue ainsi un enjeu majeur en oncologie. C'est donc avec enthousiasme que je me suis lancé dans ce travail de thèse proposé par le Dr Véronique Maguer-Satta, persuadé qu'une meilleure prise en charge de la pathologie passe par une meilleure compréhension de celle-ci. L'objectif de ce travail est d'évaluer l'impact du micro-environnement de la glande mammaire sur la transformation des cellules souches normales en cellules souches cancéreuses dans la tumorigenèse des cancers basal-like. Cette contribution du micro-environnement est étudiée sous l'angle de la voie BMP (Bone Morphogenetic Proteins), une voie développementale essentielle également impliquée dans la biologie des cellules souches normales et cancéreuses notamment de la glande mammaire.

Le premier chapitre du travail prend la forme d'une bibliographie introduisant les différentes notions abordées dans ce manuscrit. Certaines des notions évoquées dans cette partie introductive ont fait l'objet d'un premier article dans lequel j'ai pu passer en revue les altérations de la recombinaison homologue (voie essentielle de réparation des cassures double brins de l'ADN) dans les cancers du sein basal-like. Cet article est consultable en annexe de ce manuscrit.

Homologous recombination pathway alterations in basal-like breast cancers (Prêt pour soumission)

Simon AHO, Boris GUYOT, Véronique MAGUER-SATTA

Le deuxième chapitre du travail est consacré aux expérimentations menées au laboratoire dans le but d'affiner notre compréhension de l'effet de certains éléments de la voie BMP sur les cellules immatures de la glande mammaire et les conséquences éventuelles sur l'émergence de cancers du sein basal-like. Ce chapitre est lui-même subdivisé en 2 parties. La première, descriptive, rapporte, par le biais d'études de cohortes publiques et constituées au laboratoire, les anomalies de la voie BMP retrouvées spécifiquement dans les cancers basal-like comparativement aux autres sous-types moléculaires. La deuxième, expérimentale, s'attache à explorer les conséquences fonctionnelles de ces anomalies sur le contingent immature de la glande mammaire en termes de propriétés de cellules souches (stemness), clonogénécité, différenciation, stabilité génomique et transformation tumorale. Les résultats de ce deuxième chapitre ont été organisés sous forme d'un article en cours de préparation.

BMP4 and BMPR1A induce BRCAness in immature mammary cells and contribute to the emergence of breast cancer stem cells in basal-like breast cancer initiation (En préparation)

Simon AHO, Isabelle TREILLEUX, Sylvain LEFORT, Adrien BUISSON, Sandrine JEANPIERRE, Emmanuel DELAY, Véronique MAGUER-SATTA, Boris GUYOT

Le troisième chapitre du travail est une discussion des résultats obtenus et leur mise en perspectives, soulignant notamment l'impact de la dérégulation du micro-environnement de la glande mammaire sur le processus de carcinogénèse. Comme autre exemple de carcinogénèse mammaire médiée par des perturbations micro-environnementales, nous avons rédigé un article portant sur les carcinomes épidermoïdes mammaires associés aux implants dans lequel nous suggérons un rôle de l'inflammation chronique sur certains éléments du micro-environnement favorisant leur transformation. Cet article est consultable dans la section annexe.

Breast implant associated squamous cell carcinoma : clinical, pathological and molecular analysis of 2 cases (Prêt pour soumission)

***Simon AHO**, Isabelle TREILLEUX, Adrien BUISSON, Daniel PISSALOUX, Olivier TREDAN, Paul FROBERT, Emmanuel DELAY*

Par ailleurs, en parallèle de ces travaux d'écriture, j'ai également profité de cette thèse de sciences pour participer à une formation à la médiation scientifique dans le cadre du prix Kerner de la fondation ARC pour lequel j'ai pu obtenir le prix de 2^{ème} lauréat. Cette expérience très enrichissante m'a conforté dans l'idée que la médiation scientifique avec le grand public, tout comme la communication avec nos patients sont des éléments essentiels à la mobilisation, aux côtés des professionnels médico-scientifiques, de pans entiers de la société contribuant à amplifier et harmoniser la lutte contre le cancer qui semble nécessairement protéiforme.

Table des matières

Remerciements	5
Avant-propos	7
Table des matières	11
Liste des abréviations	15
Liste des Figures	21
Liste des Tableaux	23
CHAPITRE 1 : Introduction	25
La glande mammaire	25
Organisation et structure de la glande mammaire	25
Généralités et considérations morphologiques	25
Considérations histologiques et moléculaires.....	26
Evolution de la glande mammaire au cours du temps.....	28
Morphogénèse embryonnaire	29
Morphogénèse pubertaire	31
Modifications de la glande mammaire au cours des cycles menstruels.....	36
Modification de la glande mammaire au cours de la grossesse	37
Modification de la glande mammaire au cours de la lactation.....	39
Modification de la glande mammaire à la ménopause.....	40
Rôle des cellules souches dans le développement et le maintien de la glande mammaire	40
Généralités	40
Moyens d'étude	40
Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles	42
Notion de cellules souches cancéreuses	47
Généralités	47
Implication dans la tumorigenèse	47
Implication dans la résistance thérapeutique et la rechute.....	49
Quiescence	49
Diminution des dérivés réactifs de l'oxygène et résistance multi-drogue.....	50
Augmentation de la réponse aux dommages à l'ADN et résistance à l'apoptose	50
Caractérisation	51
Principales voies de signalisation régulatrices	52

La voie Wnt / β -catenin	52
La voie NOTCH	53
La voie Hedgehog	54
La voie des Bone Morphogenetic Proteins/TGF β	55
Les cancers du sein basal-like.....	69
Généralités et définition.....	69
Epidémiologie et présentation clinique	70
Incidence	70
Facteurs de risque	71
Pronostic.....	72
Caractéristiques biologiques	75
Caractéristiques transcriptomiques	75
Caractéristiques histologiques	80
Instabilité génétique.....	82
Similitudes avec les tumeurs déficientes en BRCA1.....	84
Mise en évidence de l'HRD dans les tumeurs basal-like	88
Qu'est-ce que la recombinaison homologue ?.....	88
Comment mesurer l'HRD ?.....	91
Causes de l'HRD dans les cancers basal-like.....	100
Altérations génétiques	101
Dérégulations transcriptionnelles	106
Dérégulations post-transcriptionnelles.....	112
Principes de traitement.....	114
Au stade localisé.....	114
Au stade métastatique	115
Sensibilité aux sels de platines et inhibiteurs de PARP	116
CHAPITRE 2 : Résultats	125
Problématique et justification de l'étude	125
Article original	129
CHAPITRE 3 : Discussion.....	171
Dérégulation de la voie BMP dans les cancers basal-like.....	171
Les récepteurs BMPR1A/BMPR1B.....	171
Les ligands BMP2/BMP4.....	173
Dérégulation de la voie BMP dans les tissus sains mutés pour BRCA1.....	174

Répression de BRCA1 par BMP4.....	175
Conséquences fonctionnelles de la répression de BRCA1 par BMP4 dans le modèle MCF10A	177
Différenciation et stemness	177
Statut de la recombinaison homologue	179
Sensibilité aux inhibiteurs de PARP	180
Transformation tumorale	183
Perspectives.....	183
Conclusion	188
Bibliographie.....	189

Liste des abréviations

ABC : ATB binding cassette

ActR : Activin Receptor

AEJ : Alternative End Joining

APC : Adenomatous Polyposis Coli

Areg : Amphiréguline

ADAM17 : A disintegrin and metalloprotease 17

ALDH : Aldéhyde Déshydrogénase

α SMA : α Smooth Muscle

ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated

ATR : Ataxia Telangiectasia and Rad3

BAMBI : BMP and activin membrane-bound inhibitor

BAP1 : BRCA1 associated protein-1

BARD1 : BRCA1 Associated RING Domain 1

BL1 : Basal-like 1

BL2 : Basal-like 2

BLIA : Basal-like immune-activated

BLIS : Basal-like immune-suppressed

BLM : Bloom syndrome protein

BMP : Bone Morphogenetic Protein

BMPR : BMP Receptor

BPAG : Bullous Pemphigoid Antigen 1

BRCA1 : BReast Cancer gene 1

BRIP1 : BRCA1 interacting helicase 1

BUB1 : Budding Uninhibited by Benzimidazoles 1

CDK : Cyclin Dependent Kinase

CK : Cytokeratin

CFC : Colony Forming Cells

cFLIP : cellular FLICE-like inhibitory protein

CHORD : Classifier Of Homologous Recombination Deficiency

CNA : Copy Number Alterations (Altérations du nombre de copies)

CGH : Comparative Genomic Hybridization
CHEK : Checkpoint kinase
Co-SMAD : common partner SMAD
COSMIC : Catalogue Of Somatic Mutations in Cancer
CPB : CREB Binding Protein
CXCR1 : C-X-C Motif Chemokine Receptor 1
DACT1 : Dishevelled Binding Antagonist Of Beta Catenin 1
DKK3 : Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor 3
DMH1 : Dorsomorphin Homolog 1
E2 : 17 β oestradiol
Elf5 : E74 Like ETS Transcription Factor 5
EGF : Epidermal Growth Factor
EGFR : EGF Receptor
EMT : Epithelial Mesenchymal Transition
EpCAM : Epithelial Cell Adhesion Molecule
ER α : Estrogen Receptor α
ERK : Extra-cellular Signal Regulated Kinase
EZH2 : Enhancer of zeste homolog 2
FANC : Fanconi anemia
FGF : Fibroblast Growth Factor
FGFR : FGF Receptor
FoxM1 : Forkhead Box Protein M1
FOXO : Forkhead box O
GDF : Growth Differentiation factors
GDNF : Glial Derived Neurotrophic Factors
GH : Growth Hormone
GSK3 : Glycogène Synthase Kinase
HDAC : Histone Désacétylase
HER : Human Epidermal growth factor Receptor
HMG : High Mobility Group
HOXC8 : Homeobox C8
HRD : Homologous Recombination Deficiency

IGF1 : Insulin Growth Factor 1
IGF1R : IGF1 Receptor
IHC : ImmunoHistoChimie
IM : Immunomodulatory
I-SMADs : inhibiteurs de SMAD
JAK2 : Janus Kinase 2
JNk : c-Jun N-terminal kinase
Klf4 : Kruppel-like factor 4
LAR : Luminal androgen receptor
LGA : Large-scale Genomic alterations
Lgr6 : Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 6
LIF : Leukocyte Inhibitory Factor
LIG4 : DNA ligase 4
LOH : Loss Of Heterozygosity
LST : Large Scale state Transition
M : Mesenchymal
M2K : MAP kinase kinase
M3K : MAP kinase kinase kinase
MAPK : Mitogen-activated protein kinases
MEC : Matrice Extra-Cellulaire
MH : Mad Homology
MLPA : Multiplex Ligation-dependant Probe Amplification
MMP : Matrix MetalloProteinase
MRE11A : Meiotic Recombination 11 homolog A
MSL : Mesenchymal stem-like
MUC1 : Mucin-1
NBN : Nibrin
NFkB : facteur nucléaire kappa B
NGS : Next Generation Sequencing
NHEJ : Non Homologous End Joining
OAZ : Ornithine decarboxylase antizyme
Oct4 : Octamer-binding transcription factor 4

PALB2 : Partner and localizer of BRCA2

pCR : pathologic Complete Response

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDGFR : Platelet-Derived Growth Factor Receptors

PDX : patient-derived xenografts

Pg : Progesterone

PPP2R2A : Protein Phosphatase 2 Regulatory Subunit Balpha

PR : Progesterone Receptor

PRL : Prolactin

PRL-R : Prolactin Receptor

PTEN : Phosphatase and TENsin homolog

PTHrP : Parathyroid Hormone-related Protein

RANKL : Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand

RGM : Repulsive Guidance Molécule

RH : Recombinaison Homologue

RIF1 : Replication Timing Regulatory Factor 1

RIME : Rapid immunoprecipitation and mass spectrometry of endogenous proteins

RPA : Replication Protein A

R-SMAD : Regulatory SMAD

SBE : SMAD Binding DNA element

SFRP1-5 : Secreted Frizzled Related Proteins 1-5

SMAD : Small Mother against Decapentaplegic

SBE : SMAD Binding DNA element

SEM1 : Suppressor of Exocyst Mutations

SigMA : Signature Multivariate analysis

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

Sox : SRY-Box Transcription Factor

SSA : Single Strand Annealing

STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription

TAI : Telomeric Allelic Imbalance

TDLU : Terminal Duct Lobular Unit

TEB : Terminal End Bud

TGFβ : Transforming Growth Factor β
THY1 : Thy-1 Cell Surface Antigen
TM4SF1 : Transmembrane 4 L6 family member 1
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
WAP : Whey acidic protein
WGS : Whole Genome Sequencing
WIF1 : Wnt Inhibitory Factor 1
WRN : Werner Syndrome Helicase
XIAP : X-Linked Inhibitor Of Apoptosis
XLF : XRCC4-like factor
XRCC4 : X-ray repair cross-complementing protein 4)
ZEB1 : Zinc finger E-box-binding homeobox 1
53BP1 : p53 Binding Protein 1

Liste des Figures

Figure 1. Morphologie de la glande mammaire en période post-pubertaire.....	25
Figure 2. Morphogénèse de la glande mammaire au stade pré-natal.....	29
Figure 3. Implication de l'axe PTHrP/BMP4/BMPR1A dans la croissance du bourgeon primaire	31
Figure 4. Organisation d'un bourgeon terminal (TEB) au cours du développement pubertaire de la glande mammaire.	32
Figure 5. Implication du 17 β oestradiol (E2) dans l'élongation des TEB.....	33
Figure 6. Effets paracrines synergiques de RANKL et WNT4 sur l'alvéologenèse au cours de la gestation.....	38
Figure 7. Principes de l'essai de transplantation orthotopique.....	41
Figure 8. Exemple de stratégie de traçage de lignage chez la souris.....	42
Figure 9. Modèle hypothétique d'organisation hiérarchique de la glande mammaire dans l'espèce humaine (H) et murine (M).	45
Figure 10. Preuve de concept de l'existence de cellules souches cancéreuses mammaires.....	48
Figure 11. Plasticité des cellules souches cancéreuses mammaires.....	49
Figure 12. Caractéristiques principales des cellules souches cancéreuses mammaires.....	51
Figure 13. Représentation schématique des voies canoniques Wnt/ β catenin, NOTCH et Hedgehog.	54
Figure 14. Arbre phylogénique distinguant les 4 sous-groupes de la superfamille du TGF β déterminés selon leur analogie moléculaire et structurale.....	55
Figure 15. Organisation structurale des ligands BMP2 et BMP4	56
Figure 16. Les différentes étapes de synthèse et de sécrétion des ligands BMP	57
Figure 17. Organisation structurale des récepteurs BMPR1A, BMPR1B et BMPR2.....	58
Figure 18. Organisation structurale des effecteurs SMAD.....	61
Figure 19. Représentation schématique de la voie canonique dépendante des SMAD.....	62
Figure 20. Représentation schématique de la voie non canonique, indépendante des SMAD.....	63
Figure 21. Principaux mécanismes de régulation intracellulaires de la signalisation BMP..	65
Figure 22. Identification transcriptomique des cancers du sein basal-like selon les travaux initiaux de Perou et al	70
Figure 23. Niveau d'expression des cellules CD44+/CD24- selon les différents sous-types moléculaires de carcinomes mammaires.	74
Figure 24. Données de survie sans maladie et survie globale de tumeurs basal-like (définies par l'expression immuno-histochimique de cytokératines basales) comparativement à des contrôles non basal-like.....	74
Figure 25. Classification moléculaire des cancers du sein triple négatifs selon les travaux initiaux de Lehmann et options thérapeutiques suggérées.....	78
Figure 26. Contribution des différents sous-types moléculaires de cancers du sein triple-négatifs de Lehmann dans les cancers basal-like et non basal-like de la classification intrinsèque PAM50.....	79
Figure 27. Exemple de 4 cas de cancer du sein basal-like surexprimant la CK5/6 et l'EGFR (HER1) en immunohistochimie, comparativement à du tissu mammaire normal.	80
Figure 28. Profil d'altérations du nombre de copie en CGH-array dans les tumeurs basal-like comparativement aux autres sous-types moléculaires	83

Figure 29. Données de différentes études ayant étudié le niveau d'expression transcriptionnelle (Turner 2007, Joosse 2011) ou protéique (Rakha 2007) de BRCA1 dans des tumeurs basal-like comparativement à des contrôles non basal-like.	87
Figure 30. Représentation simplifiée des 2 voies principales de réparation des cassures double brins de l'ADN chez les mammifères.....	90
Figure 31. Aberrations chromosomiques associées à l'HRD.....	92
Figure 32. Moyens de détection et prévalence de l'HRD dans les cancers du sein basal-like/triple-négatifs.....	100
Figure 33 Altérations des gènes de la recombinaison homologue dans la cohorte mammaire du TCGA.	106
Figure 34. Principaux miRNA régulant l'expression de BRCA1	114
Figure 35. Expression immunohistochimique de BMPR1A dans une tumeur basal-like (triple-négative) comparativement à une glande mammaire non tumorale.....	172
Figure 36. Survie globale selon le niveau d'expression transcriptionnelle de BMPR1A, tous sous-types moléculaires de cancer du sein confondus (A). Survie globale selon le niveau d'expression de BMPR1B spécifiquement dans les cancers du sein définis comme basal-like selon la classification PAM50 (B)	173
Figure 37. Kinome du LDN-193189 (A). IC50 associé au LDN-193189 déterminé par kinase Assay (B).	175
Figure 38. Western Blot illustrant l'effet inhibiteur du LDN-193189 sur la phosphorylation des Smad1/5/8 en réponse à BMP6 dans la lignée cellulaire C2C12.....	176
Figure 39. Analyse par RT-qPCR de l'expression transcriptionnelle d'ID1 et ID3 par les cellules MCF10A en réponse à une exposition à BMP4 (10 et 50 ng/ml pendant 12, 24 et 48h)	177
Figure 40. Heatmap représentant les gènes différentiellement exprimés dans la lignée ShBRCA1 + doxycycline comparativement aux conditions contrôles (A). Analyse de type Gene Ontology représentant l'interactome des gènes différentiellement exprimés dans la lignée MCF10A ShBRCA1 + doxycycline comparativement aux contrôles (B).	179
Figure 41. HR test mené selon Seluanov et al. testant le pourcentage de cellules ayant eu recours à la recombinaison homologue (encadré vert) comme voie de réparation de cassures doubles brins de l'ADN induite par l'endonucléase I-SceI.	181
Figure 42. Analyse en cytométrie de flux de la mort cellulaire (apoptose et nécrose secondaire) en réponse à une exposition à BMP4 et à l'Olaparib	182
Figure 43. Test des CFC représentant le pourcentage de colonies luminales, myoépithéliales et mixtes induites par une exposition à BMP4 +/- LDN-193189 dans les lignées MCF10A surexprimant ou non BMPR1A.....	185
Figure 44. Analyse de type Gene Ontology représentant l'interactome des gènes différentiellement exprimés dans la lignée MCF10A surexprimant BMPR1A comparativement à la lignée MCF10A contrôle.	186

Liste des Tableaux

Tableau 1. Affinité préférentielle des ligands BMP pour différents récepteurs de type I et II.....	59
Tableau 2. Grade de Scarff-Bloom-Richardson modifié par Elston et Elis	72
Tableau 3. Principaux gènes et groupes fonctionnels dérégulés dans les cancers basal-like.	76
Tableau 4. Profil immuno-histochimique des cancers du sein basal-like comparativement aux sous- types luminal et HER2	81
Tableau 5. Similitudes entre les tumeurs BRCA1 muté et basal-like sporadiques	86
Tableau 6. Evaluation du statut HRD dans des cohortes de cancers du sein triple-négatifs.....	94
Tableau 7. Principales études rapportant la sensibilité des cancers du sein triple-négatifs aux sels de platine et aux inhibiteurs de PARP	123

CHAPITRE 1 : Introduction

La glande mammaire

Organisation et structure de la glande mammaire

Généralités et considérations morphologiques

La glande mammaire est une glande exocrine hautement plastique et évolutive dont l'existence est propre aux mammifères. Son rôle est de produire le lait permettant l'alimentation et contribuant à la protection immunitaire de la descendance à la naissance et dans les premiers mois de la vie. Chez l'Homme, hors période gestationnelle, la glande mammaire mature est constituée d'une vingtaine de lobes reliés entre eux par des canaux galactophores de premier ordre (également appelés canaux interlobaires) s'abouchant au niveau du mamelon (**Figure 1**).

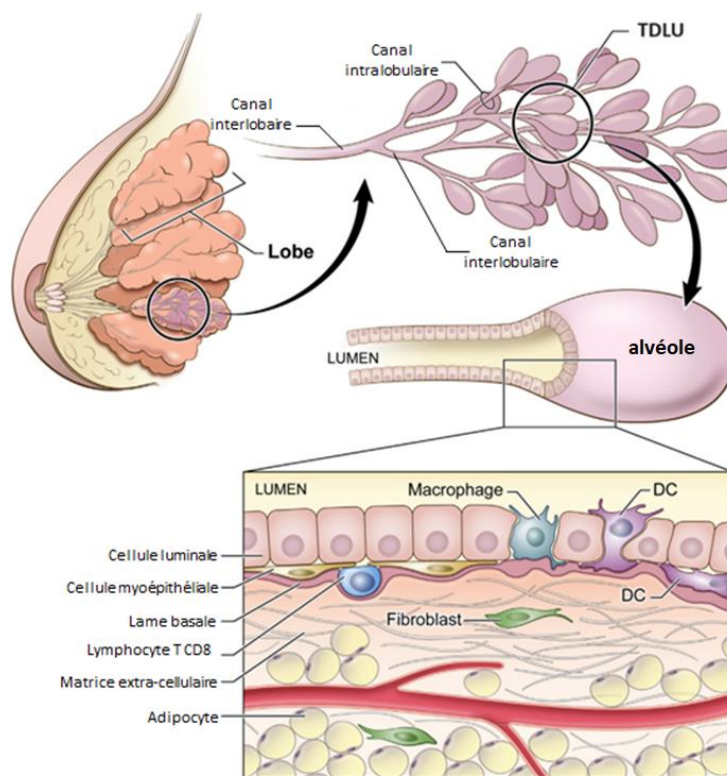


Figure 1. Morphologie de la glande mammaire en période post-pubertaire. A l'âge adulte la glande mammaire comporte une vingtaine de lobules reliés au mamelon par des canaux interlobaires. Ces lobes sont formés de multiples lobules interconnectés par de canaux interlobulaires. Les lobules sont eux-mêmes constitués de plusieurs TDLU constituant l'unité fonctionnelle de la glande. Ces TDLU comportent une couche cellulaire interne de cellules lumineuses et une couche externe de cellules myoépithéliales au contact de la lame basale qui fait l'interface avec le tissu conjonctif sous-jacent. Celui-ci est constitué de la matrice extracellulaire et de différents types cellulaires tels que les adipocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules immunitaires. D'après Goff 2021.

Chaque lobe est constitué de lobules reliés entre eux par des canaux galactophores de second ordre ou canaux interlobulaires. Ces lobules sont eux-mêmes constitués de structures alvéolaires responsables de la production de lait et constituant l'unité fonctionnelle de la glande mammaire. Ces formations sont appelées TDLU (pour Terminal Duct Lobular Unit) et sont connectées les unes aux autres par des canaux galactophores de troisième ordre ou canaux intralobulaires (Hovey et al., 2002).

Considérations histologiques et moléculaires

La glande mammaire est une glande exocrine et hormono-dépendante qui est donc constituée de structures canalaire et alvéolaires. Chacune de ces structures est composée d'un épithélium pseudo-stratifié soutenu par un compartiment stromal sous-jacent.

Le compartiment épithélial

L'épithélium mammaire ou parenchyme mammaire est composé de 2 couches de cellules au phénotype distinct. La couche interne tapisse la lumière des canaux et des alvéoles et est composée de cellules cubiques polarisées dites « luminales » participant à la production de lait en période de lactation. Ces cellules luminales arborent un phénotype caractéristique avec notamment l'expression de l'E-cadhérine et de cytokératines (CK) luminales telles que la CK8 et la CK18. Certaines de ces cellules luminales expriment également des récepteurs hormonaux tels que le récepteur aux œstrogènes α (ER α pour Estrogen Receptor α), le récepteur à la Progestérone (PR pour Progesteron Receptor) ou encore le récepteur à la prolactine (PRL-R pour Prolactin Receptor) : il s'agit des cellules luminales dites « ER+ ». D'autres cellules luminales n'expriment pas les récepteurs hormonaux sus-mentionnés : il s'agit des cellules luminales dites « ER- » (Kendrick et al., 2008; Richert et al., s. d.; Shehata et al., 2012). La couche externe de l'épithélium mammaire est au contact de la lame basale et est donc composée de cellules dites « basales ». Parmi ces cellules basales on retrouve en majorité des cellules contractiles appelées cellules myoépithéliales. Lors de la lactation, cette activité contractile permet l'éjection du lait des alvéoles vers les canaux galactophoriques et le transport de celui-ci jusqu'au mamelon. En dehors de cette période, les cellules myoépithéliales tiendraient également un rôle de garant de l'intégrité de la glande mammaire en maintenant sa polarité (Runswick et al., 2001; Stingl et al., 2006). D'un point de vue phénotypique, ces cellules partagent donc l'expression de marqueurs de cellules musculaires lisses tels que l' α SMA (α Smooth Muscle) avec des marqueurs de cellules

basales des épithélia stratifiés tels que la CK5, la CK14, la CK17, la P-cadhérine ou encore p63 (Deugnier et al., 2002; Gudjonsson et al., 2005; Kendrick et al., 2008; Moumen et al., 2011; Muschler & Streuli, 2010). Outre ces cellules myoépithéliales, le compartiment basal contient également des cellules au phénotype intermédiaire entre les cellules luminales et les cellules myoépithéliales. Ces cellules correspondent à des cellules immatures de type cellules souches et progéniteurs responsables du maintien et du renouvellement de la glande mammaire au cours du temps. La biologie de ces cellules sera détaillée dans un chapitre ultérieur.

La membrane basale

La membrane basale correspond à une matrice extracellulaire (MEC) spécialisée faisant la jonction entre le compartiment épithélial et le compartiment stromal sous-jacent. Elle est organisée en 3 couches : la lamina lucida au contact de l'épithélium, la lamina densa en position centrale et la lamina sub-basale ou reticularis qui fait la continuité avec le tissu conjonctif sous-jacent. Le terme « lame basale » désigne l'association de la lamina lucida et de la lamina densa. Ainsi la membrane basale est identifiable en microscopie optique et électronique tandis que la lame basale n'est visible qu'en microscopie électronique (Maller et al., 2010). D'un point de vue biochimique, la membrane basale est essentiellement constituée des glycoprotéines laminines et nidogènes, du protéoglycan perlecan et du collagène IV. Les cellules épithéliales sont responsables de la synthèse des constituants de la membrane basale à l'exception du collagène IV et du nidogène qui sont essentiellement synthétisés par les fibroblastes du stroma sous-jacent (Maller et al., 2010). Par ailleurs, certains récepteurs transmembranaires de la famille des intégrines ainsi que des protéoglycans de type dystroglycan et syndecan assurent l'adhésion des cellules épithéliales à la lame basale. Outre leur rôle structural, ces récepteurs permettent également la transduction dans l'épithélium de signaux mécaniques en provenance du stroma (Maller et al., 2010; Muschler & Streuli, 2010).

Le compartiment stromal

Le compartiment stromal est un réseau fibro-cellulaire enveloppant l'épithélium sus-jacent. Il est composé d'une matrice extracellulaire et de différents types cellulaires. Les cellules les plus abondantes sont les adipocytes organisés en une structure de soutien appelée coussin adipeux et constituant une réserve énergétique mobilisable lors des étapes clés du

développement de la glande mammaire (Colleluori et al., 2021). En outre, il a également été rapporté un rôle paracrine du tissu adipeux dans le développement de la glande mammaire, par le biais de la sécrétion de plus de 350 adipokines (Celis et al., 2005). Les fibroblastes jouent également un rôle majeur dans la composition du stroma mammaire de par leur fonction de soutien de la glande et leur rôle de régulateur de l'homéostasie de la matrice extracellulaire (Sumbal et al., 2021). Ils contribuent également au bon développement de la glande mammaire par l'induction de signaux paracrines et biomécaniques. Les autres intervenants cellulaires du stroma sont représentés par les cellules immunes (lymphocytes, macrophages), les terminaisons nerveuses et les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et lymphatiques (Maller et al., 2010; Muschler & Streuli, 2010). Ces cellules, indépendamment de leurs rôles physiologiques de défense immunitaire, propagation de l'influx nerveux et distribution sanguine, peuvent également sécréter des facteurs paracrines impliqués dans la morphogénèse mammaire (Gouon-Evans et al., 2002; Polyak & Kalluri, 2010). En outre, l'ensemble de ces cellules est impliqué dans la synthèse et l'assemblage des différents éléments constitutifs de la MEC (Maller et al., 2010).

La MEC est composée essentiellement des collagènes fibrillaires (collagène I, III et V) auxquels s'associent de la fibronectine, des tenascines et des protéoglycanes. Outre leur rôle structural, ces différents éléments permettent également la transmission aux cellules épithéliales de certains signaux biomécaniques ou encore biochimiques, en modulant dans ce dernier cas la biodisponibilité des cytokines sécrétées par les cellules du stroma (Maller et al., 2010). Le terme « micro-environnement », fréquemment utilisé, désigne l'association de la matrice extracellulaire et des cellules stromales (ainsi que leur sécrétome) situées à proximité immédiate des cellules épithéliales et interagissant avec elles pour réguler leur homéostasie.

Evolution de la glande mammaire au cours du temps

Contrairement à la plupart des autres organes humains, le développement de la glande mammaire s'effectue majoritairement en période post-natale. Ainsi, après une première phase de morphogénèse embryonnaire, la glande mammaire va présenter une succession de remodelages à la puberté, au cours de la grossesse, lors de la période de lactation et à la ménopause. Cette chronologie est intéressante car elle offre la possibilité de discriminer les différents processus biologiques régulant chacune des étapes de la morphogénèse

mammaire. Dans cette optique, l'apport des modèles murin a été d'importance du fait de contraintes sur la disponibilité de tissus humains notamment au stade embryonnaire. En effet, si les glandes mammaires humaines et murines présentent des différences anatomiques notables, elles démontrent malgré tout une grande proximité physiologique (Cardiff & Wellings, s. d.). Aussi, les données présentées dans cette introduction s'appuient sur des études menées chez l'Homme mais également chez la souris.

Morphogénèse embryonnaire

Chez l'Homme, cette première étape du développement de la glande mammaire est commune aux individus masculins et féminins. Aux alentours de la quatrième semaine de gestation commencent à apparaître des épaissements d'origine ectodermique, linéaires et symétriques, s'étendant de la racine des membres supérieurs à la racine des membres inférieurs : les crêtes mammaires. Peu après la septième semaine, la crête mammaire involue sauf en un point en région pectorale où la prolifération cellulaire se poursuit pour former un bourgeon mammaire primaire (**Figure 2**).

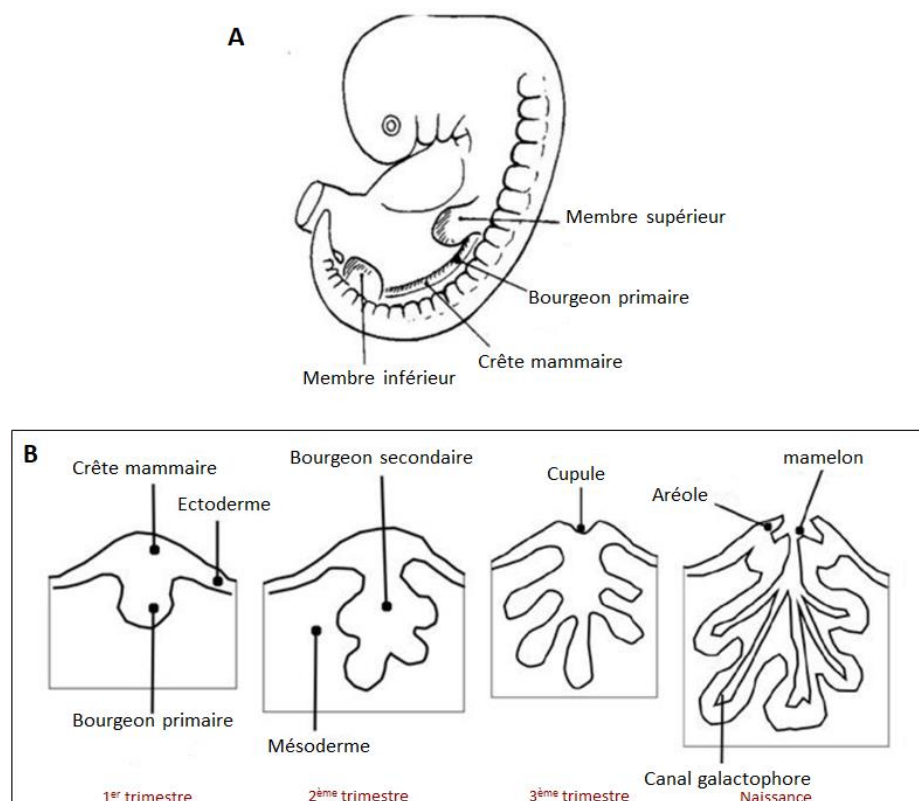


Figure 2. Morphogénèse de la glande mammaire au stade pré-natal. (A) Représentation schématique de la mise en place de la crête mammaire et du bourgeon primaire à partir de la 4^{ème} semaine de gestation. (B) Chronologie du développement de la glande mammaire in utero. Source : UVMaF.

La croissance de ce bourgeon primaire est sous la dépendance d'un dialogue étroit entre les cellules épithéliales le constituant et le mésenchyme sous-jacent (Robinson, 2007). Les différents intervenants moléculaires prenant part à ce dialogue sont largement méconnus chez l'Homme. Néanmoins, des travaux réalisés chez la souris ont permis d'en identifier certains. Ces études ont par exemple permis de mettre en lumière le rôle de la PTHrP (Parathyroid Hormone-related Protein) et de la voie des BMP (Bone Morphogenetic Protein) (Dunbar & Wysolmerski, s. d.; J. R. Hens et al., 2007). Ainsi, la PTHrP est produite par les cellules du bourgeon mammaire et induit, via son récepteur PTHR1, la différenciation du mésenchyme sous-jacent en mésenchyme mammaire spécialisé. Celui-ci comprend des fibroblastes, des cellules musculaires lisses, des cellules endothéliales et des adipocytes destinés à former ultérieurement le coussin adipeux (Javed & Lteif, 2013). En retour, le mésenchyme mammaire sécrète le ligand BMP4 et majore l'expression de son récepteur BMPRII induisant une activation de la signalisation BMP selon une boucle autocrine/paracrine (J. R. Hens et al., 2007). Ceci conduit in fine à la synthèse de la protéine MMP2 (Matrix MetalloProteinase 2) qui contribue au développement du bourgeon mammaire primaire en bourgeon mammaire secondaire (J. Hens et al., 2009) (**Figure 3**). Celui-ci va ensuite donner de nouvelles évaginations formant des bourgeonnements supplémentaires. D'autres intervenants moléculaires ont été décrits dans ce processus de croissance et de différenciation mammaire au cours de l'embryogénèse, notamment certains éléments de la voie Wnt/ β catenin, FGF (Fibroblast Growth Factor) et IGF1 (Insulin Growth Factor 1) (Briskin & O'Malley, 2010; Robinson, 2007; Veltmaat et al., 2004). Finalement, vers le septième mois in utero, les bourgeonnements mammaires se creusent d'une lumière pour devenir canaux galactophores. Ces canaux galactophores sont formés de 2 couches cellulaires : les cellules luminales et les cellules basales (ainsi dénommées en considérant leur position par rapport à la lumière nouvellement créée) (Tobon & Salazar, 1974). Ils s'abouchent au niveau d'une petite dépression ectodermique appelée cupule, qui se transformera secondairement en mamelon. A ce stade, la plupart des auteurs s'accordent à dire que l'extrémité des canaux galactophores va mûrir pour former une ébauche de lobules (Tobon & Salazar, 1974). Pour d'autres, les canaux galactophores sont orphelins de lobules au troisième trimestre de gestation et le système sécrétoire n'est donc pas mature à ce stade. Quoi qu'il en soit, à partir de là, le tissu mammaire va demeurer largement quiescent jusqu'à la période pubertaire.

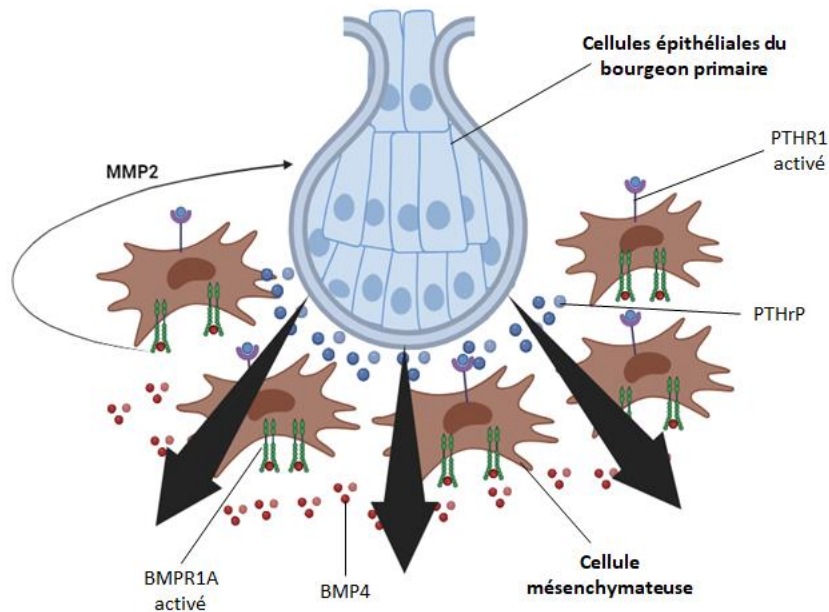


Figure 3. Implication de l'axe PTHrP/BMP4/BMPR1A dans la croissance du bourgeon primaire. La PTHrP, sécrétée par les cellules épithéliales du bourgeon primaire, se lie à son récepteur PTHr1 au niveau des cellules mésenchymateuses sous-jacentes. Ces cellules sécrètent en retour le ligand BMP4 et expriment dans le même temps son récepteur BMPR1A. L'axe BMP4/BMPR1A induit la synthèse de MMP2 qui va médier la croissance du bourgeon primaire.

Morphogénèse pubertaire

Si au cours de l'embryogénèse le développement de la glande mammaire est principalement indépendant des hormones sexuelles (Briskin & O'Malley, 2010; Robinson, 2007), leur implication lors de la morphogénèse pubertaire est prépondérante. A cette période, la glande mammaire va donc se développer de manière substantielle sous l'effet principalement du 17β œstradiol (E2), de la progestérone (Pg) et de l'hormone de croissance (GH pour Growth Hormone). Les cellules situées à l'extrémité distale des canaux galactophoriques vont alors sortir de quiescence et proliférer de manière intense selon un processus d'élongation et de ramification, de manière à former des bourgeons terminaux (ou TEB pour Terminal End Buds) (Williams & Daniel, 1983). Ces TEB (**Figure 4**) sont structurés en plusieurs couches de cellules immatures contrairement aux cellules situées au niveau du front d'élongation des canaux galactophoriques qui sont matures et différenciées. La couche interne des TEB est une multi-couche de cellules dites « du corps » qui sont précurseurs des cellules luminales et en expriment les marqueurs, notamment la kératine 18. La couche externe est une mono-couche de cellules dites de la « coiffe » qui semblent être les précurseurs des cellules myoépithéliales et en expriment également les marqueurs

(α SMA, P-cadhérine, p63, et faiblement les kératines 5 et 14) (Deugnier et al., 2002; Sternlicht, 2005).

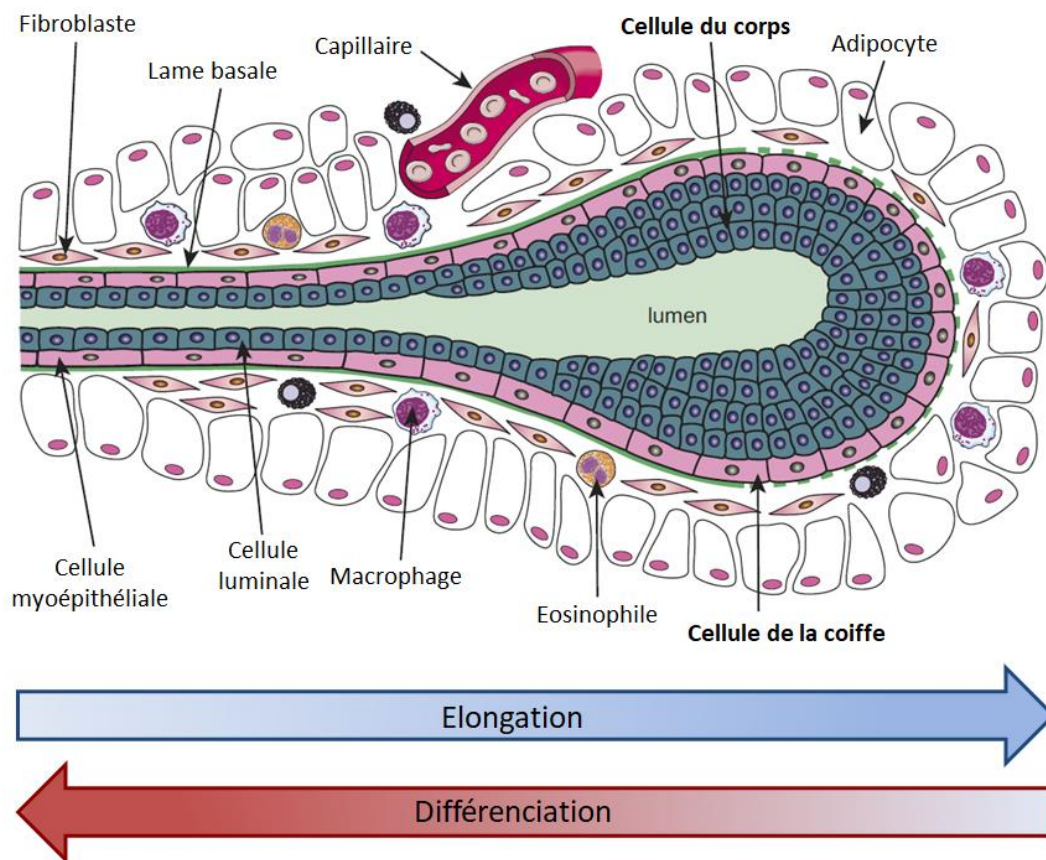


Figure 4. Organisation d'un bourgeon terminal (TEB) au cours du développement pubertaire de la glande mammaire. La lame basale sépare le bourgeon terminal du tissu conjonctif sous-jacent constitué de nombreux adipocytes, fibroblastes, cellules endothéliales et cellules immunitaires. La portion externe du bourgeon est constituée d'une mono-couche de cellules de la coiffe, progéniteurs destinés à se différencier en cellules myoépithéliales et éventuellement en cellules luminales. La portion interne du bourgeon est faite d'une multi-couche de cellules du corps, progéniteurs destinés à se différencier en cellules luminales. D'après Fu 2020.

Néanmoins, certains auteurs ont suggéré que ces cellules de la coiffe, de morphologie indifférenciée, auraient la capacité de migrer dans le corps du bourgeon afin de se différencier en cellules luminales. Ainsi, l'hypothèse selon laquelle les cellules de la coiffe seraient des cellules souches multipotentes a été soulevée mais plusieurs expériences de transplantation de cellules uniques et de traçage de lignage ont apporté des conclusions contradictoires et n'ont donc pas permis de répondre définitivement à la question (Rios et al., 2014; Van Keymeulen et al., 2011).

Au cours de leur maturation, les TEB vont traverser le stroma sous-jacent jusqu'à atteindre les limites du coussin adipeux, permettant ainsi de densifier considérablement la glande

mammaire. La bifurcation des TEB est à l'origine de l'arborescence de la glande mammaire via la formation d'un réseau de canaux organisés de manière hiérarchique. L'apoptose de certaines cellules du corps du bourgeon permet par ailleurs de consolider la lumière au sein de ces structures, soulignant l'importance de l'équilibre entre prolifération, différenciation et apoptose dans la morphogénèse mammaire (Humphreys, s. d.).

Implication du 17- β -œstradiol

Plusieurs facteurs hormonaux sont impliqués dans ces transformations de la glande mammaire au stade pubertaire. En premier lieu, l'E2 apparaît comme étant l'inducteur principal de la prolifération des cellules de l'épithélium mammaire au niveau des TEB (Mallepell, s. d.) (**Figure 5**).

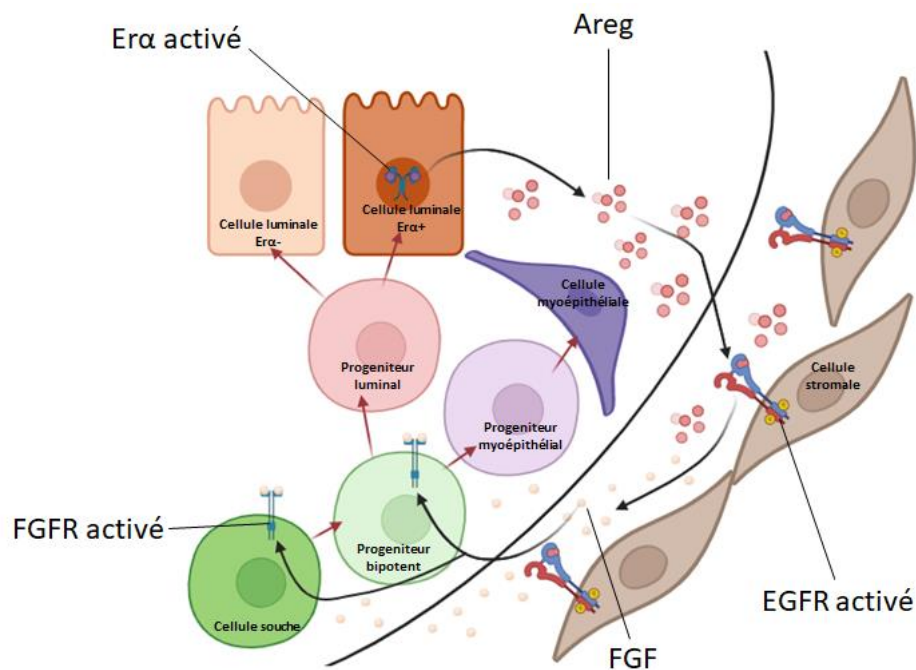


Figure 5. Implication du 17 β œstradiol (E2) dans l'élongation des TEB. La fixation de l'E2 à son récepteur nucléaire Er α conduit à la synthèse d'Amphiréguline (Areg). La fixation de l'Areg à son récepteur EGFR au niveau des cellules stromales va conduire à la synthèse de FGF. Celui-ci va se fixer à ses récepteurs cibles (FGFR1 et FGFR2) au niveau des cellules souches mammaires et des progéniteurs bipotents, induisant leur prolifération et différenciation en cellules luminales et myoépithéliales.

En effet la fixation de l'E2 sur son récepteur Er α exprimé par certaines cellules luminales va induire l'expression de pro-amphiréguline à la membrane plasmique où elle sera clivée en sa forme active, l'amphiréguline (Areg) par la métalloprotéase transmembranaire ADAM17 (A disintegrin and metalloprotease 17) (Sternlicht, 2005). La libération de l'Areg dans le stroma

résulte en la mise en place d'un dialogue entre les cellules stromales qui vont générer des signaux prolifératifs et l'épithélium qui va intégrer ces signaux et y répondre. Ainsi, l'Areg, qui appartient à la famille EGF (Epidermal Growth Factor) va se fixer sur son récepteur EGFR (pour EGF Receptor) exprimé par les cellules stromales résultant en la synthèse par ces cellules de différents ligands notamment le FGF. Le FGF va alors se fixer à ses récepteurs FGFR (pour FGF receptors) notamment FGFR1 et FGFR2 exprimés par les cellules souches et progéniteurs bi-potents des TEB entraînant la prolifération et la différenciation en cellules des lignages luminal et myoépithélial nécessaires au processus d'élongation de la glande (Parsa et al., 2008; Pond et al., 2013; X. Zhang et al., 2014).

Implication de la Progestérone

Physiologiquement, les œstrogènes induisent l'expression du récepteur à la progestérone PR (pour Progesterone Receptor) dans différents tissus notamment l'endomètre et la glande mammaire (Mauvais-Jarvis et al., 1986) si bien que les effets propres de la progestérone (Pg) in vivo ont historiquement été difficiles à identifier dans un contexte de co-exposition oestro-progestative. Néanmoins l'utilisation de modèles murins présentant une inactivation homozygote de PR (PR^{-/-}) a permis de clarifier les fonctions intrinsèques de la Pg. En effet, dans ces études l'inactivation de PR impacte négativement l'élongation des TEB (Humphreys et al., s. d.; Lydon et al., 1995). Ces effets passeraient par une action directe de la Pg sur les cellules épithéliales des TEB et par un effet paracrine sur leur micro-environnement stromal. En effet, l'exposition à la Pg de souris ovariectomisées induit l'activation du PR et la synthèse épithéliale d'Areg conduisant au développement des TEB (Aupperlee et al., 2013). D'autre part, la Pg semble également capable de se fixer aux PR exprimés par les cellules stromales conduisant à la libération de facteur prolifératifs dans le micro-environnement (Humphreys et al., 1997).

Implication de l'hormone de croissance

La GH est une hormone sécrétée par l'ante-hypophyse stimulant la sécrétion d'IGF1 par le foie et également les cellules stromales de la glande mammaire en développement (Walden et al., 1998). L'IGF1, via son récepteur IGF1R semble être un facteur essentiel à l'élongation des TEB. En effet, un traitement par GH ou E2 n'induit pas d'élongation des TEB dans un modèle de souris ovariectomisées IGF1^{-/-}, à l'inverse d'un traitement par IGF1-seule (Ruan & Kleinberg, 1999, p. 199). Il a été suggéré que l'IGF1 produite dans le stroma signalerait de

manière paracrine via un effet prolifératif sur l'épithélium des TEB, en synergie avec l'E2 ou également la Pg (Kleinberg & Barcellos-Hoff, 2011; Ruan et al., 2005).

Implication du remodelage de la matrice extracellulaire

Comme nous l'avons vu, l'élongation et le développement des TEB est hautement dépendant des modifications du climat hormonal au cours de la puberté et du dialogue qui en résulte entre les cellules épithéliales et le stroma. Outre les différents types de cellules le composant, ce stroma est également constitué d'un ensemble de macro-molécules extracellulaires interconnectées et organisées en un réseau tridimensionnel complexe lui conférant sa structure : la MEC. Comme précédemment détaillé, on retrouve parmi ces molécules les protéines de la famille du collagène, des protéoglycanes/glycosaminoglycanes, les laminines, l'élastine, la fibronectine et diverses autres glycoprotéines (Theocharis et al., 2016). Ces éléments interagissent entre eux et avec les cellules épithéliales via leur fixation à des molécules d'adhésion transmembranaire, telles que les intégrines, capables d'initier la transduction de signaux en provenance de la MEC. La réponse à ces signaux est essentielle au maintien de l'homéostasie de chaque tissu. En fonction des besoins physiologiques du tissu, la MEC peut être remodelée par différentes enzymes de dégradation. C'est le cas lors de la morphogénèse mammaire au stade pubertaire qui nécessite certaines modifications de la structure de la MEC pour permettre l'élongation des TEB et l'invasion du stroma sous-jacent. Certaines cellules de la coiffe et du stroma partagent cette fonction de synthèse des enzymes de dégradation en réponse par exemple à la signalisation oestrogénique. Parmi ces enzymes on retrouve les MMP (Matrix Metalloproteinases) notamment MMP2 et MMP14 ainsi que certaines heparanases qui vont générer des zones de moindre résistance dans le stroma en dégradant la MEC directement au contact des TEB, favorisant ainsi leur progression (Gomes et al., 2015; Wiseman et al., 2003). D'autre part, plusieurs études ont décrit le rôle du collagène de type I dans l'organisation de la structure et l'orientation des TEB lors de l'élongation (Brownfield et al., 2013; Inman et al., 2015). D'autres équipes ont également rapporté l'importance de certaines intégrines, notamment l'intégrine $\beta 1$ (CD29) exprimée par les cellules souches mammaires, dans le développement des TEB (Klinowska et al., 1999; Taddei et al., 2008).

Modifications de la glande mammaire au cours des cycles menstruels

A la fin de la puberté, une fois que les TEB se sont étendus jusqu'aux limites du coussin adipeux et que les cellules le constituant se sont différenciées, l'E2 perd peu à peu ses capacités d'induction de prolifération et la glande mammaire reste relativement quiescente jusqu'à la gestation, en dehors de phases de réponse proliférative transitoires au cours de chaque cycle menstruel. Dans ce contexte, l'effet anti-prolifératif observé est principalement médié par le TGF β (Transforming Growth Factor β) toujours selon un mode d'action autocrine et paracrine impliquant une communication entre l'épithélium et le stroma (Daniel, s. d.). A l'inverse, l'activité proliférative est essentiellement médiée par la Pg dont la concentration sérique augmente à la phase lutéale de chaque cycle menstruel. A ce stade, la Pg induit la sécrétion de 2 médiateurs par les cellules luminales exprimant le PR : Wnt-4 (Briskin et al., 2000) et RANKL (Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand) (Mulac-Jericevic et al., 2003). L'effet prolifératif de RANKL passerait par l'induction de l'expression de la cycline D1 dans les cellules du lignage luminal environnantes (Y. Cao et al., s. d.; Mulac-Jericevic et al., 2003) tandis que Wnt-4 exercerait un effet prolifératif direct et indirect (via les cellules stromales) sur le compartiment souche de la glande mammaire (B. Y. Liu et al., 2004; Reya & Clevers, 2005; Willert et al., 2003), conduisant in fine au développement de branches latérales surnuméraires terminées par des bourgeons alvéolaires. De manière intéressante, il a aussi été rapporté un effet prolifératif direct de la Pg sur les cellules luminales exprimant le PR, également par le biais de l'induction de la cycline D1 dans ces cellules (Beleut et al., 2010). A la fin du cycle menstruel, en l'absence de nidation, la chute de la concentration plasmatique de Pg induit une régression des branches latérales et de leurs terminaisons alvéolaires (Andres & Strange, s. d.). Ces terminaisons alvéolaires sont catégorisées en différents types selon leur degré de maturation (de I à IV). Les types I, II et III correspondent aux alvéoles retrouvées en dehors de toute grossesse. On retrouve une proportion plus importante d'alvéoles de type I chez la femme nullipare tandis que chez la femme multipare, les types II et III sont prédominants (Arendt et al., 2014; Russo & Russo, 2004).

Modification de la glande mammaire au cours de la grossesse

Au cours de la grossesse, la glande mammaire va compléter sa maturation par la formation de branches secondaires et tertiaires et le développement d'un tissu sécrétoire lobulo-alvéolaire responsable de la production de lait. Ce processus appelé alvéologénèse comprend deux phases successives : une phase proliférative et une phase sécrétoire. La première phase débute dès le début de la grossesse et est caractérisée par une prolifération intense et rapide des cellules épithéliales aboutissant à la formation de branches latérales surnuméraires à l'extrémité desquelles se développent des bourgeons alvéolaires latéraux (Russo & Russo, 2004). La deuxième phase débute à la mi-grossesse et est caractérisée par la différenciation des bourgeons alvéolaires latéraux en alvéoles sécrétrices de lait organisées en lobules. Cette deuxième étape s'accompagne d'un remodelage important du compartiment stromal sous-jacent incluant une sécrétion de gouttelettes lipidiques par les adipocytes, une augmentation de l'angiogénèse, une réorganisation des fibroblastes et une infiltration macrophagique. Les alvéoles sécrétrices contiennent des progéniteurs alvéolaires bipotents capables de se différencier en cellules myoépithéliales et en cellules luminales sécrétrices de lait (Joshi et al., 2015).

Implication de la Progestérone

Produite par le corps jaune à partir de la deuxième phase du cycle menstruel, la Pg est ensuite synthétisée par le placenta à partir de la 8^{ème} semaine de gestation. Elle est hautement impliquée dans la phase proliférative de la morphogénèse gestationnelle, essentiellement par le biais de sa fixation à l'isoforme β du récepteur à la Pg (PR β). En effet, contrairement à l'inactivation de PR α , l'inactivation expérimentale de PR β conduit à des perturbations importantes du développement gestationnel de la glande mammaire (Briskin, 2002; Conneely et al., 2003; Humphreys et al., 1997; Lydon et al., 1995; Mulac-Jericevic et al., 2003). PR β est globalement exprimé par le compartiment stromal et le compartiment épithélial (Mulac-Jericevic et al., 2003). Néanmoins, seulement 30% des cellules luminales avéolaires expriment les récepteurs hormonaux (Briskin et al., 1998; Tanos et al., 2012) suggérant un rôle paracrine de la Pg dans la morphogénèse mammaire en cours de gestation. Plusieurs équipes ont confirmé cette hypothèse en mettant en évidence le rôle de RANKL et Wnt4 dans ce contexte. En effet, comme représenté sur la **Figure 6**, ces médiateurs sont produits par les cellules ER+/PR+ exposées à la Pg et agissent de manière

paracrine sur les progéniteurs luminaux et basaux ER-/PR- environnants en stimulant leur prolifération de manière cycline D1 dépendante et indépendante (Beleut et al., 2010; Brisken et al., 2000; Conneely et al., 2003; Joshi et al., 2015).

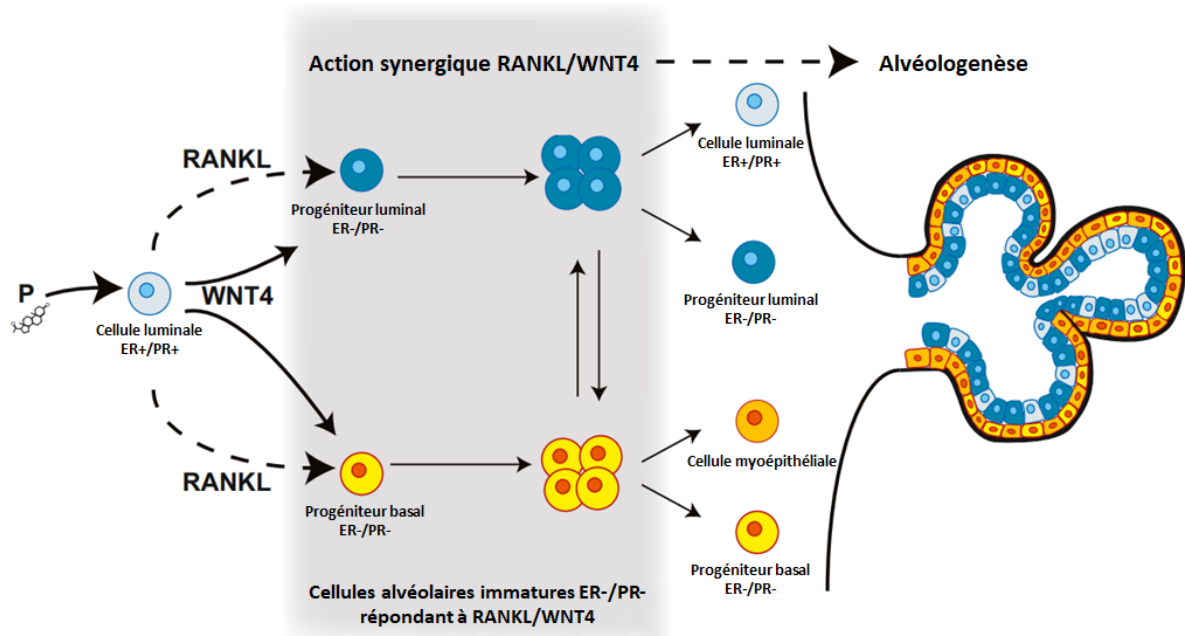


Figure 6. Effets paracrines synergiques de RANKL et WNT4 sur l'alvéologénèse au cours de la gestation. La fixation de la Progéstérone à son récepteur PR β dans les cellules alvéolaires luminales ER+/PR+ induit la synthèse par ces cellules des médiateurs RANKL et WNT4 qui vont jouer un rôle paracrine dans la régulation des progéniteurs bipotents ER-/PR- des lignages luminaux et myoépithéliaux. Ces cellules immatures vont alors proliférer et commencer à se différencier pour soutenir la phase proliférative de l'alvéologénèse. D'après Joshi 2015.

Implication de la Prolactine

Essentiellement produite par l'antéhypophyse, la prolactine (PRL) joue un rôle complémentaire à celui de la Pg dans l'alvéologénèse, notamment en deuxième partie de gestation (Ormandy et al., 1997). Elle exerce principalement ses fonctions via sa fixation au PRL-R, qui, une fois activé peut recruter la Janus Kinase 2 (JAK2). JAK2 phosphoryle alors les facteurs de transcription STAT5a et STAT5b (STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription). L'activation du premier nommé entraîne ensuite la transcription de gènes clefs impliqués dans la prolifération et différenciation des cellules alvéolaires tels que RANKL, IGF-2, Elf5 (E74 Like ETS Transcription Factor 5) ou encore certains gènes codant pour des protéines du lait telles que WAP (Whey acidic protein) ou β -caséine. L'activation de STAT5b en réponse à la PRL peut également induire la transcription du gène de la Pg.

Inversement la PRL peut être synthétisée en réponse à la Pg, soulignant le rôle complémentaire et synergique de la Pg et PRL dans le développement de la glande mammaire en cours de gestation (Lydon et al., 1995; Ormandy et al., 1997).

Modification de la glande mammaire au cours de la lactation

Si les protéines composant le lait sont synthétisées au cours de la gestation, leur sécrétion active à ce stade est cependant inhibée par la Pg (Neville et al., 2002). Dans les suites de l'accouchement, à la perte du placenta, la diminution de la synthèse de Pg entraîne donc la sécrétion des vésicules contenant les différents constituants du lait. Ceux-ci continuent alors à être produits en abondance sous l'action de la PRL dont la propre synthèse pulsatile hypophysaire est soutenue par la tétée du mamelon (Tay et al., 1996). La tétée du mamelon, associée à d'autres stimuli sensoriels tels que les cris de l'enfant, génère également la synthèse pulsatile d'une autre hormone hypophysaire, l'ocytocine (Armstrong & Hatton, 2006; Reversi et al., 2005). Celle-ci agit sur ses cellules cibles, les cellules myoépithéliales des alvéoles, en induisant leur contraction nécessaire à l'acheminement du lait le long des canaux galactophores jusqu'au mamelon (Reversi et al., 2005). L'ocytocine est également nécessaire au maintien de l'architecture lobulo-alvéolaire en cours de lactation.

Involution de la glande mammaire en fin de lactation

En l'absence durable de stimuli de succion mamelonnaire, la synthèse de PRL et ocytocine diminue rapidement. Le lait stagne alors dans la glande mammaire ce qui a pour effet d'inhiber la synthèse des protéines du lait par les cellules alvéolaires. La stagnation du lait dans les voies excrétrices conduit également à l'involution de la glande mammaire selon un processus en 2 étapes. La première étape est réversible et implique des facteurs locaux initiateurs d'apoptose tels que les cytokines LIF (Leukocyte Inhibitory Factor), TGF β 3 et le facteur de transcription STAT3. La deuxième étape est irréversible et implique la dégradation de la membrane basale par certaines MMP ainsi que la poursuite des phénomènes d'apoptose jusqu'au collapsus des alvéoles induisant un retour à l'état pré-gestationnel avec une glande mammaire restant quiescente jusqu'à la gestation suivante (McCready et al., 2010; Watson, 2006).

Modification de la glande mammaire à la ménopause

A la ménopause, l'arrêt de l'activité ovarienne induit des modifications profondes du climat hormonal, notamment une diminution importante des taux d'œstrogènes circulants. Il en résulte une diminution du nombre et de la taille des lobules. Ce processus irréversible est appelé involution lobulaire. Il est à noter que la majorité des cellules épithéliales résiduelles exprime le récepteur aux œstrogènes (90% versus 10% en pré-ménopause). En parallèle, le stroma intra-lobulaire s'enrichit en collagène tandis que le stroma inter-lobulaire s'enrichit en adipocytes (McCready et al., 2010).

Rôle des cellules souches dans le développement et le maintien de la glande mammaire

Généralités

Comme nous l'avons vu, le sein est un organe hautement plastique capable d'expérimenter différentes phases de remodelage au cours du temps en fonction des besoins physiologiques. Ces capacités évolutives sont soutenues par une population de cellules souches présentes au sein de la glande mammaire afin d'en maintenir l'homéostasie. En effet, les cellules souches sont caractérisées par leur capacité d'auto-renouvellement et différenciation en progéniteurs eux-mêmes voués à se différencier selon un lignage donné au sein de l'organe. Par exemple concernant l'épithélium mammaire, il est possible, comme précédemment détaillé, de distinguer le lignage basal et le lignage luminal, lui-même subdivisé en lignage canalaire et alvéolaire.

Moyens d'étude

Transplantation orthotopique

Plusieurs méthodes ont été décrites pour l'étude de la biologie des cellules souches. Les essais de transplantation orthotopique reposent sur l'introduction de fragments d'épithélium mammaires ou de cellules mammaires isolées, au sein de coussins adipeux débarrassés de leur épithélium mammaire endogène (**Figure 7**). Dans ce système, seules les cellules souches sont capables de reconstituer les compartiments luminal et basal de la glande mammaire du fait de leur capacité de prolifération, différenciation et auto-renouvellement. Cette dernière caractéristique peut être mise en évidence par des tests de transplantation en série dont la positivité est établie lorsque la transplantation de fragments

épithéliaux mammaires néo-formés conduit à la reconstitution d'une nouvelle arborescence mammaire multi-lignage (Hoshino, 1964; Smith & Medina, 1988). L'un des écueils de cette première méthode est qu'elle pourrait pousser certains progéniteurs normalement restreints à un seul lignage à se comporter comme des cellules souches multipotentes (De Visser et al., 2012; Prater et al., 2014; Van Keymeulen et al., 2011; van Amerongen et al., 2012). Néanmoins, elle permet d'étudier fonctionnellement les capacités de repopulation d'une cellule donnée.

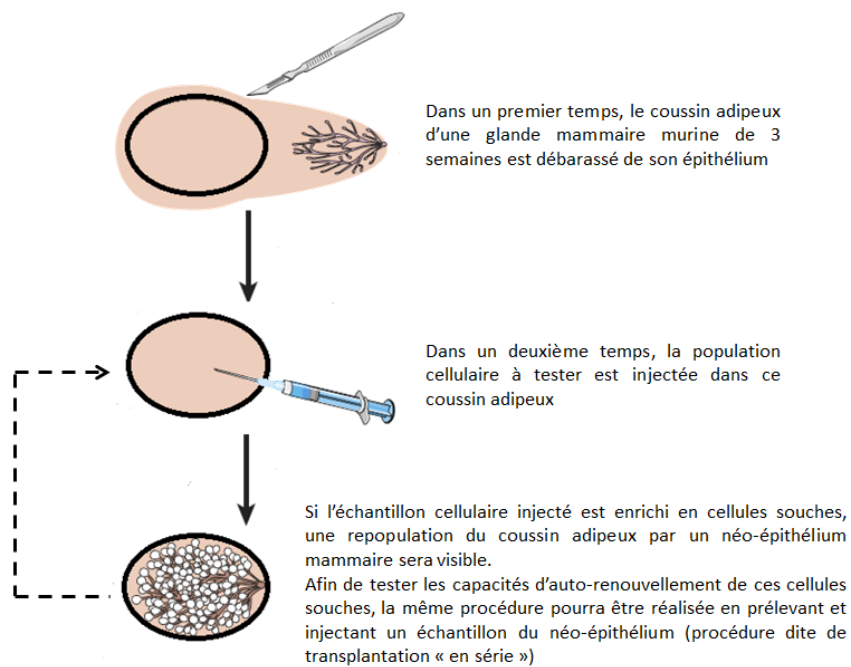


Figure 7. Principes de l'essai de transplantation orthotopique. D'après Fu 2020.

Traçage de lignage cellulaire

D'autre part, le traçage de lignage cellulaire repose sur le marquage de manière permanente des cellules souches et de leur descendance avec une protéine fluorescente donnée. Dans cette technique développée sur des modèles de souris transgéniques, l'expression de cette protéine dépend de l'activité de la Cre recombinase elle-même sous le contrôle d'une part d'un promoteur spécifique des cellules d'intérêt et d'autre part de l'introduction d'un stimulus chimique, par exemple le Tamoxifène (**Figure 8**). L'avantage principal de cette technique est qu'elle permet de suivre in vivo le devenir de cellules d'intérêt et de leur descendance, offrant une vue d'ensemble dynamique de la distribution spatio-temporelle de ces cellules au sein de la glande mammaire. Les limites de la technique concernent

essentiellement l'efficacité du marquage, la spécificité des promoteurs utilisés pour induire l'expression de la Cre recombinase et la toxicité des agents utilisés pour l'activer (par exemple le Tamoxifène) (Rios et al., 2016).

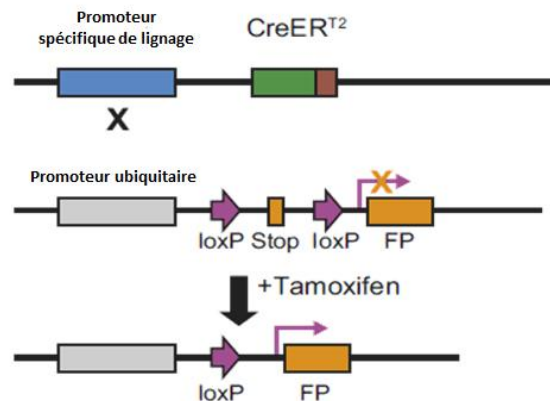


Figure 8. Exemple de stratégie de traçage de lignage chez la souris. Dans cet exemple, l'enzyme CreER^{T2} est sous la dépendance d'un promoteur de lignage spécifique. L'activation de cette enzyme induit l'excision du codon STOP dont la présence entrave la transcription du gène codant pour la protéine fluorescente spécifique du lignage d'intérêt. En présence de Tamoxifène, ce gène est transcrit et la protéine traduite. D'après Fu 2020.

Formation de sphères in vitro

In vitro, les propriétés d'auto-renouvellement et différenciation des cellules souches s'illustrent par leur capacité à générer des sphères dans des conditions de culture spécifiques, reconstituant de manière miniature l'organisation de l'organe en 3 dimensions. Par exemple, les cellules souches mammaires sont capables de former des mammosphères en conditions de culture non adhérentes (Dontu et al., 2003). En outre, les capacités d'engagement des cellules immatures mammaires vers un lignage donné peuvent être étudiées in vitro par le biais du test des CFC (Colony Forming Cells) (Bachelard-Cascales et al., 2012).

Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles

Apport des modèles murins

L'existence de cellules souches mammaires a été suggérée pour la première fois dans les années 50 par les travaux de DeOme et al. qui ont démontré chez la souris le potentiel de renouvellement de la glande mammaire après transplantation orthotopique de différents

fragments d'épithélium mammaire au niveau de coussins adipeux amputés de leur épithélium mammaire initial par microchirurgie (Deome et al., 1959). Une cinquantaine d'années plus tard, Shackleton et al. a montré que la transplantation de cellules $\text{Lin}^- \text{CD29}^{\text{hi}} \text{CD24}^+$ dans les mêmes conditions résulte en la repopulation des coussins adipeux ensemencés, selon les lignages luminal et basal, du fait des propriétés d'auto-renouvellement et différenciation de ces cellules considérées comme cellules souches (Shackleton et al., 2006). De manière intéressante, ces cellules ont été retrouvées localisées dans le compartiment basal de la glande mammaire murine, avec environ 5% des cellules de ce compartiment qui arborerait des capacités de repopulation (Prater et al., 2014; Shackleton et al., 2006). La position basale de ces cellules souches a été confirmée par des modèles d'organoïdes (Jamieson et al., 2016; L. Zhang et al., 2017). D'autres part, des travaux complémentaires se sont attachés à préciser le phénotype de ces cellules sur la base de différents paramètres incluant le niveau d'expression de multiples marqueurs parmi lesquels CD24, CD29, CD49f, CK8/18, CK14, p63 ou le récepteur à la protéine C (Bai & Rohrschneider, 2010; Shackleton et al., 2006; Sleeman et al., 2005; Stingl et al., 2006; D. Wang et al., 2015). Ainsi, plusieurs études ont montré l'existence de cellules souches multipotentes au stade embryonnaire qui permettraient l'expansion des compartiments luminal et basal et en exprimeraient les marqueurs de lignage spécifiques CK8 et CK14 (Spike et al., 2012; Van Keymeulen et al., 2011). Ces cellules sont caractérisées par un haut niveau d'expression de CD24 et CD49f (Spike et al., 2012). Au cours de la période post-natale, la contribution de telles cellules souches multipotentes sur le développement des lignages luminal et basal est controversée. En effet certaines études semblent confirmer leur existence (Rios et al., 2014; van Amerongen et al., 2012; D. Wang et al., 2015), notamment sous la forme de cellules quiescentes (Boras-Granic et al., 2014; Fu et al., 2017) réintroduites dans le cycle cellulaire sous l'effet de la grossesse (Boulanger et al., 2005; Cai et al., 2017). A l'inverse, d'autres études suggèrent plutôt que le développement de chaque compartiment à l'âge adulte repose sur l'existence de cellules souches unipotentes restreintes à un seul lignage (Van Keymeulen et al., 2011; Wuidart et al., 2016).

Ensemble, ces données plaident néanmoins pour la coexistence de cellules souches mammaires unipotentes et bipotentes dans la glande mammaire adulte murine. L'engagement et la progression de ces cellules immatures dans une voie de différenciation

spécifique dépend de l'activation de diverses voies de signalisation spécifique d'un lignage donné. Par exemple, le destin des progéniteurs luminaux dépend de l'activation de la voie NOTCH mais aussi de l'interaction avec de nombreux acteurs moléculaires tels que BRCA1 (Breast Cancer gene 1), Elf5 (E74 Like ETS Transcription Factor 5), GATA3, ER, PR, Lgr6 (Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 6), Sox3 (SRY-Box Transcription Factor 3), Sox9 (SRY-Box Transcription Factor 9), FoxM1 (Forkhead Box Protein M1) ou encore Blimp1 (Blaas et al., 2016; Carr et al., 2012; Domenici et al., 2019; Elias et al., 2017; Girardi et al., 2018; Kouros-Mehr et al., 2006; S. Liu et al., 2008; Oakes et al., 2008).

Caractéristiques des cellules souches mammaires humaines

Chez l'Homme, l'épithélium de la glande mammaire a été divisé en 4 contingents selon le niveau d'expression d'EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) et CD49f ainsi que des marqueurs de lignage CD31 et CD45. On distingue ainsi les cellules souches bipotentes ($\text{Lin}^- \text{EpCAM}^{\text{faible}} \text{CD49f}^{\text{fort}}$), les cellules basales progénitrices ($\text{Lin}^- \text{EpCAM}^{-/\text{faible}} \text{CD49f}^+$), les cellules luminales progénitrices ($\text{Lin}^- \text{EpCAM}^+ \text{CD49f}^+$) et les cellules luminales différenciées ($\text{Lin}^- \text{EpCAM}^+ \text{CD49f}^-$) (Eirew et al., 2008; Lim et al., 2009; Shehata et al., 2012; Villadsen et al., 2007). D'autres marqueurs complémentaires ont également été utilisés pour discriminer les différents contingents épithéliaux comme MUC1 (Mucin-1), CD133, CK8, CK18, CK19, CK14, THY1 (Thy-1 Cell Surface Antigen), CD10, CD24, CD44, ALDH (Aldéhyde Déshydrogénase) (Bachelard-Cascales et al., 2010; Keller et al., 2011; Shehata et al., 2012; Shipitsin et al., 2007; Stingl et al., 2001). Dans ce contexte, la preuve de l'existence de cellules souches mammaires multipotentes $\text{Lin}^- \text{EpCAM}^{\text{faible}/-} \text{CD49f}^+$ dans la glande mammaire humaine a été apportée par des tests de repopulation après greffe dans des coussins adipeux humanisés (Lim et al., 2009) ou sous la capsule rénale de souris immuno-déprimées (Eirew et al., 2008), confirmant des données d'essais in vitro ayant suggéré la présence de cellules bipotentes à la base de l'organisation hiérarchique de la glande mammaire (Gudjonsson et al., 2002; Stingl et al., 2001; Villadsen et al., 2007) (**Figure 9**).

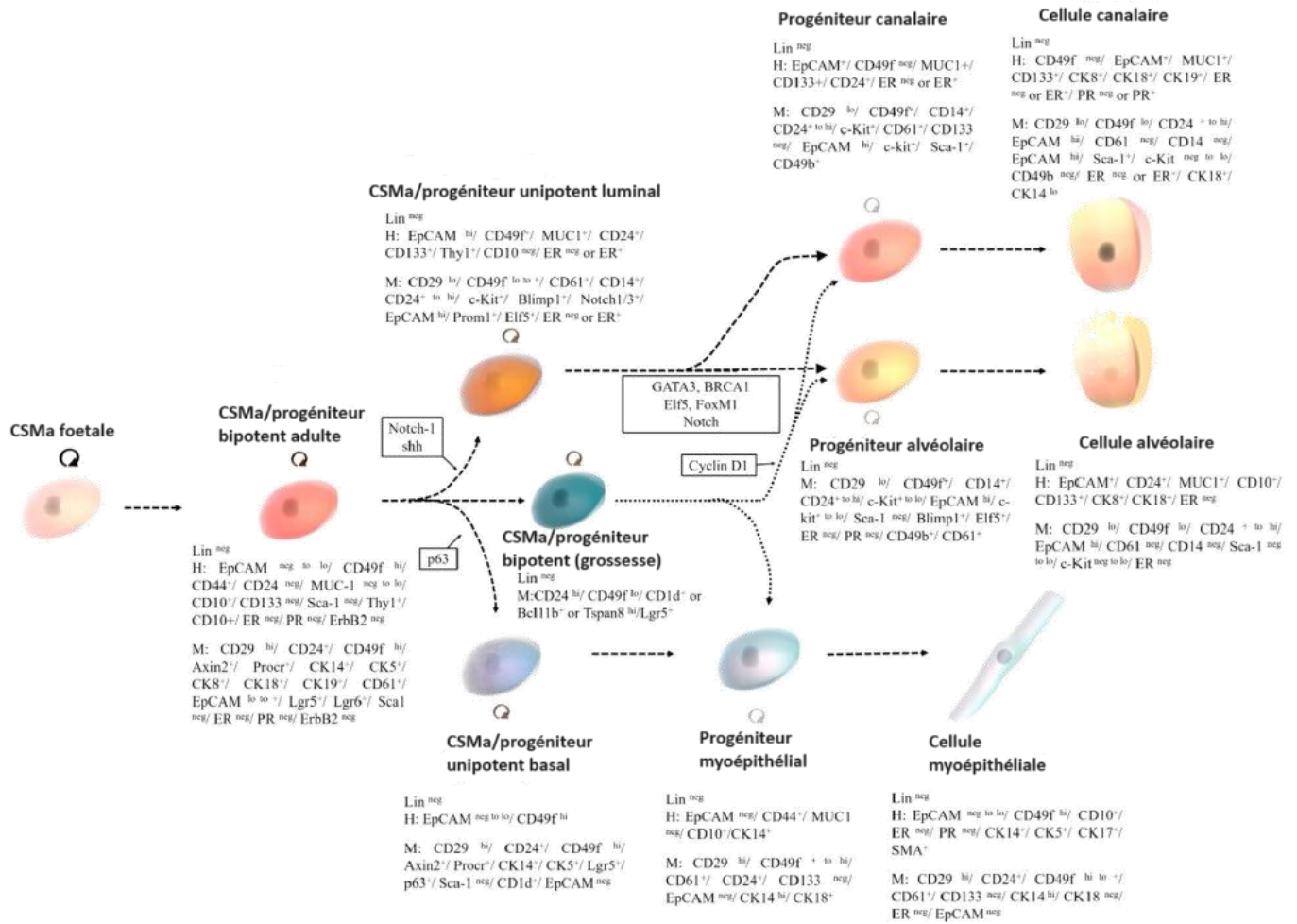


Figure 9. Modèle hypothétique d'organisation hiérarchique de la glande mammaire dans l'espèce humaine (H) et murine (M). Les marqueurs spécifiques de lignage sont annotés en dessous de chaque type cellulaire. Les étapes de différenciation sont matérialisées par des flèches en pointillés. Certains acteurs moléculaires d'intérêt impliqués dans ces transitions sont encadrés. CSMa : cellules souches mammaires. D'après Taurin 2020.

Notion de cellules souches cancéreuses

Généralités

Les similitudes entre l'organisation hiérarchique de certains cancers avec celle des organes dont ils sont issus ont conduit à l'émergence du concept de cellules souches cancéreuses. Selon ce concept, la tumorigenèse serait soutenue par la présence d'un petit contingent de cellules combinant les propriétés de cellules souches normales (auto-renouvellement, différenciation multi-lignage) et de cellules cancéreuses (prolifération, résistance à l'apoptose, invasion). Deux hypothèses coexistent pour expliquer la formation de ces cellules souches cancéreuses, dites cellules initiatrices de tumeurs. La première suppose la survenue d'évènements transformants d'origine génétique, épigénétique ou micro-environnementale directement au sein de cellules souches normales ou progéniteurs d'un tissu donné (Blokzijl et al., 2016; Chapellier et al., 2015; Morel et al., 2008; Z. Yu et al., 2012). La seconde considère l'implication de cellules plus différenciées qui au cours de leur transformation seraient en mesure d'acquérir des propriétés de cellules souches par le biais d'altérations génétiques ou sous l'influence de phénomènes de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT : Epithelial Mesenchymal Transition) (W. Guo et al., 2012; Mani et al., 2008). Dans les 2 cas, ces hypothèses inscrivent ces cellules souches cancéreuses comme acteurs majeurs de la tumorigenèse.

Implication dans la tumorigenèse

La preuve de l'existence des cellules souches cancéreuses a été apportée pour la première fois en 1994 par Lapidot et al. dans le modèle de la leucémie aigüe (Lapidot et al., 1994). Dans les tumeurs solides et plus particulièrement le cancer du sein, l'existence de telles cellules a été démontrée pour la première fois par Al-hajj en 2003 (Al-Hajj et al., 2003). Dans cette étude, les cellules $CD44^+CD24^{-/faible}$ Lignage⁻ préalablement isolées de tumeurs mammaires humaines puis réinjectées de manière orthotopique à des souris immunodéprimées, étaient capables de former de nouvelles tumeurs mammaires reconstituant toute la diversité phénotypique de la tumeur initiale. Une centaine de ces cellules étaient suffisantes pour ré-initier la tumorigenèse de cancers secondaires alors que plusieurs dizaines de milliers de cellules de phénotype différents n'en étaient pas capables (**Figure 10**).

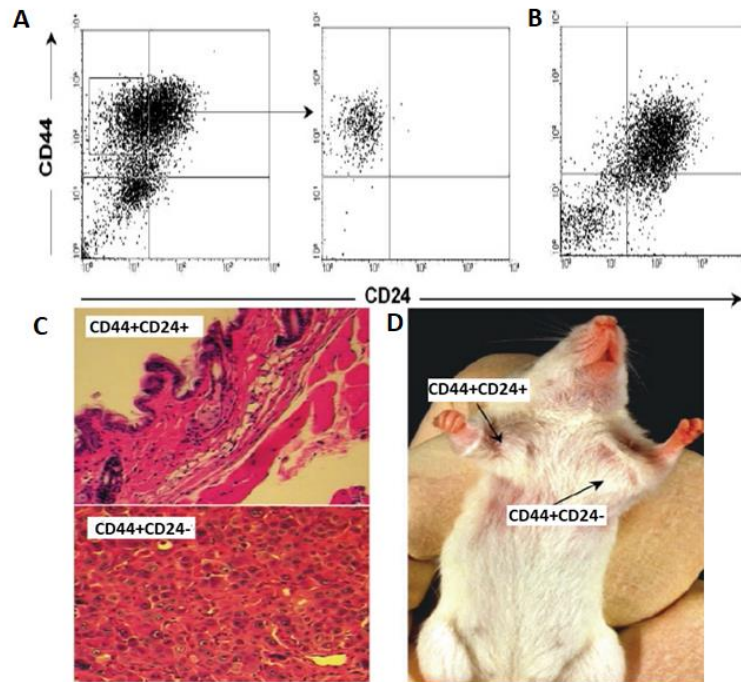


Figure 10. Preuve de concept de l'existence de cellules souches cancéreuses mammaires. La transplantation orthotopique de cellules CD44+/CD24- (isolées par FACS, fig 10A) induit la formation spécifique de tumeur au site d'injection visible à l'échelle microscopique en immunohistochimie après coloration de Papanicolaou (grossissement x100, fig 10C) et à l'échelle macroscopique (fig 10D). L'analyse en FACS d'un échantillon de la tumeur néo-formée retrouve la diversité phénotypique de la tumeur initiale (fig 10B). D'après Al-hajj 2003.

De manière intéressante, Liu et son équipe ont par la suite isolé, dans le modèle de cancer du sein triple-négatif (c'est-à-dire n'exprimant ni le récepteur aux oestrogènes, ni le récepteur à la Progestérone et ne surexprimant pas le récepteur HER2), 3 sous-types différents de cellules souches cancéreuses en fonction de l'expression de 3 marqueurs préalablement identifiés comme discriminants pour l'authentification de ces cellules : CD24, CD44 et ALDH (Al-Hajj et al., 2003; Ginestier et al., 2007). On distingue ainsi les cellules souches cancéreuses mammaires pseudo-mésenchymateuses ($ALDH^-CD24^-CD44^+$), pseudo-épithéliales ($ALDH^+CD24^+CD44^+$) et de phénotype intermédiaire ($ALDH^+CD24^-CD44^+$), ces dernières étant associées au caractère tumorigène le plus important (M. Liu et al., 2018; S. Liu et al., 2014)(Liu 2013, Liu 2018) (**Figure 11**). Ces différentes cellules sont capables de transiter d'un état phénotypique à un autre en fonction de l'intégration de signaux micro-environnementaux ou encore épigénétiques, leur permettant d'être tantôt invasives et quiescentes (sous leur forme pseudo-mésenchymateuse) tantôt d'avantage prolifératives (sous leur forme pseudo-épithéliale) (S. Liu et al., 2014). Les phénomènes d'EMT et de transition mésenchymato-épithéliale (MET pour mesenchymal epithelial transition) sont

particulièrement impliqués dans ces modifications phénotypiques (Shibue & Weinberg, 2017). De part cette plasticité, ces cellules souches cancéreuses mammaires sont également impliquées tant dans les phénomènes d'invasion et de dissémination micrométastatique que dans la prolifération secondaire macrométastatique (Balic et al., 2006; Charafe-Jauffret et al., 2010; Dionísio et al., 2020; H. Liu et al., 2010; S. Liu et al., 2014). Ainsi, l'ensemble de ces données est en faveur d'une implication des cellules souches cancéreuses non seulement dans l'initiation tumorale mais également la progression, l'invasion et la dissémination métastatique.

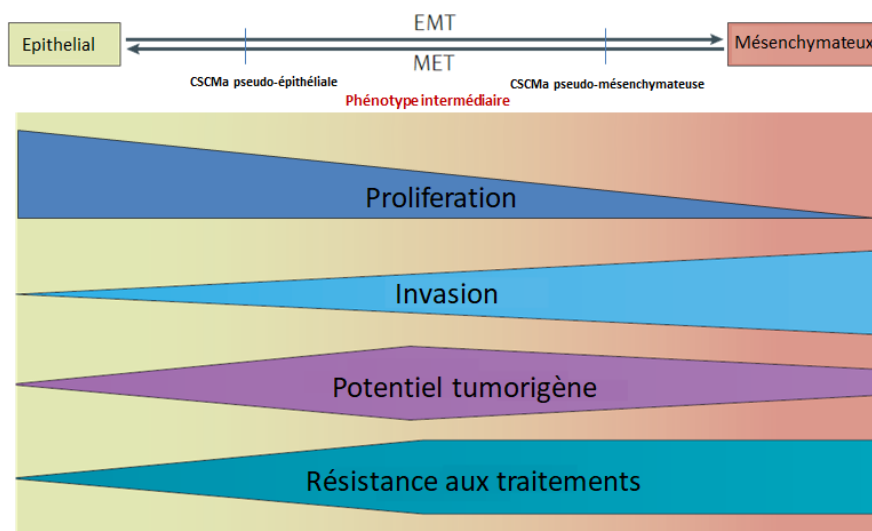


Figure 11. Plasticité des cellules souches cancéreuses mammaires. Les cellules souches cancéreuses mammaires (CSCMa) peuvent acquérir au cours du temps des traits mésenchymateux plus ou moins marqués leur permettant d'optimiser leur potentiel de migration, prolifération, résistance aux traitements et donc leur capacité tumorigène. D'après Shibue 2017.

Implication dans la résistance thérapeutique et la rechute

De plus, plusieurs travaux suggèrent également un rôle de ces cellules dans la résistance au traitement (et donc la rechute secondaire). Plusieurs propriétés biologiques des cellules souches cancéreuses semblent pouvoir expliquer ce phénomène.

Quiescence

La quiescence est un phénomène au cours duquel les cellules souches sont arrêtées à la phase G0 du cycle cellulaire, et ce de manière réversible. Les cellules souches cancéreuses partagent cette propriété par le biais de l'activation des mêmes programmes d'arrêt du cycle

cellulaire (Rumman et al., 2015). On parle alors de dormance. Or les chimiothérapies conventionnelles, de par leurs mécanismes d'action, impactent seulement les cellules en cycle. Plusieurs études ont ainsi démontré dans différents systèmes et organes que les chimiothérapies usuelles, bien qu'efficaces sur la majorité des cellules en cycle constituant la tumeur, échouent à éradiquer les cellules quiescentes et ce faisant, participent à la sélection de ces dernières ce qui favorise la progression tumorale et la rechute (Chen et al., 2012; Kurtova et al., 2015).

Diminution des dérivés réactifs de l'oxygène et résistance multi-drogue

L'ALDH est une enzyme cytoplasmique permettant de limiter le niveau de dérivés réactifs de l'oxygène grâce à son action d'oxydation des aldéhydes intracellulaires. Sa surexpression a été identifiée dans différents types de cellules souches cancéreuses, notamment les cellules souches cancéreuses mammaires (Ginestier et al., 2007), et associée à la résistance à de nombreux traitements anti-cancéreux (Crocker & Allan, 2012; Huang et al., 2013). Par ailleurs, les cellules souches cancéreuses mammaires surexpriment également d'autres gènes impliqués dans l'élimination des radicaux libres de l'oxygène notamment par le biais du métabolisme du glutathion (Diehn et al., 2009). Enfin, les cellules souches cancéreuses surexpriment également régulièrement les protéines de la famille ABC (ATB binding cassette) qui sont des pompes à efflux permettant à de nombreuses drogues d'être transportées en dehors de la cellule par des mécanismes de transport actif dépendants de l'ATP (Begicevic & Falasca, 2017).

Augmentation de la réponse aux dommages à l'ADN et résistance à l'apoptose

De manière similaire aux cellules souches normales (Mujoo et al., 2017), les cellules souches cancéreuses arborent également des mécanismes particulièrement développés de réponse aux dommages à l'ADN (Blanpain et al., 2011; Maugeri-Saccà et al., 2012), contribuant à leur radio et chimio-résistance. Ainsi, on retrouve fréquemment dans différents types de cellules souches cancéreuses une surexpression de gènes impliqués dans le maintien de la stabilité du génome (Abad et al., 2020; Cheng et al., 2011; Desai et al., 2014), en particulier certains gènes impliqués dans la réparation des cassures double brins de l'ADN par recombinaison homologue (RH) (Desai et al., 2014; King et al., 2017; Wu et al., 2014). Dans ce contexte, Liu

et al. ont par exemple démontré que dans les carcinomes mammaires triple négatifs, une augmentation de l'activité de RAD51 est à l'origine de la chimio-résistance des cellules souches cancéreuses mammaires (Y. Liu et al., 2017). En parallèle, une inhibition aberrante de l'apoptose a été décrite dans ces cellules, notamment par le biais de la surexpression des protéines anti-apoptotiques survivin et cFLIP (cellular FLICE-like inhibitory protein), contribuant également à leur chimio-résistance (French et al., 2015; C.-J. Yu et al., 2015). Les caractéristiques principales des cellules souches cancéreuses mammaires sont illustrées dans la **Figure 12**.

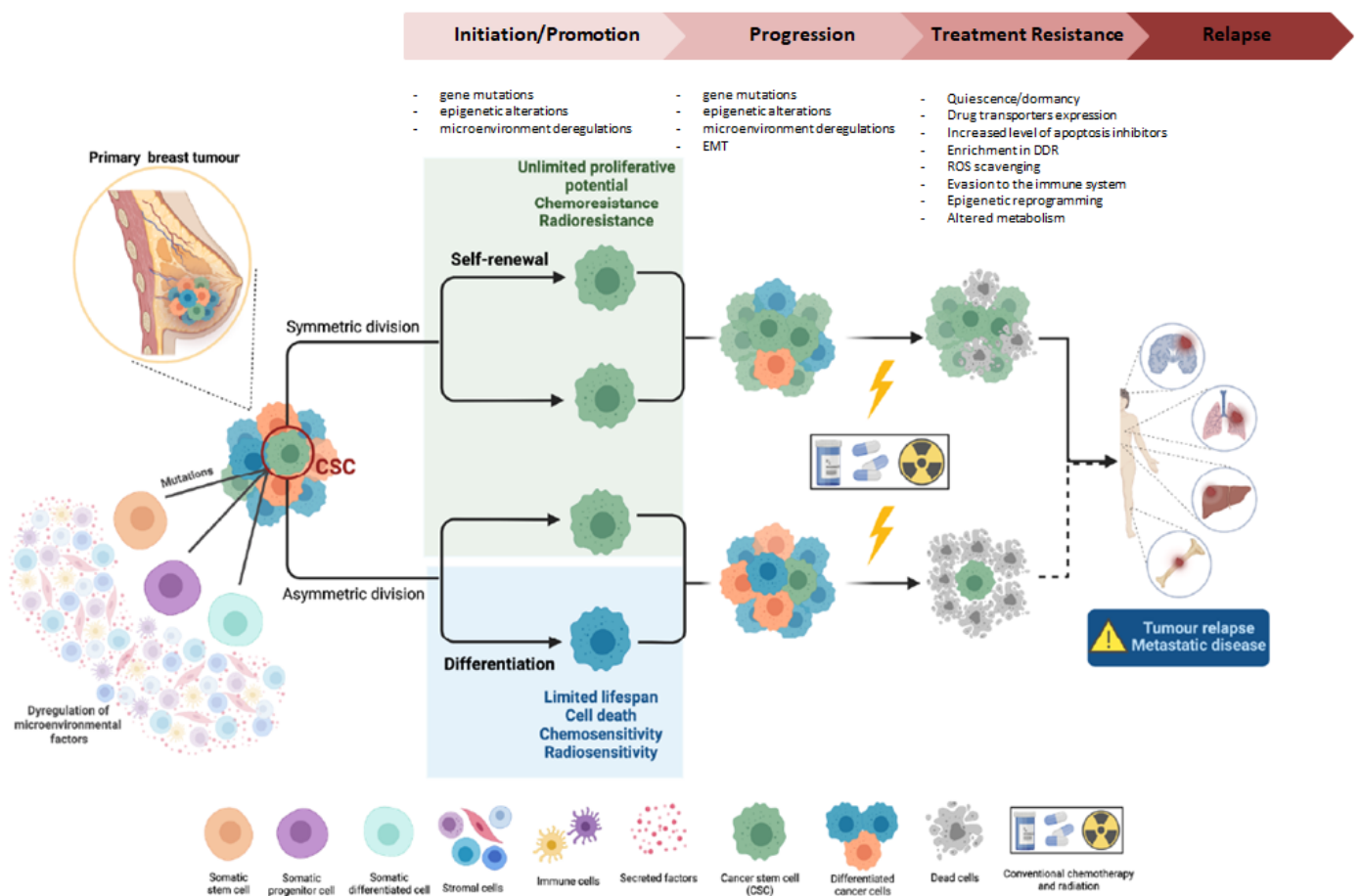


Figure 12. Caractéristiques principales des cellules souches cancéreuses mammaires. D'après Conde 2022.

Caractérisation

Plusieurs méthodes ont été développées pour caractériser et identifier les cellules souches cancéreuses. Tout comme les cellules souches normales, les cellules souches cancéreuses sont capables de former des sphères in vitro et de maintenir cette capacité après plusieurs

passages (A. P. Deshmukh et al., 2022). In vivo, les cellules souches cancéreuses sont également capables de former des tumeurs après transplantation orthotopique chez des souris immunodéprimées (Al-Hajj et al., 2003), méthode qui est toujours considérée à ce jour comme étant le test de référence. Par ailleurs, bien qu'il n'existe pas de marqueurs universels pour caractériser les cellules souches cancéreuses, plusieurs protéines ont été évaluées dans cet intérêt. Ces marqueurs correspondent à des protéines transmembranaires ou intracellulaires ainsi qu'à certains facteurs de transcription et sont variables selon le sous-type de cellules souches cancéreuses considéré. Par exemple, concernant les cellules souches cancéreuses mammaires, les protéines transmembranaires les plus reconnues sont CD44 et CD24, dans le cadre d'un phénotype classiquement CD44⁺CD24⁻ (Al-Hajj et al., 2003; Beça et al., 2013; Fillmore & Kuperwasser, 2008; Ponti et al., 2005). CD49f, EpCAM, Cadherin 3, CD133 ou encore CXCR1 (C-X-C Motif Chemokine Receptor 1) ont également été décrits comme étant fortement exprimés dans les cellules souches cancéreuses mammaires (Crocker et al., 2009; Ginestier et al., 2010; Osta et al., 2004; To et al., 2010; Vieira et al., 2012). D'autre part, il a également été démontré que l'activité et l'expression de l'enzyme ALDH peuvent être utilisées comme biomarqueur des cellules souches mammaires normales et cancéreuses (Ginestier et al., 2007). Enfin, plusieurs facteurs de transcription impliqués dans la régulation des cellules souches pluripotentes normales ont été identifiés comme biomarqueurs des cellules souches cancéreuses mammaires. On peut notamment citer Sox2, Oct4 (Octamer-binding transcription factor 4), Klf4 (Kruppel-like factor 4) et Nanog (Gwak et al., 2017; Leis et al., 2012; D. Wang et al., 2014; Z. Yu et al., 2012). Le facteur de transcription inducteur d'EMT ZEB1 (Zinc finger E-box-binding homeobox 1) a également été étudié (Preca et al., 2015; Sun et al., 2022; X. Zhang et al., 2014).

Principales voies de signalisation régulatrices

Les principales voies de signalisation régulant la biologie des cellules souches cancéreuses mammaires sont les voies Wnt/ β -catenin, NOTCH, et Hedgehog (schématisées dans la **Figure 13**) ainsi que la voie BMP/TGF β qui fera l'objet d'un développement particulier dans cette introduction.

La voie Wnt / β -catenin

Plusieurs auteurs ont mis en évidence l'implication de la voie Wnt/ β -catenin, sous ses formes canonique et non canoniques, dans la régulation des cellules souches cancéreuses

mammaires. Par exemple, dans les cancers du sein triple-négatifs, Sulaiman et al. ont démontré des niveaux d'activation différents de la voie Wnt/ β -catenin en fonction du phénotype pseudo-épithélial ou pseudo-mésenchymateux des cellules souches cancéreuses mammaires (Sulaiman et al., 2018). D'autres études ont également mis en évidence l'importance de cette voie de signalisation dans la biologie des cellules souches cancéreuses mammaires, quel que soit le sous-type de cancer du sein considéré (Agur et al., 2011; Bhuvanlakshmi et al., 2017; A. Deshmukh et al., 2018; DiMeo et al., 2009; Forget et al., 2007; Hardt et al., 2012; Miller-Kleinhenz et al., 2018; D. Wang et al., 2014), mais avec un tropisme prédominant pour les cancers triple-négatifs (pour revue Pohl et al., 2017). Par ailleurs, de nombreux gènes codant pour différents régulateurs négatifs de la voie Wnt/ β -catenin apparaissent également réprimés dans les carcinomes mammaires (le plus souvent par le biais de mécanismes épigénétiques), conduisant à une sur-activation de la voie et à l'acquisition et au maintien d'un phénotype de cellule souche cancéreuse. C'est notamment le cas de WIF1 (Wnt Inhibitory Factor 1), SFRP1-5 (Secreted Frizzled Related Proteins 1-5), DKK3 (Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor 3), DACT1 (Dishevelled Binding Antagonist Of Beta Catenin 1), ou encore APC (Adenomatous Polyposis Coli) (Ai et al., 2006; F. C. Geyer et al., 2011; Klarmann et al., 2008; S. Y. Park et al., 2012; Veeck et al., 2009; X. Yin et al., 2013).

La voie NOTCH

La voie NOTCH est également impliquée dans la régulation des cellules souches cancéreuses mammaires (Hoey et al., 2009; Mamaeva et al., 2016; Rizzo et al., 2008; Sansone et al., 2007). Plusieurs effecteurs de la voie ont été décrits comme sur-activés dans les carcinomes mammaires avec des spécificités selon le sous-type considéré. Ainsi l'activité de NOTCH1 semble plutôt associée in vitro à la régulation des cellules souches cancéreuses des tumeurs luminales (J. Mao et al., 2013; E. Y. Park et al., 2014) même si son implication dans les tumeurs triple-négatives (Gonzalez et al., 2014; Lagadec et al., 2012) et surexprimant HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2) (Magnifico et al., 2009; Osipo et al., s. d.) a également été décrite. Pour leur part, NOTCH 2 et 4 ont été associés in vitro à la régulation des cellules souches cancéreuses mammaires dans la lignée MCF7, ce qui suggère plutôt leur implication dans les cancers du sein de sous-type luminal (Agur et al., 2011; Harrison et al., 2010; S.-H. Kim & Singh, 2015). NOTCH 3 par ailleurs a lui été associé à la fois aux tumeurs

triple-négatives in vivo (Choy et al., 2017) et luminales in vitro (Sansone et al., 2007). Enfin, plusieurs modifications post transcriptionnelles de régulateurs négatifs de la voie NOTCH, notamment la protéine NUMB, ont été décrites. Le microARN miR-146a est impliqué dans ces aspects (X. Wang et al., s. d., p. 8; Z. Wang et al., 2010).

La voie Hedgehog

La voie Hedgehog est une voie développementale également associée à la régulation des cellules souches cancéreuses mammaires au sein desquelles plusieurs effecteurs de la voie sont retrouvés impliqués. Ainsi, l'implication de Gli1 a été démontrée in vitro par des procédés d'interférence par ARN, que cela soit dans le contexte de carcinome mammaire triple-négatif (Colavito et al., 2014; Goel et al., 2013; Koike et al., 2017) ou de profil luminal. L'activité de Gli2 a été préférentiellement rapportée dans le contexte triple-négatif (Han et al., 2015).

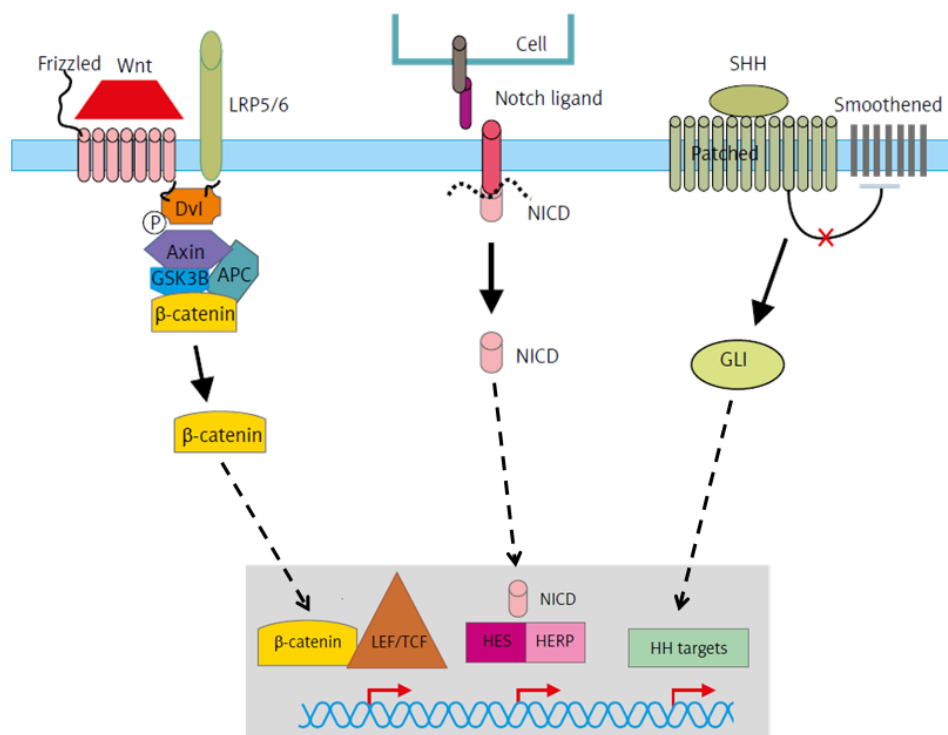


Figure 13. Représentation schématique des voies canoniques Wnt/βcatenin, NOTCH et Hedgehog. En l'absence d'interaction du ligand Wnt avec ses co-récepteurs Frizzled et LRP5/6, le βcatenin est stabilisée par un complexe multi-protéique impliquant Axin, GSK3B et APC. La fixation de Wnt à ses récepteurs induit la libération de la βcatenin qui peut interagir avec les facteurs de transcription LEF/TCF conduisant à la transcription des gènes cibles de la voie. L'interaction des récepteurs NOTCH avec leurs ligands, exprimés à la membrane des cellules activatrices, induit le clivage du domaine intracellulaire de NOTCH (NICD : NOTCH Intracellular Domain) et secondairement sa translocation dans le noyau afin de favoriser la transcription des gènes cibles. La fixation de Sonic Hedgehog (SHH) à son récepteur transmembranaire Patched active son partenaire Smoothened. Smoothened réprime la séquestration cytoplasmique de l'effecteur GLI qui peut alors transloquer dans le noyau et engendrer ainsi la transcription des gènes cibles de la voie. D'après Czerwinska 2015.

La voie des Bone Morphogenetic Proteins/TGFβ

Généralités

Les BMP (Bone Morphogenetic Proteins) sont des morphogènes décrits pour la première fois en 1965 par Urist et al. Ils ont initialement été ainsi dénommés du fait de leur capacité à induire de manière ectopique la formation d'os et de cartilage en favorisant la différenciation de cellules souches mésenchymateuses en ostéoblastes et chondroblastes (Wozney et al., s. d.). Les BMP constituent la plus large sous-famille de la superfamille du TGF-β (Weiskirchen, 2009) (**Figure 14**).

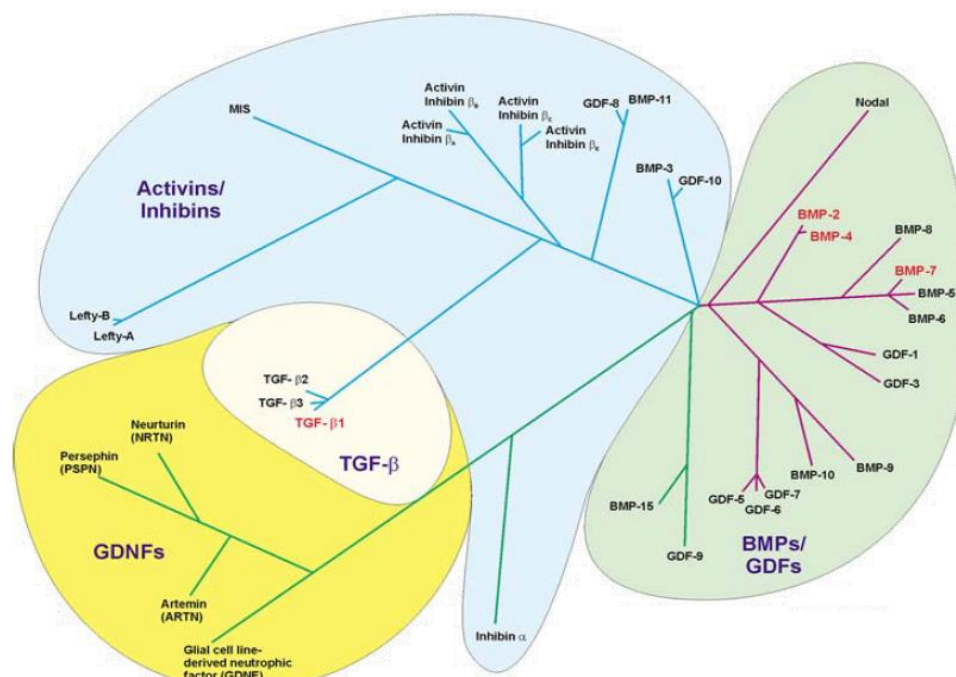


Figure 14. Arbre phylogénique distinguant les 4 sous-groupes de la superfamille du TGFβ déterminés selon leur analogie moléculaire et structurale. D'après Weiskirchen 2009.

Les autres sous-groupes incluent les activins/inhibins, les GDF (Growth Differentiation factors), les GDNF (Glial Derived Neurotrophic Factors) et la sous-famille TGF-β. La sous-famille des BMP est par ailleurs elle-même subdivisée en 4 grands sous-groupes en fonction de l'homologie structurale entre ses différents éléments : BMP2/4, BMP5/6/7/8, BMP9/10 et BMP12/13/14 (également appelés GDF7, 6 et 5) (Miyazono et al., 2010). Les BMP jouent un rôle crucial dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que la différenciation, la prolifération, l'apoptose et la motilité cellulaire, particulièrement dans les processus développementaux au cours de l'embryogénèse et de maintien de l'homéostasie tissulaire à

l'âge adulte (Basson, 2012; Marsell & Einhorn, 2009; Sountoulidis et al., 2012). Ces différentes caractéristiques en font des régulateurs importants des cellules souches normales. Des dysfonctionnements de cette voie de signalisation peuvent donc conduire à l'émergence de cellules souches cancéreuses notamment de cellules souches cancéreuses mammaires comme successivement passé en revue par différents auteurs (Alarmo & Kallioniemi, 2010; T. Sharma et al., 2022; Ye, 2009; Zabkiewicz et al., 2017).

Les ligands

Les ligands de la voie BMP sont des cytokines solubles essentiellement sécrétées par le compartiment stromal des organes et le microenvironnement des tumeurs. Sous leur forme active, ces ligands s'organisent en homo ou hétéro-dimères. Ils sont sécrétés sous la forme de précurseurs constitués de 400 à 500 acides aminés. Ces précurseurs comprennent un domaine N terminal nécessaire à leur prise en charge initiale dans le reticulum endoplasmique, un pro-domaine qui assure leur stabilisation et dans certains cas favorise leur dépôt dans la matrice extra-cellulaire une fois sécrétés et un domaine actif C terminal voué à interagir directement avec les récepteurs cibles (Bragdon et al., 2011; Weiskirchen, 2009). Une fois le domaine N terminal clivé, les précurseurs vont être glycosylés ce qui va permettre leur dimérisation. Après la dimérisation, le domaine actif va pouvoir être libéré après clivage du pro-domaine au niveau d'un site dibasique. La forme biologiquement active des ligands BMP se présente donc typiquement sous la forme de dimères de 50 à 100 acides aminés par monomère. Chaque monomère est stabilisé par 3 ponts disulfures reliant 6 cystéines distinctes. Par exemple, la structure des ligands BMP2 et BMP4 est détaillée dans la **Figure 15**.

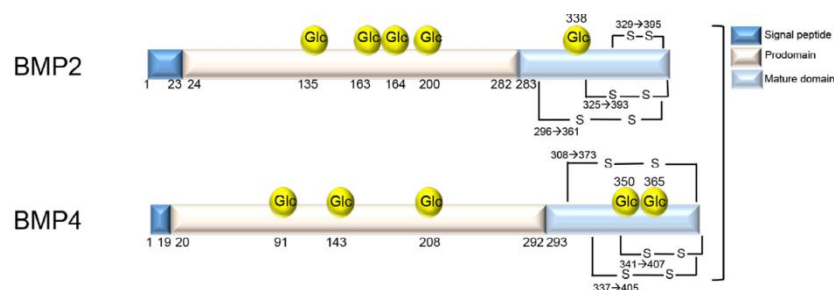


Figure 15. Organisation structurale des ligands BMP2 et BMP4. D'après Zylbersztejn 2018.

Les monomères sont reliés en dimères grâce à un autre pont disulfure engageant une 7^{ème} cystéine (Nelsen & Christian, 2009; Sieber et al., 2009; Xiao et al., 2007). Classiquement une organisation en homo-dimères a été historiquement décrite bien que des hétéro-dimères aient également été secondairement mis en évidence in vivo et in vitro avec même des capacités d'activation de la signalisation plus importantes que les homo-dimères correspondants. On peut citer notamment les hétéro-dimères BMP2/5, BMP2/6, BMP2/7 et BMP4/7 (Little & Mullins, 2009; Sieber et al., 2009). Une fois dimérisés, les ligands BMP vont être sécrétés dans le compartiment extra-cellulaire au sein de vésicules ou sous forme libre. Ils y seront séquestrés par le biais d'interactions avec les éléments de la matrice extra-cellulaire afin d'être présentés à leurs récepteurs cibles (Ramirez & Rifkin, 2009; Sengle et al., 2008) (Figure 16).

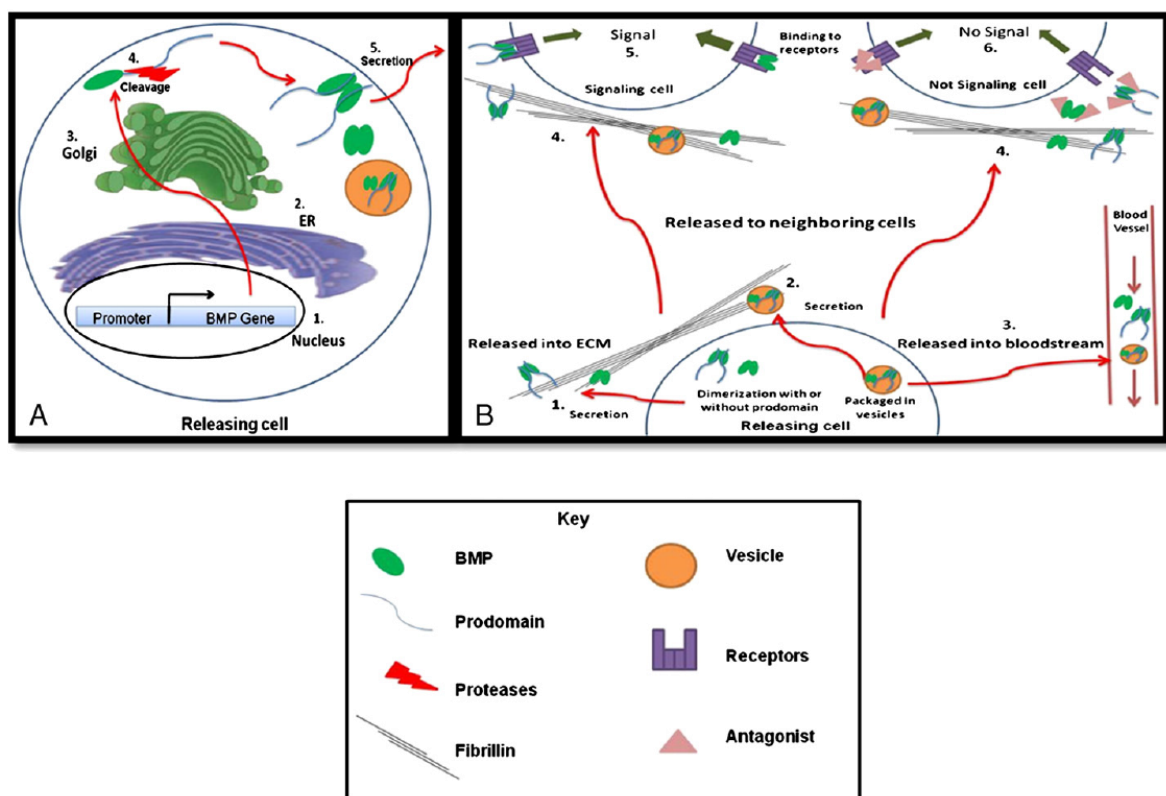


Figure 16. Les différentes étapes de synthèse et de sécrétion des ligands BMP. Après une phase de transcription dans le noyau, les ligands BMP sont traduits dans le reticulum endoplasmique et subissent des modifications post-traductionnelles dans le Golgi. Par la suite, les ligands se dimérisent, avec ou sans leur pro-domaine, celui-ci pouvant être ou non préalablement clivé. Les dimères de BMP sont ensuite sécrétés sous forme libre ou empaquetés dans des vésicules et vont pouvoir interagir avec les éléments de la matrice extra-cellulaire d'une part et les différents éléments régulateurs et effecteurs de la voie d'autre part. D'après Bragdon 2011.

Les récepteurs

Il existe deux grandes classes de récepteurs aux BMP (BMPR), les récepteurs de type I et les récepteurs de type II, qui sous leur forme active s'organisent en hétéro-tétramères (2 récepteurs de chaque type) à la membrane plasmique (Derynck & Zhang, 2003). Ces 2 types de récepteurs partagent une structure commune constituée d'un court domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire doté d'une activité sérine-thréonine kinase. Par exemple, la structure des récepteurs BMPR1A, BMPR1B et BMPR2 sont illustrés dans la **Figure 17**.

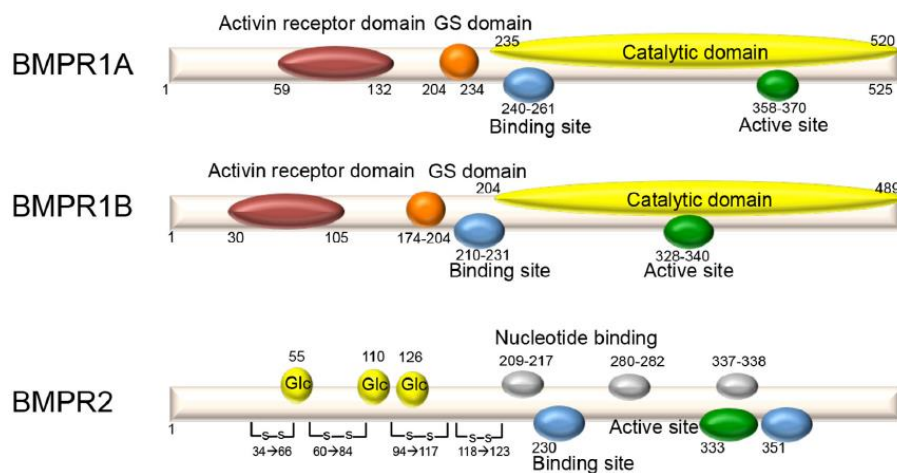


Figure 17. Organisation structurale des récepteurs BMPR1A, BMPR1B et BMPR2. D'après Zylbersztejn 2018.

Les 2 types de BMPR sont nécessaires à la transduction du signal. Ainsi les ligands BMP se fixent sur les récepteurs de type I, soit déjà associés à la membrane à des récepteurs de type II dans le cadre de structures hétéro-tétramériques, soit présents sous forme d'homodimères. Dans ce dernier cas, la fixation du ligand sur un homo-dimère de type I induit le recrutement secondaire d'un homodimère de type II (Zabkiewicz et al., 2017). Lorsque les 2 types de récepteurs sont couplés sous formes de complexes pré-formés, ceci induit néanmoins une augmentation drastique de leur affinité de fixation (Rosenzweig et al., 1995). Dans tous les cas, le récepteur de type II va ensuite phosphoryler le récepteur de type I ce qui va initier la transduction du signal. Il existe 7 récepteurs de type I différents, sub-divisés en 3 sous-groupes en fonction de leur homologie structurale et fonctionnelle. Ainsi on distingue (i) le groupe BMPRI constitué des récepteurs BMPR1A (ou ALK3) et BMPR1B (ou

ALK6), (ii) le groupe ALK1 constitué des récepteurs ALK1 et ALK2, (iii) le groupe T β R1 constitué des récepteurs ALK4 (ou ActRIB), ALK5 (ou T β RI) et ALK-7 (Kawabata, 1998). Les récepteurs du groupe BMPR1 et ALK1 vont activer les mêmes effecteurs intracellulaires de la famille SMAD (Small Mothers Against Decapentaplegic), à savoir SMAD1/5/8, tandis que les récepteurs du groupe T β R1 vont activer SMAD2/3. Ces différents récepteurs présentent une affinité variable pour les différents ligands. Par exemple BMP2 et BMP4 présentent une affinité particulière pour BMPR1A et BMPR1B (**Tableau 1**). Cette affinité peut par ailleurs être modulée par les récepteurs de type II (P. B. Yu et al., 2005) dont il existe 3 types : BMPRII, ActRII et ActRIIB. BMPRII est spécifique de la signalisation BMP tandis qu'ActRII et ActRIIB peuvent interagir avec des ligands associés à d'autres voies de signalisation, notamment la signalisation activin/myostatin. Enfin, les récepteurs de type I et de type II sont suffisants pour transduire la signalisation initiée par les ligands BMP. Néanmoins, l'interaction ligands/récepteurs peut être modulée par des co-récepteurs. Par exemple, les protéines de la famille RGM (Repulsive Guidance Molécule), notamment RGMa, RGMb (autrement appelé DRAGON) et RGMc (autrement appelé hemojuvelin) sont des co-récepteurs pour BMP2 et BMP4 dont ils augmentent l'activité (Babitt et al., 2005, 2006; Samad et al., 2005).

BMP ligands	Type II receptors	Type I receptors
BMP-2, BMP-4	BMPR-II, ActR-II, ActR-IIB	ALK3(BMPR-IA), ALK6(BMPR-IB)
BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8A, BMP-8B	BMPR-II, ActR-II, ActR-IIB	ALK2(ActR-I), ALK6(BMPR-IB)
BMP-9, BMP-10	BMPR-II, ActR-II, ActR-IIB	ALK1, ALK2(ActR-I)
GDF-5(BMP-12), GDF-6(BMP-13), GDF-7(BMP14)	BMPR-II, ActR-II, ActR-IIB	ALK6(BMPR-IB)

Tableau 1. Affinité préférentielle des ligands BMP pour différents récepteurs de type I et II. D'après Ehata 2022.

La transduction du signal

Une fois les récepteurs de type I phosphorylés par les récepteurs de type II au niveau de leur domaine riche en glycine-sérine, ces derniers se retrouvent sous leur forme active leur permettant de recruter des effecteurs intracellulaires assurant la transduction du signal.

Celle-ci peut s'effectuer selon 2 voies distinctes : une voie dite canonique, dépendante des effecteurs SMAD et une voie non canonique, indépendante des SMAD.

La voie canonique dépendante des SMAD

Les SMAD sont des effecteurs essentiels qui permettent de transduire le signal de la membrane plasmique jusqu'aux gènes cibles de la voie dans le noyau. Huit SMAD différents ont été identifiés chez les mammifères.

Le premier groupe est constitué des R-SMAD (Regulatory SMADs pour SMADs régulés par les récepteurs) parmi lesquels SMAD1/5/8 sont globalement associés à la signalisation BMP et SMAD2/3 à la signalisation TGF β /activin. Les R-SMAD sont composés d'une région N terminale et d'une région C terminale qui sont des structures hautement conservées nommées respectivement MH (Mad Homology) 1 et MH2, séparées l'une de l'autre par une région variable. A l'extrémité du domaine MH1, les R-SMAD présentent un motif spécifique Ser-Ser-X-Ser qui correspond au site de phosphorylation par les récepteurs de type I. Le domaine MH2 favorise lui l'interaction avec les récepteurs, les autres SMAD, les régulateurs et facteurs transcriptionnels ainsi que l'ADN. En l'absence de phosphorylation par le récepteur, les domaines MH1 et MH2 interagissent physiquement et s'inhibent l'un et l'autre. Après phosphorylation, cette interaction disparaît et les R-SMAD sous leur forme activée s'organisent en structure oligomérique avec SMAD 4 (2 R-SMAD associés à 1 SMAD4) ce qui leur permet de rejoindre le noyau et participer à la transcription des gènes cibles (Kawabata, 1998; Qin et al., s. d.; Y. Shi et al., 1997). La région variable est constituée de divers motifs qui peuvent être la cible de phosphorylation par différentes kinases (certaines MAP kinases et GSK3 (Glycogène Synthase Kinase) notamment), ce qui induit leur dégradation par le biais de la voie ubiquitin-proteasome.

Le deuxième groupe est uniquement composé de SMAD4 qui est un Co-SMAD (pour common partner SMAD) partagé par les voies BMP et TGF β /activin. Sa structure est similaire aux R-SMAD puisqu'il contient également une région MH1 et MH2 séparées l'une de l'autre par une région variable. Il ne contient pas cependant de site de phosphorylation Ser-Ser-X-Ser à son extrémité C terminale.

Enfin, le dernier groupe comprend SMAD6 et SMAD7 qui sont des I-SMADs (inhibiteurs de SMAD). Ces derniers présentent également un domaine NH2 C terminal (sans site Ser-Ser-X-Ser), un domaine variable, mais pas de domaine NH1.

Toutes les SMAD, à l'exception de SMAD4 et SMAD8 présentent en outre au sein de leur domaine variable un motif PY (contenant une séquence PPXY) responsable de l'interaction avec certaines ubiquitin-ligases (**Figure 18**).

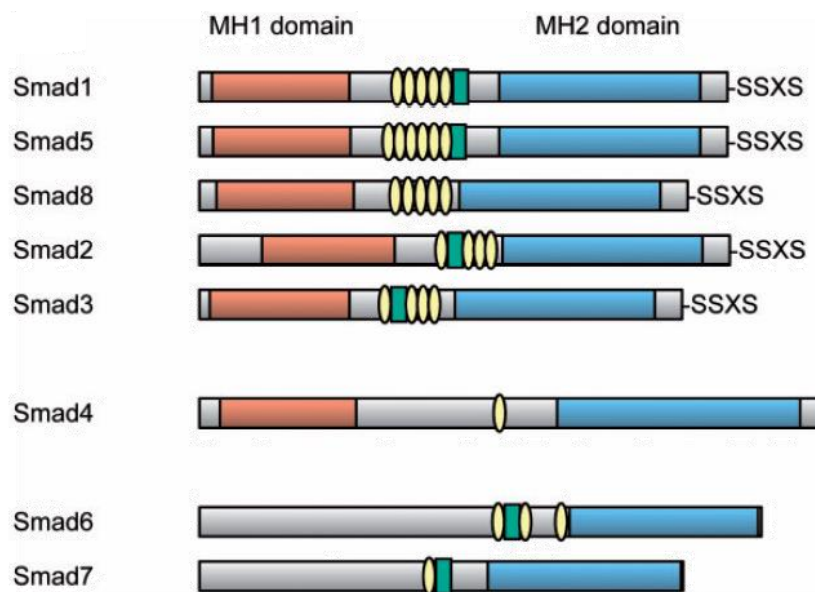


Figure 18. Organisation structurale des effecteurs SMAD. D'après Miyazono 2009.

L'initiation de la voie canonique implique donc la fixation des dimères de ligands BMP directement à des complexes tétramériques pré-formés de 2 récepteurs de type I et 2 récepteurs de type II au sein de régions spécifiques de la membrane plasmique riches en clathrine (Hartung et al., 2006; Nohe et al., 2002). A ce niveau, certaines molécules comme l'endofin ou CD44 interagissent avec les R-SMAD et favorisent leur présentation aux récepteurs de type I (Peterson et al., 2004; W. Shi et al., 2007). Les R-SMAD sont ensuite phosphorylés et oligomérisés avec SMAD4. Le complexe R-SMAD-SMAD4 peut ainsi transloquer dans le noyau où il régule la transcription des gènes cibles soit en interagissant directement avec l'ADN en se fixant sur des éléments de réponse de type SBE (SMAD Binding DNA element), soit en interagissant avec différents facteurs transcriptionnels, soit enfin en

recrutant d'autres co-activateurs (OAZ pour Ornithine decarboxylase antizyme, p300, CPB pour CREB Binding Protein) et co-répresseurs transcriptionnels (HDAC pour Histone Désacétylase, Ski ou encore FOXO pour Forkhead box O) (Massagué et al., 2005; Massagué & Wotton, s. d.; Nemer & Nemer, 2003).

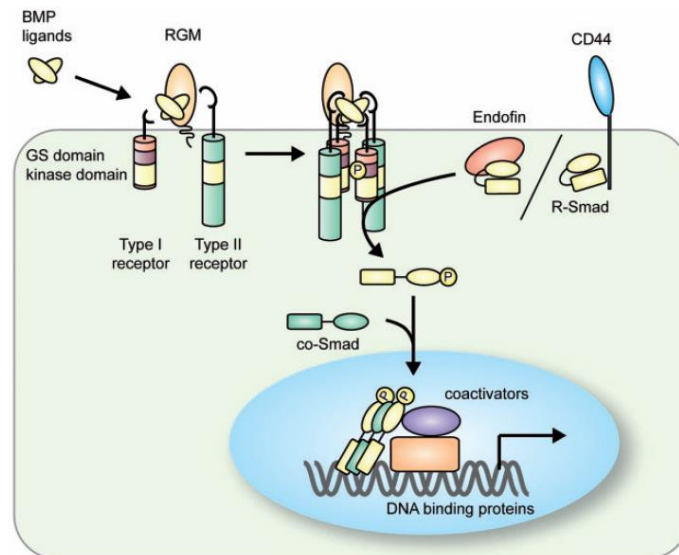


Figure 19. Représentation schématique de la voie canonique dépendante des SMAD. La fixation des dimères BMP à leurs récepteurs transmembranaires induit l'activation des R-SMAD et leur association au co-SMAD SMAD4 formant ainsi un complexe capable de transloquer dans le noyau pour activer la transcription des gènes cibles de la voie. D'après Miyazono 2009.

De nombreux gènes cibles de la voie BMP ont été identifiés dans différents systèmes. Par exemple, dans le contexte de la différenciation ostéoblastique des cellules immatures mésenchymateuses, certains sont exprimés rapidement après exposition aux BMP (environ 2 heures après) et sont considérés comme des gènes de réponse précoce immédiate. D'autres sont exprimés un peu plus tardivement (6 et 24 heures environ) et sont appelés respectivement gènes de réponse précoce intermédiaire et précoce tardive (Jong et al., 2004). Parmi les gènes cibles des BMP les plus décrits, on retrouve les 4 isoformes des régulateurs transcriptionnels négatifs de la famille Id (Id1-4), le facteur de transcription Runx2 (Ito & Miyazono, 2003; Miyazono & Miyazawa, 2002) ou encore les I-SMAD SMAD6 et SMAD7 dans le cadre d'un rétro-contrôle négatif d'auto-régulation de la voie (cf infra).

La voie non canonique indépendante des SMAD

Dans le cadre de la voie non canonique, les ligands BMP se fixent d'abord sur un dimère de récepteurs de type I avec recrutement secondaire d'un dimère de récepteurs de type II. Ce

processus a lieu préférentiellement au niveau de domaines membranaires riches en cavéoline. Il en résulte l'activation de diverses voies de signalisation dépendantes des MAP kinases (MAPK pour Mitogen-activated protein kinases) notamment les voies ERK (Extracellular Signal Regulated Kinase), JNK (c-Jun N-terminal kinase), p38 ou encore NFκB (facteur nucléaire kappa B). Les mécanismes d'activation de ces voies restent mal élucidés mais il semblerait que la protéine XIAP (X-Linked Inhibitor Of Apoptosis) soit recrutée et activée dans un premier temps par le biais de sa fixation aux domaines cytosoliques des récepteurs de type I et II (Yamaguchi, 1999). XIAP activerait ensuite secondairement la MAPK kinase kinase (M3K) TAK1 (TGFβ activated kinase 1). La M3K MEKK1 pourrait aussi être impliquée dans la transduction du signal BMP non canonique. Ainsi TAK1 et MEKK1 pourraient activer JNK par l'intermédiaire de la MAPK kinase (M2K) MKK4 et p38 par l'intermédiaire de MKK3 et MKK6. Il semblerait également que TAK1 puisse phosphoryler et activer la kinase IκB, stimulant ainsi la voie NFκB. Enfin ERK serait activée suite à l'activation de RAS par les récepteurs de type I/II (Derynck & Zhang, 2003) (**Figure 20**). L'activation de ces différentes MAPK conduirait ainsi à la transcription des gènes cibles (Hartung et al., 2006; Nohe et al., 2002).

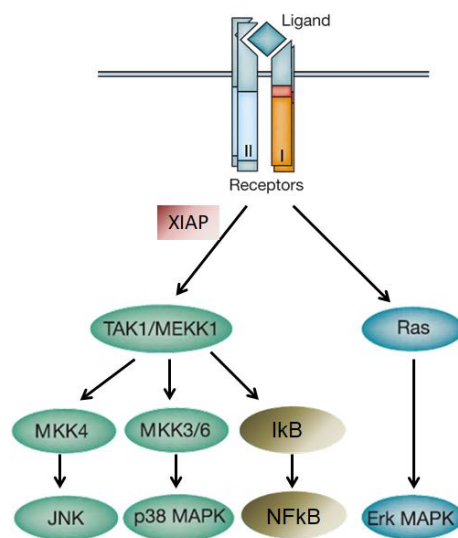


Figure 20. Représentation schématique de la voie non canonique, indépendante des SMAD. D'après Derynck 2003.

La régulation du signal

La signalisation BMP, au vu des nombreuses fonctions biologiques qu'elle promeut, est très finement régulée à plusieurs niveaux.

Tout d'abord, un premier niveau de régulation est en rapport avec la disponibilité des ligands. Ainsi, la nature et la composition de la matrice extra-cellulaire influent sur la manière dont les BMP sont retenus dans l'espace extra-cellulaire et disponibles pour fixation à leurs récepteurs (Corradini et al., 2009). Par ailleurs, il existe plusieurs molécules solubles sécrétées dans le compartiment extra-cellulaire qui ont la capacité de moduler la disponibilité des ligands. Par exemple, la noggin, la chordin et la gremlin se lient directement aux ligands BMP, empêchant leur fixation aux récepteurs (Reddi, s. d.). La follistatin se lie également aux BMP, formant avec eux un complexe ternaire qui va venir antagoniser l'activité des récepteurs (Balemans & Van Hul, 2002).

Un deuxième niveau de régulation concerne la disponibilité des récepteurs à la membrane plasmique. En effet, des phénomènes d'endocytose, dépendants des clathrines ou des cavéolines, en diminuant la présence, limitant ainsi la quantité de néo-signal. Néanmoins, il a été montré que ces mécanismes d'endocytose sont nécessaires à la bonne transduction du signal une fois les ligands fixés sur leurs récepteurs (Hartung et al., 2006). La protéine transmembranaire BAMBI (BMP and activin membrane-bound inhibitor) est un pseudo-récepteur dont le domaine extra-cellulaire est très similaire à celui des BMPRI mais dont le domaine intra-cellulaire est raccourci et dépourvu d'activité sérine-thréonine kinase (Onichtchouk et al., 1999). Ce pseudo-récepteur est capable de se dimériser avec des récepteurs de type I ou II, inhibant leur activité (Canalis et al., 2003). En revanche, comme mentionné plus haut, les co-récepteurs de la famille RGM interagissent avec les BMPRI mais sont considérés comme des régulateurs positifs de la signalisation BMP (Corradini et al., 2009).

Un troisième niveau de régulation concerne la disponibilité des SMAD. Comme nous l'avons vu plus haut, certaines molécules transmembranaires comme l'endofin sont capables dans un premier temps d'initier la transduction du signal en présentant les R-SMAD aux BMPRI. Néanmoins, dans un deuxième temps, ces molécules jouent également un rôle répressif sur la voie en recrutant la Protéine Phosphatase I qui va déphosphoryler BMPRI induisant son inactivation puis sa dégradation. Les I-SMAD jouent également un rôle majeur dans la régulation de l'activité des SMAD. En effet, ils interagissent avec les récepteurs BMPRI, de manière compétitive avec les R-SMAD. Les I-SMAD recrutent également les E3 ubiquitin ligases Smurf1 et Smurf2 auprès des BMPRI, conduisant à leur dégradation par la voie

ubiquitin proteasome. De plus, les I-SMAD interagissent avec les R-SMAD, de manière compétitive avec le co-SMAD SMAD4, réduisant ainsi la translocation des complexes R-SMAD-SMAD4 vers le noyau. Enfin, les I-SMAD agissent dans le noyau où ils compromettent les interactions entre l'ADN et le complexe R-SMAD-SMAD4 (**Figure 21**).

Un quatrième niveau de régulation correspond à la présence de co-répresseurs transcriptionnels dans le noyau qui permettent de limiter la transcription des gènes cibles de la voie. Certains de ces co-répresseurs, comme HOXC8 (Homeobox C8) peuvent d'ailleurs être stabilisés par les I-SMAD (Bai 2002).

De manière intéressante, la plupart de ces régulateurs sont aussi des gènes cibles de la voie BMP ce qui suggère que leur expression en réponse à l'induction de la signalisation BMP constitue un mécanisme de rétro-contrôle négatif dans un but de maintien de l'homéostasie de la voie. Enfin, il est à noter que des mécanismes de régulation épigénétiques et post-transcriptionnels de type micro-ARN ont également été décrits dans la régulation de la signalisation BMP (Lee et al., 2008; Long et al., 2013; Raje & Ashma, 2019; Q. Yin et al., 2010).

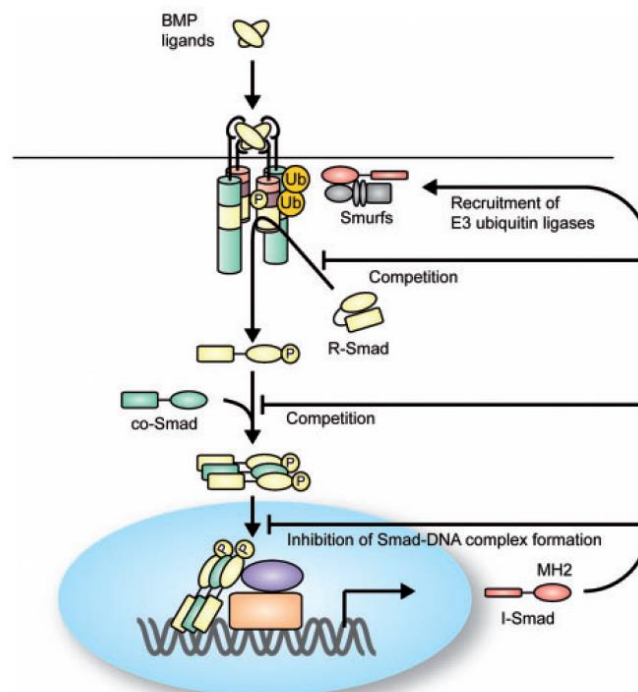


Figure 21. Principaux mécanismes de régulation intracellulaires de la signalisation BMP. D'après Miyazono 2009.

Implication dans la régulation des cellules souches cancéreuses mammaires

La plupart des ligands et des récepteurs d'intérêt de la voie BMP sont exprimés à l'échelle transcriptionnelle et protéique dans de nombreuses lignées de cancers du sein et de nombreux échantillons tumoraux humains bien que les rôles de certains éléments de la voie dans la carcinogénèse et la dissémination métastatique soient parfois contradictoires ou mal élucidés (Alarmo et al., 2007, 2013; Alarmo & Kallioniemi, 2010; T. Sharma et al., 2022; Ye, 2009; Zabkiewicz et al., 2017). Néanmoins, au-delà de cette constatation, des dérégulations de la voie BMP ont été décrites comme spécifiquement impliquées dans la biologie des cellules souches cancéreuses mammaires dans le contexte des tumeurs triple-négatives et hormono-dépendantes. Ces dérégulations concernent essentiellement les ligands BMP2 et BMP4 et leurs récepteurs préférentiels BMPR1A et BMPR1B.

Concernant les tumeurs hormono-dépendantes, notre équipe a démontré que le récepteur BMPR1B est surexprimé dans l'épithélium des tumeurs luminales, de même que BMP2 dans leur micro-environnement. Cette sur-régulation de l'axe BMP2/BMPR1B induit *in vitro*, dans le modèle de cellules souches mammaires humaines immortalisées mais non transformées MCF10A, la transformation de ces cellules immatures selon le phénotype luminal, comme mis en évidence par les tests de soft agar et de transplantation orthotopique de souris immunodéprimées.

Par ailleurs dans les cancers du sein triple-négatifs de type basal, Balboni et al. ont démontré en immuno-histochimie (IHC) une surexpression de BMPR1A comparativement aux tissus normaux, ainsi qu'une sur-activation de la voie canonique (Balboni et al., 2013). Ceci suggère une signalisation dépendant majoritairement de BMPR1B dans certaines tumeurs hormono-dépendantes et de BMPR1A dans certaines tumeurs triple-négatives. Dans l'étude de Bokobza (Bokobza et al., 2009) ayant inclus majoritairement des tumeurs non hormono-dépendantes, la perte d'expression de BMPR1B (et donc possiblement l'émergence d'un signal BMPR1A dominant) était corrélée à un faible pronostic, une augmentation de la prolifération tumorale et une augmentation des aberrations cytogénétiques. Le travail de Pickup et al. a de plus établi que l'inactivation de BMPR1A dans un modèle murin de cancer du sein limite le développement de la tumeur primitive et des métastases, suggérant le rôle de ce récepteur dans ces phénomènes (Pickup et al., 2015). Par ailleurs, Di et al. ont démontré, *in vitro* et *in vivo* chez des souris transgéniques, qu'un inhibiteur des récepteurs

aux BMP/TGF β (ZL170) réduit de manière significative les phénomènes d'EMT, les propriétés de cellules souches (stemness) et la dissémination métastatique dans des modèles de cancers du sein triple-négatifs, confirmant l'implication de cette voie de signalisation dans la carcinogénèse et la biologie des cellules souches cancéreuses mammaires dans ce type de tumeurs (Di et al., 2019). Ceci vient compléter les données de Garulli et al. qui avaient précédemment montré que la dorsomorphin, un inhibiteur d'ALK2, ALK3, ALK6 et AMPK, reverse le phénotype de cellules souches mésenchymateuses de la lignée A17 (Garulli et al., 2014). Par ailleurs, Choi et al. ont montré que BMP4 induit une augmentation de l'EMT et de la stemness dans la lignée MCF10A ainsi qu'une augmentation de la stemness et de l'expression de marqueurs de cellules souches cancéreuses dans la lignée humaine triple négative basal-like MDA-MB-231 (Choi et al., 2019). Sharma et al. ont rapporté de manière consistante le même phénomène dans la lignée MDA-MB-231 (R. Sharma et al., 2022) bien que des données contradictoires aient été générées en utilisant la lignée triple-négative de carcinome mammaire anaplasique SUM159PT (Yan et al., 2021). Buijs et al. ont également fourni des données contradictoires dans la lignée MDA-MB-231 mais dans un contexte d'exposition à des hétérodimères BMP2/BMP7 (Buijs et al., 2012), suggérant des rôles opposés de l'axe BMP4-BMPR1A et BMP2/7-BMPR1B selon le sous-type de carcinome mammaire considéré. Ketolainen et al. ont mis en évidence un effet de BMP4 sur le ralentissement du cycle cellulaire (accumulation en G1) et l'augmentation de la capacité de migration/invasion sur plusieurs lignées cellulaires de cancer du sein incluant MDA-MB-231 (Ketolainen et al., 2010). Guo et al. ont quant à eux démontré une augmentation similaire de la capacité de migration et invasion des cellules de la lignée MDA-MB-231 en réponse à BMP4 (D. Guo et al., 2012). Park et al. et Ampuja et al. ont démontré les mêmes données de migration/invasion dans des systèmes 2D et 3D impliquant les lignées MCF10A et MDA-MB-231 également exposées à BMP4 (Ampuja et al., 2013, 2017; K.-S. Park et al., 2015). La même équipe a montré qu'un traitement par BMP4 intraveineux chez des souris ayant subi préalablement une injection intra-cardiaque de cellules MDA-MB-231 induit une tendance à l'accélération du développement de métastase (Ampuja et al., 2016). Des données concordantes sur l'association BMP4 et dissémination métastatique ont été générées par Neckmann et al. (Neckmann et al., 2019). Néanmoins, des données contradictoires ont été rapportées par Eckhardt et al. (Eckhardt et al., 2020). Par ailleurs Shin et al. ont démontré qu'ID1, un des gènes cibles majeurs de la voie BMP, induit une augmentation du contingent

de cellules souches cancéreuses mammaires in vitro dans la lignée MDA-MB-231 et in vivo dans un modèle de souris transgénique MMTV-IId1, conduisant au développement de tumeurs basal-like (Shin et al., 2015).

Les cancers du sein basal-like

Généralités et définition

Le cancer du sein est le cancer le plus diagnostiqué et la première cause de décès par cancer chez la femme dans le monde (Arnold et al., 2022). Néanmoins, il s'agit d'une pathologie extrêmement hétérogène dont il existe plusieurs entités moléculaires de pronostic variable (Perou et al., 2000; Sørlie et al., 2001, 2003). En effet, des analyses transcriptomiques débutées il y a une vingtaine d'années par Perou et Sorlie ont identifié au moins 5 sous-types différents de cancers du sein (Perou et al., 2000). Parmi eux, le sous-type basal représente environ 15% des cas (**Figure 22**). L'origine de sa dénomination vient du fait que son profil d'expression génique se rapproche de celui des cellules normales de la couche basale de la glande mammaire. Les cancers basal-like surviennent classiquement à un âge relativement précoce. Ce sont des tumeurs de mauvais pronostic, triple-négatives (négativité des récepteurs aux estrogènes, à la progestérone et HER2), prolifératives, avec des capacités de dissémination métastatique et de résistance aux traitements importantes du fait de leur enrichissement en cellules souches cancéreuses mammaires (Honeth et al., 2008; Toft & Cryns, 2011). Ces cancers sont génétiquement instables et cette instabilité génomique est souvent due à des altérations de la recombinaison homologue (RH), voie majeure de réparation des cassures double-brin de l'ADN dépendante de l'activité du gène BRCA1. Les patientes présentant une mutation inactivatrice de ce gène de prédisposition ont donc une probabilité plus importante de développer au cours de leur vie un cancer du sein, qui, le cas échéant, sera de phénotype basal-like dans 85% des cas (Foulkes, 2003). On estime en retour qu'environ 10% des cancers du sein basal-like sont associés à une mutation germinale de BRCA1 (N. C. Turner & Reis-Filho, 2006). Même si des avancées importantes ont été faites dans la caractérisation du comportement de ces tumeurs particulièrement agressives, certaines zones d'ombre persistent. Il semble ainsi important d'acquérir une meilleure compréhension de leur biologie afin de pouvoir proposer des traitements innovants s'y adaptant spécifiquement. Dans ce chapitre, nous proposons donc de passer en revue les caractéristiques épidémiologiques et clinico-biologiques de ces cancers, ainsi que les traitements actuellement disponibles en pratique courante afin de mieux cerner les besoins médico –scientifiques qui s'y rapportent.

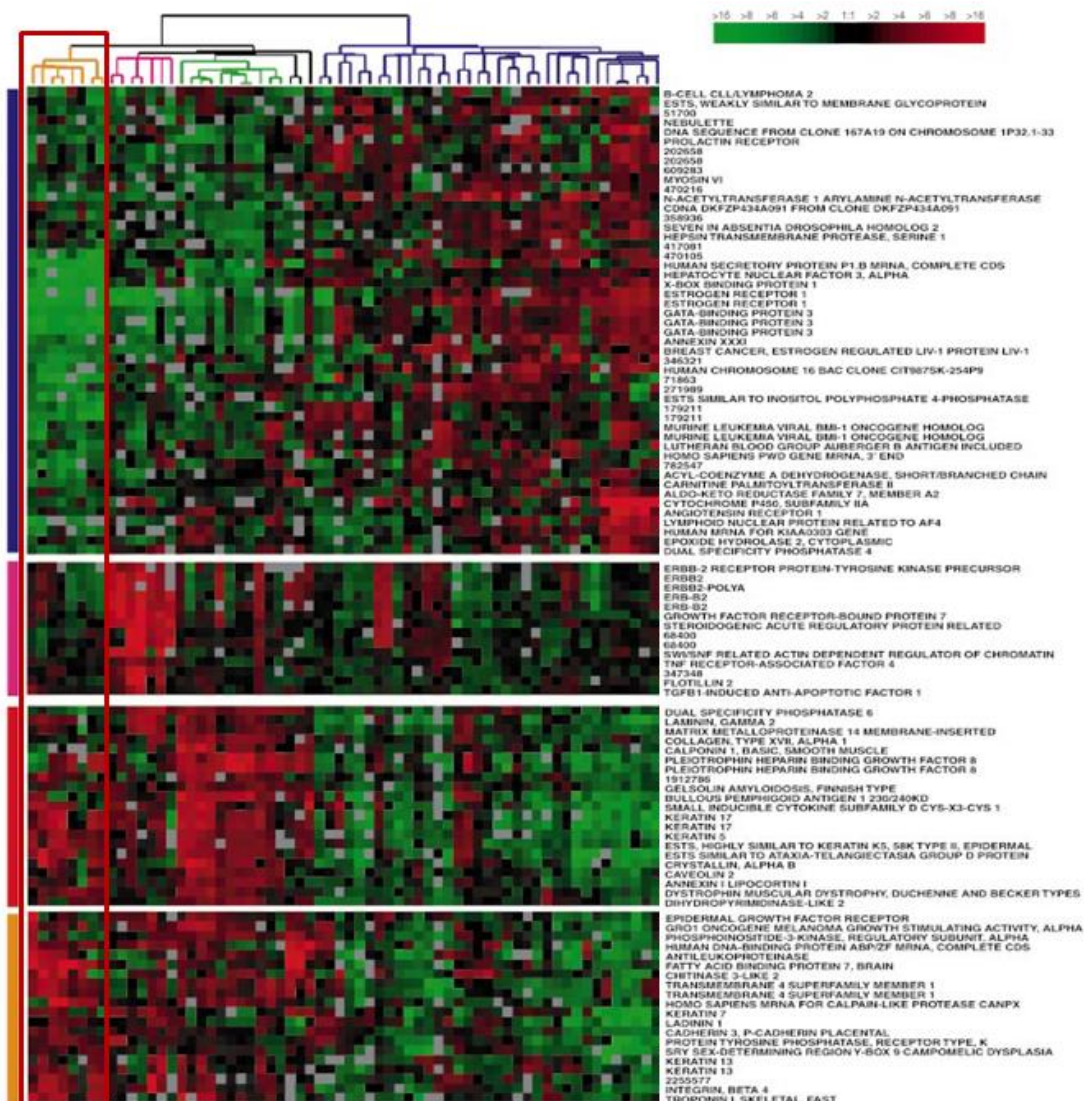


Figure 22. Identification transcriptomique des cancers du sein basal-like selon les travaux initiaux de Perou et al. Les cancers basal-like sont encadrés en rouge sur la heatmap. D'après Perou 2000.

Epidémiologie et présentation clinique

Incidence

Tous sous-types confondus, le cancer du sein est le cancer le plus diagnostiqué et la première cause de décès par cancer chez la femme dans le monde. C'est le deuxième cancer le plus incident dans le monde tout sexe confondu, derrière le cancer bronchique (Bray et al., 2022). En France, c'est même devenu le plus diagnostiqué tout sexe confondu selon les dernières données de santé publique France, confirmant une augmentation de 104% depuis

1990. Cette augmentation de l'incidence s'explique par les changements démographiques (accroissement et vieillissement de la population), l'évolution des facteurs de risque et l'amélioration des techniques de dépistage et de diagnostic. Les cancers du sein basal-like représentent environ 10 à 37% de ces cancers du sein selon les études (Carey et al., s. d.; Millikan et al., 2008; Sørli et al., 2003; Sweeney et al., 2014) avec un diagnostic porté chez des femmes statistiquement plus jeunes que dans les autres sous-types de cancers du sein. Par exemple, dans l'étude de Sweeney, 10,8% des patientes atteintes d'un cancer basal-like étaient diagnostiquées avant 40 ans contre seulement 2,9% des patientes atteintes d'un cancer luminal A (OR = 3,05, [IC 95% = 1,40 – 6,65]) (Sweeney et al., 2014). De manière intéressante, une étude française récente a confirmé l'augmentation globale de l'incidence des cancers du sein entre 1990 et 2018 avec une augmentation annuelle de 0,8% (Hassaine et al., 2022). L'augmentation la plus importante était retrouvée dans la catégorie des femmes jeunes, de moins de 40 ans, estimée à 2,1% par an. Entre 2011 et 2018, dans cette tranche d'âge, on retrouvait une tendance à l'augmentation de l'incidence des cancers du sein triple-négatifs et HER2 amplifié et une stabilité de l'incidence des cancers du sein de type luminal. Néanmoins sur cette période, toutes tranches d'âge confondues, l'incidence des cancers du sein triple-négatifs en France ne semble pas avoir augmenté de manière significative (Hassaine et al., 2022).

Facteurs de risque

Si dans les cancers du sein de sous-type luminal (qui sont les plus fréquents) les facteurs de risque liés à la reproduction et au climat hormonal sont prépondérants, ceci est moins évident pour les cancers du sein triple-négatifs/basal-like pour lesquels les facteurs de risque les plus reconnus sont les mutations du gène de prédisposition BRCA1, le statut pré-ménopausique, l'origine afro-américaine, le syndrome métabolique, un faible niveau socio-économique (Millikan et al., 2008; Toft & Cryns, 2011).

Dans une méta-analyse récente (X. Mao et al., 2023), Mao et al. ont comparé les facteurs de risque liés à la reproduction en fonction du sous-type moléculaire de cancer du sein. En ce qui concerne les cancers du sein triple-négatifs/basal-like, les facteurs de risque significativement retrouvés parmi les études cas-témoins étaient des ménarches précoces et l'utilisation d'une contraception orale tandis que l'allaitement apparaissait comme un facteur protecteur. Une revue de la littérature plus ancienne (Barnard et al., 2015) avait

également retrouvé l'impact des premières règles précoces et l'utilisation d'une contraception orale, auxquelles s'ajoutaient la multiparité et une ménopause tardive. L'allaitement était également décrit comme facteur protecteur. Parmi les facteurs de risque non reproductifs, on retrouvait un indice de masse corporelle élevé à la pré-ménopause et des antécédents familiaux de cancers du sein. Les mêmes facteurs de risque (indice de masse corporelle élevé et multiparité sans allaitement) ont été récemment retrouvés dans la cohorte de plus de 5000 femmes afro-américaines AMBER (Benefield et al., 2021).

Pronostic

Les facteurs de mauvais pronostic

Grade et marqueurs de prolifération

Le grade de Scarff-Bloom-Richardson modifié par Elston et Ellis est un facteur pronostique indépendant largement utilisé en pratique clinique pour évaluation pronostique et aide à la décision thérapeutique (Elston & Ellis, 1991; Schwartz et al., 2014). Il s'agit d'un score composite prenant en compte 3 critères : la différenciation tubulo-glandulaire, le pléiomorphisme nucléaire et l'index mitotique (**Tableau 2**). Comme établi par plusieurs travaux, les cancers basal-like sont de haut grade (grade 3) dans 72 (E. Rakha et al., 2006) à 100% (Fulford et al., 2006; M.-J. Kim et al., 2006; Livasy et al., 2006a) des cas. Par ailleurs l'index mitotique est globalement important dans ces tumeurs. Livasy et al. ont ainsi rapporté un taux de 45 mitoses/10 champs au fort grossissement (Livasy et al., 2006a). Fulford et al ont démontré qu'environ 86% des cancers basal-like ont un index mitotique supérieur à 40 mitoses/10 champs (Fulford et al., 2006).

1. Différenciation tubulo-glandulaire : proportion de tubes ou glandes dans la tumeur (en % de surface tumorale)	Score
>75 % : tumeur bien différenciée	1
10 à 75 % : tumeur moyennement différenciée	2
<10 % : tumeur peu différenciée	3
2. Pléiomorphisme nucléaire : degré d'atypie apprécié sur la population tumorale prédominante	
Noyaux petits, réguliers, uniformes	1
Pléiomorphisme modéré	2
Variations marquées de taille, de forme, avec nucléoles proéminents	3
Nombre de mitoses (à compter sur 10 champs au grossissement x400 ; valeurs définies pour un champ de 0,48 mm de diamètre ; calibrage du microscope nécessaire pour des champs différents)	
0 à 6 mitoses	1
7 à 12 mitoses	2
>12 mitoses	3
AU TOTAL	
Grade I	3 ou 4 ou 5
Grade II	6 ou 7
Grade III	8 ou 9

Tableau 2. Grade de Scarff-Bloom-Richardson modifié par Elston et Elis. Source : oncologik.

Stade et topographie des métastases

Le stade TNM (Tumor, Node, Metastasis) est une classification pronostique basée sur la taille de la tumeur, son extension ganglionnaire loco-régionale et la présence ou non de métastases à distance (Teichgraber et al., 2021). Plusieurs études ont ainsi mis en évidence la propension des cancers basal-like à être diagnostiqués à un stade plus avancé (Anders et al., 2008; Carey et al., s. d.; Sweeney et al., 2014). Par ailleurs, au stade métastatique, la topographie des lésions secondaires diffère également des autres sous-types moléculaires avec un tropisme significatif pour les métastases viscérales touchant le foie, les poumons, le système nerveux central, participant également au mauvais pronostic des cancers basal-like (Lin et al., 2008; Luck et al., 2008; Smid et al., 2008).

Phénotype triple négatif

Le niveau d'expression des récepteurs hormonaux (récepteur aux œstrogènes et à la progestérone) et du récepteur HER2 est un facteur pronostic important dans les carcinomes mammaires avec un pronostic plus défavorable associé aux cancers triple-négatifs (Fallahpour et al., 2017; Howlader et al., 2018). Or 80% environ de ces cancers sont de type basal-like et inversement 80% environ des cancers basal-like sont triple-négatifs (Bertucci et al., 2008; Nielsen et al., 2004; E. A. Rakha, Reis-Filho, et al., 2008).

Enrichissement en cellules souches cancéreuses

La valeur pronostique du phénotype de cellules souches cancéreuses mammaires $CD44^+/CD24^-$ et $ALDH^+$ est controversée (Abraham et al., s. d.; A. Bane et al., 2013; Resetskova et al., 2010; Ricardo et al., 2011) mais a néanmoins été établie par bon nombre de travaux (Charafe-Jauffret et al., 2010; Giatromanolaki et al., 2011; Ginestier et al., 2010; Mylona et al., 2008; Neumeister et al., 2010).

Plusieurs études ont ainsi mis en évidence l'association entre cellules souches cancéreuses mammaires et cancer du sein basal-like. Dans une analyse menée en 2008, Honeth et al. ont identifié le phénotype $CD44^+/CD24^-$ comme préférentiellement retrouvé dans les cancers basal-like (**Figure 23**), notamment dans les tumeurs mutées pour BRCA1 (Honeth et al., 2008). Des données similaires ont été retrouvées par l'équipe de Ricardo (Ricardo et al., 2011). De même, en 2010, Park et al. ont corrélé l'expression de $CD44^+/CD24^{\text{faible}/-}$ et $ALDH1^+$ au phénotype basal-like (S. Y. Park et al., 2010). Des données similaires ont été rapportées par l'équipe de Bane (A. Bane et al., 2013).

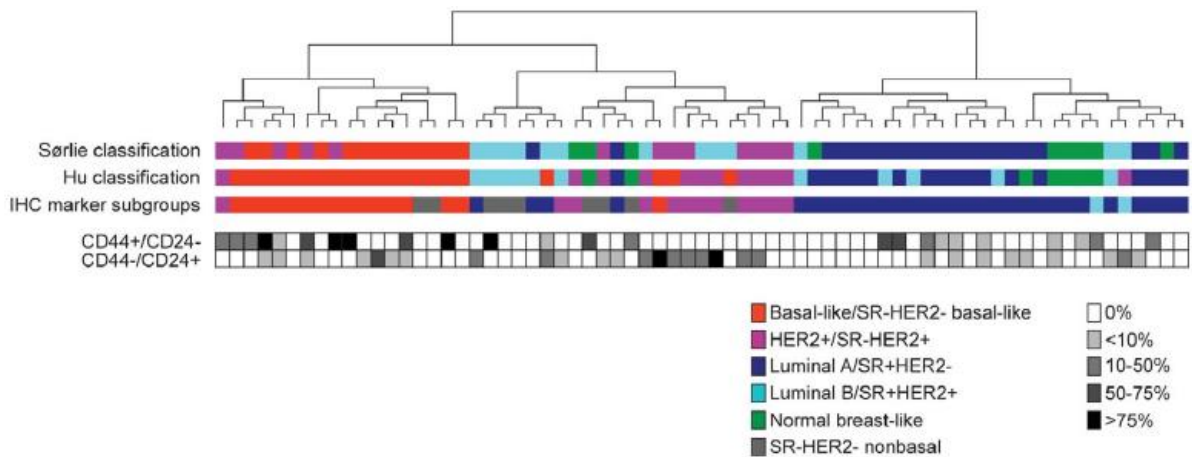


Figure 23. Niveau d'expression des cellules CD44+/CD24- selon les différents sous-types moléculaires de carcinomes mammaires. D'après Honeth 2008.

Les données de survie

Ces différents facteurs de mauvais pronostic associés aux cancers basal-like expliquent les données de survie plus défavorables qui leur sont associées. Ces données sont retrouvées de manière consistante dans de nombreuses études, notamment s'agissant de la survie globale (Banerjee, 2006; Carey et al., s. d.; Fan & Weigelt, 2006; Sørli et al., 2001, 2003).

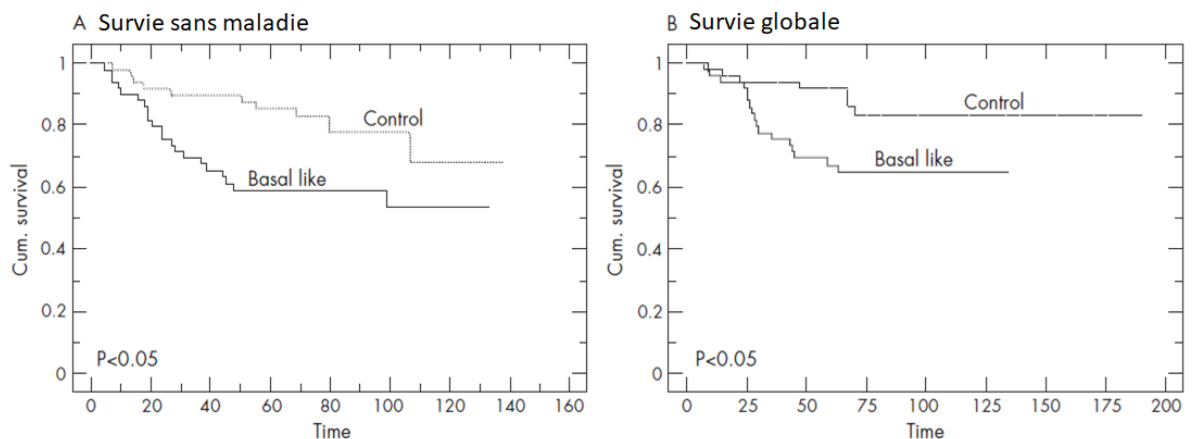


Figure 24. Données de survie sans maladie et survie globale de tumeurs basal-like (définies par l'expression immuno-histo-chimique de cytokératines basales) comparativement à des contrôles non basal-like. n = 49 cas dans chaque groupe. D'après Banerjee 2006.

Caractéristiques biologiques

Caractéristiques transcriptomiques

Dans les années 2000, une succession d'analyses transcriptomiques a permis d'individualiser 5 sous-types distincts de cancers du sein appelés sous-types intrinsèques : luminal A, luminal B, normal-like, HER2 enriched et basal-like (Perou et al., 2000; Sørlie et al., 2001, 2003). D'un point de vue transcriptionnel, les cancers basal-like sont ainsi nommés car ils expriment de manière robuste un cluster de gènes également exprimés par les cellules situées dans la couche externe (basale) de la glande mammaire : les cellules myoépithéliales ainsi que les cellules souches et progéniteurs basaux (Q. H. Nguyen et al., 2018; Perou et al., 2000; Sørlie et al., 2001, 2003). Les produits de certains de ces gènes, notamment cytokéramine 5 (CK5) et cytokéramine 17 (CK17), mais aussi laminine, intégrine- β 4 ou encore BPAG1 sont normalement impliqués dans l'ancrage des cellules basales à la membrane basale (Tsuruta et al., 2008). Néanmoins, au-delà de ce rôle structural, certains sont également impliqués dans diverses voies de signalisation tumorigènes notamment ERK, PI3K-AKT ou NF κ B (Wilhelmsen et al., 2006). D'autres produits géniques du cluster basal-like sont impliqués dans la transition épithelio-mésenchymateuse (EMT) (TGF β 2, MMP14, TM4SF1 pour Transmembrane 4 L6 family member 1), la prolifération (cycline E1, BUB1 pour Budding Uninhibited by Benzimidazoles 1, EZH2 pour Enhancer of zeste homolog 2) (Yehiely et al., 2006) ou encore la stemness (cKIT, TGF β 2) (Stingl et al., 2006). A l'opposé du spectre d'expression génique, parmi les gènes les moins exprimés, on retrouve les gènes codant pour le récepteur oestrogénique ER α , le récepteur à la progestérone et le récepteur à activité oncogénique HER2 (Perou et al., 2000; Sørlie et al., 2001, 2003), les tumeurs basal-like étant très majoritairement triple-négatives (absence d'expression d'ER α et de PR, absence d'amplification/surexpression d'HER2). Le **Tableau 3** récapitule les principaux gènes dérégulés dans les cancers basal-like.

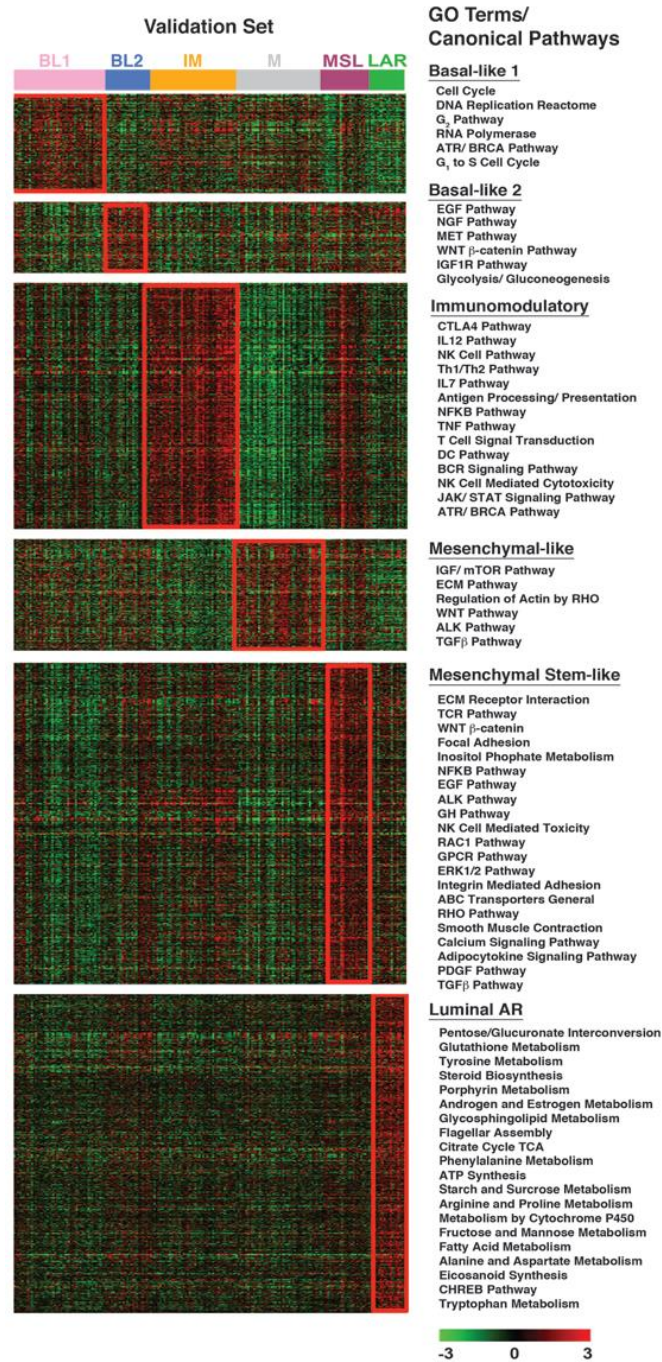
Groupes fonctionnels	Dérégulation positive ou négative	Gènes
Eléments structuraux des cellules épithéliales basales	+	Metallothionein 1X, fatty acid binding protein 7, FOXC2, activating transcription factor 3, KRT5 (CK5), KRT17 (CK17), P-cadherin
Eléments d'interaction entre les cellules épithéliales basales et la matrice extracellulaire	+	Integrin $\alpha 6\beta 4$, laminin-5, MMP14, collagen type XVII alpha-1
Voies de signalisation tumorigènes	+	MEK, ERK, PI3K, AKT, p38, MRAS, CDCA7, NF κ B
Prolifération et croissance cellulaire	+	cyclin E1, BUB1, MYBL2, TTK, topoisomerase II α , MCM2, MAD2L1, STK6, CDC2, CDCA3, CDCA5, PCNA
Récepteurs à activité tyrosine kinase, transduction du signal, régulation de la transcription	+	c-KIT, EGFR, caveolin 1 et 2, hepatocyte growth factor, Pleiotrophin, c-fos, c-jun
Protéines de choc thermique	+	$\alpha\beta$ -crystallin, Hsp27
Migration, invasion, remodelage de la matrice extracellulaire	+	TGF β 2
Signalisation hormonale, oncogènes, facteurs de transcription et autres	-	ER α , PR, GATA transcription factors (GATA3), basic transcription factor 3, FOXC1, FOXA1, TFF3, X-box binding protein 1, RAB
Oncogènes et autres	-	HER-2, GRB7, GTPase binding effector protein 1, fibronectin-1, mucin-1

Tableau 3. Principaux gènes et groupes fonctionnels dérégulés dans les cancers basal-like. D'après Rakha 2008.

De manière intéressante, des analyses transcriptomiques plus récentes s'intéressant exclusivement aux tumeurs triples négatives ont établi que ces cancers peuvent aussi être discriminés en différents sous-types moléculaires.

Ainsi en 2011, Lehmann et al. ont mis en évidence par analyses de clusters 6 sous-types différents : Basal-like 1 (BL1), Basal-like 2 (BL2), Immunomodulatory (IM), Mesenchymal (M), Mesenchymal stem-like (MSL), Luminal androgen receptor (LAR) (Lehmann et al., 2011). Dans cette étude, les auteurs ont montré que les voies de signalisation et fonctions biologiques dérégulées dans ces sous-types étaient différentes, ouvrant la porte à des thérapies ciblées adaptées à chacun d'entre eux (**Figure 25**). Par exemple, les sous-types BL1 et BL2 sont enrichis en gènes impliqués dans le cycle cellulaire et la réponse aux dommages à l'ADN. Le sous-type IM est enrichi en gènes relatifs à la réponse immunitaire. Les sous-types M et MSL sont enrichis en signalisations en rapport avec l'EMT et la stemness (voies TGF- β , mTOR, Rac1/Rho, Wnt/ β -catenin, FGFR, PDGFR pour Platelet-Derived Growth Factor

Receptors, VEGF pour Vascular Endothelial Growth Factor). Enfin le sous-type LAR est enrichi en gènes associés à la signalisation du récepteur aux androgènes.



Sous-type	Voies de signalisation dérégulées	Options thérapeutiques
BL1	Réponse aux dommages à l'ADN	Inhibiteurs de PARP Sels de Platine
BL2	Signalisation des facteurs de croissance, glycolyse et néoglucogénèse	Inhibiteurs des voies associées aux facteurs de croissance
LAR	Signalisations associées aux androgènes	Antagonistes du récepteur aux androgènes
M	Différenciation cellulaire, interaction entre récepteurs extracellulaires, mobilité cellulaire	Inhibiteurs de Wnt/ β catenin, inhibiteurs de PI3K/AKT/mTOR, inhibiteurs des voies associées au TGF β
MSL	Idem que M mais claudin-low + voies associées aux cellules souches mésenchymateuses	Idem que M
IM	Réponse immunitaire	Immunothérapie

Figure 25. Classification moléculaire des cancers du sein triple négatifs selon les travaux initiaux de Lehmann et options thérapeutiques suggérées. D'après Lehmann 2011.

De manière intéressante, Masuda et al. ont évalué dans leur cohorte de cancers du sein triple-négatifs localisés la contribution de chacun de ces sous-types dans les cancers basal-like et non basal-like définis selon la classification intrinsèque PAM50. Comme montré sur la **Figure 26**, le groupe basal-like est principalement constitué des sous-types IM (23%), BL1 (21%) et M (20%) tandis que le groupe non basal-like est majoritairement constitué du sous-type LAR (59%) (Masuda et al., 2013).

Par ailleurs, en 2015, Burstein et al. ont eux identifié 4 sous-types moléculaires de pronostic variable : Luminal androgen receptor (LAR), Mesenchymal (M), Basal-like immune-suppressed (BLIS) et Basal-like immune-activated (BLIA) (Burstein et al., 2015). De manière intéressante, les sous-types LAR et M de Burstein se recoupent fidèlement avec les sous-types LAR et MSL de Lehmann. Par contre, les sous-types BLIS et BLIA de Burstein comprennent un mélange des 4 autres sous-types définis par Lehmann (BL1, BL2, IM et M).

En 2016, Lehmann et al. ont simplifié leur classification de 2011 en prenant en compte la contribution de transcrits provenant de cellules immunes et stromales normales du micro-environnement tumoral. Les auteurs distinguent donc au final 4 sous-types : BL1, BL2, M et LAR.

En 2019, une étude multi-omique menée par Jiang et al. a également divisé une large cohorte chinoise de 465 tumeurs triple-négatives en 4 sous-types : Basal-like immune-suppressed (BLIS), Immunomodulatory (IM), Luminal androgen receptor (LAR) et Mesenchymal-like (M) (Jiang et al., 2019). Ainsi, les sous-types BLIS, IM et LAR de Jiang recourent fidèlement les sous-types BL1, IM et LAR de la classification initiale de Lehmann. En revanche le sous-type M de Jiang contient un mélange de tumeurs des sous-types BL2, M et MSL de Lehmann. De plus, on constate que la quasi-totalité des tumeurs des groupes BLIS et IM de Jiang ainsi que la majorité des tumeurs du groupe M s'intègrent en fait dans le sous-type basal-like initialement décrit dans la classification intrinsèque de Perou et Sorlie (Perou et al., 2000; Sørlie et al., 2001, 2003). A l'inverse une faible proportion de tumeurs classées LAR selon Jiang appartiennent au groupe intrinsèque basal-like.

Enfin, en 2021, Lehmann et al. ont réalisé de nouvelles analyses multi-omiques à partir de données publiques issues des cohortes du TCGA, METABRIC, CPTAC, MET500 (Lehmann et al., 2021a). Ils ont confirmé par cette étude l'existence des 4 sous-types précédemment décrits par leur groupe (BL1, BL2, M et LAR). Dans cette étude, les analyses de single cell RNAseq, altérations du nombre de copie (CNA pour Copy Number Alterations), profilage génétique et épigénétique plaident pour une éventuelle origine commune aux tumeurs BL1 et M pour lesquelles il existerait donc un continuum biologique. Les tumeurs M dans cette hypothèse correspondraient à une forme dédifférenciée des tumeurs BL1. D'ailleurs, ces 2 sous-types correspondent exclusivement à des tumeurs basal-like selon la classification intrinsèque, contrairement au sous-type BL2 qui correspond pour moitié à des tumeurs basal-like et pour moitié à des tumeurs HER2 enriched. Le sous-type LAR dans ce travail correspond lui exclusivement à des tumeurs HER2 enriched.

Ainsi, ces différentes études nous montrent toute la diversité moléculaire du sous-type basal-like initialement décrit par Perou et Sorlie.

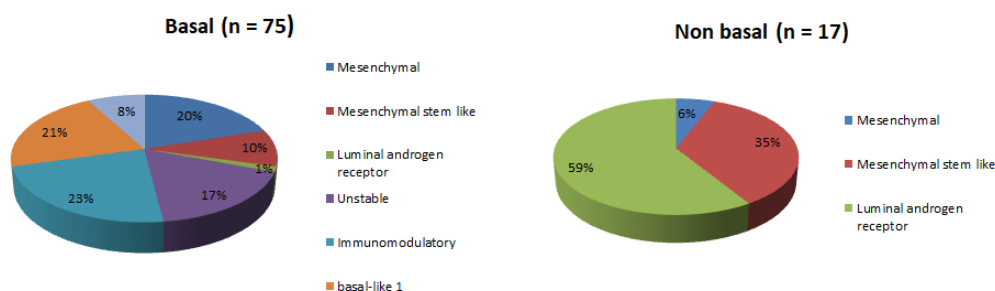


Figure 26. Contribution des différents sous-types moléculaires de cancers du sein triple-négatifs de Lehmann dans les cancers basal-like et non basal-like de la classification intrinsèque PAM50. D'après Masuda 2013.

Caractéristiques histologiques

Comme les analyses transcriptomiques ne sont pas facilement faisables en pratique courante, plusieurs équipes ont cherché à développer des panels de marquages immunohistochimiques permettant d'identifier de manière fiable les cancers basal-like. Historiquement, le phénotype triple-négatif était utilisé dans ce but, mais, comme nous l'avons vu précédemment toutes les tumeurs triples négatives ne sont pas basal-like et par ailleurs une minorité de tumeurs basal-like ne sont pas non plus triple-négatives (Fan & Weigelt, 2006; Rouzier et al., 2005; Sørlie et al., 2001). Aussi, des marqueurs supplémentaires comportant notamment les cytokératines basales (CK5/6, CK14, CK17) et l'EGFR (HER1) ont été utilisés pour une meilleure discrimination des cas (**Figure 27**). Par exemple, Nielsen et al. ont établi qu'un panel de 4 marqueurs (négativité d'Er α et HER2 associée à positivité de CK5/6 et/ou EGFR) permet de discriminer les tumeurs basal-like (définies selon la classification intrinsèque) avec une sensibilité de 76% et une spécificité de 100% (Nielsen et al., 2004).

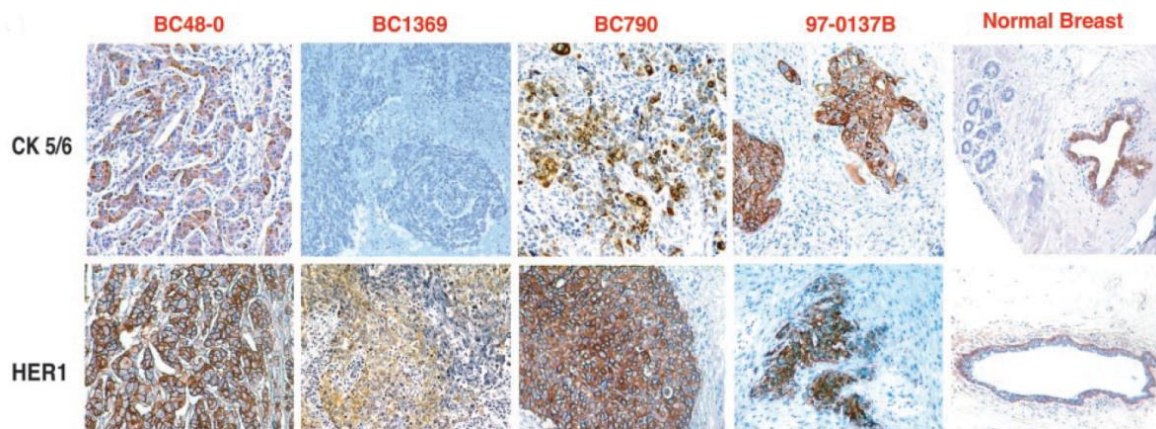


Figure 27. Exemple de 4 cas de cancer du sein basal-like surexprimant la CK5/6 et l'EGFR (HER1) en immunohistochimie, comparativement à du tissu mammaire normal. D'après Nielsen 2004.

Par la suite, Cheang et al. ont optimisé ce panel en y ajoutant la négativité du récepteur à la Progestérone (Cheang et al., 2008). Ce panel de 5 marqueurs permet de mieux discriminer les tumeurs basal-like en termes de survie. De plus, Livasy et al. ont étudié le profil IHC de tumeurs basal-like précédemment sélectionnées sur la base de leur profil d'expression génique (Livasy et al., 2006b). L'immuno-phénotype le plus fréquemment rencontré était une négativité d'Er α et PR associée à une positivité de CK5/6, CK8/18, EGFR et vimentin. Cette positivité des marqueurs luminaux CK8/18, associée à la fréquente négativité des

marqueurs myoépithéliaux SMA, p63 et CD10 est intéressante. Elle rend peu probable l'hypothèse d'une origine myoépithéliale différenciée pour les cancers basal-like mais suggère plutôt l'implication d'un progéniteur bi-potent, comme évoqué par plusieurs autres travaux (Lim et al., 2009; Lehmann et al., 2021a; S. Liu et al., 2008; Molyneux et al., 2010) (**Tableau 4**).

<i>MA profile</i>	<i>ER</i>	<i>HER2</i>	<i>EGFR</i>	<i>SMA</i>	<i>CD10</i>	<i>p63</i>	<i>CK 8/18</i>	<i>CK 5/6</i>	<i>Vimentin</i>
Basal-like	0/18	0/18	13/18	4/18	2/18	4/18	15/18	11/18	17/18
Luminal	16/16	0/16	0/16	0/16	0/16	2/16	16/16	0/16	1/16
HER2	0/12	11/12	7/12	0/12	1/12	4/12	12/12	1/12	1/12

MA = microarray, ER = estrogen receptor, SMA = smooth muscle actin, CK = cytokeratin.

Tableau 4. Profil immuno-histochimique des cancers du sein basal-like comparativement aux sous-types luminal et HER2. D'après Livasy 2005.

Par ailleurs, d'autres groupes ont intégré des marqueurs supplémentaires dans leur panel diagnostique, augmentant ainsi leur spécificité au prix de la sensibilité. Ces marqueurs peuvent être structuraux (fascin, laminin 5, $\beta 4$ integrin, P-cadherin) ou associés à la transduction de signaux tumorigènes (c-KIT, VEGF, c-MYC, p53). Ils sont décrits de manière exhaustive dans la revue de Choo et Nielsen (Choo & Nielsen, 2010) et Botti et al. (Botti et al., 2019)). Ceci illustre le manque de consensus sur le meilleur critère de substitution (surrogate) IHC du phénotype basal-like établi par analyse d'expression génique.

Par ailleurs, au-delà de ces marqueurs utilisés comme surrogate, d'autres caractéristiques histologiques sont partagées par la majorité des tumeurs basal-like. Si ces caractéristiques ne constituent pas des critères diagnostiques en tant que tels, elles ont valeur d'orientation. Parmi elles, on retrouve une faible différenciation, un haut grade nucléaire, un index mitotique élevé, une nécrose centrale, des marges refoulantes (pushing margins), une infiltration lymphocytaire stromale ou encore un enrichissement en cellules souches cancéreuses C44⁺/CD24⁻ (Fulford et al., 2007; Honeth et al., 2008; Livasy et al., 2006b; Rodríguez-Pinilla et al., 2006).

D'un point de vue histologique, le sous-type le plus représenté est le carcinome canalaire infiltrant non spécifique (Fulford et al., 2007). Néanmoins tous les sous-types peuvent présenter un profil basal-like. A noter la sur-représentation des carcinomes médullaires

(10%) (Marginean et al., 2010) et métaplasiques (10%) (Weigelt et al., 2009) dans le groupe basal-like.

Instabilité génétique

Au-delà de la caractérisation IHC des tumeurs basal-like, plusieurs équipes ont cherché à évaluer leur complexité chromosomique par l'utilisation de techniques de CGH (Comparative Genomic Hybridization) array. Par exemple Chin et al. ont simultanément analysé le profil d'expression génique et les CNA d'une cohorte de patientes traitées à la phase précoce et ont corrélé ces CNA au sous-type moléculaire de la classification intrinsèque et à la survie (Chin et al., 2006). Ce travail indique que les CNA varient effectivement en fonction du sous-type moléculaire et que les tumeurs basal-like sont enrichies en low-level CNA (gains impliquant les chromosomes 3q, 8q et 10p et pertes impliquant les chromosomes 3p, 4p, 4q, 5q, 12q, 13q, 14q et 15q). Par ailleurs les auteurs ont également montré que les high-level CNA de type amplification sont rares dans ces tumeurs, et ce quel que soit le locus considéré. De manière similaire Bergamaschi et al. ont analysé par CGH-array les CNA de 89 cancers du sein localement avancés précédemment classés selon les 5 sous-types de la classification intrinsèque (Bergamaschi et al., 2006). De manière intéressante, les gains et les pertes chromosomiques étaient statistiquement plus fréquents dans les tumeurs basal-like avec notamment des gains sur les chromosomes 1q12-q41, 6p12-p25, 7q22-q36, 10p12-p15, 17q25 et 21q22 et des pertes sur les chromosomes 3q12, 4p15-p32, 4q31-q35, 5q11-q3 et 14q22-q23. Les auteurs confirment également un faible taux d'amplifications dans ce sous-type (**Figure 28**).

PATTERNS OF DNA COPY NUMBER ALTERATION IN BREAST CANCER

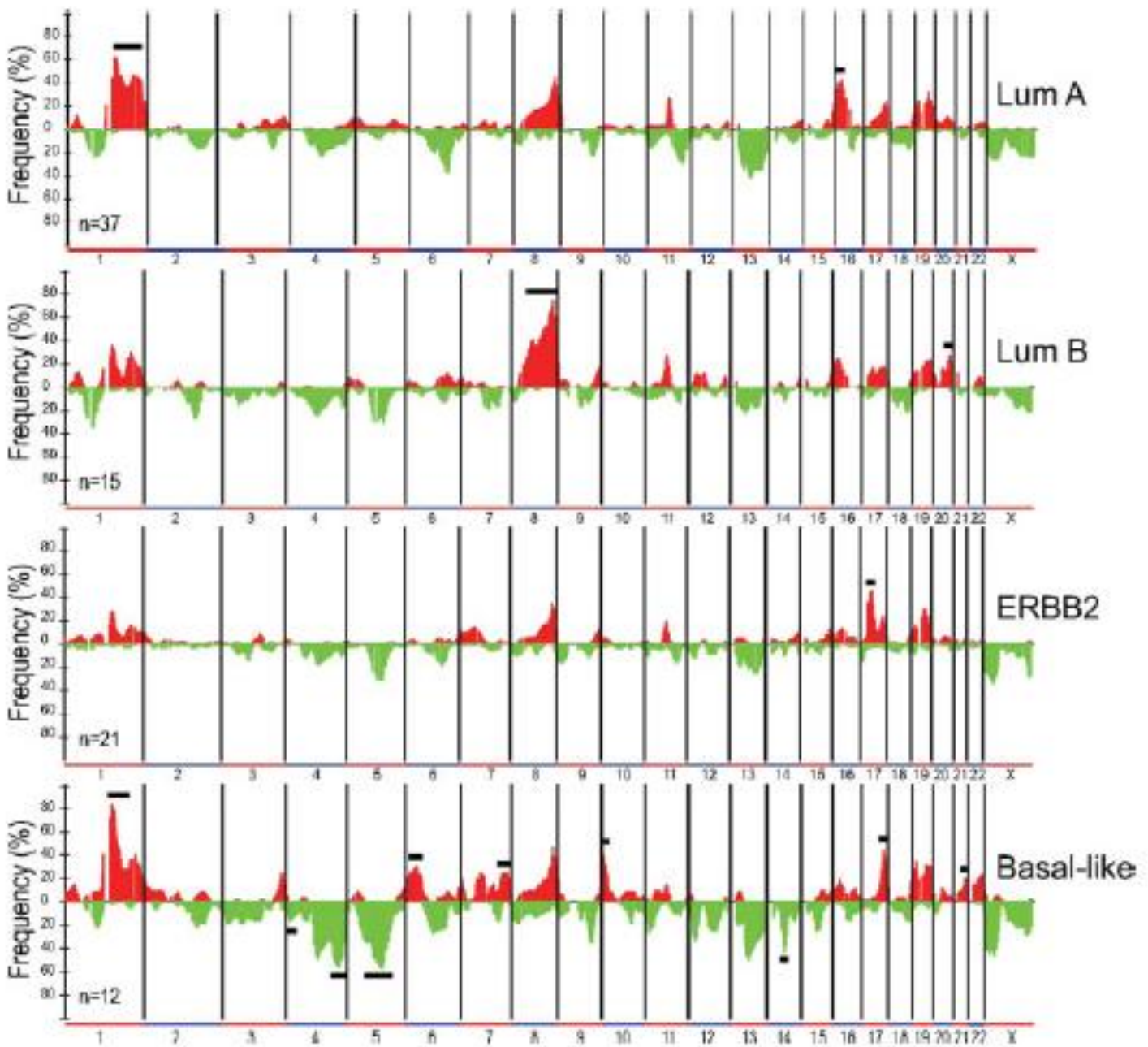


Figure 28. Profil d'altérations du nombre de copie en CGH-array dans les tumeurs basal-like comparativement aux autres sous-types moléculaires. Gains principaux : 1q, 3q, 6p, 7q, 8p, 8q, 10p, 12p, 17q, 21q. Pertes principales : 1p, 3p, 3q, 4p, 4q, 5q, 8p, 10q, 12q, 13q, 14q, 15q, Xp. D'après Bergamaschi 2006.

Par ailleurs, Adelaïde et al. ont analysé les CNA de 45 tumeurs basales et 48 tumeurs lumineuses, définies là-encore selon leur profil d'expression génique (Adelaïde et al., 2007). Dans cette étude, les altérations les plus prévalentes (>20%) dans les tumeurs basal-like étaient les gains au niveau des régions 1q, 3q24-27, 8p11-12, 8q21-ter, 10p, 12p13-ter et 17q25-ter et les pertes au niveau des régions 4q13-14, 4q34-35, 5q, 8p21-ter et 14q21. De

rare amplifications étaient retrouvées dans ce sous-type touchant notamment les régions 8p11, 8q11-ter, 10p13-ter, 15q26, 18q11 et 19q11-12.

Enfin, en 2009, Natrajan et al. ont analysé les CNA de 69 carcinomes canaux infiltrants de type non spécifique de grade 3 dont 14 définis comme basal-like en IHC selon la classification de Nielsen (Nielsen et al., 2004). Ils ont montré que les altérations les plus fréquentes (>50%) pour ce sous-type étaient les gains dans les régions 1q, 6p, 8q et 10p et les pertes dans les régions 1p, 4p, 5q, 8p, 10q, 15q et Xp. Des amplifications ont par ailleurs été trouvées sur 1q21, 3q25, 8q24,12p13 et 19q12 (Natrajan et al., 2009).

De manière intéressante, ce profil d'anomalies chromosomiques (low-level CNA de type gains et pertes) partagées par les tumeurs basal-like dans ces différentes études, est évocateur d'un déficit sous-jacent en recombinaison homologue (RH).

Similitudes avec les tumeurs déficientes en BRCA1

BRCA1 est un gène comprenant 24 exons localisé sur le chromosome 17q21. Il exerce un rôle de gène suppresseur de tumeur grâce à ses différentes fonctions biologiques incluant la régulation du cycle cellulaire, l'organisation du cytosquelette, la régulation de l'apoptose, l'inactivation du chromosome X ou encore la régulation de la transcription de certains gènes tels que TP53 ou STAT1 (Paul, 2014; Takaoka & Miki, 2018). Plus récemment, son rôle dans la différenciation des progéniteurs luminaux mammaires a également été rapporté (Furuta et al., 2005; He et al., 2022; Lim et al., 2009; S. Liu et al., 2008; Martinez-Ruiz et al., 2016; Molyneux et al., 2010; Proia et al., 2011; H. Wang et al., 2016). Néanmoins la fonction la plus connue et la plus décrite de BRCA1 reste son rôle dans le maintien de l'intégrité du génome par son implication dans la réparation des cassures double brin de l'ADN par RH (Scully et al., 2019). De fait, une mutation germinale inactivatrice de BRCA1 confère une prédisposition accrue à certains cancers notamment de l'ovaire et du sein. Ces cancers du sein développés chez les porteurs d'un variant pathogène de BRCA1 sont très homogènes d'un point de vue clinique, histo-pathologique et moléculaire. En effet, d'un point de vue morphologique et histologique, ces tumeurs sont fréquemment hautement prolifératives, de haut grade avec des marges refoulantes (pushing margins), une nécrose centrale et fréquemment une infiltration lymphocytaire périphérique. Focalement, des zones de phénotype atypique médullaire ont été décrites. Sur le plan immuno-histochimique, les tumeurs BRCA1 mutées sont largement triple-négatives et expriment fréquemment les cytokératines basales (CK5/6,

CK14) ainsi que l'EGFR. Une expression nucléaire de p53 est également souvent retrouvée. Ces caractéristiques similaires aux tumeurs basal-like ont été extensivement étudiées et rapportées notamment par Turner et al. (N. C. Turner & Reis-Filho, 2006) et Domagala et al. (Domagala et al., 2011). De manière intéressante, en complément de ces similitudes immuno-histochimique, Sorlie et al. ont également montré une grande concordance entre le profil d'expression génique des cancers basal-like et BRCA1 muté (Sørli et al., 2003).

Par ailleurs, plusieurs études ont également examiné, par CGH, les caractéristiques des tumeurs BRCA1 muté en termes d'aberrations chromosomiques. Par exemple dans un premier temps, Tirkkonen et al. ont comparé les CNA présentes dans 21 carcinomes mammaires BRCA1 muté aux CNA présentes dans 55 cas sporadiques utilisés comme contrôles (Tirkkonen et al., 1997). Dans les cancers BRCA1 muté, les pertes sur les chromosomes 5q (86%), 4q (81%), 4p (64%), 2q (40%) et 12q (40%) étaient significativement plus fréquentes que dans le groupe contrôle. Wessels et al. ont aussi rapporté des résultats similaires notamment des délétions plus fréquentes de 4p, 5q and 12q dans les échantillons BRCA1 muté (Wessels et al., 2002). De manière intéressante, ce profil d'aberrations chromosomiques est différent de celui retrouvé dans un contexte de mutation de BRCA2 (van Beers et al., 2005). D'autre part, Jönsson et al. (Jönsson et al., 2005) ont comparé les CNA de 14 tumeurs BRCA1 muté avec celles de 26 cas sporadiques. Dans cette étude, les auteurs rapportent une plus grande fréquence de CNA dans les tumeurs BRCA muté. Les gains les plus fréquents dans ces tumeurs (>75%) étaient retrouvés au niveau des chromosomes 1q42.12-q42.13, 3q26.32-q26.33, 3q27.1-q27.33, 7q36.1-q36.3, 8q24.23-q24.3, 10p15.3 et 10p15.1-p14. Les pertes les plus fréquentes (>75%) impliquaient les chromosomes 4p15.32-p14, 4q31.3, 4q32.1-q34, 5q11.2-q23.3, 8pter-p12, 13q13.3-q21.32, 15q12-13.1, 15q15.3-q21.1 et 17p13.2-p12. Des résultats similaires ont été rapportés dans une étude menée par Joosse et al. (Joosse et al., 2009). Comme rapporté par Melchor et al. (Melchor et al., 2008) et Holstege et al. (Holstege et al., 2010), ces anomalies chromosomiques retrouvées dans les tumeurs BRCA1 muté sont très similaires à celles retrouvées dans les tumeurs basal-like sporadiques. Ces similitudes concernent notamment les gains sur les chromosomes 1p, 2p, 3q, 6p, 6q, 7q, 8q, 10p, 12p, 13q et 19q et les pertes sur les chromosomes 3p, 4p, 5q, 10q, 12q, 14q et 15q (Holstege et al., 2010). Les similitudes entre tumeurs mammaires BRCA1 muté et basal-like sporadiques sont répertoriées dans le **Tableau 5**.

	Tumeurs BRCA1 muté	Tumeurs basal-like sporadiques
Critères cliniques		
Survenue à un âge jeune	+	+
Mauvais pronostic	+	+
Critères histologiques		
Haut grade	+	+
Index de prolifération élevé	+	+
Marges refoulantes	+	+
Nécrose centrale	+	+
Zones de phénotype médullaire ou métaplasique	+	+
Infiltration lymphocytaire périphérique	+	+
Phénotype triple négatif	+	+
Surexpression de l'EGFR	+	+
Expression des kératines basales	+	+
Expression nucléaire de p53	+	+
Profil chromosomique		
Gains/pertes	Fréquents	Fréquents
Type de gains	1p, 1q, 2p, 3q, 6p, 6q, 7q, 8q, 10p, 13q, 19q	1q, 3q, 6p, 7q, 8q, 10p, 12p, 17q, 21q
Type de pertes	2q, 3p, 4p, 4q, 5q, 8p, 10q, 12q, 13q, 14q, 15q, 17p	1p, 3p, 3q, 4p, 4q, 5q, 8p, 10q, 12q, 13q, 14q, 15q, Xp

Tableau 5. Similitudes entre les tumeurs BRCA1 muté et basal-like sporadiques

Le profil d'instabilité génomique commun aux tumeurs basal-like et BRCA1 muté oriente vers un déficit sous-jacent en RH (HRD pour Homologous Recombination Deficiency), processus dans lequel la protéine BRCA1 est hautement impliquée. Ceci suggère qu'une partie des cancers basal-like sporadiques pourrait présenter une inactivation de BRCA1 par le biais de mutations somatiques de BRCA1 ou de mécanismes de répression épigénétique ou post-transcriptionnelle de ce gène. Cette hypothèse est soutenue par le fait que l'expression transcriptionnelle et protéique de BRCA1 est fréquemment réduite dans les tumeurs basal-like sporadiques (**Figure 29**). Ainsi, Turner et al. (N. C. Turner et al., 2007) ont comparé l'expression transcriptionnelle de BRCA1 dans 37 tumeurs basal-like (identifiées en IHC par un marquage CK5/6 positif) et 37 tumeurs CK5/6 négatives appariées sur l'âge et le grade. L'expression de l'ARN messager de BRCA1 était 2 fois plus faible dans les tumeurs basal-like. De plus, Joosse et al. (Joosse et al., 2011) ont analysé par PCR (Polymerase Chain Reaction) le niveau d'expression de BRCA1 dans 41 tumeurs basal-like sporadiques et 83 tumeurs luminales sporadiques, utilisées comme contrôle. Ils ont montré une réduction d'expression

de BRCA1 dans 51% des tumeurs basal-like. A l'échelle protéique, Rakha et al. (E. A. Rakha, El-Sheikh, et al., 2008) ont rapporté une association entre altération de l'expression nucléaire de BRCA1 en IHC et phénotype basal-like défini selon plusieurs classifications IHC. Par exemple, 76% des tumeurs identifiées comme basal-like selon la classification de Nielsen (Nielsen et al., 2004) présentait une altération de l'expression nucléaire de BRCA1.

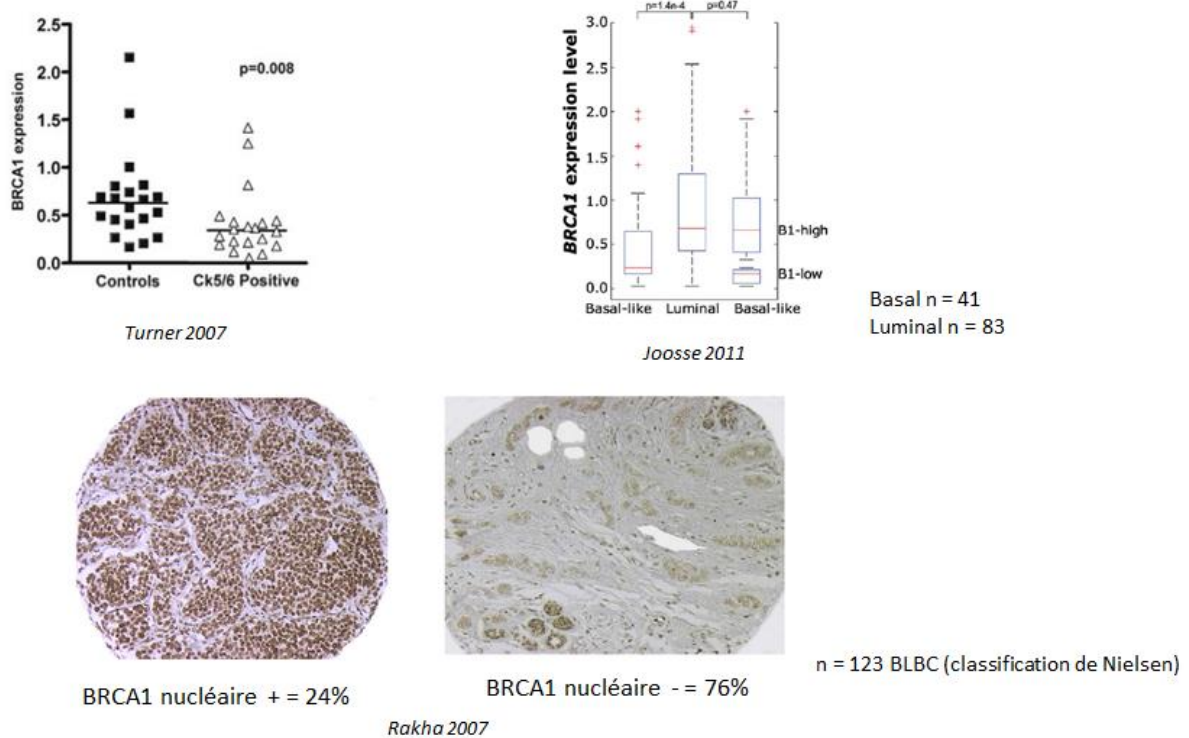


Figure 29. Données de différentes études ayant étudié le niveau d'expression transcriptionnelle (Turner 2007, Joosse 2011) ou protéique (Rakha 2007) de BRCA1 dans des tumeurs basal-like comparativement à des contrôles non basal-like.

Cependant, comme le montrent ces différentes études, tous les cancers basal-like ne présentent pas d'altération de l'expression transcriptionnelle ou protéique de BRCA1. Ceci suggère que dans ces tumeurs, d'autres gènes impliqués dans la RH pourraient être altérés à l'échelle transcriptionnelle ou post transcriptionnelle, conduisant également à un phénotype BRCA-like dit de « BRCA-ness » (N. Turner et al., 2004; De Summa et al., 2013; Lord & Ashworth, 2016).

Dans la suite de cette introduction, nous passerons en revue les différentes techniques ayant permis de suspecter la présence d'altération de la RH dans les cancers basal-like et nous examinerons les causes identifiées de ces altérations.

Mise en évidence de l'HRD dans les tumeurs basal-like

Qu'est-ce que la recombinaison homologue ?

La recombinaison homologue est une voie de réparation des cassures double brins de l'ADN basée sur la disponibilité d'une séquence homologue à la séquence lésée (à savoir la chromatide sœur) nécessaire à sa réparation fidèle. Pour cette raison, il s'agit d'un processus restreint aux phases S et G2 du cycle cellulaire. Suite à la survenue d'une cassure double brin de l'ADN, la RH fait intervenir un grand nombre d'effecteurs. Dans un premier temps la reconnaissance des cassures doit se mettre en place. Cette dernière est médiée par les kinases ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3 related) (reconnaissant préférentiellement les cassures simple brin de l'ADN) et ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) (reconnaissant préférentiellement les cassures double-brin de l'ADN). L'activation d'ATR induit un blocage du cycle cellulaire au niveau de la transition G2/M, évènement essentiel à la recombinaison homologue. D'autre part, le recrutement d'ATR et ATM au site de cassure et leur activation va induire la phosphorylation du variant d'histone H2Ax sur plusieurs milliers de paires de base au pourtour de la cassure. H2Ax phosphorylé est appelé γ H2Ax. Ces histones favorisent ensuite le recrutement du complexe MRN (composé de MRE11, RAD50 et NBS1). Ce complexe est impliqué dans l'activation d'ATM initiant ainsi une boucle de rétrocontrôle positif (Qiu & Huang, 2021). Il est également pourvu d'une activité endonucléase lui permettant d'initier la résection 5'-3' de part et d'autre de la cassure double-brin, générant ainsi des mono filaments d'ADN simple brin 3'. Cette résection 5'-3', médiée par le complexe MRN, le co-régulateur CtIP et les protéines BRCA1 et BARD1 (BRCA1 Associated RING Domain 1) (Scully et al., 2019), constitue un déterminant essentiel du choix de la réparation de la cassure par recombinaison homologue. Une fois la résection effectuée, les mono filaments simple brins ainsi générés sont stabilisés par les protéines RPA (Replication Protein A) ce qui les empêche de s'hybrider avec d'autres séquences. Par la suite, RPA va être remplacée par la recombinase RAD51 dont le recrutement est sous la dépendance de l'activité des effecteurs BRCA1 et BARD1 mais également BRCA2 et PALB2 (Partner and localizer of BRCA2) (Scully et al., 2019). Le filament RAD51-ADN simple brin, stabilisé par les paralogues de RAD51, procède ensuite à la recherche d'homologie. La configuration intrinsèque du noyau favorisant la recombinaison entre séquences physiquement proches, la recombinaison avec la chromatide sœur est de loin l'évènement le plus fréquent, assurant

de ce fait une réparation fidèle de la cassure en offrant une matrice pour la néo-synthèse de l'ADN complémentaire, en remplacement de l'ADN lésé. Cette recombinaison avec la chromatide sœur est également sous la dépendance de BRCA1/BARD1. Il est à noter qu'en l'absence d'occupation des brins lésés par RAD51, d'autres voies de réparation peuvent être stimulées notamment les voies AEJ (Alternative End Joining) et SSA (Single Strand Annealing). Ces voies sont exclusivement mutagènes et pourvoyeuses d'instabilité génétique (Scully et al., 2019).

Néanmoins, la principale alternative à la recombinaison homologue pour réparer les cassures double brin de l'ADN reste la voie NHEJ (Non Homologous End Joining) qui peut opérer pendant toutes les phases du cycle cellulaire. Dans un premier temps, celle-ci est médiée par la fixation des dimères Ku70-Ku80 de part et d'autre du site de cassure double-brin, induisant ainsi le recrutement d'autres effecteurs de la voie parmi lesquels DNA-PKcs et Artemis. Ceci permet un premier rapprochement des extrémités de l'ADN lésé sous la forme d'un complexe synaptique de longue portée (long-range synaptic complex). Par la suite, le recrutement d'autres effecteurs tels que XRCC4 (X-ray repair cross-complementing protein 4), LIG4 (DNA ligase 4), XLF (XRCC4-like factor) ou encore PAXX induisent un rapprochement plus conséquent des brins d'ADN endommagés sous la forme d'un complexe synaptique de courte portée (short-range synaptic complex). Suite à cela, grâce notamment à la contribution finale d'Artemis et des polymerases λ et μ , on observe la ligature des 2 extrémités d'ADN, préalablement appariés selon un processus de micro-homologie sur 1 à 2 paires de bases (Pannunzio et al., 2014). De ce fait, cette voie de réparation de l'ADN est d'avantage pourvoyeuse d'instabilité génomique que la recombinaison homologue car elle génère des micro-délétions adjacentes aux zones de micro-homologie. Le choix du mode de réparation entre recombinaison homologue et NHEJ dépend de la phase du cycle cellulaire dans lequel se trouve la cellule au moment du dommage à l'ADN et de la résection 5'-3' de part et d'autre de la cassure médiée par le complexe MRN. Ainsi, en phase G1, 53BP1 (p53 Binding Protein 1), RIF1 (Replication Timing Regulatory Factor 1) et les protéines du complexe Shieldin promeuvent la réparation par NHEJ en inhibant la résection par le complexe MRN (Dev et al., 2018). A l'inverse, en phase G2, BRCA1 et BARD1 inhibent 53BP1, favorisant ainsi la résection et la réparation par recombinaison homologue (Feng et al.,

2015). La **Figure 30** illustre le mode d'action des principaux effecteurs de la recombinaison homologue et NHEJ.

Ainsi, comme nous l'avons vu, en cas d'HRD, d'autres mécanismes de réparation de l'ADN peuvent se mettre en place, mais avec un taux d'erreur important conduisant à une instabilité génomique favorisant la carcinogénèse par le biais de l'activation d'oncogènes et de l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (Scully et al., 2019). Cependant, l'HRD constitue aussi un point faible des tumeurs dont tirent profit certaines molécules inductrices de cassures double-brins de l'ADN, notamment les inhibiteurs de PARP (iPARP) (Bryant et al., 2005; Farmer et al., 2005). Il est donc important de savoir détecter l'HRD dans les tumeurs, d'un point de vue théranostique. A cet effet, plusieurs techniques ont été développées ces dernières années.

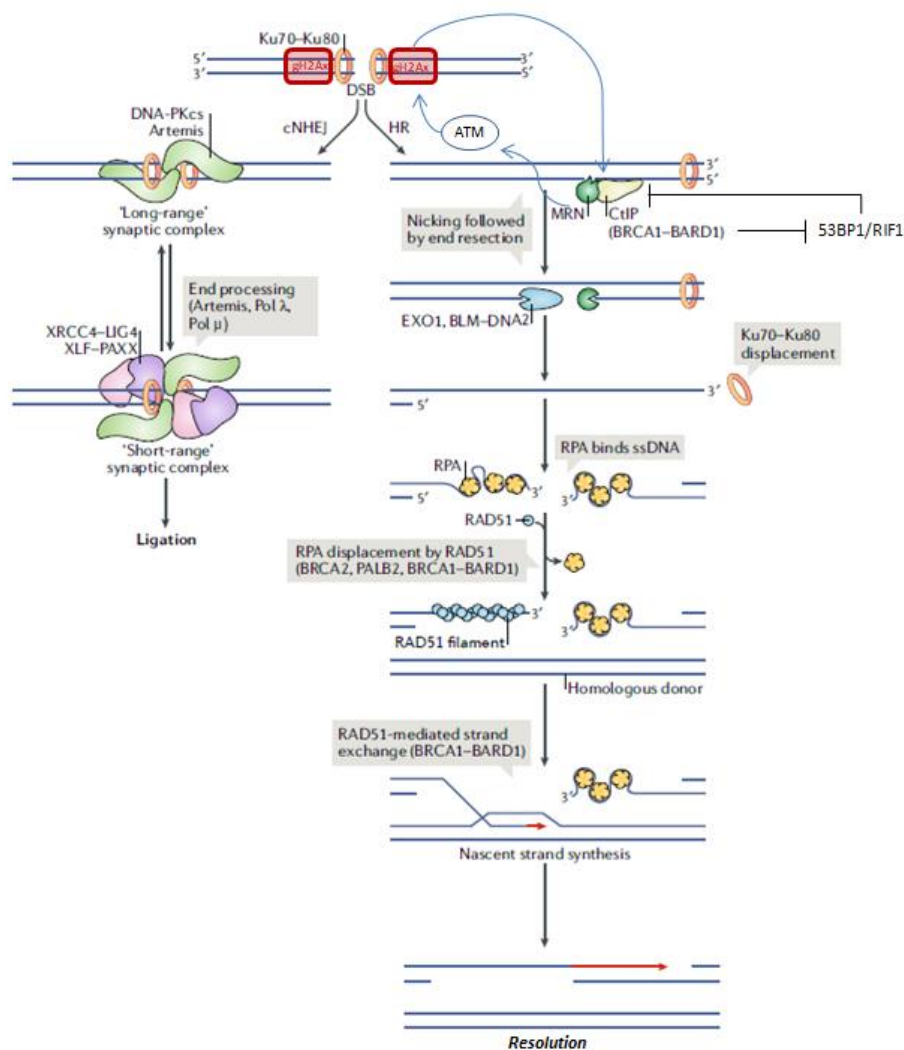


Figure 30. Représentation simplifiée des 2 voies principales de réparation des cassures double brins de l'ADN chez les mammifères. D'après Scully 2019.

Comment mesurer l'HRD ?

Recherche des aberrations chromosomiques

La première technique est basée sur la reconnaissance des aberrations chromosomiques qui sont la conséquence de l'HRD. Initialement, plusieurs solutions basées sur la détection de CNA associées à l'HRD par CGH-array (Joosse et al., 2009) ou MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) (Lips, Laddach, et al., 2011) ont été développées. Néanmoins ces techniques étaient peu reproductibles en raison du manque d'uniformisation des outils d'analyse des données. Finalement, c'est le développement ultérieur de la technique de SNP (Single Nucleotide Polymorphism)-array qui a permis des avancées significatives dans la détection robuste de l'HRD. Ainsi cette technique permet d'identifier 3 types d'aberrations chromosomiques corrélées à l'HRD (**Figure 31**) :

-Les LST (Large Scale state transition) sont des cassures d'ADN (translocations, inversions, délétions) impliquant des régions chromosomiques de plus de 10 Mb. Une signature d'HRD basée sur les LST a été développée par Popova et al. à partir de 65 tumeurs définies comme basal-like en IHC (tumeurs triple négatives positives pour CK5/6/14/17 et/ou EGFR) dont 23 présentant un variant pathogène de BRCA1. Cette signature a ensuite été validée sur 55 échantillons primaires et 17 lignées cellulaires basal-like. Elle permet d'identifier les tumeurs basal-like présentant une inactivation de BRCA1 ou BRCA2 avec une sensibilité de 100% et une spécificité de 97% (Popova et al., 2012). Elle a ensuite été validée sur de nouvelles cohortes de carcinomes mammaires de différents sous-types histologiques (Manié et al., 2016) et également sur des cohortes de cancers ovariens (Goundiam et al., 2015).

-Les HRD-LOH (Loss Of Heterozygosity) correspondent à des délétions impliquant des régions chromosomiques de plus de 15 Mb sans impliquer le chromosome entier. Une signature d'HRD basée sur ces zones de LOH a été établie par Abkevich et al. sur la base d'échantillons primaires de carcinomes ovariens mutés et non mutés BRCA1/2. Elle a été validée ensuite sur une cohorte de carcinomes ovariens et sur des lignées cellulaires ovariennes et mammaires déficientes pour BRCA1/2 (Abkevich et al., 2012).

-Les TAI (Telomeric Allelic Imbalance) se rapportent à des gains ou pertes de copie en région télomérique. Une signature basée sur ces TAI a été mise au point par Birnbak et al. Les

auteurs ont montré une corrélation inverse entre la quantité de TAI et le niveau d'expression transcriptionnel de BRCA1 dans des cancers du sein triple-négatif et des carcinomes séreux ovariens (Birkbak et al., 2012).

Il est à noter qu'il existe des solutions commerciales combinant de manière plus robuste ces 3 signatures sous la forme d'un score qui oriente, au-dessus d'une valeur seuil, vers un phénotype d'HRD (Timms et al., 2014). C'est le cas du score HRD de Myriad Genetics qui a montré par exemple sa capacité à prédire la réponse des cancers épithéliaux de l'ovaire HRD à l'iPARP Olaparib en première ligne de traitement d'entretien (Ray-Coquard et al., 2019).

De manière intéressante, il a été démontré que les aberrations chromosomiques de type LST, LOH et TAI pouvaient être détectée par des techniques de séquençage de nouvelle génération (NGS : Next Generation Sequencing) avec des résultats similaires aux techniques de SNP-array (Sztupinski et al., 2018).

Plus récemment, pour limiter le temps et le coût inhérent à ce type d'analyses et rendre la détection de l'HRD plus accessible en pratique clinique, plusieurs équipes (Eeckhoutte et al., 2020; Macintyre et al., 2018) ont développé un outil alternatif appelé shallowHRD basée sur le WGS (Whole Genome Sequencing) à faible couverture (shallow WGS, ~1X coverage) permettant de détecter les LGA (Large-scale Genomic alterations) spécifiques de l'HRD avec une excellente sensibilité et spécificité (87,5 et 90,5 % respectivement pour l'équipe de Popova à l'Institut Curie (Eeckhoutte et al., 2020)).

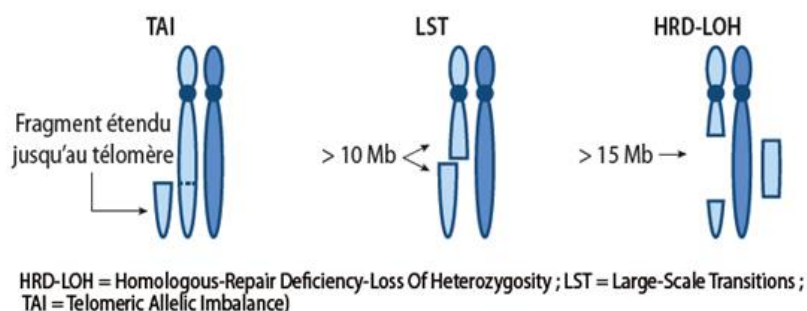


Figure 31. Aberrations chromosomiques associées à l'HRD. Les TAI correspondent à des gains ou pertes de copie en régions télomériques. Les LST correspondent à des cassures d'ADN (translocations, inversions, délétions) impliquant des régions chromosomiques de plus de 10 Mb. Les LOH correspondent à des délétions impliquant des régions chromosomiques de plus de 15 Mb sans impliquer le chromosome entier. D'après Rodrigues 2016.

Application aux cancers basal-like

Concernant les cancers basal-like, peu d'études ont exploré la prévalence de l'HRD spécifiquement dans cette sous-population.

Imanishi et al. ont analysé en situation néo-adjuvante le statut HR selon la technique de Myriad (statut HRD positif si HRD score ≥ 42) dans 141 cancers du sein dont 35 cancers triple-négatifs. Selon la classification de Lehmann (Lehmann et al., 2011), ces cancers se subdivisaient en 7 cancers Basal-like 1, 7 Mesenchymal, 8 Immunomodulatory, 7 Mesenchymal Stem-Like et 6 Luminal Androgen Receptor. De manière intéressante, les sous-types BL1 et M (qui s'intègrent systématiquement au cluster basal-like de la classification intrinsèque) présentent tous deux des taux d'HRD de près de 75% (contre environ 60% pour le sous-type MSL, 50% pour le sous-type IM et 0% pour le sous-type LAR) (Imanishi et al., 2019).

De manière similaire, dans l'étude de Jiang et al. (Jiang et al., 2019), les HRD scores selon Myriad étaient les plus élevés dans le sous-groupe Basal-like immune-suppressed et les plus faibles dans le groupe Luminal Androgen Receptor. Par ailleurs, le score HRD était également bien corrélé au statut basal-like de la classification intrinsèque.

Dans une étude récente de Ter Brugge et al., 54,5% (30/55) des PDX (patient-derived xenografts) étudiés issus de cancers du sein triple-négatifs précoces étaient classifiés comme HRD+ par shallow WGS et cette technique montrait des taux de concordance de 95% dans la prédiction de l'HRD par rapport au test de Myriad. De même, ces 2 techniques ont démontré dans cette étude des sensibilités et spécificités similaires dans la prédiction de la réponse aux sels de platine (81% de sensibilité et 65% de spécificité pour le shallow WGS, 76% de sensibilité et 61% de spécificité pour le test de Myriad) (Ter Brugge et al., 2023).

Enfin, plusieurs essais cliniques explorant notamment la sensibilité de cancers du sein triple-négatifs aux sels de platine et aux iPARP ont étudié en parallèle leur statut HR selon différentes techniques basées sur la mesure des aberrations chromosomiques. En considérant que 80% environ des cancers du sein triple-négatifs sont basal-like (Bertucci et al., 2008; Nielsen et al., 2004; E. A. Rakha, Reis-Filho, et al., 2008), ceci donne une approximation des altérations de la RH dans ce sous-type moléculaire. Comme indiqué dans le **Tableau 6**, le statut HRD est retrouvé dans 41,5 à 76,9% des cancers triple-négatifs selon les études et les techniques d'évaluation de l'HRD utilisées.

Essai/référence	Population étudiée	Type d'évaluation de l'HRD	% d'HRD dans la population triple-négative	Informations complémentaires
Timms 2014(Timms et al., 2014)	Tout type de cancers du sein	HRD score (Myriad)	44,2%	
Isakoff 2015(Isakoff et al., 2015) TBCRC 009	Cancers du sein triple-négatifs	HRD LOH HRD LST	43,8% 50%	
Telli 2015(Telli et al., 2015) PrECOG	Cancers du sein triple-négatifs et/ou mutation pathogène BRCA1/2, situation néo-adjuvante	HRD LOH (positif si ≥ 10) et/ou mutation délétère BRCA1/2. Test HRD LOH sur les biopsies pré-thérapeutiques.	76,9%	78% des cancers triple-négatifs étaient identifiés comme basal-like selon la classification intrinsèque. Selon la classification de Lehmann : 16% BL1, 4% BL2, 27% IM, 8% LAR, 27% M, 6% MSL, 12% instable
Manié 2016(Manié et al., 2016)	Cancers du sein triple-négatifs	HRD LST	52%	
Tutt 2018(A. Tutt et al., 2018) TNT	Cancers du sein triple-négatifs non sélectionnés, en phase avancée	HRD score (Myriad) (positif si ≥ 42) et/ou mutation pathogène tumorale BRCA1/2	41,5%	
Loibl 2018(Loibl, Weber, et al., 2018) GEPARSIXTO	Cancers du sein triple-négatifs stade II-III, situation néo-adjuvante	HRD score (Myriad) (positif si ≥ 42) et/ou mutation pathogène tumorale BRCA1/2	70,5%	60,3% HRD + sans mutation BRCA1/2
Sharma 2018(P. Sharma et al., 2018) SWOGS9313	Cancers du sein triple-négatifs, situation adjuvante	HRD score (Myriad) (positif si ≥ 42) et/ou mutation pathogène tumorale BRCA1/2	67%	
Mayer 2020(Mayer et al., 2020) TBCRC030	Cancers du sein triple-négatifs stade II-III, situation néo-adjuvante.	HRD score (Myriad) (positif si ≥ 33)	71,1%	

Tableau 6. Evaluation du statut HRD dans des cohortes de cancers du sein triple-négatifs

Signatures mutationnelles

Une autre approche pour mesurer l'HRD est de détecter par séquençage de l'ADN une signature mutationnelle qui lui est spécifique. En effet, en plus des aberrations

chromosomiques sus-mentionnées, le génome des tumeurs HRD est caractérisé par la présence de petites délétions (> 50 nucléotides) entourées de régions de micro-homologie (Moynahan et al., 2001; A. Tutt, 2001; Xia et al., 2001) qui peuvent être détectées par high coverage WGS et identifiées comme « cicatrices génomiques ». Par exemple les signatures 3 et 8 du COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations in Cancer) sont enrichies en cicatrices génomiques relatives à l'HRD (Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative et al., 2013; Nik-Zainal et al., 2016; Polak et al., 2017). Ainsi, le WGS permet de combiner dans un échantillon donné la détection de signatures mutationnelles et de réarrangements chromosomiques associés à l'HRD, permettant son diagnostic avec une grande robustesse, au prix d'un coût et d'un temps qui ne sont pas encore compatibles avec son application en pratique courante. La signature HRDetect est par exemple basée sur cette approche (Davies et al., 2017). Ce modèle a été développé sur une cohorte de 560 cancers du sein dont 22 cas présentant une mutation germinale de BRCA1/2 qu'il a été capable de détecter avec une sensibilité de 98,7 %. Il a ensuite été validé sur des cohortes indépendantes de cancer du sein, de l'ovaire et du pancréas, permettant la mise en évidence d'HRD au-delà des seules mutations de BRCA1/2. Une signature similaire appelée CHORD (Classifier Of Homologous Recombination Deficiency) a également été développée sur la base de l'analyse initiale de 3824 tumeurs solides (pan-cancer) avec ou sans inactivation bi-allélique de BRCA1/2 (L. Nguyen et al., 2020).

Enfin, une approche simplifiée basée sur la détection de la signature 3 à partir du séquençage d'un panel de gènes (au lieu d'un WGS comme HRDetect ou CHORD) a été récemment développée. Il s'agit de la signature SigMA (Signature Multivariate analysis) qui a montré des capacités de détection intéressantes dans l'étude de Gulhan (Gulhan et al., 2019).

Application aux cancers basal-like

Quelques études ont évalué le statut HRD dans les cancers du sein basal-like en utilisant des outils basés sur la détection de signatures mutationnelles spécifiques.

Ainsi Nik-Zainal et al. ont retrouvé un enrichissement en signature 3 dans les cancers basal-like (Nik-Zainal et al., 2016). Cette donnée a été confirmée par Polak et al. qui ont mis en évidence un enrichissement en signature 3 dans des cancers basal-like de jeunes femmes

afro-descendantes, en lien avec une répression épigénétique de BRCA1 et RAD51C par hyper-méthylation du promoteur de ces 2 acteurs de la RH (Polak et al., 2017).

D'autre part, Chopra et al. ont analysé 20 cancers du sein triple-négatifs avec la signature HRDetect. Sur ces 20 tumeurs, 15 (75 %) ont été classées comme basal-like selon la classification intrinsèque. De manière intéressante, 80 % (12/15) de ces tumeurs basal-like avaient un score HRDetect positif ($>0,7$). À l'inverse, seule 1 tumeur non-basal-like était HRD selon cette signature et ce cas correspondait à une tumeur BRCA1 muté exprimant Er α (Chopra et al., 2020).

Par ailleurs, Staaf et al. (Staaf et al., 2019) ont séquencé 254 cancers du sein triple-négatifs et classé 237 d'entre eux selon la signature HRDetect. De manière intéressante, 59 % des cas étaient HRDetect high ($> 0,7$), avec une cause génétique ou épigénétique retrouvée dans 67 % des cas (mutation germinale ou somatique de BRCA1/2, hyperméthylation du promoteur de BRCA1 ou RAD51C, perte biallélique de PALB2). Le statut HRD high était corrélé, après chimiothérapie adjuvante, à de meilleures survies sans maladie invasive (Hazard Ratio, HR=0.42, 95% confidence interval, CI=0.2-0.87) et survie sans progression à distance (HR=0.31, CI=0.13-0.76). La cohorte HRDetect high était comme attendu nettement enrichie en tumeur basal-like de la classification intrinsèque même si un nombre non négligeable de tumeurs basal-like étaient classées HRDetect low. Ainsi on retrouvait 92,1 et 54,1 % de tumeurs basal-like dans les cohortes HRDetect high et low respectivement. En considérant cette fois la classification de Lehmann, on retrouvait dans la cohorte HRDetect high un enrichissement en sous-type Basal-like 1 et Mesenchymal. Des données similaires ont été rapportées dans l'étude multi-omique de Lehmann et al. (Lehmann et al., 2021b).

Signatures transcriptomiques

Récemment, Walens et al. (Walens et al., 2022) ont développé une signature d'HRD basée sur le niveau d'expression de 51 gènes impliqués dans la réparation de l'ADN. En comparant à l'HRD score de Myriad (utilisé comme technique de référence), ils ont montré que cette signature transcriptomique pouvait détecter l'HRD avec une sensibilité de 84% et une spécificité de 73%.

De manière similaire, Konstantinopoulos et al. ont également développé une signature transcriptomique d'HRD, basée sur l'expression de 60 gènes et établie sur l'analyse de

cancers épithéliaux de l'ovaire muté pour BRCA1/2 (34 cas) ou non mutés (27 cas) (Konstantinopoulos et al., 2010).

De plus, Larsen et al. ont établi une signature transcriptomique « BRCA1-like » basée sur l'expression différentielle de 110 gènes dans 33 tumeurs BRCA1 muté et 128 tumeurs sporadiques (Larsen et al., 2013).

D'autre part, Peng et al. ont établi in vitro une signature transcriptomique d'HRD à partir de la lignée mammaire MCF10A dans laquelle ils ont réprimé par ARN-interférence certains gènes clés de la recombinaison homologue notamment BRCA1 et RAD51. Ils ont ensuite validé cette signature sur d'autres lignées cellulaires déficientes en gènes impliqués dans la RH et ont démontré sa capacité à prédire in vitro la réponse aux iPARP Olaparib et Rucaparib et in vivo la survie globale dans plusieurs cohortes pan-cancers de patients (Peng et al., 2014).

De manière similaire, Daemen et al. ont mis au point in vitro une signature transcriptomique d'HRD à partir de la réponse de 22 lignées cellulaires mammaires à une gamme de doses croissantes d'Olaparib (Daemen et al., 2012).

Application aux cancers basal-like

Dans l'étude de Walens et al. (Walens et al., 2022), la cohorte HRD high était enrichie en tumeurs basal-like et associée à un mauvais pronostic en termes de rechutes.

Par ailleurs, Severson et al. (Severson et al., 2017) ont mis au point une autre signature d'HRD basée sur le niveau d'expression de 77 gènes pré-sélectionnés pour leur expression différentielle dans des tumeurs triple-négatives classées HRD+ comparativement à des tumeurs triple-négatives classées HRD- (sur la base de leur CNA). Cette signature transcriptomique a été testée ensuite sur 116 tumeurs mammaires HER2- de l'essai I-SPY2 ayant reçu du Taxol (groupe contrôle) associé ou non avec l'iPARP Veliparib et du Carboplatine (groupe expérimental) en situation néo-adjuvante. Elle a donc permis de détecter un phénotype HRD + dans 47 % des cas (78 % des tumeurs triple-négatives et 14 % des tumeurs exprimant Er α). Ce phénotype HRD+ était corrélé à une meilleure réponse au Veliparib + Carboplatine.

Test fonctionnel : recrutement nucléaire de RAD51

Les différentes signatures présentées ci-dessus ont l'avantage de prédire avec précision le statut HRD, et ce, que les anomalies causales de l'HRD soient connues ou non. Néanmoins,

ces outils se basent sur la détection d'anomalies génétiques établies lors des phases précoces de la carcinogénèse et considérées comme étant des « cicatrices génomiques » (Watkins et al., 2014). Elles peuvent donc classer par erreur les tumeurs initialement HRD mais qui auraient secondairement restauré leur statut HR en activant des mécanismes compensatoires, la pression de sélection exercée par certains agents thérapeutiques (notamment les iPARP) pouvant favoriser cette situation de transition d'un statut HR déficient à proficient. Comme les signatures génomiques ne renseignent pas sur le statut de la RH en temps réel dans les tumeurs, plusieurs équipes ont cherché à contourner cette difficulté en développant des tests fonctionnels basés sur la détection en immunohistochimie du recrutement nucléaire de RAD51 sous forme de foci, après évènement génotoxique. En effet, comme précédemment évoqué, RAD51 est une protéine hautement impliquée dans la recombinaison homologue et son utilisation comme surrogate d'une RH proficiente a été validée par plusieurs travaux préliminaires réalisés sur biopsies tumorales mammaires fraîches après chimiothérapie (Asakawa et al., 2010; Graeser et al., 2010). Dans ces études, l'absence de recrutement de RAD51 (phénotype HRD) était corrélée à une meilleure réponse à la chimiothérapie. Eikesdal et al. ont montré que l'absence de recrutement de RAD51 était également corrélée à une meilleure réponse à l'Olaparib (Eikesdal et al., 2021).

D'autres travaux ont évalué le recrutement de RAD51 sur des tissus biopsiés avant traitement (McCabe et al., 2006; Meijer et al., 2018; Mutter et al., 2017; Naipal et al., 2014; Willers et al., 2009). Dans ce cas les cassures d'ADN étaient générées après irradiation ex vivo de ces tissus. De manière intéressante, Mutter et al. ont comparé cette technique fonctionnelle à la détection de l'HRD par Whole Exome Sequencing. Ils ont ainsi considéré 9 biopsies de carcinomes mammaires RAD51- (défiance fonctionnelle de la RH) et 15 biopsies RAD51+ (intégrité fonctionnelle de la RH). Les scores LST, TAI, LOH ainsi que le nombre d'insertions et délétions étaient significativement plus élevés dans le groupe RAD51- (Wilcoxon rank-sum test $p=0.002$, $p=0.009$, $p=0.048$ and $p=0.044$, respectivement) (Mutter et al., 2017). De plus, dans une étude similaire menée par Meijer, 60% (6/10) des tumeurs mammaires RAD51- analysées étaient enrichies en signature 3. Dans ce travail, le taux de tumeurs HRD non-BRCA identifiées par l'absence de recrutement de RAD51 (33%) était similaire au taux retrouvé via HRDetect (Meijer et al., 2018).

Enfin d'autres équipes ont tenté de réaliser ces marquages RAD51 sur des tissus tumoraux non exposés à un évènement génotoxique exogène de type chimiothérapie ou radiothérapie (Castroviejo-Bermejo et al., 2018; Cruz et al., 2018). Dans ce cas, l'analyse du recrutement de RAD51 se fait sur la base de l'existence dans ces tumeurs de cassures endogène spontanées de l'ADN. Ainsi Castroviejo-Bermejo et al. (Castroviejo-Bermejo et al., 2018) ont démontré la faisabilité de cette technique. Dans leur étude, le test fonctionnel de recrutement de RAD51 permettait de prédire la réponse aux iPARP avec une sensibilité et une spécificité de 100%, de manière encore plus robuste que le test HRD de Myriad.

Application aux cancers basal-like

Peu d'études ont étudié le recrutement nucléaire de RAD51 spécifiquement dans les cancers basal-like. En revanche, plusieurs études ont mis en évidence la corrélation entre absence de recrutement nucléaire de RAD51 et phénotype triple négatif.

Ainsi dans l'étude de Graeser et al. (Graeser et al., 2010), les tumeurs triple-négatives étaient plus fréquemment RAD51 déficientes, et ce de manière statistiquement significative. Naipal et al. (Naipal et al., 2014) ont rapporté le même résultat. De même, Chopra et al. (Chopra et al., 2020) ont montré que 77% des tumeurs triple négatives analysées dans leur étude étaient RAD51 déficientes.

Par ailleurs, dans l'étude de Willers et al. (Willers et al., 2009), 75% des tumeurs mammaires RAD51 déficientes (3/4) étaient triple-négatives. Cet enrichissement en tumeurs triple-négatives dans le sous-groupe RAD51 déficient a également été décrit par Meijer et al. (Meijer et al., 2018).

Enfin, le travail de Hill et al. (Hill et al., 2014) a étudié spécifiquement le recrutement de RAD51 dans des lignées cellulaires de cancers du sein basal-like, comparativement à des lignées de cancers du sein non basal-like et à des échantillons non tumoraux. De manière intéressante, seulement un tiers des lignées basal-like étaient RAD51 déficiente, les autres ayant des niveaux de recrutement nucléaire de RAD51 similaires aux contrôles. Ces données sont confortées par l'étude de Ter Brugge et al. dans laquelle le recrutement de RAD51 après traitement par sel de platine a été étudié dans 32 PDX basal-like précoces. Dans ce travail 46,9% (15/32) des cas étaient RAD51 déficients et 53,1% (17/32) étaient RAD51 proficients. Parmi les PDX RAD51 déficients, 93,3% (14/15) présentaient une HRD en shallow WGS et 6,7% (1/15) étaient considérés comme HRP. Parmi les PDX RAD51 proficients, 35,3% (6/17)

étaient HRD et 64,7% (11/17) étaient HRP (Ter Brugge et al., 2023). Ceci suggère qu’une partie seulement des cancers basal-like présentent une déficience fonctionnelle en RH ou bien que l’HRD ne se manifeste pas forcément par une perte de recrutement de RAD51 dans un sous-groupe de cancers basal-like. Des études plus approfondies semblent nécessaires pour éclairer ce point.

La **Figure 32** récapitule les moyens de détecter l’HRD dans les tumeurs basal-like et triple négatives et la prévalence de ce phénomène dans ces sous-types de cancers du sein.

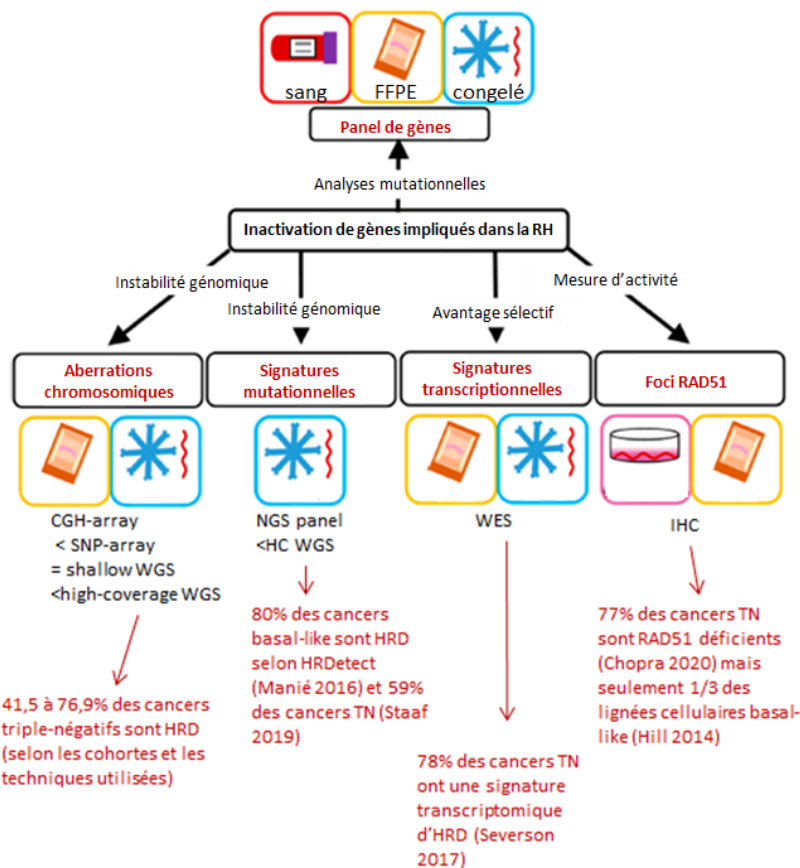


Figure 32. Moyens de détection et prévalence de l’HRD dans les cancers du sein basal-like/triple-négatifs. D’après Ladan 2021.

Causes de l’HRD dans les cancers basal-like

Au-delà de BRCA1 et BRCA2 qui constituent des gènes de prédisposition importants, de nombreux autres gènes sont impliqués dans la RH (Scully et al., 2019). Certains d’entre eux peuvent être la cible de différents mécanismes d’inactivation : répression épigénétique (par

exemple par hyperméthylation de leur promoteur), mutation inactivatrice, silencing post transcriptionnel (Bodily et al., 2020). Généralement, dans les tumeurs HRD, les 2 allèles sont retrouvés inactivés, bien que plusieurs études aient montré que l'inactivation mono-allélique de BRCA1 (haplo-insuffisance) est déjà associée à un certain niveau d'instabilité génétique favorisant l'apparition ultérieure d'un phénotype HRD (Cousineau & Belmaaza, 2007; Konishi et al., 2011; Rennstam et al., 2010; Sedic et al., 2015). Dans ce chapitre nous détaillerons donc les différents mécanismes d'inactivation des gènes de la recombinaison homologue impliqués dans l'acquisition d'un phénotype HRD dans les cancers basal-like.

Altérations génétiques

BRCA1 et BRCA2

Au début des années 2000, plusieurs études ont ainsi analysé la prévalence des mutations BRCA1 et 2 dans des cohortes de cancers du sein triple-négatifs constituées de sujets sélectionnés sur leurs antécédents familiaux ou encore leur âge. Dans ces cohortes, comme rapporté par Hartman et al. (Hartman et al., 2012), la prévalence des mutations BRCA1 était de 6,5 à 34,4% selon les séries. La prévalence des mutations BRCA2 était de 0 à 9,2%. D'autres études similaires ont été passées en revue par Peshkin et al. avec des taux de mutation allant de 9 à 100% (moyenne 35%) pour BRCA1 et 2 à 12% (moyenne 8%) pour BRCA2 (Peshkin et al., 2011).

Par la suite, des études complémentaires se sont intéressées à la prévalence des mutations BRCA1 et BRCA2 dans des populations de tumeurs triple-négatives non sélectionnées. Dans l'étude de Hartman et al., 6,5% (13/199) des patientes présentaient une mutation germinale de BRCA1 et 4% (8/199) des patientes présentaient une mutation germinale de BRCA2 (Hartman et al., 2012).

Dans l'étude de Gonzalez-Angulo et al. (Gonzalez-Angulo et al., 2011), le taux de mutation de BRCA1 était de 19,5% (15/77 dont 1 seule mutation somatique) et le taux de mutation de BRCA2 était de 3,9% (3/77, pas de mutation somatique), confirmant les données de Janatova et al. (Janatova et al., 2005) selon lesquelles les mutations somatiques de BRCA1 et 2 sont rares dans les cancers du sein sporadiques. De manière intéressante, ces mutations de BRCA1 et 2 étaient associées à une meilleure survie sans récurrence (HR: 0.19, 95% CI: 0.045–0.79, P = 0.016) (Gonzalez-Angulo et al., 2011).

D'autre part, Couch et al. ont analysé le taux de mutation germinale de gènes de prédisposition dans 1824 cas de cancers du sein triple-négatifs non sélectionnés. Ils ont retrouvé un taux de mutation germinale de BRCA1 de 8,5% (155/1824) et de BRCA2 de 2,7% (49/1824) (Couch et al., 2015).

Dans l'étude de Brianese et al., 11,5% (15/131) des cancers triple-négatifs de la cohorte présentaient une mutation germinale de BRCA1, 0,8% (1/131) une mutation somatique de BRCA1 et 1,5% (2/131) une mutation germinale de BRCA2. Dans cette étude, l'inactivation de BRCA1 était également associée à un meilleur pronostic en termes de survie globale et survie sans progression (Brianese et al., 2018).

Dans l'étude d'Engel et al. ayant analysé 802 tumeurs triple-négatives unilatérales chez des femmes sans histoire familiale de cancer du sein, le taux de mutation germinale de BRCA1 était de 14,7% (118/802) et le taux de mutation germinale de BRCA2 était de 1,1% (9/802) (on behalf of the German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer (GC-HBOC) et al., 2018).

Dans la cohorte chinoise exploitée par Ma et al. (Ma et al., 2021) et comprenant 325 cancers du sein triple négatifs non sélectionnés, les gènes BRCA1 et BRCA2 présentaient une mutation germinale dans 7,4 (24/325) et 2,2 (7/325) % des cas respectivement.

De plus, les travaux de Shimelis et al. (Shimelis et al., 2018) ont permis de comparer les taux de mutations germinales pour les gènes BRCA1 et BRCA2 dans 8753 cancers triples négatifs en fonction de l'origine géographique des patientes. Ainsi dans cette étude le taux de mutations germinales de BRCA1 était de 5,6% dans la population caucasienne et 5,9% dans la population afro-américaine. Le taux de mutation germinale de BRCA2 était de 2,2 et 3,1% dans ces populations respectivement.

A noter également que dans l'étude de Manié et al., 52% (69/132) des cas de cancers du sein triple-négatifs présentait une signature HRD LST+. Sur ces 69 cas, 30% (21/69) une mutation/délétion de BRCA1 et 12% (8/69) une inactivation de BRCA2 (Manié et al., 2016).

Enfin, les travaux de séquençage du réseau TCGA ont permis d'évaluer le taux de mutation de BRCA1/2 spécifiquement dans le sous-type basal-like. Sur 81 cancers basal-like, environ 20% présentait une mutation de BRCA1/2 : 12% de mutation germinale et 8% de mutation somatique (The Cancer Genome Atlas Network, 2012).

Autres gènes de la recombinaison homologue

PALB2

Plusieurs études ont identifié PALB2 comme un gène de susceptibilité au cancer du sein (Easton et al., 2015; Tischkowitz & Xia, 2010). En effet, la plupart de ces études ont montré un enrichissement en diverses mutations de PALB2 dans des cohortes de formes familiales de cancers du sein (Antoniou et al., 2014; A.-Y. Cao et al., 2009; Dansonka-Mieszkowska et al., 2010; Erko et al., 2007; Foulkes et al., 2007; García et al., 2009; Heikkinen et al., 2009; Papi et al., 2010; Sluiter et al., 2009; Southey et al., 2016; The Breast Cancer Susceptibility Collaboration (UK) et al., 2007; Thompson et al., 2016; Tischkowitz et al., 2007).

De plus, Polak et al. ont montré que de telles mutations de PALB2 étaient associées à la signature 3 (signature mutationnelle d'HRD) (Polak et al., 2017).

Ainsi, par exemple, dans l'étude de Heikkinen, la mutation 1592delT de PALB2 était retrouvée chez 19 patients dans la cohorte familiale (2,0 %, odds ratio 11,03, 95 % CI 2,65 – 97,78, $p < 0,0001$) versus 8 patients dans la cohorte sporadique (0,6 %, odds ratio, 3,40, 95 % CI 0,68 – 32,95, $p = 0,1207$) et 2 patients dans la cohorte contrôle (0,2 %). Ces cancers PALB2 déficients correspondaient majoritairement à des cancers de phénotype basal-like en IHC.

Par ailleurs dans l'étude de Couch et al. 1,1% (21/1824) des cancers triple-négatifs de la cohorte avaient une mutation germinale de PALB2 (Couch et al., 2015).

Dans l'étude de Zhang et al., 55,9% (132/236) des cas de cancers du sein triple-négatifs métastatiques présentaient une mutation germinale d'un gène de la RH parmi lesquels étaient inclus 5 cas de variants pathogènes de PALB2 (2,1%).

Dans l'étude chinoise de Ma et al., seulement 0,6% des cancers triples négatifs (2/325) présentaient une mutation germinale de PALB2 (Ma et al., 2021).

Enfin, dans l'étude de Shimelis et al. (Shimelis et al., 2018) 1,7% de la cohorte caucasienne de cancers du sein triple-négatifs et 0,8% de la cohorte afro-américaine démontraient une mutation germinale de PALB2, soulignant les différences ethniques dans le spectre de variants impliqués dans la biologie de ces tumeurs.

BARD1

En 2020, Bodily et al. (Bodily et al., 2020) ont analysé la cohorte mammaire du TCGA composée de 1101 cas de cancers du sein de différents sous-types. Dans cette cohorte, ils ont retrouvé 8 altérations du gène BARD1 (0,7% des cas) : 1 mutation germinale, 2

mutations somatiques, 5 délétions homozygotes. Ces tumeurs BARD1 déficientes présentent une signature mutationnelle similaire aux tumeurs BRCA1 déficientes, suggérant l'implication d'altérations de BARD1 dans la carcinogénèse de quelques tumeurs HRD.

Cette observation vient conforter les données de Polak et al. qui ont rapporté le cas d'une tumeur BARD1-/- associée à la signature 3 (Polak et al., 2017).

Sabatier et al. ont également rapporté le cas d'une jeune femme de 36 ans présentant un carcinome mammaire avec une délétion homozygote de BARD1 (1 perte héréditaire et 1 perte somatique). Cette tumeur était caractérisée comme HRD en CGH et basal-like en profil d'expression génique (Sabatier et al., 2010).

Néanmoins, les altérations de BARD1 semblent relativement rares parmi les cancers du sein triple négatifs. En effet, Couch et al. ont retrouvé un taux de mutation germinale de BARD1 de 0,5% (9/1824) dans leur série (Couch et al., 2015).

De leur côté, Shimelis et al. ont mis en évidence un taux de mutation germinale de BARD1 de 0,7% dans leur cohorte caucasienne et 1,2% dans leur cohorte afro-américaine (Shimelis et al., 2018).

Dans la population chinoise, l'équipe de Zhang et al. (J. Zhang et al., 2018) a montré un taux de 3,8% de variants pathogènes de BARD1 (9/236) tandis que l'équipe de Ma et al. (Ma et al., 2021) n'en a retrouvé aucun dans sa cohorte (0/325).

RAD51D

Les mutations germinales de RAD51D dans les cancers du sein triple-négatifs sont rares dans les populations non asiatiques (estimées à 0,4% dans l'étude de Couch et al. (Couch et al., 2015) et 0,3% dans l'étude de Shimelis et al. (Shimelis et al., 2018)). Néanmoins, elles semblent plus fréquentes dans les populations asiatiques : 0,8% (2/236) dans l'étude de Zhang et al. et surtout 2,8% (9/325) dans l'étude de Ma et al. (Ma et al., 2021). Dans cette même étude était retrouvée une association entre mutation germinale de RAD51D et statut HRD déterminé en NGS.

PTEN

Même si la perte bi-allélique de PTEN (Phosphatase and TENsin homolog) a été décrite comme associée à l'HRD (Mendes-Pereira et al., 2009), il est difficile de savoir si cette perte contribue à l'HRD ou est seulement la conséquence de celle-ci (Saal et al., 2008).

Dans la série de cancers du sein triple-négatifs de Couch et al., le taux de mutation germinale de PTEN était de 0,05% (1/1824) (Couch et al., 2015).

Le même chiffre a été rapporté dans la cohorte clinique de Shimelis et al. (0,05% soit 4 cas/8719, toute ethnie confondue) (Shimelis et al., 2018).

Autres gènes

La voie de la recombinaison homologue étant complexe et régulée par de nombreux autres gènes, la question de l'implication de certains de ces gènes dans l'acquisition d'un phénotype d'HRD mérite d'être posée. McCabe et al. (McCabe et al., 2006) ont donc évalué in vitro la sensibilité à différents iPARP de cellules déficientes en protéines impliquées dans la RH. Dans cette étude, les cellules déficientes en RAD51, RAD54, SEM1 (Suppressor of Exocyst Mutations), RPA1 (Replication Protein A1), NBN (Nibrin), ATR, ATM, CHEK1 (Checkpoint kinase 1), CHEK2, FANCD2 (Fanconi anemia group D2 protein), FANCA ou FANCL présentaient une sensibilité accrue aux iPARP. D'autres gènes tels que BAP1 (BRCA1 associated protein-1), CDK12 (Cyclin Dependent Kinase 12), BRIP1 (BRCA1 interacting helicase 1), BLM (Bloom syndrome protein), WRN (Werner Syndrome Helicase), MRE11A (Meiotic Recombination 11 homolog A), RAD51B, RAD51C ont également été décrits comme associés à un phénotype d'HRD lorsqu'ils sont altérés (Lord & Ashworth, 2016). Actuellement il existe donc des panels de gènes liés à la RH pouvant être séquencés en pratique clinique en remplacement ou en complément des techniques d'évaluation de l'HRD sus-mentionnées. Par exemple, De Bono et al. ont évalué dans l'essai PROFOUND l'efficacité d'un traitement par Olaparib (vs Enzalutamide ou Abiraterone) chez des hommes atteints d'un cancer de prostate métastatique résistant à la castration, progressifs après une ligne d'hormonothérapie de seconde génération et porteurs d'au moins une altération sur l'un des gènes présélectionnés pour leur rôle direct ou indirect dans la recombinaison homologue. Le panel de gène incluait donc BRCA1, BRCA2 et ATM (cohorte A) et BRIP1, BARD1, CDK12, CHEK1, CHEK2, FANCL, PALB2, PPP2R2A (Protein Phosphatase 2 Regulatory Subunit Balpha), RAD51B, RAD51C, RAD51D et RAD54L (cohorte B). Un bénéfice de l'Olaparib en termes de survie sans progression radiologique et survie globale a donc été retrouvé dans la cohorte A et dans la population globale (cohorte A + B) (de Bono et al., 2020).

Néanmoins le taux d'altérations de ces gènes additionnels spécifiquement dans les carcinomes mammaires triple-négatifs/basal-like semble faible.

Ainsi dans la cohorte de 1824 cancers du sein triple-négatifs de Couch et al., les taux de mutations germinales d'ATM, CHEK2, BRIP1, MRE11A et RAD51C étaient respectivement de 0,11, 0, 0,44, 0,11 et 0,33 %. (Couch et al., 2015) Dans la cohorte de Shimelis et al., ils étaient respectivement de 0,26, 0,33, 0,42, 0,09 et 0,48 (Shimelis et al., 2018). Néanmoins, dans ces études, il n'y a pas eu d'analyses des mutations somatiques ni des CNA. La **Figure 33** représente donc les altérations, germinales ou somatiques ainsi que les CNA des gènes de la recombinaison homologues sus-mentionnés, spécifiquement dans le sous-groupe basal-like de la cohorte mammaire du TCGA et comparativement aux autres sous-types moléculaires (Cerami et al., 2012; The Cancer Genome Atlas Network, 2012).

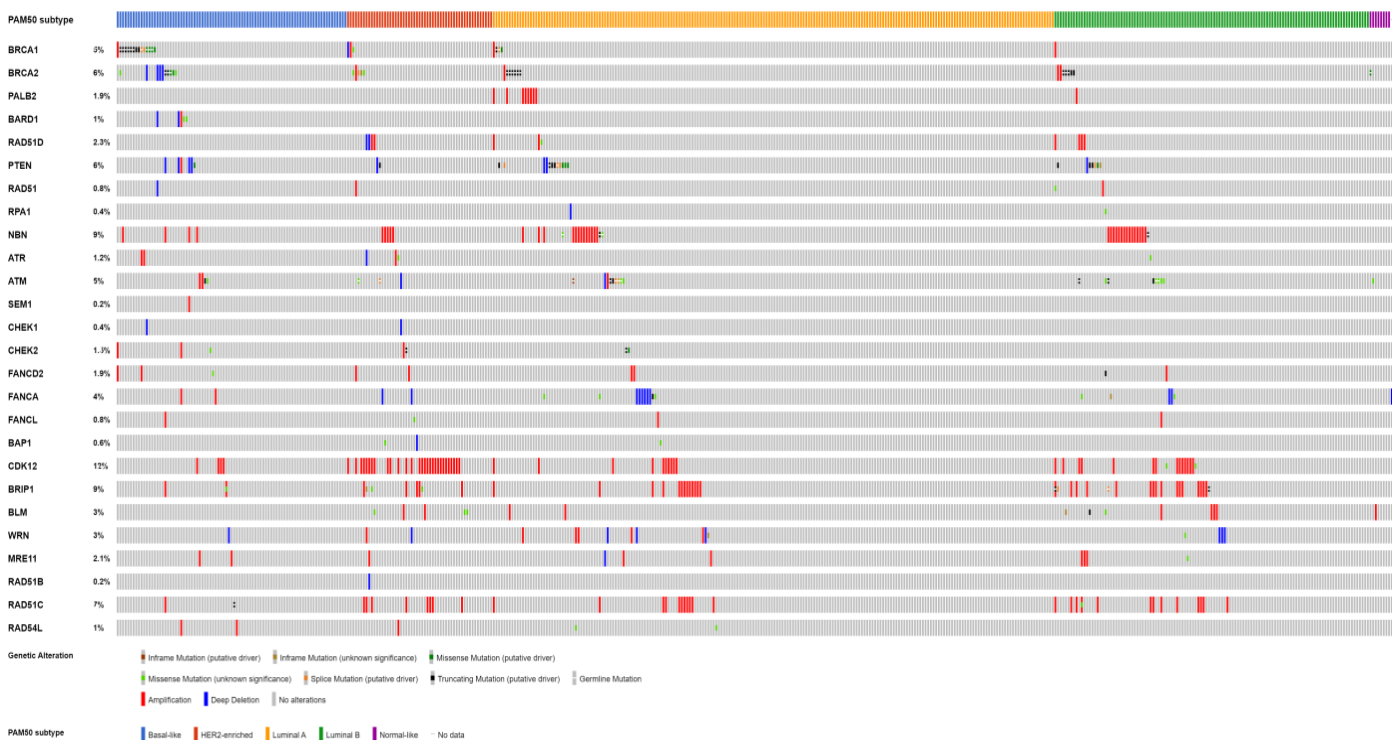


Figure 33 Altérations des gènes de la recombinaison homologues dans la cohorte mammaire du TCGA.

Dérégulations transcriptionnelles

Même si le nombre de gènes potentiellement impliqués dans l'acquisition d'un phénotype d'HRD est conséquent, les mutations et CNA portant sur ces gènes n'expliquent pas à elles seules l'ensemble des cas d'HRD dans les cancers du sein basal-like/triple négatifs. Il a donc

été proposé que des dérégulations transcriptionnelles de certains de ces gènes puissent constituer des phénomènes alternatifs expliquant l'HRD dans ces cancers.

Hyperméthylation du promoteur de BRCA1

De nombreux travaux, répertoriés par Watanabe et al. (Watanabe et al., 2013), ont ainsi identifié l'hyperméthylation du promoteur de BRCA1 dans certains sous-groupes de cancers du sein sporadiques.

Parmi ces travaux, nous pouvons citer l'étude d'Esteller et al. qui a retrouvé une hyperméthylation du promoteur de BRCA1 dans 13% (11/84) des tumeurs mammaires non sélectionnées étudiées. Dans une deuxième série, 20% (9/45) des carcinomes mammaires présentant une perte d'hétérozygotie pour BRCA1 présentaient une inactivation du deuxième allèle par hyperméthylation du promoteur de BRCA1 (Esteller, 2000). Dans la cohorte chinoise de Chen et al., 26% (139/536) des cas de cancers du sein sporadiques présentaient une hyperméthylation du promoteur de BRCA1 et cet évènement était associé à une moindre survie sans progression (Chen et al., 2009). Par ailleurs Lips et al. ont retrouvé une hyperméthylation du promoteur de BRCA1 dans 25% (41/163) des cas de cancers du sein HER2- étudiés (Lips, Mulder, et al., 2011a).

L'hyperméthylation du promoteur de BRCA1 a également été étudiée plus spécifiquement dans les tumeurs triple négatives.

En effet, dès 1999, Catteau et al. ont recherché la méthylation du promoteur de BRCA1 dans 96 cancers du sein invasifs. Cet évènement a été retrouvé dans 11% des cas et était fortement associé au phénotype triple négatif (Catteau et al., 1999). Dans l'étude de Watanabe et al., 23% (7/30) des cas de cancers du sein triple-négatifs analysés présentaient une hyperméthylation du promoteur de BRCA1 contre seulement 3% (1/29) dans le groupe contrôle de tumeurs lumineales ($p = 0,03$) (Watanabe et al., 2013). De plus, Yamashita et al. ont analysé le statut de méthylation de 69 cancers du sein triple-négatifs localisés. Dans cette étude, 16% (11/69) des cas étaient positifs. Il n'y avait aucun cas positif dans la cohorte contrôle constituée de 161 tumeurs non triple-négatives. Par ailleurs, l'hyperméthylation du promoteur de BRCA1 était significativement associée à l'invasion lympho-vasculaire, au grade nucléaire et à la faible expression transcriptionnelle et protéique de BRCA1 (Yamashita et al., 2015). Par ailleurs, dans une analyse translationnelle de l'essai SWOG9313, Sharma et al. ont retrouvé une hyperméthylation du promoteur de BRCA1 dans 32% (111/348) des

cancers triple-négatifs localisés de la cohorte (P. Sharma et al., 2018). De manière similaire, Brianese et al. ont retrouvé des taux de 20,6% (27/131) (Brianese et al., 2018). Tian et al. ont retrouvé un chiffre semblable de 25,2% (38/151) (Tian et al., 2019). Pour rappel, dans l'étude de Manié et al., 52% (69/132) des cancers triple-négatifs de la cohorte était HRD (LST+), dont 35% (24/69) avec une hyperméthylation du promoteur de BRCA1 (Manié et al., 2016).

Des études ont également concerné spécifiquement les cancers basal-like.

Dans l'étude de Matros et al. de 2005, le taux d'hyperméthylation du promoteur de BRCA1, bien que de 21% (16/75) dans leur cohorte de cancers du sein sporadique, était faible parmi les cancers du sein basal-like (Matros et al., 2005). Ces données ont été confirmées par l'étude de Turner et al. de 2007. En effet, cette étude a analysé 37 cancers du sein sporadiques exprimant la cytokératine basale 5/6 ainsi que des contrôles appariés sur l'âge et le grade. L'hyperméthylation du promoteur de BRCA1 dans cette étude était de 14% dans la cohorte basale et 11% dans la cohorte contrôle (différence non significative, $p = 0,72$) (N. C. Turner et al., 2007). Dans l'étude de Joosse s'intéressant à 41 cancers basal-like, les résultats étaient un peu différents. En effet l'hyperméthylation du promoteur de BRCA1 était retrouvée dans 34% (14/41) des cas et était significativement associée à une faible expression transcriptionnelle de BRCA1 (Joosse et al., 2011). Enfin, dans l'étude indienne de Bal et al., 24% (11/45) des cas de cancers du sein sporadiques étudiés démontraient une hyperméthylation du promoteur de BRCA1. Ces 11 cas présentaient une expression réduite voire une absence d'expression protéique de BRCA1 et un phénotype basal.

A noter que dans l'essai de phase II PETREMAC mené sur des patientes présentant un cancer du sein triple négatif localisé de stade II/III, l'hyperméthylation du promoteur de BRCA1 était associée de manière significative à une meilleure réponse à l'Olaparib. A l'inverse, dans une étude récente menée par Ter Brugge et al. sur des PDX de cancers du sein triple-négatifs localisés, la méthylation du promoteur de BRCA1 n'était pas associée à une meilleure réponse aux sels de platine. Néanmoins, dans cette étude, seul un niveau de méthylation de BRCA1 de 90 à 100% était associé à une extinction complète de son expression, des niveaux de méthylation inférieurs (40 à 60 %) pouvant être associés à une expression résiduelle de BRCA1 et à une résistance aux sels de platine (Ter Brugge et al., 2023).

Surexpression d'Id4

Les protéines de la famille Id (Id1 – Id4) sont des protéines possédant un domaine de dimérisation en hélice-double-hélice grâce auquel elles peuvent former des hétérodimères avec des facteurs transcriptionnels également structurés en hélice-boucle-hélice mais présentant aussi un domaine basique de liaison à l'ADN. Comme les protéines Id ne possèdent pas ce domaine de fixation à l'ADN, les hétérodimères qu'elles forment avec les facteurs de transcription antagonisent ces derniers en les empêchant d'interagir avec l'ADN. Elles sont donc considérées comme des régulateurs transcriptionnels dominants négatifs (Ruzinova & Benezra, 2003). Dans la famille Id, Id4 a notamment été identifié comme un régulateur négatif de l'expression de BRCA1 (Beger et al., 2001), notamment dans certains cancers du sein sporadiques Er α négatifs (Roldán et al., 2006). Par ailleurs, dans l'étude de Branham et al., la déméthylation d'ID4 était positivement corrélée à son expression transcriptionnelle et protéique et fortement associée à un phénotype de BRCAness mesuré par MLPA dans 63 tumeurs mammaires. De manière intéressante, la surexpression d'Id4 est fortement associée au phénotype basal-like (Branham et al., 2016).

Ainsi, dans l'étude de Turner et al., le niveau d'expression d'Id4 (évalué par qPCR) dans les 37 tumeurs sporadiques basal-like étudiées, était 9,1 fois plus important que dans les contrôles non basal-like appariés sur l'âge et le grade ($p < 0.0001$) (N. C. Turner et al., 2007). De plus, Wen et al. ont comparé le niveau d'expression d'Id4 en IHC dans 101 cancers triple-négatifs comparativement à 113 cancers non triple-négatifs. Dans cette étude, 75% (76/101) des cas triple-négatifs présentaient une immunoréactivité pour Id4, dont 40% (40/101) avec un marquage positif dans plus de 50% des cellules tumorales. A l'inverse, seulement 5 % (6/113) des cas contrôles étaient positifs pour Id4 ($p < 0.0001$). L'expression d'Id4 était significativement associée au grade nucléaire, à l'index mitotique et à l'expression de la cytokératine basale CK14 (non significatif pour CK5/6 et EGFR) (Wen et al., 2012). De manière similaire, Thike et al. ont évalué le statut d'Id4 en IHC dans 699 cas de cancers du sein triple-négatifs organisés en TMA. Dans cette étude, l'expression d'Id4 était retrouvée dans 95 % (663/699) des cas parmi lesquels 45,6% (317/699) d'expression intense et 65% (454/699) d'expression dans plus de 50% des cellules tumorales. L'expression d'Id4 était significativement associée au stade, au grade, à l'index mitotique et au phénotype basal-like défini en IHC par l'expression de CK14, EGFR et 34 β E12 (Thike et al., 2016). De plus, Junankar et al. ont analysé le niveau d'expression d'Id4 en IHC dans une cohorte de 80 cancers du sein

basal-like. Dans cette étude, 37,5 % (30/80) des cas présentaient un niveau d'expression élevé d'Id4 (Id4 high). Le statut Id4 high était significativement associé à un pronostic défavorable en termes de survie globale à 3 ans (hazard ratio for death 4.24, $p < 0.0008$), et ce de manière indépendante du grade ou de la prolifération estimée par le Ki67. Le même impact pronostic défavorable était retrouvé pour l'expression transcriptionnelle d'Id4 dans 2 autres cohortes indépendantes de cancers du sein basal-like de 60 et 285 cas respectivement. Dans ces cohortes, Id4 était hautement exprimé dans environ 50 % des cas. A noter que dans ce même travail, la répression d'Id4 dans des modèles cellulaires de cancers basal-like était associée in vitro à une moindre prolifération et in vivo à une moindre croissance tumorale ce qui pourrait expliquer la différence de pronostic entre les cohortes Id4 high et Id4 low (Junankar et al., 2015). A noter également que dans le TCGA, le transcriptome des cancers basal-like ID4 high était enrichi en de nombreux gènes impliqués dans la biologie des cellules souches mammaires. Ce rapport entre Id4 et stemness pourrait également expliquer en partie l'impact pronostic négatif d'Id4 (Junankar et al., 2015). Néanmoins, les fonctions biologiques d'Id4 spécifiquement dans les cancers basal-like restent obscures. De ce fait, Baker et al. ont analysé par Chip-seq l'interactome d'Id4 avec la chromatine dans différentes lignées cellulaires de cancers du sein basal-like et de carcinomes séreux ovariens de haut grade). Ils ont également identifié par RIME (Rapid immunoprecipitation and mass spectrometry of endogenous proteins) l'ensemble des interactions protéiques d'Id4 dans ces modèles. De manière intéressante, ils ont montré qu'outre son rôle canonique de régulateur transcriptionnel dominant négatif, Id4, dans les cancers basal-like, pouvait interagir avec certaines zones de l'euchromatine et ce même en l'absence de tout domaine connu de fixation à l'ADN. Ces zones d'interactions correspondent à des sites de transcription active et de dommages à l'ADN. A ce niveau, Id4 ne semble pas influencer la transcription mais plutôt interagir avec de nombreuses protéines impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN. Les conséquences exactes de ces interactions sur le maintien de l'intégrité du génome et la stabilité génomique restent à déterminer mais ces découvertes pourraient faire le lien entre surexpression d'Id4 et BRCAness dans certains cancers basal-like (Baker et al., 2020).

Autres mécanismes

Plusieurs autres mécanismes de dérégulations transcriptionnelles et épigénétiques d'acteurs de la recombinaison homologues ont été décrits dans les carcinomes mammaires et récemment passés en revue par Mekonnen et al. (Mekonnen et al., 2022). Ces mécanismes incluent notamment l'hyperméthylation de RAD51C et de FANCF. Ainsi, dans l'étude de Polak et al. l'hyperméthylation du promoteur de RAD51C était bien corrélée à une baisse significative d'expression de l'ARNm de RAD51C et fortement associée à la signature 3. De manière intéressante, parmi les patientes présentant cette anomalie épigénétique, on retrouvait un enrichissement en patientes jeunes afro-descendantes présentant un cancer basal-like. Néanmoins, la contribution de l'hyperméthylation du promoteur de RAD51C dans l'acquisition d'un phénotype d'HRD dans les cancers basal/like triple-négatifs semble faible. En effet, dans l'étude de Manié et al., seulement 4% (3/69) des cas de cancers du sein triple-négatifs HRD+ (LST+) présentait cette altération (Manié et al., 2016).

De la même manière, bien que Turner et al. aient initialement proposé l'hyperméthylation du promoteur de FANCF comme mécanisme d'HRD (N. Turner et al., 2004), la fréquence de cette altération est de moins de 1% dans la cohorte de cancers du sein multi-sous-types de Wei et al. (Wei et al., 2008).

Par ailleurs, EMSY est un gène situé sur le chromosome 11q13 dont la protéine interagit avec l'exon 3 du gène BRCA2 conduisant à sa répression transcriptionnelle (Hughes-Davies et al., 2003). La surexpression d'EMSY in vitro conduit à l'accumulation d'aberrations chromosomiques similaires à celles observables en contexte de mutation inactivatrice de BRCA2, faisant de l'amplification/surexpression d'EMSY une cause potentielle d'HRD (A. L. Bane et al., 2011). L'amplification d'EMSY a été décrite dans un certain nombre de cancer du sein sporadique et corrélée à un mauvais pronostic (A. L. Bane et al., 2011; Cousineau & Belmaaza, 2011; Holm et al., 2012; Hughes-Davies et al., 2003; Lips, Mulder, et al., 2011b; Madjd et al., 2014; Navazio et al., 2016; Rodriguez et al., 2004). Néanmoins, cette altération est rare dans les cancers basal-like et est plutôt associée au phénotype luminal B (A. L. Bane et al., 2011; Holm et al., 2012).

Les gènes de la famille homeobox (HOX) sont des morphogènes codant pour des facteurs de transcription régulant l'expression de nombreux gènes impliqués dans la croissance cellulaire et la différenciation. Ils sont fréquemment dérégulés dans de nombreux cancers (Grier et al., 2005, p. 2). Gilbert et al. ont ainsi identifié HOXA9 comme un régulateur positif

de l'expression de BRCA1 et ont montré que son niveau d'ARNm était significativement plus faible dans leur cohorte de 47 tumeurs triple-négatives, comparativement aux contrôles non tumoraux. Néanmoins les conséquences de la perte d'HOXA9 sur l'acquisition d'un phénotype d'HRD restent à déterminer. De plus, dans la cohorte mammaire du TCGA, HOXA9 n'apparaît pas inactivé ou réprimé dans les cancers basal-like (The Cancer Genome Atlas Network, 2012).

Enfin, HMGA1b (High Mobility Group A1b) est une protéine capable de se fixer à l'ADN au niveau de régions riches en AT et d'interagir avec différents facteurs de transcription dont elle peut moduler l'activité. Baldassarre et al. ont démontré que cette protéine pouvait interagir directement avec le promoteur de BRCA1 conduisant à sa répression transcriptionnelle (Baldassarre et al., 2003). La surexpression d'HMGA1b reste toutefois relativement rare dans les cancers basal-like (1 seul cas d'amplification dans la cohorte mammaire du TCGA (The Cancer Genome Atlas Network, 2012)) et les conséquences en termes d'HRD restent également à déterminer.

Dérégulations post-transcriptionnelles

En complément des mécanismes d'HRD précédemment détaillés, certaines équipes ont cherché à explorer l'impact de certains miRNA sur la régulation post-transcriptionnelle de certains acteurs de la recombinaison homologue, notamment BRCA1. Ainsi Garcia et al., ont démontré la capacité de miR-146a et miR-146b-5p à réprimer BRCA1. Comme attendu, dans cette étude, les plus hauts niveaux d'expression de ces miRNA étaient retrouvés dans les lignées cellulaires de cancers basal-like et dans les tissus de cancers triple-négatifs (Garcia et al., 2011). En étudiant les données du TCGA, M'hamed et al. ont confirmé que miR-146a est significativement surexprimé dans les cancers du sein triple-négatifs comparativement aux cancers non triple-négatifs. Néanmoins ils ont échoué à démontrer la capacité de ce miRNA à réprimer BRCA1 dans la lignée de cancer du sein triple-négatif mesenchymal-like MDA-MB-231, contrairement à miR-10b et miR-26a (Fkih M'hamed et al., 2015). De plus, Shen et al. et Pastrello et al. ont montré que certains polymorphismes de miR-146a étaient associés à un diagnostic de cancer du sein plus précoces dans certains groupes à risque, soulignant l'impact probable de ce miRNA dans la tumorigénèse de certains cancers du sein (Pastrello et al., 2010; Shen et al., 2008).

Par ailleurs, Moskwa et al. ont mis en évidence une corrélation inverse statistiquement significative entre le niveau d'expression d'un autre miRNA, miR-182, et BRCA1 dans un panel de lignées cellulaires de cancers du sein triple-négatifs. Inversement, ils ont aussi montré que dans ces modèles, la répression de miR-182 conduisait à la surexpression de BRCA1, suggérant un rôle pour ce miRNA dans la régulation post-transcriptionnelle de BRCA1 (Moskwa et al., 2011; Yao & Ventura, 2011).

Shen et al. et De Summa et al. ont montré qu'un autre miRNA, miR-17, était capable d'interagir avec l'extrémité 3'UTR de l'ARNm de BRCA1 et de l'inactiver (De Summa et al., 2014; Shen et al., 2009). Ce miRNA était retrouvé surexprimé dans la lignée MDA-MB-231 (De Summa et al., 2014).

De plus, Tan et al. ont également identifié le transcrite de BRCA1 comme une cible directe de miR638 dans des lignées de cancer du sein triple-négatifs. Dans leur étude, la surexpression de ce miRNA induisait une hypersensibilité au Cisplatine. Néanmoins, il était retrouvé plutôt sous-exprimé dans les tissus primaires triple-négatifs de leur cohorte (Tan et al., 2014).

En outre, Quann et al. ont montré que plusieurs miRNA de la famille miR15/107 ont la capacité à interagir directement avec la séquence codante de l'ARNm de BRCA1, induisant son inactivation. Néanmoins, les conséquences en termes d'expression protéique étaient hétérogènes dans les lignées de cancer pancréatique et colo-rectal utilisées (Quann et al., 2015). De plus ces miRNA semblent plutôt sous-exprimés dans le contexte des carcinomes mammaires (Li et al., 2011).

Enfin, Song et al. ont démontré dans la lignée MDA-MB-231 que miR-1245 était capable de supprimer l'activité du transcrite de BRCA2 via l'interaction avec sa région 3' UTR, avec pour conséquence l'apparition d'une HRD, d'une instabilité génomique et d'une sensibilité accrue à l'irradiation (Song et al., 2012). Néanmoins, l'abondance de ce miRNA spécifiquement dans les cancers basal-like et son impact sur le statut de la RH in vivo restent à déterminer.

Les principaux miRNA impliqués dans la régulation de l'expression de BRCA1 sont représentés sur la **Figure 34**.

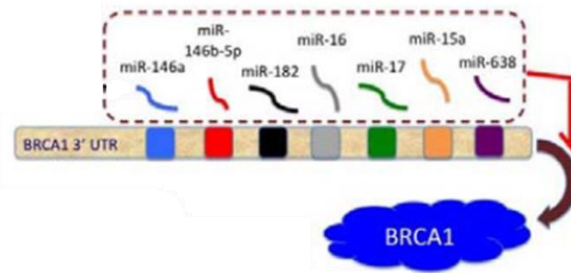


Figure 34. Principaux miRNA régulant l'expression de BRCA1. D'après Chang 2012.

Principes de traitement

Dans les recommandations actuelles, les traitements des cancers du sein ne sont pas déterminés selon le sous-type moléculaire mais plutôt selon l'expression des récepteurs hormonaux et d'HER2. Ainsi il n'existe pas de recommandations de traitement s'appliquant spécifiquement aux cancers basal-like. Nous discuterons donc brièvement les traitements des cancers triple-négatifs (qui correspondent au phénotype le plus fréquent des cancers basal-like), au stade localisé et métastatique.

Au stade localisé

Au stade localisé, la chirurgie constitue le pilier de la prise en charge. Pour les stades I cette chirurgie est généralement réalisée en premier lieu suivie d'une chimiothérapie adjuvante, éventuellement dose-dense, à base d'anthracyclines et taxanes (12 à 24 semaines) et d'une radiothérapie adjuvante, notamment en cas de chirurgie conservatrice. Pour les stades II et III, une combinaison de chimio-immunothérapie néo-adjuvante par Carboplatine (sel de platine), Paclitaxel (taxane) et Pembrolizumab (anti-PD1) puis Anthracyclines, Cyclophosphamide (agent alkylant) et Pembrolizumab (24 mois), complétée par 9 cycles de Pembrolizumab adjuvant améliore le taux de réponse histologique complète et la survie sans événement à 3 ans (hazard ratio 0.63, 95% IC 0.48-0.82, $P < 0.001$) (Schmid et al., 2022). En cas de réponse histologique non complète, l'adjonction de Capecitabine (anti-métabolite) en situation adjuvante améliore la survie sans maladie (hazard ratio 0.70, 95% CI 0.53-0.92, $P = 0.01$) et la survie globale (hazard ratio 0.59, 95% CI 0.39-0.90 ; $P = 0.01$). Pour les patients présentant une mutation germinale de BRCA1/2 non en réponse histologique complète, l'adjonction d'Olaparib (inhibiteur de PARP) pendant 1 an en situation adjuvante réduit de 32% le risque de décès (hazard ratio 0.68; 98.5% CI 0.47-0.97; $P = 0.009$) (C. E. Geyer et al.,

2022). Selon, les recommandations européennes l'association Pembrolizumab-Capecitabine et Pembrolizumab-Olaparib est possible. Par contre l'association Capecitabine – Olaparib n'est pas recommandée car le profil d'effets secondaires de cette association n'est pas parfaitement établi (Loibl et al., 2023).

Au stade métastatique

Au stade métastatique, la prise en charge repose essentiellement sur les traitements anti-cancéreux systémiques. En première ligne, le choix du traitement dépend du statut CPS (combined positive score) PDL1 de la tumeur, déterminé en IHC. Pour les CPS PDL1 supérieur ou égaux à 10%, le traitement standard consiste en l'association d'une immunothérapie par Pembrolizumab, combinée à une chimiothérapie par taxanes ou Carboplatine-Gemcitabine (anti-métabolite) sur la base de l'essai KEYNOTE 355 qui a donc démontré son intérêt en termes de survie sans progression (9.7 versus 5.6 mois; hazard ratio 0.65; CI 0.49-0.86; $P = 0.0012$) et survie globale (23.0 versus 16.1 mois; hazard ratio 0.73; 95% CI 0.55-0.95; $P = 0.0093$) comparativement à une chimiothérapie seule (Cortés et al., 2021). Pour les patients avec PDL1 négatif (inférieur à 10%), une chimiothérapie par Paclitaxel est recommandée, éventuellement associée au Bevacizumab (anti-angiogénique)(Miles et al., 2013). Plusieurs options sont possibles pour les lignes ultérieures. En l'absence de préexposition antérieure il est recommandé de recourir aux anthracyclines et aux taxanes de manière précoce. Pour les patients présentant une mutation germinale de BRCA1/2, un traitement par Inhibiteur de PARP (Litton et al., 2018; Robson et al., 2017) ou Carboplatine (A. Tutt et al., 2018) représente une option de choix en deuxième ligne. Par ailleurs, les anticorps-conjugués constituent également une alternative extrêmement intéressante en deuxième ligne ou plus. Ainsi, dans cette situation, le Sacituzumab Govitecan a montré un bénéfice en survie sans progression (6,5 vs 1,7 ; hazard ratio 0.41; 95% CI, 0.32-0.52; $P < 0.001$) et survie globale (12,1 vs 6,7 ; hazard ratio 0.48; 95% CI, 0.38 to 0.59; $P < 0.001$) comparativement à une chimiothérapie au choix de l'investigateur comprenant Capecitabine, Gemcitabine, Eribuline (poison du foieau), Vinorelbine (vinca-alcaloïde) (Bardia et al., 2021). A ce stade, le Trastuzumab Deruxtecan a également montré son intérêt en termes de survie globale et survie sans progression comparativement à une chimiothérapie au choix de l'investigateur (Capecitabine, Gemcitabine, Eribuline, Paclitaxel) chez les patients présentant un statut HER2 faible (expression d'HER2 en IHC à 1+ ou 2+ avec FISH non amplifiée). Ces résultats

sont valables dans la cohorte globale et également dans le sous-groupe de cancers triple-négatifs. La survie sans progression y est de 8,5 vs 2,9 mois (hazard ratio 0.46; 95%CI, 0.24–0.89) et la survie globale de 18,2 vs 8,3 mois (hazard ratio 0.48; 95% CI, 0.24–0.95) (Modi et al., 2022). Aux lignes avancées, la prise en charge repose sur l'utilisation d'autres chimiothérapies comme la Capecitabine, l'Eribuline, La Gemcitabine, la Vinorelbine, le Cyclophosphamide (Gennari et al., 2021). La radiothérapie se discute généralement seulement à visée antalgique et/ou de contrôle local. Il existe donc un certain nombre de traitements disponibles même au stade métastatique. Néanmoins la survie globale médiane de moins de 2 ans dans le bras expérimental de l'étude de première ligne KEYNOTE 355 (Cortés et al., 2021), nous rappelle le pronostic défavorable de ces cancers au stade métastatique et la nécessité de bien comprendre leur biologie pour proposer des traitements innovants plus efficaces.

Sensibilité aux sels de platines et inhibiteurs de PARP

Etant donné la fréquence de l'HRD dans les cancers basal-like, ceux-ci devraient théoriquement être relativement sensibles aux sels de platine et aux inhibiteurs de PARP, comme c'est le cas notamment dans les cancers épithéliaux de l'ovaire (Coleman et al., 2019; González-Martín et al., 2019; Ray-Coquard et al., 2019). Dans la plupart des études, l'analyse de la réponse à ces agents et l'impact de leur utilisation sur la survie ont porté sur des cohortes de cancers du sein triple-négatifs, comme ils représentent environ 80 % des cancers basal-like et que la classification en sous-type moléculaire est rarement réalisée en pratique courante. Le **Tableau 7** répertorie donc les principaux essais dans ces situations. Ainsi, en phase néo-adjuvante l'ajout de Carboplatine à une chimiothérapie standard à base d'anthracyclines et taxanes en traitement de cancers du sein triple-négatifs non sélectionnés semble améliorer le taux de réponse pathologique complète (pCR pour pathologic Complete Response) avec un impact inconstant en termes de survie sans récurrence et non significatif en termes de survie globale dans les essais de phase III (Loibl, O'Shaughnessy, et al., 2018; Loibl, Weber, et al., 2018; Schmid et al., 2022; Sikov et al., 2015). Le remplacement des anthracyclines par un sel de platine semble également donner des taux de pCR similaires dans cette situation (P. Sharma et al., 2018, 2021). En pratique, la réponse aux sels de platine en phase précoce semble corrélée au statut HRD mais ceci est inconstant selon les études (Kaklamani et al., 2015; Loibl, Weber, et al., 2018; Mayer et al., 2020; Telli et al.,

2015). De même, l'intérêt de l'utilisation des iPARP en phase précoce est bien établi en cas de mutation germinale de BRCA1/2 (Litton et al., 2020; A. N. J. Tutt et al., 2021) et suggéré par des études de phase II dans les autres situations d'HRD (Eikesdal et al., 2021; Telli et al., 2015).

En phase métastatique, le Carboplatine en monothérapie donne des taux de réponse similaires au Taxotère en première ligne, comme démontré dans l'étude de Tutt et al (A. Tutt et al., 2018). Néanmoins, dans cette étude, le Carboplatine était associé à un meilleur taux de réponse objective dans le sous-groupe présentant une mutation germinale de BRCA1/2 mais pas dans la cohorte HRD (test Myriad). Ces données viennent renforcer celles de Byrski et al. qui avaient montré un excellent taux de réponse objective au Cisplatine de 80% en situation de carcinome mammaire métastatique présentant une mutation de BRCA1/2 (70% de cancers triple-négatifs). En cas d'utilisation d'un doublet de chimiothérapie dans les cancers triple-négatifs métastatique, un protocole à base de sels de platine semble associé à une meilleure survie sans progression, sans bénéfice en survie globale (Yardley et al., 2018; J. Zhang et al., 2018). Dans cette situation, l'association Carboplatine + Nab-Paclitaxel semble supérieure à Carboplatine + Gemcitabine. Par ailleurs, le bénéfice de l'ajout d'un iPARP à une chimiothérapie à base de sels de platine est inconstant selon les études considérées (Diéras et al., 2020; O'Shaughnessy et al., 2014; Rodler et al., 2023), même si un bénéfice spécifiquement dans la population BRCA-like (sBRCAm, HRDscore (Myriad) > 42, hyperméthylation du promoteur de BRCA1, mutation germinale de gènes de la RH autres que BRCA1/2) n'est pas à exclure (Rodler et al., 2023). Enfin, si les iPARP en monothérapie ont montré leur intérêt en survie sans progression dans les cancers du sein avec mutation germinale de BRCA1/2 (Litton et al., 2018; Robson et al., 2017), leur inefficacité globale dans les cancers du sein triple-négatifs sporadiques est démontrée (Gelmon et al., 2011). A noter des taux de réponse intéressants en cas de mutation germinale de PALB2 ou somatique de BRCA1/2 (N. M. Tung et al., 2020).

Quoi qu'il en soit, l'efficacité des sels de platine et des iPARP dans les cancers du sein basal-like/triple négatifs semble moindre que dans les cancers épithéliaux de l'ovaire (Coleman et al., 2019; González-Martín et al., 2019; Ray-Coquard et al., 2019) suggérant l'existence de mécanismes de résistance aux iPARP dans ces cancers (enrichissement en cellules souches cancéreuses, mutations de réversion, perte de 53BP1, mécanismes de compensation de l'HRD...). La mise en évidence de tels mécanismes, au-delà du diagnostic d'HRD en lui-même,

semble donc nécessaire pour progresser encore dans le traitement du cancer basal-like qui reste à ce jour le sous-type moléculaire le plus agressif.

Essai/référence	Population	Stade	Sous-groupes d'analyse selon statut HR	Traitements testés	Critères de jugement	Résultats
PETREMAC/Eikesdal(Eikesdal et al., 2021) Phase II monobras	TNBC non sélectionnés (Néo-adjuvant) 32 patients	II/III		Olaparib 300mg x2/j pendant 10 semaines maximum	-principal : taux de réponse objective (TRO)	-TRO = 56,3% (18/32) -88,9% (16/18) des répondeurs vs 28,6% (4/14) des non répondeurs présentaient des mutations de gènes de la RH ou une hyperméthylation de BRCA1 (p = 0.0008)
PRECOG 0105/Telli(Telli et al., 2015) Phase II	TNBC non sélectionnés (Néo-adjuvant) 80 patients	I à IIIA	A : HRD-LOH high (n = 50) B : no HRD-LOH low (n = 15)	Gemcitabine (1000 mg/m2 J1 J8) + Carboplatin (AUC 2 J1 J8) + Iniparib (5.6 mg/kg J1 J4 J8 J11) tous les 21 jours x 6 cycles	-principal : réponse pathologique complète (pCR) et residual cancer burden (RCB) 0/1	-pCR globale = 36% A : RCB 0/1: 66% B : RCB0/1: 20%
SOLTI NeoPARP/Llombart-Cussac 2015(Llombart-Cussac et al., 2015) Phase II	TNBC non sélectionnés (Néo-adjuvant) 141 patients	II/IIIA		Paclitaxel 80 mg/m2 hebdo (P) vs Paclitaxel 80 mg/m2 hebdo + Iniparib 11,2 mg/kg hebdo (PI1) vs Paclitaxel 80 mg/m2 hebdo + Iniparib 5,6 mg/kg bihebdo J1 J4 (PI2)	-principal : pCR	-pCR P : 21% -pCR PI1 : 22% -pCR I2 : 19%
GeparOLA/Fasching(Fasching et al., 2021) Phase II	Cancers du sein HRD (Myriad) ou BRCA1/2m 107 patients	I à III		Paclitaxel 80 mg/m2 hebdo + Olaparib 100 mg x2/jour (PO) vs Paclitaxel 80 mg/m2 + Carboplatine AUC 2 hebdo (PC) 12 semaines Après les 12 semaines, 3 à 4 cycles d'Epirubicine + Cyclophosphamide	-principal : pCR	-pCR PO 55.1%, 90% CI 44.5% à 65.3% vs pCR PC 48.6%, 90% CI 34.3% à 63.2%)
Fontaine(Fontaine et al., 2019) Phase II monobras	TNBC non sélectionnés (Néo-adjuvant) 63 patients	II/III		Paclitaxel 80 mg/m2 hebdo + Carboplatine AUC 2 hebdo 12 semaines puis Epirubicine/Cyclophosphamide dose dense 4 cycles	-principal : pCR	-pCR : 54%
Sharma(P. Sharma et al., 2018) Phase II monobras	TNBC non sélectionnés (Néo-adjuvant) 190 patients	I/III	A : BRCAm B : BRCA wild type	Carboplatine AUC 6 + Taxotère 75mg/m2/3 semaines 6 cycles	-principal : pCR -secondaire : RCB0/1	-pCR : 55% pCR A 59% pCR B 56% (p = 0,83) -RCB0/1 : 68%
I-SPY-2/Rugo(Rugo et al., 2016) Phase II	TNBC (Néo-adjuvant) 72 patients	II/ III		Paclitaxel 80 mg/m2 hebdo + Veliparib 50 mg x2/jour + Carboplatine AUC6/3 semaines, 12 semaines (PVC) Vs Paclitaxel seul (P) Après les 12 semaines 4 cycles de Doxorubicine/Cyclophosphamide dans les 2 bras	-principal : pCR	-pCR PVC 51% (95% Bayesian probability interval, 36 à 66%) vs pCR P 26% (95% PI, 9 à 43%)
Litton(Litton et al., 2020) Phase II	Cancers du sein HER2-avec gBRCA1/2m (75 % de triple-négatifs) (Néo-adjuvant) 20 patients	I à III		Talazoparib 1 mg/jour 6 mois	-principal : RCB0/1	-RCB0 : 53% -RCB0/1 : 63%
OlympiA/Tutt(A. N. J. Tutt et al., 2021) Phase III	Cancers du sein HER2-avec gBRCA1/2m (> 80 % de triple-négatifs) et à haut risque clinico-pathologique de récidive	I à III		Olaparib 300 mg x2/j vs placebo, 52 semaines	-principal : survie sans maladie invasive (iDFS) -secondaire : survie globale (SG)	-iDFS à 4 ans Olaparib 82.7% vs placebo 75.4% (HR : 0,63, 95% CI 0,50 – 0,78) -SG à 4 ans Olaparib 89.8% vs placebo 86.4 % (HR : 0,68, 95% CI 0,47 – 0,97)

	(Adjuvant) 1836 patients					
Silver(Silver et al., 2010) Phase II monobras	TNBC non sélectionnés (Néo-adjuvant) 28 patients	II/III		Cisplatine 75 mg/m ² /3 semaines 4 cycles	-principal : pCR -secondaire : TRO -identification de biomarqueurs prédictifs de réponse	-pCR : 22% (6/28) incluant les 2 gBRCA1m -TRO : 64% (18/28) Tous les cas étaient classés en basal-like selon la classification intrinsèque. Facteurs associés à une bonne réponse au Cisplatine : âge jeune (p = 0,001), faible expression de l'ARNm de BRCA1 (p = 0,03), méthylation du promoteur de BRCA1 (p = 0,04), mutation inactivatrice de p53 (p = 0,01), signature d'activation d'E2F3 (p = 0,03).
Yuan(Yuan et al., 2021) Phase II monobras	TNBC non sélectionnés (Néo-adjuvant) 67 patients	II/III		Carboplatine AUC6/4 semaines 4 cycles + Nab-Paclitaxel 100 mg/m ² hebdo 16 semaines	-principal : pCR/RCB	-pCR (RCB0) : 48% (32/67) -RCB1 : 15% (10/67) -RCB2 : 28% (19/67) -RB3 : 7% (5/67) -progression : 2% (1/67)
NeoSTOP/Sharma(P. Sharma et al., 2021) Phase II	TNBC non sélectionnés (Néo-adjuvant) 100 patients	I à III		Carboplatine AUC 6/3 semaines 4 cycles + Paclitaxel 80 mg/m ² hebdo 12 semaines puis Doxorubicine + Cyclophosphamide/2 semaines 4 cycles (CPDC) Vs Carboplatine AUC6/3 semaines + Taxotère (CT) 75mg/m ² /3 semaines 6 cycles	-principal : pCR/RCB -secondaire : SSR et SG	-pCR CPDC 54% (95% CI:40%-69%) vs CT 54% (95% CI:40%-68%). -RCB 0+I : 67% dans les 2 bras. Pas de différence en SSR et SG.
TBCRC031/Tung(N. Tung et al., 2020) Phase II	Cancers du sein localisé avec gBRCAm (70 % de cancers triple-négatifs) (Néo-adjuvant) 118 patients	I à III		Cisplatine 75 mg/m ² /3 semaines 4 cycles vs Doxorubicine 60mg/m ² + Cyclophosphamide 600mg/m ² /2 à 3 semaines 4 cycles (AC)	-principal : pCR -secondaire : probabilité RCB0/1	-pCR Cisplatine 18% vs pCR AC26 % (RR : 0,70, 95% CI 0,39 – 1,2) -probabilité RCB0/1 Cisplatine 33% vs AC 46% (RR 0,73, 95% CI 0,50 – 1,1)
Byrski(Byrski et al., 2014) Phase II	Cancers du sein localisé avec BRCA1m (76,6 % triple-négatifs) (Néo-adjuvant) 107 patients	I à III		Cisplatine 75 mg/m ² /3 semaines 4 cycles	-principal : pCR	-PCR : 61% (65/107)
WSG-ADAPT-TN/Gluz(Gluz et al., 2022) Phase II	Cancers du sein triple-négatifs non sélectionnés (Néo-adjuvant) 336 patients	I à III		Nab-Paclitaxel 125 mg/m ² + Gemcitabine 1g/m ² J1 J8/3 semaines (NG) vs Nab-Paclitaxel 125mg/m ² + Carboplatine AUC2 J1 J8/3 semaines AUC2 (NC) 12 semaines	-principal : pCR	-pCR NG 28.7%, 95% CI : 0.22 à 0.36 vs NC 45.9%, 95% CI : 0.38 à 0.54; P = 0.002
BrightNess/Loibl(Loibl, O'Shaughnessy, et al., 2018) Phase III	TNBC non sélectionnés (Néo-adjuvant) 634 patients	II/III		Paclitaxel (80 mg/m ² hebdo 12 semaines) + Carboplatine (AUC 6/3 semaines 4 cycles) + Veliparib (50 mg x2/jour) (PCV) vs Paclitaxel (80 mg/m ² hebdo 12 semaines) + Carboplatine (AUC 6/3 semaines 4 cycles) + placebo (PC) vs Paclitaxel (80 mg/m ² hebdo 12 semaines) seul (P) Suivi de 4 cycles de Doxorubicine/Cyclophosphamide dans les 3 bras	-principal : pCR -secondaires : survie sans récurrence (SSR) et SG	-pCR PCV vs P : 53 % (168/316) vs 31% (49/158), p<0.0001 -pCR PCV vs PC : 53 % (168/316) vs 58% (92/160), p = 0.36 -SSR : HR PCV vs P = 0.63, 95% CI : 0.43-0.92, P = 0.02 HR PCV vs PC = 1.12, 95% CI : 0.72-1.72, P = 0.62) -SG : pas de différence significative entre les groupes
KEYNOTE 522/Schmid Phase III	TNBC non sélectionnés (Néo-adjuvant) 1174 patients	II/III		Carboplatin + Paclitaxel + PEMBRO /placebo 12 semaines puis AC +PEMBRO/placebo 12 semaines.	-principal : pCR, SSR -secondaire : SG	pCCR : 64,8% dans le bras expérimental vs 51,2 dans le bras contrôle (Différentiel de 13,6%,

					(non mature)	[95% CI, 5.4 to 21.8]; P<0.001) -SSR à 15 mois : 92,6% dans le bras expérimental vs 88,2% dans le bras contrôlé (hazard ratio, 0.63; 95% CI, 0.43 - 0.93)
Kaklamani(Kaklamani et al., 2015) Phase II monobras	TNBC non sélectionnés (Néo-adjuvant) 30 patients	I/III	A : HRD(Myriad) et/ou BRCAm B : no HRD	Carboplatin AUC 6/3 semaines + Eribulin 1.4 mg/m ² J1-J8 4 cycles de 21 jours	-principal : pCR	-pCR : 43% (13/30) -PCR groupe A : 75% (9/12) -pCR groupe B : 14,2% (2/14)
TBCRC30/Mayer(Mayer et al., 2020) Phase II	TNBC non sélectionnés (Néo-adjuvant) 48 patients	I à III	A : HRD (Myriad) ou tmBRCA B : HRP	Cisplatine 75 mg/m ² /3 semaines (n = 56) vs Paclitaxel 80mg/m ² hebdo 12 semaines	-principal : RCB0/1 vs RCB2/3	-RCB0/1 Cisplatine = 26,4% vs RCB0/1 Paclitaxel = 26,3% (ns) A : RCB0/1: 23% vs. 12% ; OR 2.22 (95% CI: 0.39–23.68) ; ns B : RCB0/1: 29% vs. 31% ; OR 0.90 (95% CI: 0.19–4.95) ; ns
CALGB40603/Sikov(Sikov et al., 2015) Phase III	TNBC non sélectionnés (Néo-adjuvant) 443 patients	II/III		Paclitaxel 80 mg/m ² hebdo 12 semaines vs Paclitaxel 80 mg/m ² hebdo 12 semaines + Bevacizumab 10 mg/kg/2 semaines 9 cycles vs Paclitaxel 80 mg/m ² hebdo 12 semaines + Carboplatine AUC6/3 semaines 4 cycles vs Paclitaxel 80 mg/m ² hebdo 12 semaines + Carboplatine AUC6/3 semaines 4 cycles + Bevacizumab 10 mg/kg/2 semaines 9 cycles Suivi de Doxorubicine/Cyclophosphamide 4 cycles après les 12 premières semaines de traitement dans chaque bras	-principal : pCR -secondaires : SSR et SG	-pCR groupes Carboplatine 54% vs autres groupes 41%; P .0029 -pas de différences significatives en SSR et SG
GEPARSIXTO/Loibl(Loibl, Weber, et al., 2018) Phase III	TNBC non sélectionnés (Néo-adjuvant) 595 patients	II/III	2 sous-groupes A : HRD (Myriad) et/ou tmBRCA B : HRP	Paclitaxel 80 mg/m ² hebdo + Doxorubicine liposomale non pegylée 20 mg/m ² hebdo + Bevacizumab 15 mg/kg/3 semaines (n = 157) 18 semaines (PDB) vs même traitement + Carboplatine AUC 2 hebdo 18 semaines (PDBC)	-principal : pCR -secondaires : SSR et SG	-pCR PDB : 36,9% (84/158) vs PCR PDBC : 53,2% (58/157), p = 0,005. A : pCR 33.9% vs 63.5% ; OR 3.4 (95% CI : 1.7–6.9) B : pCR 20.0% vs 29.6% ; OR 1.7 (95% CI : 0.5–5.7) -amélioration de la SSR dans le groupe PDBC (hazard ratio 0.56 (95% CI 0.34–0.93); P = 0.022). A : HR 0.49 (95% CI : 0.23–1.04) ; P = 0.059 B : HR 0.44 (95% CI : 0.17–1.17) ; P = 0.086) -pas de différence significative en SG
TBCRC048 /Tung(N. M. Tung et al., 2020) Phase II	Cancers du sein métastatiques avec altérations de gènes impliqués dans la recombinaison homologues (19 % de cancers du sein triple-négatifs) Pré-traitement par 2 lignes maximum de chimiothérapie en phase métastatique, pas de traitement	IV	-Cohorte 1 : mutation germinale de ATM, ATR, BAP1, BARD1, BLM, BRIP1, CHEK1, CHEK2, CDK12, FANCA, FANCC, FANCD2, FANCF,MRE11A, NBN, PALB2, RAD50, RAD51C, RAD51D, Ou WRN	Olaparib 300 mg x 2/jour	-principal : TRO	-Cohorte 1 : TRO 33% (9/27); les 9 cas avec gPALB2m TRO dans la population gPALB2m : 82% (9/11) -Cohorte 2 : TRO 31% (8/26) TRO population non mutée BRCA1/2 : 0% (0/10)

	antérieur par iPARP ni progression sous sels de platine. 27 patients dans chaque cohorte		-Cohorte 2 : mutation somatique sur l'un des mêmes gènes ou BRCA1/2 27 patients dans chaque cohorte			
Gelmon(Gelmon et al., 2011) Phase II monobras	Cancers du sein triple-négatifs métastatiques ou avec BRCA1/2m (81 % de triple-négatifs) 26 patients	IV		Olaparib 400 mg x2/jour	-principal : TRO	-TRO : 0%
Kummar(Kummar et al., 2016) Phase II	TNBC non sélectionnés (2 ^{ème} ligne métastatique ou plus) 21 patients	IV		Cyclophosphamide 50 mg x1/jour (n = 18) Vs Cyclophosphamide 50 mg x1/jour + Veliparib 60 mg/jour	-principal : TRO -secondaire : survie sans progression (SSP)	-TRO Cyclophosphamide = 5,6% (1/18) vs TRO Cyclophosphamide + Veliparib = 9,5% (2/21), ns -SSP Cyclophosphamide = 1,9 mois vs SSP Cyclophosphamide + Veliparib = 2,1 mois, ns.
Byrski(Byrski et al., 2012) Phase II	Cancers du sein avec BRCA1m métastatiques (70 % de triple-négatifs) Possibilité d'avoir reçu jusqu'à 4 lignes de chimiothérapie antérieure en phase métastatique. 20 patients	IV		Cisplatine 75mg/m2/3 semaines 6 cycles	-Principal : TRO	-TRO : 80 % soit réponse complète 45% (9/20) et réponse partielle 35% (7/20)
SWOG1416/Rodler(Rodler et al., 2023) Phase II	Cancers du sein triple-négatifs non sélectionnés métastatiques. Possibilité d'avoir reçu 1 ligne antérieure de traitement systémique en phase métastatique 335 patients	IV	3 sous-groupes : A : g BRCAm B : BRCA-like : sBRCAm, HRDscore (Myriad) > 42, hyperméthylation du promoteur de BRCA1, mutation germinale de gènes de la RH autres que BRCA1/2 C : non BRCA-like	Cisplatine 75 mg/m2/3 semaines (C) vs Cisplatine 75 mg/m2/3 semaines + Veliparib 300 mgxé/jour J1-J14 (CV)	-principal : SSP	-SSP A : CV = 6.2 mois (95% CI 2.3-9.2) vs C = 6.4 mois (HR 0.79 [95% CI 0.38-1.67]; p=0.54) -SSP B : CV = 5.9 mois (95% CI 2.3-9.2) vs C = 4.2 mois (HR 0.57 [95% CI 0.37-0.88]; p=0.010) -SSP C : CV = 4.0 mois (95% CI 2.3-9.2) vs C = 3.0 mois (HR 0.89 [95% CI 0.60-1.33]; p=0.57)
OlympiAD/Robson(Robson et al., 2017) Phase III	Cancers du sein métastatiques HER2-gBRCA1/2m (>49 % de triples négatifs) (Pas plus de 2 lignes métastatiques antérieurement reçues) 302 patients	IV		Olaparib 300mg x2/jour vs traitement au choix de l'investigateur (Capecitabine, Eribuline, Vinorelbine) (CEV)	-principal : SSP -secondaire : TRO, SG	-SSP Olaparib 7.0 mois vs CEV 4.2 mois (HR 0.58, 95% CI 0.43 - 0.80; P<0.001) -TRO Olaparib 59,9% vs CEV 28,8% -SG Olaparib 19.3 mois vs CEV 17.1 mois (HR 0.90, 95% CI 0.66-1.23; P = 0.513)
EMBRACA/Litton(Litton et al., 2018) Phase III	Cancers du sein métastatique gBRCA1/2m (>40% de triple négatifs) Pas plus de 2 lignes métastatiques antérieurement reçues) 431 patients	IV		Talazoparib 1 mg/jour vs traitement au choix de l'investigateur (Capecitabine, Eribuline, Vinorelbine, Gemcitabine) (CEVG)	-principal : SSP -secondaire SG	-SSP Talazoparib 8.6 mois vs CEVG 5.6 mois (HR 0.54; 95% CI, 0.41 à 0.71; P<0.001) - SG Talazoparib 19.3 mois vs CEVG 19.5 mois (HR 0.848; 95% CI, 0.67 à 1.07; P = 0.17)
BROCADE3/Dieras(Dieras et al., 2020) Phase III	Cancers du sein métastatiques HER2- (>47 % de triples négatifs) (Pas plus de 2 lignes	IV		Carboplatine (AUC 6) J1 + Paclitaxel (80 mg/m ² J1 J8 J15/ 3 semaines) + Veliparib (120 mg x2/jour J-2 à 5) (CPV) Vs Carboplatine (AUC 6) J1 +	-principal : SSP -secondaire : SG	-SSP CPV 14,5 mois vs CP 12,6 mois, HR = 0,71, 95% CI = 0,57 - 0,88, p = 0,0016 -SG CPV 33,5 mois vs CP 28,2 mois, HR = 0,95, 95% CI = 0,73 -

	métastatiques antérieurement reçues) 513 patients			Paclitaxel (80 mg/m ² J1 J8 J15/ 3 semaines) + placebo (CP)		1,23, p = 0,67
TBCRC009/Isakoff(Isakoff et al., 2015) Phase II monobras	TNBC non sélectionnés (1 ^{ère} ou 2 ^{ème} ligne métastatique) 43 patients dans chaque sous-groupe	IV		Cisplatine (75 mg/m ²) ou Carboplatine (AUC 6)/ 3 semaines	-principal : TRO	-TRO global = 25,6% TRO Cisplatine = 32,6% TRO Carboplatine = 18,7% -Le score d'HRD LOH/LST était plus important parmi les répondeurs BRCA1wt que parmi les non répondeurs BRCA1wt (12.7 vs. 5.1; p = 0.032)
Yardley 2018(Yardley et al., 2018) Phase II	TNBC non sélectionnés (1 ^{ère} ligne métastatique) 191 patients	IV		Nab-Paclitaxel 125 mg/m ² + Carboplatine AUC2 J1 J8/3 semaines (NC) vs Nab-Paclitaxel 125 mg/m ² + Gemcitabine 1g/m ² J1 J8/3 semaines (NG) vs Carboplatine AUC2 J1 J8 + Gemcitabine 1g/m ² J1 J8/3 semaines (CG)	-principal : SSP -secondaire : SG, TRO	-SSP : *NC 8.3 mois vs PG 5.5 mois, HR 0.59; 95% CI, 0.38–0.92; P = 0.02 *NC 8.3 mois vs CG 6.0 mois, HR 0.58; 95% CI, 0.37–0.90; P = 0.02 -SG : *NC 16.8 mois vs PG12.1 mois, HR 0.73; 95% CI, 0.47–1.13; P = 0.16 *NC 16.8 mois vs CG 12.6 mois; HR 0.80; 95% CI, 0.52–1.22; p = 0.29 -TRO : *NC : 73% *NG : 39% *CG : 44%
O'Shaughnessy(O'Shaughnessy et al., 2014) Phase III	TNBC non sélectionnés métastatiques 519 patients	IV		Carboplatine AUC2 + Gemcitabine 1g/m ² J1 J8 (CG) vs même traitement + Iniparib 5,6 mg/kg J1 J4 J8 J11 (CGI)	-principal : SSP et SG	Pas de différence en SG (CG 11,1 vs CGI 11,8 mois, HR 0.88; 95% CI, 0.69 à 1.12; P = 0.28) ni SSP (CG 4,1 mois vs CGI 5,1 mois, HR 0.79; 95% CI, 0.65 à 0.98; P = 0.27)
TBCSG006/Zhang(J. Zhang et al., 2018) Phase III	TNBC non sélectionnés (1 ^{ère} ligne métastatique) 236 patients	IV	A : groupe HRD = mutation germinale de ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK1, CHEK2, FANCA, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANGC, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, PALB2, PMS2, PTEN, RAD50, RAD51C, RAD51D, STK11 and TP53 B : groupe gBRCA1/2 C : groupe HRD sans gBRCA1/2m D : groupe HRP	Cisplatine 75 mg/m ² J1 + Gemcitabine 1250 mg/m ² J1-J8 (CG) vs Paclitaxel 175 mg/m ² J1 + Gemcitabine 1250 mg/m ² J-J8 (PG) toutes les 3 semaines pour un maximum de 8 cycles	-principal : SSP -secondaires : SG, TRO	*Population globale : -SSP : CG 7.73 mois, 95% CI 6.46–9.00 vs PG 6.07 mois, 95% CI 5.32–6.8; P = 0.005. -SG : pas de différence significative *Analyse en sous-groupes : -groupe A : meilleurs TRO et SSP dans le bras CG que dans le bras PG (71.9% vs 38.7 %, P = 0.008; 10.37 vs 4.30 mois, P = 0.011). -groupe B : meilleurs TRO et SSP dans le bras CG que dans le bras PG (83.3% vs 37.5%, P = 0.086; 8.90 vs 3.20 mois, P = 0.0459). -groupe C : meilleurs TRO et SSP dans le bras CG que dans le bras PG (70.4% vs 37.0%, P = 0.014; 10.37 vs 3.53 mois, P = 0.022). -groupe D : pas de différence en TRO et SSP.
TNT/Tutt(A. Tutt et al., 2018) Phase III	TNBC non sélectionnés (1 ^{ère} ligne métastatique) 188 patients dans chaque groupe	IV	A : gBRCAm (n = 43) B : HRD Myriad (n = 81) C : HRD Myriad ou gBRCAm (n = 86)	Carboplatine AUC6/3 semaines vs Taxotère 100mg/m ² /3 semaines 6 cycles	-principal : TRO -secondaires : SSP et SG	-TRO global : Carboplatine 31.4 % (59/188) vs Taxotère 34.0% (64/188); P = 0.66 -TRO cohorte A : Carboplatine 68% vs Taxotère 33%; P = 0.01 -TRO cohorte B : Carboplatine

						<p>38.2% (13/34) vs Taxotère 40.4% (19/47); ns</p> <p>-TRO cohorte C : Carboplatine 44.7% (17/38) vs Taxotère 39.6% (19/48); ns</p> <p>-SSP : Carboplatine 3.1 mois (95% CI, 2.4–4.2), vs Taxotère 4,4 mois (95% CI, 4.1–5.1), ns</p> <p>-SG : Carboplatine 12.8 mois (95% CI, 10.6–15.3) vs Taxotère 12.0 mois (95% CI, 10.2–13.0); ns</p>
--	--	--	--	--	--	---

Tableau 7. Principales études rapportant la sensibilité des cancers du sein triple-négatifs aux sels de platine et aux inhibiteurs de PARP

CHAPITRE 2 : Résultats

Problématique et justification de l'étude

Le cancer basal-like est un sous-type de cancer du sein agressif défini dans les années 2000 sur la base de son profil d'expression génique dans le cadre de la classification dite intrinsèque. Des surrogates d'expression protéique en IHC ont par la suite été établis, si bien qu'il représente 17 à 37 % des cas de cancer du sein lorsque l'on considère la classification intrinsèque (Sørli et al., 2003) et environ 16 % des cas lorsque l'on considère des classifications IHC (Carey et al., s. d.; Millikan et al., 2008). Les similitudes cliniques, biologiques et moléculaires des cancers BRCA1 muté avec les cancers basal-like sporadiques ont rapidement fait suspecter l'implication de mécanismes d'HRD dans la biologie de ces tumeurs, au-delà de la seule mutation de BRCA1. En plus de l'intérêt mécanistique, il existe donc un intérêt thérapeutique à détecter l'HRD dans ce type de cancer, cette anomalie ayant été associée en clinique à la réponse à différents agents thérapeutiques (notamment les sels de platine et les iPARP) dans plusieurs localisations. Bien que les définitions des cancers basal-like et de l'HRD soient variables selon les études, nous avons montré que jusqu'à 80% des cancers du sein basal-like présentent une HRD (Chopra et al., 2020). Les principaux mécanismes (le plus souvent mutuellement exclusifs(The Cancer Genome Atlas Network, 2012)) expliquant cette HRD semblent être :

-mutations germinales (environ 12%) ou somatiques (environ 8%) des gènes BRCA1/2, avec une large majorité de mutations de BRCA1(Manié et al., 2016)

-hyperméthylation du promoteur de BRCA1 (de 14(N. C. Turner et al., 2007) à 34(Joosse et al., 2011)%)

-hyperméthylation du promoteur de RAD51C (environ 4%)(Manié et al., 2016)

Une surexpression d'Id4 (de 37,5 à 50%) a également été fréquemment retrouvée(Junankar et al., 2015).

Les autres mécanismes incluent des mutations inactivatrices d'autres gènes de la recombinaison homologue ou encore des mécanismes de répression transcriptionnelle ou post transcriptionnelle de ces éléments. Ces derniers mécanismes plaident pour une origine non exclusivement mutationnelle de certains cancers du sein basal-like. Les causes de ces altérations non mutationnelles de certains gènes de la recombinaison homologue sont

largement inexplorées. Par exemple, les facteurs régulant l'hyperméthylation du promoteur de BRCA1, la surexpression d'Id4 ou encore la surexpression de certains miRNA dans les cancers basal-like sont méconnus, de même que les conditions favorisant leur survenue. A ce titre, plusieurs études ont montré que certaines cytokines du micro-environnement tumoral, comme le TGF β , étaient associées in vitro à la répression transcriptionnelle de plusieurs gènes de la recombinaison homologue, notamment via l'implication de la famille miR-181 (L. Liu et al., 2014; Pal et al., 2017). Cette dérégulation transcriptionnelle de la voie de la RH conduirait donc selon ces travaux à l'apparition d'un phénotype de BRCAness caractérisé par une instabilité génétique importante et une sensibilité accrue à certains agents génotoxiques comme les iPARP. Ceci suggère que dans la carcinogénèse basal-like, certaines contraintes du micro-environnement tumoral pourraient conduire à l'acquisition d'un phénotype d'HRD, en se substituant aux mutations des gènes de la recombinaison homologue plus classiquement décrites ou en coopérant avec celles-ci. Or, comme évoqué plus haut, les cancers basal-like sont caractérisés par un enrichissement en cellules souches cancéreuses (A. Bane et al., 2013; Honeth et al., 2008; S. Y. Park et al., 2010; Ricardo et al., 2011) suggérant leur implication dans la carcinogénèse. Avec ces différentes données, nous faisons donc l'hypothèse que dans la carcinogénèse basal-like, des dérégulations du microenvironnement des cellules souches normales pourraient contribuer à leur transformation et à l'émergence de cellules souches cancéreuses. Comme nous l'avons vu, la voie des BMP est une voie majeure de régulation des cellules souches normales et cancéreuses dans différents systèmes, notamment la glande mammaire (Alarmo & Kallioniemi, 2010; T. Sharma et al., 2022; Ye, 2009; Zabkiewicz et al., 2017). Des dérégulations de la voie BMP, notamment de l'axe BMP2/BMPR1B ont été décrites par notre équipe comme impliquées dans l'émergence de cellules souches cancéreuses mammaires de certaines tumeur luminales (Chapellier et al., 2015). Néanmoins, le rôle de cette voie de signalisation dans la carcinogénèse basal-like reste méconnu même si certaines données suggèrent l'implication de l'axe BMP4/BMPR1A (Ampuja et al., 2013, 2017; Balboni et al., 2013; Choi et al., 2019; Di et al., 2019; K.-S. Park et al., 2015; R. Sharma et al., 2022, p. 202). Pour explorer le rôle de la voie BMP dans l'émergence des cellules souches cancéreuses mammaires et l'initiation du cancer du sein basal-like, nous avons donc subdivisé ce travail en 2 axes. Le premier axe vise à mettre en évidence les dérégulations de la voie BMP associées aux cancers basal-like dans des cohortes déjà constituées. Le deuxième axe vise à

étudier les conséquences de ces dérégulations dans un modèle de cellules immatures mammaires normales (immortalisées mais non transformées), en termes de stemness, clonogénicité, différenciation, stabilité génomique et transformation.

Article original

BMP4 and BMPR1A induce BRCAness in immature mammary cells and contribute to the emergence of breast cancer stem cells in basal-like breast cancer initiation

Simon AHO, Isabelle TREILLEUX, Sylvain LEFORT, Adrien BUISSON, Sandrine JEANPIERRE, Emmanuel DELAY, Véronique MAGUER-SATTA, Boris GUYOT

Abstract

Introduction: Breast cancer is the leading cause of cancer death in women worldwide. It is a heterogeneous disease with several molecular subtypes correlated with prognosis. Of these, the basal-like subtype has the poorest prognosis. It is characterized by increased expression of basal differentiation markers and significant genetic instability, frequently due to alterations in homologous recombination. It is also enriched in cancer stem cells. These cells appear to be involved in the early stages of carcinogenesis, but also in resistance to cytotoxic treatments and relapse. Several signaling pathways influence their biology, notably the bone morphogenetic protein (BMP) pathway. Dysregulation of this pathway has been identified in some luminal breast tumors, but its involvement in the emergence of basal-like tumors remains to be explored.

Materials and methods: Using primary samples and public databases, we investigated BMP pathway abnormalities in basal-like tumors and BRCA1-mutated predisposed tissues. We also used the MCF10A human mammary epithelial stem cell line to model in vitro stem cell tumor initiation in the mammary gland.

Results: We show that BMPR1A receptor and BMP4 ligand expression are dysregulated in basal-like tumors and predisposed tissues. These dysregulations lead to transcriptional repression of BRCA1 in our stem cell model. Functional consequences include preferential differentiation according to basal phenotype, increased stemness and alterations in the homologous recombination pathway.

Conclusion: We suggest a role for the BMP4-BMPR1A axis in the early stages of carcinogenesis of basal-like mammary tumors by (i) promoting the maintenance of a stem cell population in the mammary gland, (ii) directing their differentiation towards a basal phenotype, (iii) promoting the genetic instability necessary for their transformation into cancer stem cells.

Introduction

Breast cancer is a heterogeneous disease with several molecular subtypes, each subtype being associated with a specific gene expression profile in the so-called intrinsic classification. According to this transcriptomic classification, luminal A, luminal B, normal-like, HER2 enriched and basal-like subtypes can be distinguished¹⁻³. Basal-like breast cancer (BLBC) accounts for approximately 20% of breast cancer cases³⁻⁵ and is associated with the poorest prognosis, particularly in terms of age at diagnosis and survival⁶⁻⁹. It is so named because it strongly expresses a number of genes also expressed by cells located in the outer (basal) layer of the mammary gland: myoepithelial cells as well as progenitors and mammary stem cells¹⁰. In particular, genes coding for basal cytokeratins CK5, CK14 and CK17 are overexpressed. Other genes involved in epithelial-mesenchymal transition (EMT), proliferation or stemness are also overexpressed^{1,3}. Conversely, genes encoding oestrogen receptor (ER α), progesterone receptor (PR) and Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 (HER2) are weakly expressed in BLBCs^{1,3}, resulting in a frequent triple-negative phenotype (absence of ER α and PR expression, absence of HER2 amplification/overexpression)^{6,11}. Beyond these transcriptomic characteristics, BLBCs display other histo-molecular features contributing to their aggressiveness. At the molecular level, most BLBCs show specific mutational patterns and chromosomal rearrangements related to alterations in homologous recombination (HR)¹², a DNA double-strand break repair pathway essential for maintaining genome stability. It is an error-free process that uses sister chromatid of the damaged chromatid as a template to restore its integrity¹³. HR involves a large number of proteins that interact with each other and with the damaged DNA. Among genes encoding these proteins, BRCA1 and BRCA2 are the best known because their germline mutation is associated with an increased risk of certain cancers, notably ovarian and breast cancers¹⁴. However, other homologous recombination deficiency (HRD) mechanisms have been described beyond the BRCA1/2 germline mutations, leading to a "BRCAness" situation, i.e. a phenocopy of these inherited mutations¹⁵. Depending on the studies and HRD detection techniques considered, up to 80% of BLBCs are thought to be HRD^{12,16-18}. Some causes of HRD are well documented in these tumors including germline (10% of cases) or somatic (6%) BRCA1 mutations, germline (2.5%) or somatic (2.5%) BRCA2 mutations¹⁹, BRCA1 promoter hypermethylation (14²⁰-34%²¹) or ID4 overexpression (37.5-50%)²². Mechanisms of transcriptional or post-transcriptional repression involving for example certain miRNAs directed against BRCA1 transcript have also been described²³⁻²⁷. Thus many mechanisms seem to induce BRCAness in BLBCs. However, the origin of these mechanisms remains largely unexplored to date. For example, little is known about factors regulating BRCA1 promoter hypermethylation, Id4 overexpression or specific miRNAs overexpression in BLBC. Interestingly, several studies have shown in vitro that some tumor microenvironment (TME) cytokines, notably belonging to the TGF β superfamily, could repress some HR genes in tumors^{28,29} suggesting that in basal-like carcinogenesis, some TME stresses could contribute to the acquisition of an HRD phenotype. Histologically, BLBCs are characterised by high expression of basal cytokeratins CK5/6, CK14, CK17 and EGFR^{30,31}. They are proliferative, high-grade tumors with high mitotic index and high intra-tumor heterogeneity³¹. Interestingly, enrichment of cancer stem cells with a CD44+/CD24- phenotype is also observed³². These cells share self-renewal and differentiation properties with normal stem cells, but also display tumorigenic and treatment-resistant properties, so that they are involved not only in initiation but also in tumor progression and relapse, in particular in certain breast carcinomas³³. The Bone Morphogenetic Proteins (BMP) pathway is a major regulatory pathway for normal and cancer stem cells. The BMP ligands belong to the TGF β superfamily and are

produced by the mammary gland microenvironment. Organised in homo or heterocomplexes, they exert their functions by binding to their receptors classically organised in tetramers (2 type I receptors and 2 type II receptors with serine-threonine kinase activity able to initiate signal transduction). The signal is then further transduced through a canonical pathway involving SMAD1/5/8 phosphorylation and their binding to SMAD4 forming a transcriptionally active complex in the nucleus. A SMAD independent non-canonical pathway, involving the activation of certain MAP kinases such as ERK, JNK or p38³⁴, has also been described. BMP pathway dysregulations have been identified in some luminal breast cancers tumorigenesis³⁵. However, the involvement of this pathway specifically in BLBC carcinogenesis has been poorly explored, even if the role of BMPR1A and BMP4 has been suggested by a few studies. In this study we first show that BMP4 ligand and BMPR1A receptor are specifically upregulated in BLBC and non transformed BRCA1-mutated human mammary glands. In a second step, we show in the MCF10A human normal mammary immature cell model that BMPR1A overexpression and BMP4 exposure induce BRCA1 repression, leading to basal differentiation, increased stemness and acquisition of homologous recombination alterations associated with early transformation. These data thus suggest the involvement of the BMP4/BMPR1A axis in the transformation of mammary stem cells during basal-like carcinogenesis.

Results

The BMP4/BMPR1A axis is specifically dysregulated in BLBC with prognostic implications

In a previous study, we demonstrated that the BMP pathway and more specifically the BMP2/BMPR1b axis was specifically deregulated in luminal tumours compared with BLBCs and healthy tissues³⁵. In this study, we therefore observed a BMPR1A repression and a BMPR1B overexpression in luminal tumours, in favour of a dominant BMPR1b signal. The BMP2 ligand, in contrast to BMP4, was overproduced by the luminal tumour microenvironment, leading to its repression in the tumour epithelium through a negative feedback loop. Given the enrichment of BLBCs in cancer stem cells and the involvement of the BMP pathway in the regulation of these cells, we hypothesized that the BMP pathway could also be dysregulated in BLBCs. We therefore set out to establish the transcriptional expression profile of BMPR1A, BMPR1B, BMP2 and BMP4 in BLBCs compared with other molecular subtypes and normal breast tissue. To do this we interrogated the TCGA-Breast cancer and GTEx cohorts using Breast Cancer Gene-Expression Miner v5.0 (bc-GenExMiner v5.0) online tool. These data confirmed BMPR1B overexpression and BMPR1A repression in luminal tumours compared with both BLBCs and healthy tissue (Figure 1A). In contrast, in BLBCs, we observed a rebalancing of BMPR1A and BMPR1B expression levels, close to those observed in normal tissues, in favour of a dominant BMPR1A signal in these tumours compared with the other molecular subtypes (Figure 1A, supp 1A). These data are consistent with those previously reported by the team demonstrating in a microarray analysis of 150 breast tumours a significant BMPR1B underexpression and BMPR1A overexpression in BLBCs compared with healthy tissues and luminal tumours³⁵. In addition, analysis of some TNBC supernatants showed a trend towards BMP4 over-representation in the microenvironment of these tumours compared with healthy tissue (supp 1B). In parallel, just as BMP2 was preferentially repressed in luminal tumors, so was BMP4 in basal-like tumors (Figure 1A), suggesting greater production of this cytokine in the BLBC microenvironment. Data from the GOBO cohort (<http://co.bmc.lu.se/gobo>) (1,881 cases of breast

carcinoma) confirmed the loss of BMP4 expression by the basal-like tumour bulk (Figure 1B). These data also confirmed the increase in the BMPR1A/BMPR1B ratio in BLBC compared with other molecular subtypes (Figure 1B). Interestingly, in-silico analyses carried out on the TCGA breast cancer cohort using the bc-GenExMiner v5.0 tool showed that BMP4 expression was correlated with that of numerous genes involved in regulating oncogenic processes such as proliferation, angiogenesis and migration, specifically in BLBCs (supp 1C, supp table 1). Moreover, in this molecular subtype, BMPR1A expression correlated with the expression of genes involved in chromatin remodelling, migration and response to DNA damage (Figure 1C, supp table 2), suggesting that an alteration in the BMP4/BMPR1A axis may be involved in basal-like carcinogenesis. In addition, survival analyses using the kmploater tool showed that BMPR1A overexpression was associated with a poor prognosis in terms of overall survival, specifically in the basal-like subtype (Figure 1D). We then examined the expression profile of BMPR1A, BMPR1B and BMP4 specifically in healthy BRCA1 mutated tissues derived from prophylactic mastectomies in a context of predisposition to BLBC. Interestingly, we found alterations in the BMP pathway similar to those observed in BLBC, i.e. a transcriptional predominance of BMPR1A over BMPR1B and a trend towards BMP4 transcriptional repression in mammary epithelium (Figure 1E), with BMP4 production being maintained in the supernatant of the mammary gland (Figure 1F). The presence of these BMP pathway alterations as early as the BLBC predisposition stage is compatible with the hypothesis that they could contribute to the transition from a predisposed stage to a transformed stage, for example by cooperating with a BRCA1 haploinsufficiency.

BRCA1 transcriptional expression is inversely related to BMPR1A protein expression in basal-like breast cancers

To test this hypothesis and as BRCA1 is frequently repressed in basal-like breast cancers^{20,36}, we selected BRCA1 wild-type triple-negative breast cancer cases for which the membrane expression of basal cytokeratin CK14 was also assessed (Figure 2A), the latter being highly specific to basal-like breast cancers³⁷⁻³⁹. For these samples, we analyzed in immunohistochemistry the BMPR1A cytosolic and membrane expression (Figure 2B) as well as the BMP4 cytosolic expression (Figure 2C). For each case, we established the associated BRCA1 transcriptional expression by RT-qPCR. With these data, we tested the hypothesis of a relationship between BRCA1 transcriptional expression and (i) BMPR1A membrane expression, (ii) overall (cytosolic and membrane) BMPR1A expression, (iii) BMP4 cytosolic expression. The fractional polynomial test for non-linearity was non-significant for these 3 hypotheses (supp 2A), leading us to use linear regression models in first instance. Interestingly, univariate linear regression showed a significant inverse relationship between BRCA1 transcriptional expression and BMPR1A membrane expression (Figure 2D). We obtained similar results using a median regression with bootstrap model (pseudo R² = 0.6721; coefficient = -.0000421; 95%CI = [-.0000779 -6.32e-06]; p = 0.028). Furthermore, bivariate linear regression models showed the persistence of this relationship after adjustment for age, stage, BMPR1A and BMP4 cytosolic expression, and CK14 membrane expression respectively (Table 1A). Similarly, univariate linear regression showed that overall BMPR1A expression (cytosolic and membrane) was also significantly inversely related to BRCA1 expression (Figure 2E). In bivariate analysis, this relationship remained statistically significant after adjustment for age, stage, cytosolic BMP4 expression and membrane CK14 expression (Table 1B). Conversely, in univariate analysis, BMP4 cytosolic expression by the

tumor epithelium was not significantly related to BRCA1 expression (data not shown), again suggesting that extrinsic production of BMP4 by the microenvironment, rather than by the tumor epithelium itself, could be responsible for the ligand's biological effects. All these data were confirmed in a second step using Bayesian approaches (supp 2B). Collectively, these results, together with the previously detailed data, suggest that BMPR1A expression is (i) predominant, (ii) associated with poor prognosis, (iii) inversely related to BRCA1 transcriptional expression in basal-like breast cancers.

The BMP4/BMPR1A axis induces BRCA1 repression in immature mammary cells leading to increased basal differentiation and stemness

As the BMP pathway is a major regulatory pathway of normal and cancer stem cells in the mammary gland, and considering that BLBCs are enriched in cancer stem cells³², we investigated whether the BMP4/BMPR1A axis might be involved in BRCA1 transcriptional repression directly in mammary stem cells. To test this hypothesis, we tested the impact of BMP4 exposure on BRCA1 expression in the MCF10A immortalised but non-transformed human immature mammary cell line. As illustrated in Figure 3A, MCF10A cells exposed for 48 hours to BMP4 doses ranging from 10 to 50 ng/ml induced a more than 50% repression of BRCA1 primary transcript and messenger RNA expression, suggesting a BMP4-mediated BRCA1 transcriptional repression. Moreover, as shown in Figure 3B, this BMP4 effect on BRCA1 repression was completely reversed by LDN-193189 (a BMPR1A and BMP canonical pathway inhibitor), suggesting the involvement of these effectors in BRCA1 repression. Conversely, the use of E6201 (BMPR1B and MEK inhibitor), SCH772984 (ERK inhibitor) and AG490 (JAK2 and EGFR inhibitor) did not lead to any reversion of BRCA1 repression by BMP4, which does not support a contribution of BMPR1B and the non-canonical pathway in these effects. After validating the BMP4-mediated BRCA1 repression at the protein level (Figure 3C), we sought to assess the associated functional consequences in MCF10A cells. To this end, we developed a Doxycycline-inducible shBRCA1 model (Figure 3D) in order to uncouple the BMP4 exposure and BRCA1 knock-down (BRCA1 KD) effects. We validated this model at transcriptional (Figure 3E) and protein (Figure 3F) levels. Subsequently, knowing the involvement of BRCA1 in the differentiation of mammary luminal progenitors⁴¹⁻⁴⁵, we aimed to assess the impact of BMP4 exposure on MCF10A differentiation. To do this we used the colony forming cell (CFC) assay as previously described⁴⁶ (supp 3A). MCF10A BMP4 exposure induced a significant increase in the number of basal colonies and at the same time a significant decrease in the total number of colonies (Figure 3G). Interestingly, a similar effect was found under BRCA1 KD conditions, with a significant increase in the number of basal colonies and a trend towards a reduction in the total number of colonies generated under BRCA1 repression conditions, either by ShBRCA1 induction in MCF10A cells (Figure 3H) or in primary BRCA1 mutated but untransformed tissues derived from prophylactic mastectomy in high-risk patients (Figure 3I). There was also an additive effect of BMP4 and BRCA1 KD in blocking luminal differentiation and inducing basal differentiation (supp 3B). Furthermore, the overall decrease in clonogenicity under BMP4 exposure/BRCA1 repression suggests an overall increase in stemness. To test this hypothesis, we used the mammosphere assay, which assesses the enrichment of stem cells or stem-like cells in a given biological sample based on the number of colonies formed under non-adherent culture conditions^{47,48} (supp 3C). As shown in Figure 3J and 3K, both BMP4 exposure and BRCA1 repression by RNA interference induced an increase in stemness. Taken together, these data suggest that BMP4,

through BRCA1 repression, induces a luminal differentiation defect in immature mammary cells, with an increase in both basal differentiation and stemness in this cell compartment.

The BMP4/BMPR1A axis induces BRCA1 repression in immature mammary cells associated with aberrant RAD51 recruitment after DNA double-strand breaks

Two main pathways are classically described for DNA double-strand break repair: Homologous Recombination (HR) and Non Homologous End Joining (NHEJ). HR is an error-free pathway based on the availability of uninjured homologous DNA from the sister chromatid. This is a multi-step process involving not only BRCA1 but also numerous other effectors such as RAD51, which plays a major role in homologous strand search and invasion, a key step in the HR process¹³. RAD51 nuclear recruitment after DNA damage has therefore been described by several teams as a marker of homologous recombination proficiency⁴⁹⁻⁵³. Conversely, NHEJ is a less reliable pathway, based on a more approximate ligation of the 2 ends of the damaged DNA. Numerous effectors are also involved in this process, notably 53BP1 which plays an important regulatory role by inhibiting DNA end resection, one of the early stages of HR in which BRCA1 is also involved. 53BP1 is therefore frequently considered to be an NHEJ promoter¹³. In this context, considering the well-established involvement of BRCA1 in homologous recombination, we attempted to assess the impact of BMP4 exposure on the homologous recombination status in MCF10A cells. To do this, we investigated the RAD51 nuclear recruitment after a genotoxic event such as irradiation. We also used two other complementary immunostains: γ H2Ax used as a DNA double-strand break marker and 53BP1 used as an NHEJ pathway activation marker. We first sought to validate the suitability of this approach in the MCF10A cell line using our shBRCA1 model. BRCA1 repression by shRNA induction did not induce a significant difference in the number of double-strand breaks generated 1 hour after irradiation compared with controls (Figure 4A). However, it did induce a drastic impairment of RAD51 recruitment (Figure 4B), thus validating the use of this functional approach in the MCF10A cell line, notably under BMP4 exposure conditions. Furthermore, after BMP4 exposure, we did not find any deficiency in RAD51 nuclear recruitment but rather an aberrant RAD51 over-recruitment (Figure 4C) seemingly independent of any increase in RAD51 protein synthesis in this condition (Figure 4D). Although RAD51 is frequently associated with maintaining genome integrity through its involvement in homologous recombination, it is paradoxically frequently overexpressed or overactivated in many cancers known to be genetically unstable, notably TNBC⁵⁴. Several authors have suggested that this RAD51 overexpression/overactivation could promote a pathological non-homologous hyper-recombination process leading to the appearance of chromosomal aberrations potentially involved in carcinogenesis⁵⁵⁻⁶². Interestingly, 53BP1 has been described as an inhibitor of this tumorigenic process⁶³. In our study, 1h after irradiation, and in the absence of BMP4 exposure, we witnessed modest 53BP1 and RAD51 nuclear recruitment in proportions favouring a dominant 53BP1 signal. In contrast, under BMP4 exposure, we observed a major RAD51 and 53BP1 nuclear recruitment associated with an increase in the RAD51/53BP1 ratio (Figure 4E). This effect was not related to an increase in the number of DNA double-strand breaks generated by irradiation in response to BMP4, since the quantity of γ H2Ax foci 1 hour after irradiation was found to be similar in MCF10A cells exposed or not to BMP4 (Figure 4F). Interestingly, we found a similar BMP4 effect on RAD51/53BP1 recruitment 4h after irradiation (Figure 4E). Taken together, these data support the hypothesis that immature mammary cells over-recruit RAD51 in compensation for BMP4-mediated BRCA1

repression, leading to a deregulation of the homologous recombination pathway potentially associated with the emergence of tumorigenic DNA damage such as chromosomal aberrations.

Activation of the BMP4/BMPR1A axis induces apoptosis in a contingent of immature mammary cells in response to genotoxic stress, but the persistence of another genetically unstable cell fraction at risk of basal-like transformation

Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors are genotoxic agents that block the replication fork at DNA single-strand breaks converted into one-ended DSBs during the replicative phase. Homologous recombination is essential for the faithful repair of these DSBs and the restoration of the replication fork. In case of HRD, other error-prone repair pathways may be activated favouring the accumulation of genetic aberrations leading to cell death by apoptosis in accordance with the principle of synthetic lethality^{64,65}. As a result, PARP inhibitors (PARPi) constitute a new therapeutic option which has demonstrated its efficacy in conditions of HRD, notably in certain epithelial ovarian cancers and certain breast cancers with a constitutional BRCA1/2 deleterious mutation⁶⁶⁻⁷³. Sensitivity to PARPi can therefore be used as a read out of HRD. We thus sought to explore the consequences of aberrant co-recruitment of RAD51 and 53BP1 after DNA double-strand breaks under BMP4 exposure conditions, in terms of PARPi sensitivity. We therefore carried out a proliferation assay showing that MCF10A cells exposed to BMP4 were over-sensitive to olaparib compared with the unexposed control (Figure 5A, supp 4A). These data were confirmed by a clonogenic assay (Figure 5B) showing similar results, statistically significant although less accurate in estimating IC50s, leading us to favor proliferation assays for further analysis. Interestingly, BRCA1 KD induced a similar olaparib sensitivity as BMP4 exposure in terms of proliferation (Figure 5C, supp 4B), suggesting that the anti-proliferative effects of BMP4 in response to olaparib indeed exert through BRCA1 repression. A similar effect was found with another PARPi, talazoparib (Figure 5D, supp 4C), thus eliminating a possible off-target effect of olaparib and confirming a class effect of PARP inhibitors. LDN-193189 completely reversed this phenomenon (Figure 5A, 5B and 5D, supp 4A, 4C) suggesting the involvement of the canonical pathway and the BMPR1A receptor in the PARPi sensitivity of BMP4-exposed MCF10A. To confirm this hypothesis, we derived a BMPR1A-overexpressing MCF10A cell line that we validated at both transcriptional and protein levels (Figure 5E and 5F). BMPR1A over-expression, alone or in combination with BMP4 exposure, led to a similar olaparib over-sensitivity. LDN-193189 also reversed this effect, thus confirming the involvement of BMPR1A in these BMP4-mediated iPARP sensitivity (Figure 5G, supp 4D). We then aimed to determine the fate of cells showing reduced proliferation under BMP4 exposure after Olaparib treatment. Preclinical data for Olaparib initially tested on BRCA1-deficient embryonic stem cells showed that its antiproliferative effect was mediated by cell cycle arrest in G2/M followed by significant apoptosis⁶⁴. We therefore explored these 2 effects in our model. BMP4 and Olaparib co-exposure effectively induced a significant increase in apoptosis compared with controls, suggesting an HRD phenotype in apoptotic cells (Figure 6A). In addition, to analyse the cell cycle, we used the Fucci system that we introduced in our MCF10A cell lines. As previously described, this system allows the discrimination of different phases of the cell cycle based on the specific expression of different fluorescent proteins of interest⁷⁴⁻⁷⁷. BMP4 and Olaparib co-exposure did not induce a significantly visible blockage in G2/M. However, there was an accumulation at G0/early G1 compared with controls, suggesting a slowing of the cell cycle in this condition (Figure 6B). Interestingly, exposure to BMP4 or Olaparib alone also resulted in

cell cycle slowing, but to a lesser extent. As it has been described by several teams that some DNA DSB-inducing agents select quiescent CSCs in TNBC⁷⁸⁻⁸⁰ and given that we previously established that BMP4 is a stemness inducer, we hypothesized that the accumulation of some cells in G0/early G1 under BMP4 and/or Olaparib exposure is related to these cells acquiring stemness properties, notably quiescence, under the influence of these molecules. To confirm this hypothesis, we used CFC and mammosphere assays to establish the stem cell/progenitor ratio in each of our experimental conditions. These experiments confirmed an increase in stemness in response to Olaparib and BMP4, separately and, more importantly, in combination (Figure 6C). Taken together, these data suggest that a proportion of BMP4-exposed immature mammary cells undergoing DNA double-strand break genotoxic stress die by apoptosis, probably following HRD-dependent synthetic lethality mediated by BMP4-mediated BRCA1 repression. However, another fraction of these BMP4-exposed cells appears to be resistant to Olaparib through the acquisition of stem-like characteristics and aberrant HR DNA repair, as previously shown. The persistence of this stem-like cell with reduced BRCA1 expression levels and altered HR could lead to the emergence and accumulation of CSCs as part of basal-like carcinogenesis. To test this hypothesis, we sought to assess the level of genetic stability of persistent cells after BMP4 exposure and Olaparib treatment. To this end, we performed a neutral comet assay to identify unresolved DNA double-strand breaks and an alkaline comet assay to assess a broader spectrum of DNA damage, including single-strand breaks. Thus, in the persistent cells, BMP4 and Olaparib co-exposure induced a significantly greater number of double-strand breaks (Figure 6D) and single-strand breaks (Figure 6E). To test whether the accumulation of such DNA damage would be able to induce transformation of cells subjected to any BMP4/BMPR1A signaling, we then exposed BMPR1A-overexpressing MCF10A cells and their control to BMP4 in a 18-week long-term exposure at the end of which we performed a soft agar assay. BMP4 exposure, BMPR1A overexpression and BMP4 exposure + BMPR1A overexpression all generated a greater number of colonies than in the control condition (Figure 6F), suggesting that some immature mammary cells may indeed acquire a certain degree of genetic instability under the influence of the BMP4/BMPR1A axis, leading to their transformation. Finally, we subjected these same long-term BMP4-exposed cells to a shallow HRD assay in order to determine the overall status of homologous recombination under these different conditions. Interestingly, the test was negative under all the different conditions (supp 5), suggesting that transformation mediated by BMP4 exposure/BMPR1A overexpression is not linked to a complete deficit in homologous recombination, but rather to disruptions in this process which nevertheless lead to the accumulation of genomic aberrations (Figure 7).

Discussion

This study provides a new insight into certain mechanisms that promote the emergence of cancer stem cells in basal-like carcinogenesis. The role of the mammary gland microenvironment is highlighted, in particular that of the BMP4/BMPR1A axis. In fact, transcriptional analyses carried out on several patient cohorts identified a dominant BMP4/BMPR1A signal in BLBCs compared with other molecular subtypes and healthy tissues, with BMPR1A overexpression associated with BMP4 overproduction by the micro-environment and not by the tumour itself, as also described with BMP2 in other tumours including certain luminal breast carcinomas and certain acute leukaemias^{35,81}. Moreover, for the first time, as far as we know, BMP4 and BMPR1A protein expression has been studied specifically in BLBCs, and in the case of BMPR1A, significantly inversely related to BRCA1

transcriptional expression. The effects of this dysregulation of the BMP4/BMPR1A axis directly on the mammary stem cell population were studied using the MCF10A cell line composed of a heterogeneous population of immature human mammary cells (stem and progenitor cells) immortalised but not transformed, enabling us to model the consequences of deregulation of the mammary gland microenvironment as early as the pre-transformation stage. We thus exposed these cells to physio-pathological BMP4 levels, the concentration used fitting within the same range as that found in the TNBC supernatant. Exposure to BMP4 for several days to several weeks consistently resulted in at least 50% BRCA1 repression at transcriptional and protein levels, mimicking a BRCA1 haploinsufficiency. This BRCA1 repression by BMP4 appears to rely on the BMPR1A receptor and the canonical BMP pathway. Several studies carried out *ex vivo* under BRCA1 haploinsufficiency have highlighted the role of BRCA1 in differentiating luminal progenitors in the mammary gland⁴¹⁻⁴³, cells considered to be the cells of origin of basal-like breast cancers⁸². Several studies have also validated the role of BRCA1 in inducing luminal differentiation in the mammary gland *in vitro*^{44,45}. Here we confirm *in vitro* and *ex-vivo* the impact of a BRCA1 defect on blocking differentiation of luminal progenitors in the mammary gland. In our study, this event is associated with an enrichment in basal differentiation and stemness, possibly following dedifferentiation of blocked luminal progenitors. This process has been described in several systems, notably the intestinal tract⁸³ (for review see also Tetteh et al. 2015⁸⁴). In the mammary gland, the work of Wang et al. has demonstrated the link between BRCA1 deficiency and dedifferentiation of certain mammary progenitors subjected to DNA interstrand cross link genotoxic stress⁸⁵. For the first time, we link these differentiation defects mediated by BRCA1 repression to microenvironmental anomalies, in this case of the BMP4/BMPR1A axis. Other studies have examined haploinsufficiency in the mammary gland from the angle of genetic stability. For example, Konishi et al have demonstrated that the introduction of a heterozygous BRCA1 pathogenic mutation (185delAG) into the MCF10A cell line (BRCA1^{mut/+}) leads, upon SNP array and FISH evaluation, to significant copy number alterations compared with the BRCA1^{+/+} control cell line⁸⁶. In addition, Rennstam et al have shown that non-transformed BRCA1 mutated tissues show a higher level of chromosomal aberrations in CGH than non-mutated control tissues (but less than BRCA1 mutated tumours)⁸⁷, suggesting that BRCA1 haploinsufficiency is already likely to generate genetic instability at the pre-transformation stage. Hyper-recombination phenomena associated with BRCA1 haploinsufficiency could be at the origin of this initial genetic instability, as suggested by the work of Cousineau et al⁸⁸. The data from our study are compatible with this hypothesis since, under BMP4 exposure, we observed aberrant nuclear RAD51 over-recruitment after MCF10A irradiation. Many authors have suggested that such RAD51 over-recruitment at the break site could be deleterious, promoting inappropriate non-homologous hyper-recombination and hence the emergence of chromosomal aberrations such as translocations, inversions or deletions leading to loss of heterozygosity and aneuploidy that may be involved in carcinogenesis⁵⁵⁻⁶². Similarly, Guirouilh-Barbat et al. have established that RAD51 is able to intrinsically generate genetic instability through non-homologous (or micro-homologous) recombination, and that this process is prevented by 53BP1⁶³. In this context, the RAD51/53BP1 ratio would influence the degree of genetic stability. Interestingly, in our study, after irradiation, we observed 53BP1 recruitment simultaneously with RAD51 recruitment. This could be interpreted as a negative feedback of RAD51 over-recruitment to limit its deleterious pro-recombinant effects. Nevertheless, 1 h after irradiation, under BMP4 exposure, we demonstrated an increase in the RAD51/53BP1 ratio compared with the untreated condition, in favor of greater genetic instability in this condition. In our model, this instability would thus be RAD51-dependent and mediated by non-

homologous hyper-recombination processes potentially established to the detriment of fully efficient HR. Comet assays confirmed the accumulation of genetic aberrations after PARPi treatment, under BMP4 exposure conditions. We therefore wondered whether these BMP4-mediated alterations in homologous recombination were sufficient to generate any sensitivity to PARPi. Interestingly, a contingent of BMP4-exposed MCF10A cells actually died by apoptosis after Olaparib treatment, suggesting a homologous recombination-deficient phenotype in these cells. In contrast, another cell contingent persists after Olaparib treatment. This contingent is enriched in SC or stem-like cells, as demonstrated by CFC and mammosphere assays. This could suggest that the dedifferentiation of some luminal progenitors in response to BMP4 is coupled with a reprogramming of their DNA damage response machinery in the form of BRCA1 repression and compensatory RAD51 over-recruitment. This is compatible with data from King et al. generated in the context of glioblastoma showing that glioblastoma stem cells, unlike differentiated cells, exhibit RAD51 over-recruitment after DNA double-strand breaks⁸⁹. In their model as in ours, this RAD51 over-recruitment in immature dedifferentiated cells would allow their persistence even under severe genotoxic stress, at the cost of genetic instability linked to the associated hyper-recombination. As also suggested by our soft agar assay data, we therefore postulate that the persistence of these stem-like cells with a lowered level of BRCA1 expression and alterations in homologous recombination associated with non-homologous hyper-recombination events could lead to their transformation into cancer stem cells in the context of basal-like tumorigenesis. This hypothesis is all the more plausible as King et al. have demonstrated that, unlike BRCA-mutated ovarian tumours, complete loss of the BRCA1 WT allele is not necessarily required for the carcinogenesis of BRCA1-mutated breast tumours⁹⁰. This could have important therapeutic implications for sporadic BLBCs displaying a BRCAness phenotype without complete loss of BRCA1 expression and/or function. Indeed, the sensitivity of these tumors to PARPi_s is poor at both localized and metastatic stages⁹¹⁻⁹⁶. This work suggests that the lower sensitivity of these tumors to PARPi_s is due to their enrichment in cancer stem cells with HR alterations sufficient for transformation, but insufficient to trigger synthetic lethality, hence their persistence after genotoxic treatment. Other treatments should therefore be considered to neutralize this type of cell and improve patient prognosis. Based on the data presented here, the BMP4/BMPRI1A axis could be a good therapeutic target. Further analysis is necessary to validate this promising concept.

Materials and methods

Cell culture

The MCF10A human immortalised but untransformed (CDKN2A homozygous deletion, cMYC amplification) immature mammary epithelial cell model was used because these cells are functionally representative of the behavior of healthy MaSCs as previously described. This cell line was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, USA) and cultured according to recommendations in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/F-12 nutrient mix supplemented with 1% Penicillin/Streptomycin (Life Technologies), 1% GlutaMAX (Thermo Fisher), 5% Horse Serum (Life Technologies), 10 ug/ml Insulin (Novorapid), 0.5 ug/ml Hydrocortisone (Sigma), 100ng/ml Cholera Toxin (Sigma) and 20 ng/ml Epithelial Growth Factor (EGF) (Sigma). Cells were incubated with 5% CO₂

at 37°C. The cell lines were tested negative for mycoplasma contamination before conducting the experiments.

Generation of cell lines

The MCF10A cell line with BRCA1 knockdown was generated using an all-in-one Tet-ON lentiviral transfected system. The transfected vector construct contained a shRNA sequence complementary to the target messengerRNA (BRCA1 or luciferase for the control cell line). Upstream was located a GFP coding sequence (allowing the transfection efficiency control), followed by a Puromycin (Puro) resistant gene constitutively expressed thanks to the PGK promoter. This enabled the selection of the successfully transfected cells with 0,5 ug/ml Puro treatment for 4 days in the MCF10A cells medium. Pooled resistant clones were then treated with an overnight pulse of 400 ng/ml Doxycycline (Dox) to induce the expression of shRNAs along with GFP protein. The GFP positive cells, i.e. able to respond to Dox, were sorted using Fluorescence-activated cell sorting (FACS) (see below) and expanded so as to form the different required conditions : shBRCA1 and shLuciferase (shLuc) i.e. shControl.

Overexpressing BMPR1A MCF10A and its related control were obtained after transfection and Puro selection (0,5 ug/ml) of MCF10A cells with a BMPR1A WT (pcDNA3-HA-BMPRIA WT) obtained from Ten Dijke/Heldin team (for overexpressing BMPR1A MCF10A) or with a control empty construct.

To generate MCF10A-FUCCI cell lines, fucci constructs (mVenus-hGeminin/pcDNA3 and mCherry-hCdt1/pcDNA3) obtained from Riken Institute were transfected into MCF10A cell line and selected with Puro (1ug/ml).

In silico analysis

Different cohorts were used for in silico analyses: TCGA-Breast cancer, GTEx, GOBO. Transcriptional expression analysis of BMPR1A, BMPR1B, BMP2, BMP4 in the different molecular subtypes of breast cancer and non-tumoral controls was performed using the Breast Cancer Gene-Expression Miner v5.0 (bc-GenExMiner v5.0) and the Gene Expression-Based Outcome for Breast Cancer Online (<http://co.bmc.lu.se/gobo>) tools. Correlation analyses were performed using bc-GenExMiner v5.0. Overall survival analyses were performed using km plotter (<https://kmplot.com/analysis/>).

Quantification of soluble BMP4 in primary tissues

To determine the concentration of secreted BMP4 in the microenvironment of primary tissue samples, standardized normal and tumor tissue supernatants were prepared as described by Chapellier et al⁹³. Supernatants were filtered using a 40 mM cell strainer and used to quantify soluble BMP4. ELISA quantifications of BMP4 were performed following the manufacturer's instructions (Quantikine ELISA Kit; R&D Systems).

Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)

Total RNA was extracted using Rneasy Mini Kit (Qiagen[®]) following the protocol from the manufacturer. The quantity of RNA was determined using a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). 1 ug of extracted RNA samples were used for the synthesis of cDNA using the SuperScript™ RT reagent kit (Takara). The samples were incubated at 25°C for 10 minutes, followed by another incubation at 42°C for 50 minutes and inactivated at 70°C for 15 minutes. The cDNA was diluted four times with Rnase-free water. 2 ul of cDNA was subjected to q-PCR using the QuantiFast SYBR[®] Green RT-PCR Kit (Qiagen[®]). The reaction consisted of an incubation at 95°C for 5 minutes, followed by 45 cycle of 95°C and 60°C incubations for 10 and 30 seconds respectively. To ensure the

experiment was carried out properly, negative controls (water/no reverse transcriptase) were included. The CT values were used to calculate the fold difference in the target gene with relative to the endogenous house-keeping gene CPB.

Primer name	Primer sequence (5' – 3')
BRCA1	Forward - AAGGTCAACAAAAGAATGTCCA
	Reverse - GTGATGTGGTGTCTTCTGGCAA
BMP4	Forward -
	Reverse -
BMPRIa	Forward - GAAAAAGTGGCGGTGAAAGT
	Reverse - TAGAGCTGAGTCCAGGAACC
BMPRIb	Forward - CAGGACCCTGTCCCTTTGAT
	Reverse - GCCAGCTGGTTCAGAGAGAC
CPB	Forward - ACTTCACCAGGGGAGATGG
	Reverse - AGCCGTTGGTGTCTTTC

Table 1 : List of primers

BMP signaling pathway inhibitors

When necessary, inhibitors were added to the culture medium 2 hours before the BMP ligands.

Inhibitor	Concentration	Reference
AG490	25 umol/l	Joung et al., 2014
E6201	100 nmol/l	Zhang et al., 2016
LDN-193189	1 ug/ml	Boergemann et al., 2010
SCH772984	1umol/l	Morris et al., 2013

Table 2 : List of BMP pathway inhibitors

Western Blot

Protein samples were collected in Laemmli buffer (0.05M Tris (pH 6.8), 2% SDS, 2,5% β -mercaptoethanol and 5% glycerol). In each experimental condition, the same number of cells was collected to obtain a similar protein concentration in each sample. Samples were boiled for 5 min at 100°C and sonicated for around 10 secondes. The 10% SDS– PAGE gradient gels were run in running buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0,1% SDS) and transferred to PVDF membranes in transfer buffer (Transfer buffer (Biorad), 20% ethanol). Membranes were blocked in 5% BSA in TBS-T buffer (Tris-buffered saline 10X (Euromedex) containing 1% Tween-20 (Euromedex). Primary antibodies were incubated overnight at 4 °C and washed with TBS-T buffer. HRP-conjugated secondary antibodies were left at room temperature for 1 h and washed with TBS-T buffer. Western blot development was performed using Clarity™ Western ECL Substrate (Biorad) and Chemidoc™ Imaging System (Biorad).

-Primary antibodies and dilution factors :

Mouse-Anti BRCA1 (Merck Op92-100, 1/500)

Rabbit-Anti RAD51 (Abcam Ab133534, 1/10000)

Rabbit-Anti cleaved caspase 3 (Cell signaling 9661 (1/1000)

Mouse-Anti GAPDH (Abcam Ab8245, 1/10000)

Rabbit-Anti β tubulin (Abcam, Ab6046, 1/2000)

Fluorescence-activated cell sorting

The different MCF10A shRNA cell lines to be sorted were cultured in 6-well plates in the MCF10A cells medium with the addition of Puro 0.5 μ g/ml for 4 days to select efficiently transfected cells and 400ng/ml Dox the day before sorting to induce shRNA and GFP expression. The cells were collected at 85% confluence, rinsed with PBS 1X (Gibco), trypsinized, centrifuged at 1200g for 5 minutes and the cell pellets were resuspended in PBS 1X containing 1% fetal calf serum. Sorting was performed using a BioRad S3e cell sorter.

Flow cytometry

Cytometric analysis of cells was performed on an LSRFortessa cytometer. The software Diva was used for acquisition and Flow-Jo for analysis.

Epithelial Colony Forming Cell (E-CFC) assay

On the day of the assay, 30Gy previously irradiated NIH3T3 feeder cells were thawed and seeded in 12-well plates at a density of 8.10^4 cells/well in the MCF10A cells medium in order to provide differentiation factors for MCF10A cells. Following this, 250 to 500 cells of interest were added at limiting dilution into each well. After 7 days of co-culture, different colonies emerge depending on the differentiation program activated by the cells: luminal, basal and mixed. The colonies formed were fixed with ice-cold methanol, visualized using Wright's stain (Sigma-Aldrich) and counted under an Olympus microscope at 4X magnification. The colonies were then classified (luminal/basal/mixed) according to their previously described morphological features⁹⁴.

Mammosphere assay

Cells of interest were cultured in 96-well ultra-low attachment plates in serum free mammary epithelial cell basal growth medium (MEBM) supplemented with B27 (a serum-free supplement from thermo-Fisher), 4 mg/ml heparin (Life Technologies), 20 ng/ml basic EGF (Life Technologies). There were 8 wells for each condition. After 6 days, the spheres formed were counted under a 4X ZEISS microscope.

Soft Agar Assay

This assay is based on the colony-like growth of transformed cells cultured in a specific soft agar medium. The bottom agar layer was prepared from 3% agar diluted in culture medium to reach a final concentration of 1,5%. 1 mL was added to 12-well cell culture plates and incubated at room temperature for 1 hour. The top agar layer was added on top of the bottom agar at a final concentration of 15000 cells/well in 1 mL. Each condition was performed in triplicate. Cell culture plates were incubated at room temperature for 30 min before incubation at 5% CO₂ and 37°C. Colonies were quantified after 3 weeks.

Cell irradiation

The cells to be irradiated were cultured on glass slides placed in 35 mm diameter Petri dishes containing the MCF10A cells medium and 400 ng/ml Dox for the relevant conditions. After 4 days of culture (85% confluence), the glass slides were irradiated by the X-ray Saphir irradiator which

delivered a dose of 2 Gy per Petri dish allowing to generate about 80 DNA DSBs per cell according to a dosimetric analysis previously performed. The repair kinetics of DNA DSBs were measured before (0 minute = untreated) and at different times after exposure to ionizing radiation (10 minutes, 1hour, 4 hours, 24 hours) using immunofluorescence staining (see below). Thus, after irradiation, Petri dishes were placed in a standard tissue culture incubator before being fixed at the appropriate time point.

Immunofluorescence

At various time points after irradiation, the irradiated glass slides were rinsed with PBS 1X (Gibco) and then the cells fixed with PBS containing 4% paraformaldehyde (PFA) (100ul/slide) for 15 min at room temperature. Then the slides were rinsed with PBS 1X and a lysis solution (kept at 4°) applied for 3 minutes. After rinsing again with PBS 1X, the slides were covered with 30 ul of a primary antibody solution diluted in 4% bovine serum albumin (BSA) (the percentage of dilution is variable depending on the antibody used and is detailed below). The slides were then incubated at 37° for 1 hour in a dry incubator and rinsed 3 times with PBS 1X. 30 ul of adequately diluted secondary antibody solution was then applied in the dark to each slide which was incubated 30 min at 37° and rinsed 3 times with PBS 1X. The slides were then mounted using 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) containing antifade mounting solution (VectaShield) and varnished after 30 min. The analysis was performed under an Olympus fluorescence microscope using a visual scoring of immunofluorescence stained foci based on the analysis of 100 cells (allowing the comparison of means).

Primary antibodies and dilution factors :

Mouse-Anti phospho-Histone H2A.X (Ser 139) (Merck millipore 05-636, 1/800)
Mouse-Anti53BP1 (millipore MAB3802, 2/500)
Mouse-Anti Keratin 18 (Cell signaling 4548, 1/800)
Rabbit-Anti RAD51 (Abcam Ab133534, 1/10000)
Rabbit-Anti Keratin 14 (Abcam Ab53115, 1/400)

Secondary antibodies and dilution factors :

Goat Anti Mouse IgG Dylight 488 (Thermo scientific 35502, 1/1000)
Goat Anti Rabbit IgG Alexa Fluor 647 (Invitrogen A21245, 1/1000)

Immunohistochemistry

IHC analyses were performed on previously untreated triple-negative breast cancer cases selected from a pre-established tissu-microarray. H&E and IHC staining of paraffin sections of breast tumors was carried out using standard methods and the following antibodies: BMPR1A (MA5-17036, Invitrogen), BMP2 (ab124715, Abcam), and CK14 (06 732 429 001, Roche diagnostics). The number of positive cells for each marker and the staining intensity on a quantitative scale from 0 to 3 were determined. An expression score was defined as the product of these two parameters.

Comet assay

The first steps are common to both neutral and alkaline comet assays. Cells of interest from the different experimental conditions were diluted in ion-free 1X PBS to a concentration of 1.5×10^6 /ml. 12.5 ul of this cell suspension was diluted in 125 ul of Trévigen 1% Agarose LMPA. 40 ul of the mix

was spread on a microscope slide placed on a hot plate at 37° before incubation for 30 min at 4° in a dark, humid chamber. The slides were then immersed in a lysis solution (Trevigen) at 4° for 1 hour. For the neutral comet assay, slides were incubated in 1X neutral electrophoresis buffer at 4° for 30 min, then placed in the electrophoresis tank with 850 ml of 1X neutral electrophoresis buffer for 45 min migration at 21 volts and 4°. The slides were then placed in a precipitation solution for 30 min at room temperature, incubated for 30 min in 70% ethanol and dried. Finally, the slides were incubated in a Sybr Gold solution for 30 minutes at room temperature, then mounted with fluoromount medium. Slides were then read under a ZEISS epifluorescence microscope using the Cy3 laser and analyzed on imageJ using the opencomet program.

For the alkaline comet assay, slides were incubated in alkaline buffer at 4° for 40 min overnight, then placed in the electrophoresis tank with 850 ml of 1X alkaline buffer for 30 min migration at 25 volts and 4°. The slides were then placed in a neutralization solution for 10 min at 4° (repeated 3 times), incubated for 30 min in 70% ethanol and dried. Finally, the slides were incubated in a Sybr Gold solution for 30 minutes at room temperature, then mounted with fluoromount medium. Slides were then read under a ZEISS epifluorescence microscope using the Cy3 laser and analyzed on imageJ using the opencomet program. The composition and concentration of the various solutions and buffers are indicated on the trvigen kit.

Statistical analysis

Regarding the relationships between BRCA1 transcriptional and BMPR1A and BMP4 protein expression :

The relationships between BRCA1 transcriptional expression and its potential predictors (membrane BMPR1A, overall BMPR1A, and cytosolic BMP4 protein expression) were modeled using linear regression. A potential non-linear relationship was first investigated using fractional polynomials. Possible confounding factors such as age at diagnosis, stage, and CK14 positivity were accounted for through bivariate regression analysis due to the small sample size. A robust variance estimator was used. A sensitivity analysis was conducted using median regression. Finally, given the sample size, a Bayesian analysis was also performed. It comprised three components:

1. A confirmatory linear regression model.
2. A Bayesian Model Averaging approach to identify the most plausible models given the data.
3. An estimation of Bayes factors to quantify the evidence provided by the data in favor of one statistical model over another. Stata software (version 18) (Stata 2023) and R (R Core Team 2023) were used for the analyses.

Regarding differentiation:

The relationship between experimental conditions and differentiation was estimated using a generalized negative binomial regression model. A robust variance estimator was used to account for correlated data (repeated measures). The presence of potential interactions between experimental conditions and differentiation was tested. Multiple comparisons were performed via marginal effect analysis, taking into account Bonferroni and Sidak tests. The goodness of fit of the data to the model was verified. Stata software (version 15) was used.

Regarding the dose-response relationship:

Different models with three, four, or five parameters (ED50 being one of them) were estimated using a nonlinear regression model. These included logistic, log-logistic, Weibull, and other models. A

mixed model (also called a hierarchical model) was used to account for repeated measurements, as a sensitivity analysis. The principle of parsimony was used to select the most adequate model. The drc package of R software was used.

Other statistical analyses were essentially carried out using student's T-test or ANOVA according to experimental situation. The statistical analyses and graphs were performed with Graphpad Prism (version 8). Significant P values are given in the text or symbolized by asterisks (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

References

1. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–752 (2000).
2. Sørlie, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 10869–10874 (2001).
3. Sørlie, T. *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 8418–8423 (2003).
4. Carey, L. A. *et al.* Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study.
5. Millikan, R. C. *et al.* Epidemiology of basal-like breast cancer. (2008).
6. Fan, C. & Weigelt, B. Concordance among Gene-Expression–Based Predictors for Breast Cancer. *N Engl J Med* (2006).
7. Banerjee, S. Basal-like breast carcinomas: clinical outcome and response to chemotherapy. *J. Clin. Pathol.* **59**, 729–735 (2006).
8. Carey, L. A. *et al.* The Triple Negative Paradox: Primary Tumor Chemosensitivity of Breast Cancer Subtypes. *Clin. Cancer Res.* **13**, 2329–2334 (2007).
9. Parker, J. S. *et al.* Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. *J. Clin. Oncol.* **27**, 1160–1167 (2009).
10. Nguyen, Q. H. *et al.* Profiling human breast epithelial cells using single cell RNA sequencing identifies cell diversity. *Nat. Commun.* **9**, 2028 (2018).
11. Rouzier, R. *et al.* Breast Cancer Molecular Subtypes Respond Differently to Preoperative Chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* **11**, 5678–5685 (2005).
12. Manié, E. *et al.* Genomic hallmarks of homologous recombination deficiency in invasive breast carcinomas: Genomic hallmarks of homologous recombination defect. *Int. J. Cancer* **138**, 891–900 (2016).
13. Scully, R., Panday, A., Elango, R. & Willis, N. A. DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 698–714 (2019).
14. Paul, A. The breast cancer susceptibility genes (BRCA) in breast and ovarian cancers. *Front. Biosci.* **19**, 605 (2014).
15. Lord, C. J. & Ashworth, A. BRCAness revisited. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 110–120 (2016).
16. Staaf, J. *et al.* Whole-genome sequencing of triple-negative breast cancers in a population-based clinical study. *Nat. Med.* **25**, 1526–1533 (2019).
17. Severson, T. M. *et al.* The BRCA1ness signature is associated significantly with response to PARP inhibitor treatment versus control in the I-SPY 2 randomized neoadjuvant setting. *Breast Cancer Res.* **19**, 99 (2017).
18. Chopra, N. *et al.* Homologous recombination DNA repair deficiency and PARP inhibition activity in primary triple negative breast cancer. *Nat. Commun.* **11**, 2662 (2020).
19. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **490**, 61–70 (2012).
20. Turner, N. C. *et al.* BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. *Oncogene* **26**, 2126–2132 (2007).
21. Joesse, S. A. *et al.* Prediction of BRCA1-association in hereditary non-BRCA1/2 breast carcinomas with array-CGH. *Breast Cancer Res. Treat.* **116**, 479–489 (2009).
22. Junankar, S. *et al.* ID4 controls mammary stem cells and marks breast cancers with a stem cell-like phenotype. *Nat. Commun.* **6**, 6548 (2015).
23. Garcia, A. I. *et al.* Down-regulation of *BRCA1* expression by miR-146a and miR-146b-5p in triple negative sporadic breast cancers. *EMBO Mol. Med.* **3**, 279–290 (2011).
24. Fkih M'hamed, I. *et al.* Identification of miR-10b, miR-26a, miR-146a and miR-153 as potential triple-negative breast cancer biomarkers. *Cell. Oncol.* **38**, 433–442 (2015).

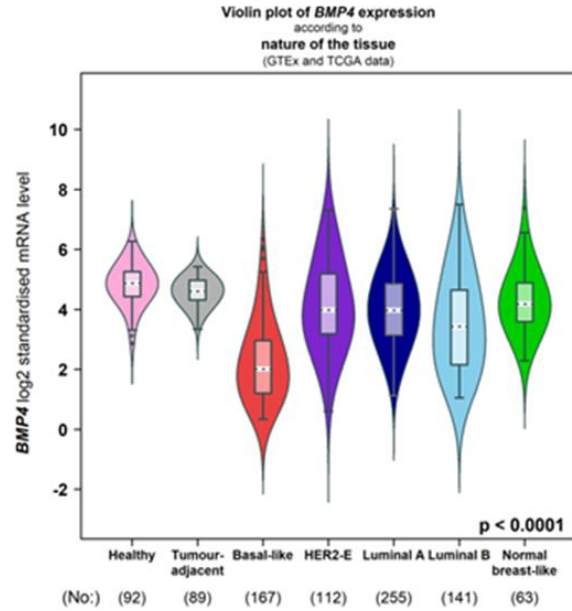
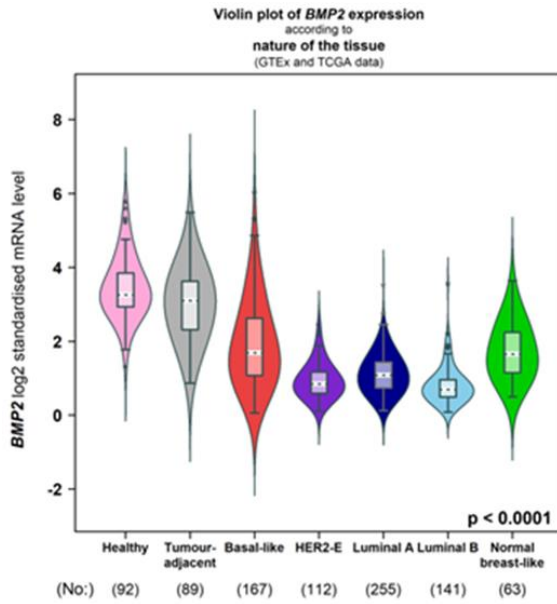
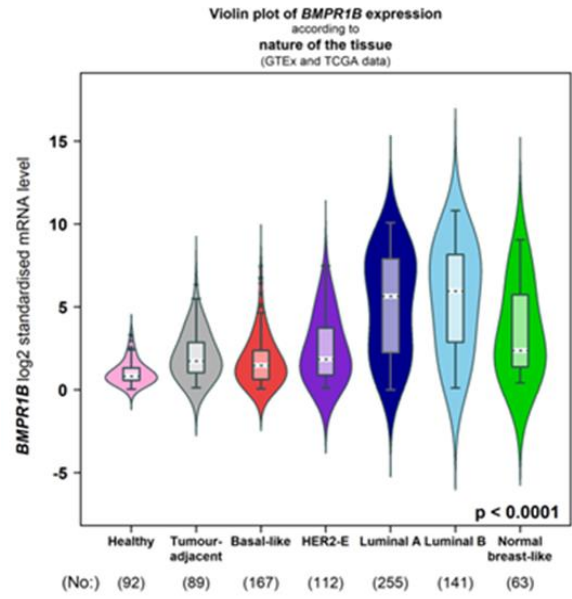
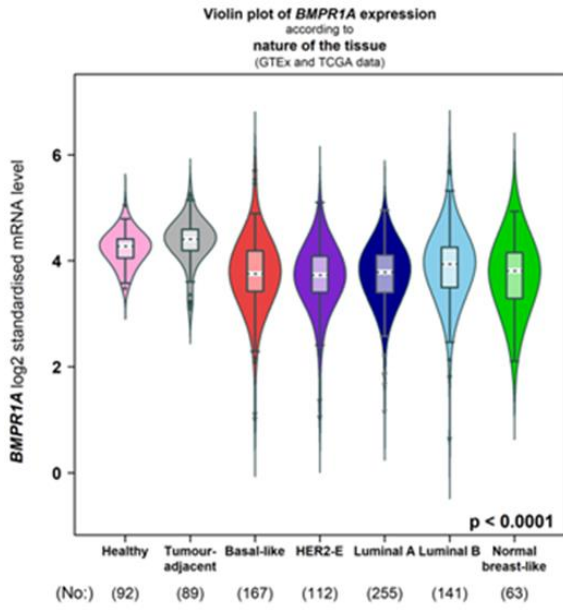
25. Moskwa, P. *et al.* miR-182-Mediated Downregulation of BRCA1 Impacts DNA Repair and Sensitivity to PARP Inhibitors. *Mol. Cell* **41**, 210–220 (2011).
26. Shen, J., Ambrosone, C. B. & Zhao, H. Novel genetic variants in microRNA genes and familial breast cancer. *Int. J. Cancer* **124**, 1178–1182 (2009).
27. De Summa, S. *et al.* Expression of base excision repair key factors and miR17 in familial and sporadic breast cancer. *Cell Death Dis.* **5**, e1076–e1076 (2014).
28. Liu, L. *et al.* TGF β Induces “BRCAness” and Sensitivity to PARP Inhibition in Breast Cancer by Regulating DNA-Repair Genes. *Mol. Cancer Res.* **12**, 1597–1609 (2014).
29. Pal, D. *et al.* TGF- β reduces DNA ds-break repair mechanisms to heighten genetic diversity and adaptability of CD44+/CD24– cancer cells. *eLife* **6**, e21615 (2017).
30. Nielsen, T. O. *et al.* Immunohistochemical and Clinical Characterization of the Basal-Like Subtype of Invasive Breast Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **10**, 5367–5374 (2004).
31. Livasy, C. A. *et al.* Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod. Pathol.* **19**, 264–271 (2006).
32. Honeth, G. *et al.* The CD44+/CD24-phenotype is enriched in basal-like breast tumors. *Breast Cancer Res.* **10**, R53 (2008).
33. Conde, I., Ribeiro, A. S. & Paredes, J. Breast Cancer Stem Cell Membrane Biomarkers: Therapy Targeting and Clinical Implications. *Cells* **11**, 934 (2022).
34. Zabkiewicz, C., Resaul, J., Hargest, R., Jiang, W. G. & Ye, L. Bone morphogenetic proteins, breast cancer, and bone metastases: striking the right balance. *Endocr. Relat. Cancer* **24**, R349–R366 (2017).
35. Chapellier, M. *et al.* Disequilibrium of BMP2 Levels in the Breast Stem Cell Niche Launches Epithelial Transformation by Overamplifying BMPR1B Cell Response. *Stem Cell Rep.* **4**, 239–254 (2015).
36. Joosse, S. A. *et al.* Genomic signature of BRCA1 deficiency in sporadic basal-like breast tumors. *Genes. Chromosomes Cancer* **50**, 71–81 (2011).
37. Botti, G. *et al.* Morphological and pathological features of basal-like breast cancer. *Transl. Cancer Res.* **8**, S503–S509 (2019).
38. Sousa, B. *et al.* P-cadherin, vimentin and CK14 for identification of basal-like phenotype in breast carcinomas: an immunohistochemical study. *Histol. Histopathol.* **25**, 963–974 (2010).
39. Thike, A. A. *et al.* Triple-negative breast cancer: clinicopathological characteristics and relationship with basal-like breast cancer. *Mod. Pathol.* **23**, 123–133 (2010).
40. Turner, N. C. *et al.* BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. *Oncogene* **26**, 2126–2132 (2007).
41. Lim *et al.* Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat. Med.* **15**, 907–913 (2009).
42. Liu, S. *et al.* BRCA1 regulates human mammary stem/progenitor cell fate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 1680–1685 (2008).
43. Proia, T. A. *et al.* Genetic Predisposition Directs Breast Cancer Phenotype by Dictating Progenitor Cell Fate. *Cell Stem Cell* **8**, 149–163 (2011).
44. Furuta, S. *et al.* Depletion of BRCA1 impairs differentiation but enhances proliferation of mammary epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 9176–9181 (2005).
45. He, Z. *et al.* Pathogenic BRCA1 variants disrupt PLK1-regulation of mitotic spindle orientation. *Nat. Commun.* **13**, 2200 (2022).
46. Stingl, J., Eaves, C. J., Zandieh, I. & Emerman, J. T. Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue. *Breast Cancer Res. Treat.* **67**, 93–109 (2001).
47. Dontu, G. *et al.* In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev.* **17**, 1253–1270 (2003).
48. Bachelard-Cascales, E., Chapellier, M., Delay, E. & Maguer-Satta, V. A Protocol to Quantify Mammary Early Common Progenitors from Long-Term Mammosphere Culture. *Curr. Protoc. Stem Cell Biol.* **20**, (2012).

49. Willers, H. *et al.* Utility of DNA Repair Protein Foci for the Detection of Putative BRCA1 Pathway Defects in Breast Cancer Biopsies. *Mol. Cancer Res.* **7**, 1304–1309 (2009).
50. Naipal, K. A. T. *et al.* Functional *Ex Vivo* Assay to Select Homologous Recombination–Deficient Breast Tumors for PARP Inhibitor Treatment. *Clin. Cancer Res.* **20**, 4816–4826 (2014).
51. Meijer, T. G. *et al.* Functional *Ex Vivo* Assay Reveals Homologous Recombination Deficiency in Breast Cancer Beyond BRCA Gene Defects. *Clin. Cancer Res.* **24**, 6277–6287 (2018).
52. Castroviejo-Bermejo, M. *et al.* A RAD 51 assay feasible in routine tumor samples calls PARP inhibitor response beyond BRCA mutation. *EMBO Mol. Med.* **10**, (2018).
53. Cruz, C. *et al.* RAD51 foci as a functional biomarker of homologous recombination repair and PARP inhibitor resistance in germline BRCA-mutated breast cancer. *Ann. Oncol.* **29**, 1203–1210 (2018).
54. Wiegmans, A. P. *et al.* Rad51 supports triple negative breast cancer metastasis. *Oncotarget* **5**, 3261–3272 (2014).
55. Kim, P. M. Overexpression of human RAD51 and RAD52 reduces double-strand break-induced homologous recombination in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **29**, 4352–4360 (2001).
56. Worrillow, L. J. & Allan, J. M. Deregulation of homologous recombination DNA repair in alkylating agent-treated stem cell clones: a possible role in the aetiology of chemotherapy-induced leukaemia. *Oncogene* **25**, 1709–1720 (2006).
57. Richardson, C., Stark, J. M., Ommundsen, M. & Jasin, M. Rad51 overexpression promotes alternative double-strand break repair pathways and genome instability. *Oncogene* **23**, 546–553 (2004).
58. Martin, R. W. *et al.* RAD51 Up-regulation Bypasses *BRCA1* Function and Is a Common Feature of *BRCA1* -Deficient Breast Tumors. *Cancer Res.* **67**, 9658–9665 (2007).
59. Francis, R. & Richardson, C. Multipotent hematopoietic cells susceptible to alternative double-strand break repair pathways that promote genome rearrangements. *Genes Dev.* **21**, 1064–1074 (2007).
60. Klein, H. L. The consequences of Rad51 overexpression for normal and tumor cells. *DNA Repair* **7**, 686–693 (2008).
61. Elango, R. *et al.* Break-induced replication promotes formation of lethal joint molecules dissolved by Srs2. *Nat. Commun.* **8**, 1790 (2017).
62. Marsden, C. G. *et al.* The Tumor-Associated Variant RAD51 G151D Induces a Hyper-Recombination Phenotype. *PLOS Genet.* **12**, e1006208 (2016).
63. Guirouilh-Barbat, J. *et al.* *RAD51 Promotes Non-Homologous Genetic Rearrangements That Are Prevented by 53BP1*. <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/768788> (2019) doi:10.1101/768788.
64. Farmer, H. *et al.* Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* **434**, 917–921 (2005).
65. Bryant, H. E. *et al.* Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. **434**, (2005).
66. de Bono, J. *et al.* Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* **382**, 2091–2102 (2020).
67. Golan, T. *et al.* Maintenance Olaparib for Germline *BRCA* -Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *N. Engl. J. Med.* **381**, 317–327 (2019).
68. Ray-Coquard, I. *et al.* Olaparib plus Bevacizumab as First-Line Maintenance in Ovarian Cancer. *N. Engl. J. Med.* **381**, 2416–2428 (2019).
69. Coleman, R. L. *et al.* Veliparib with First-Line Chemotherapy and as Maintenance Therapy in Ovarian Cancer. *N. Engl. J. Med.* **381**, 2403–2415 (2019).
70. González-Martín, A. *et al.* Niraparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *N. Engl. J. Med.* **381**, 2391–2402 (2019).
71. Tutt, A. N. J. *et al.* Adjuvant Olaparib for Patients with *BRCA1* - or *BRCA2* -Mutated Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **384**, 2394–2405 (2021).

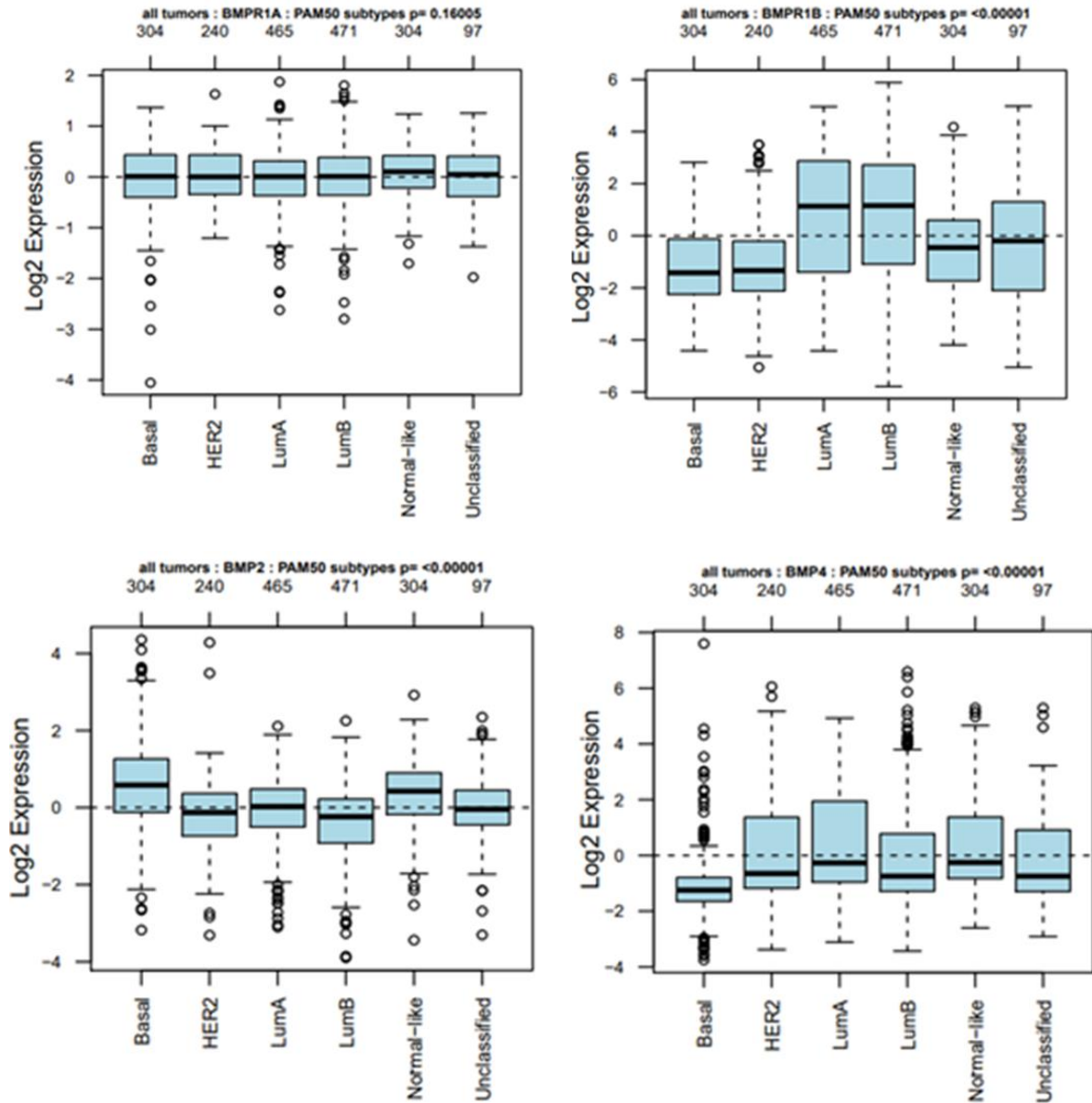
72. Robson, M. *et al.* Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline *BRCA* Mutation. *N. Engl. J. Med.* **377**, 523–533 (2017).
73. Litton, J. K. *et al.* Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline *BRCA* Mutation. *N. Engl. J. Med.* **379**, 753–763 (2018).
74. Cuitiño, M. C. *et al.* Two Distinct E2F Transcriptional Modules Drive Cell Cycles and Differentiation. *Cell Rep.* **27**, 3547–3560.e5 (2019).
75. Sakaue-Sawano, A. *et al.* Genetically Encoded Tools for Optical Dissection of the Mammalian Cell Cycle. *Mol. Cell* **68**, 626–640.e5 (2017).
76. Tomura, M. *et al.* Contrasting Quiescent G0 Phase with Mitotic Cell Cycling in the Mouse Immune System. *PLoS ONE* **8**, e73801 (2013).
77. Zielke, N. & Edgar, B. A. FUCCI sensors: powerful new tools for analysis of cell proliferation: FUCCI sensors. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **4**, 469–487 (2015).
78. Creighton, C. J. *et al.* Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 13820–13825 (2009).
79. Lee, H. E. *et al.* An increase in cancer stem cell population after primary systemic therapy is a poor prognostic factor in breast cancer. *Br. J. Cancer* **104**, 1730–1738 (2011).
80. Kabraji, S. *et al.* AKT1low quiescent cancer cells persist after neoadjuvant chemotherapy in triple negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* **19**, 88 (2017).
81. Laperrousaz, B. *et al.* Primitive CML cell expansion relies on abnormal levels of BMPs provided by the niche and on BMPRIb overexpression. *Blood* **122**, 3767–3777 (2013).
82. Molyneux, G. *et al.* BRCA1 Basal-like Breast Cancers Originate from Luminal Epithelial Progenitors and Not from Basal Stem Cells. *Cell Stem Cell* **7**, 403–417 (2010).
83. Van Es, J. H. *et al.* Dll1+ secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage. *Nat. Cell Biol.* **14**, 1099–1104 (2012).
84. Tetteh, P. W., Farin, H. F. & Clevers, H. Plasticity within stem cell hierarchies in mammalian epithelia. *Trends Cell Biol.* **25**, 100–108 (2015).
85. Wang, H. *et al.* BRCA1/FANCD2/BRG1-Driven DNA Repair Stabilizes the Differentiation State of Human Mammary Epithelial Cells. *Mol. Cell* **63**, 277–292 (2016).
86. Konishi, H. *et al.* Mutation of a single allele of the cancer susceptibility gene *BRCA1* leads to genomic instability in human breast epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 17773–17778 (2011).
87. Rennstam, K. *et al.* Genomic alterations in histopathologically normal breast tissue from *BRCA1* mutation carriers may be caused by *BRCA1* haploinsufficiency. *Genes. Chromosomes Cancer* **49**, 78–90 (2010).
88. Cousineau, I. & Belmaaza, A. BRCA1 Haploinsufficiency, but not Heterozygosity for a BRCA1-truncating Mutation, Deregulates Homologous Recombination. *Cell Cycle* **6**, 962–971 (2007).
89. King, H. O. *et al.* RAD51 Is a Selective DNA Repair Target to Radiosensitize Glioma Stem Cells. *Stem Cell Rep.* **8**, 125–139 (2017).
90. King, T. A. *et al.* Heterogenic Loss of the Wild-Type BRCA Allele in Human Breast Tumorigenesis. *Ann. Surg. Oncol.* **14**, 2510–2518 (2007).
91. Llombart-Cussac, A. *et al.* SOLT1 NeopARP: a phase II randomized study of two schedules of iniparib plus paclitaxel versus paclitaxel alone as neoadjuvant therapy in patients with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **154**, 351–357 (2015).
92. Tung, N. M. *et al.* TBCRC 048: Phase II Study of Olaparib for Metastatic Breast Cancer and Mutations in Homologous Recombination-Related Genes. *J. Clin. Oncol.* **38**, 4274–4282 (2020).
93. Gelmon, K. A. *et al.* Olaparib in patients with recurrent high-grade serous or poorly differentiated ovarian carcinoma or triple-negative breast cancer: a phase 2, multicentre, open-label, non-randomised study. *Lancet Oncol.* **12**, 852–861 (2011).

94. Kummar, S. *et al.* Randomized phase II trial of cyclophosphamide and the oral poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor veliparib in patients with recurrent, advanced triple-negative breast cancer. *Invest. New Drugs* **34**, 355–363 (2016).
95. Rodler, E. *et al.* Cisplatin with veliparib or placebo in metastatic triple-negative breast cancer and BRCA mutation-associated breast cancer (S1416): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* **24**, 162–174 (2023).
96. O’Shaughnessy, J. *et al.* Phase III Study of Iniparib Plus Gemcitabine and Carboplatin Versus Gemcitabine and Carboplatin in Patients With Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* **32**, 3840–3847 (2014).
97. Chapellier, M. *et al.* Disequilibrium of BMP2 Levels in the Breast Stem Cell Niche Launches Epithelial Transformation by Overamplifying BMPR1B Cell Response. *Stem Cell Rep.* **4**, 239–254 (2015).
98. Clément, F. *et al.* Long-term exposure to bisphenol A or benzo(a)pyrene alters the fate of human mammary epithelial stem cells in response to BMP2 and BMP4, by pre-activating BMP signaling. *Cell Death Differ.* **24**, 155–166 (2017).

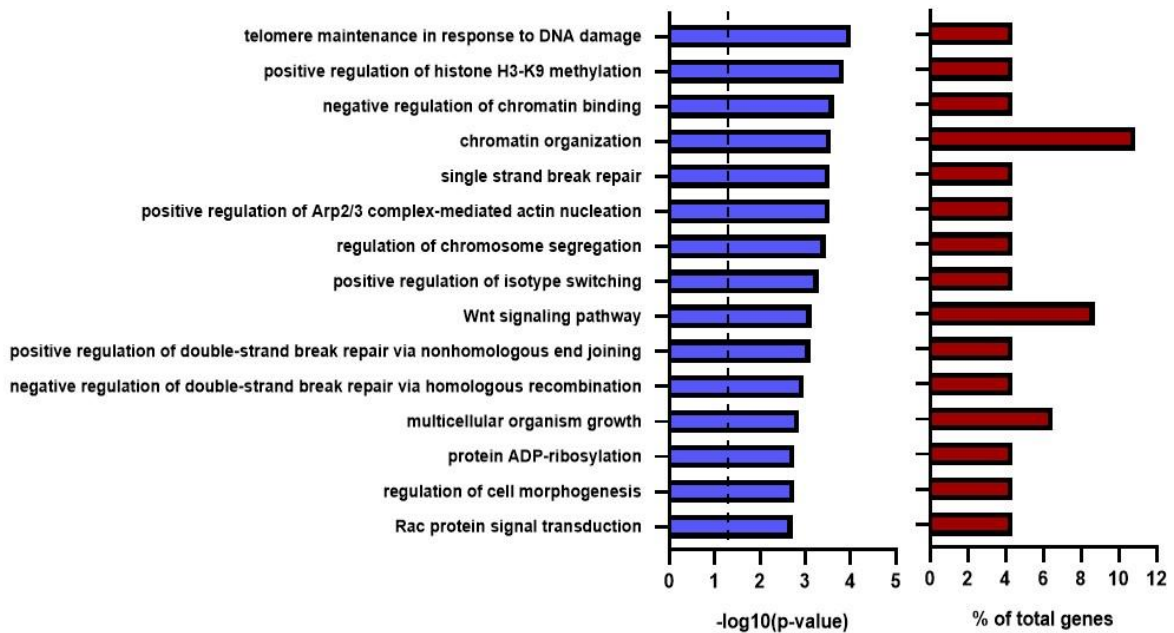
A



B



C



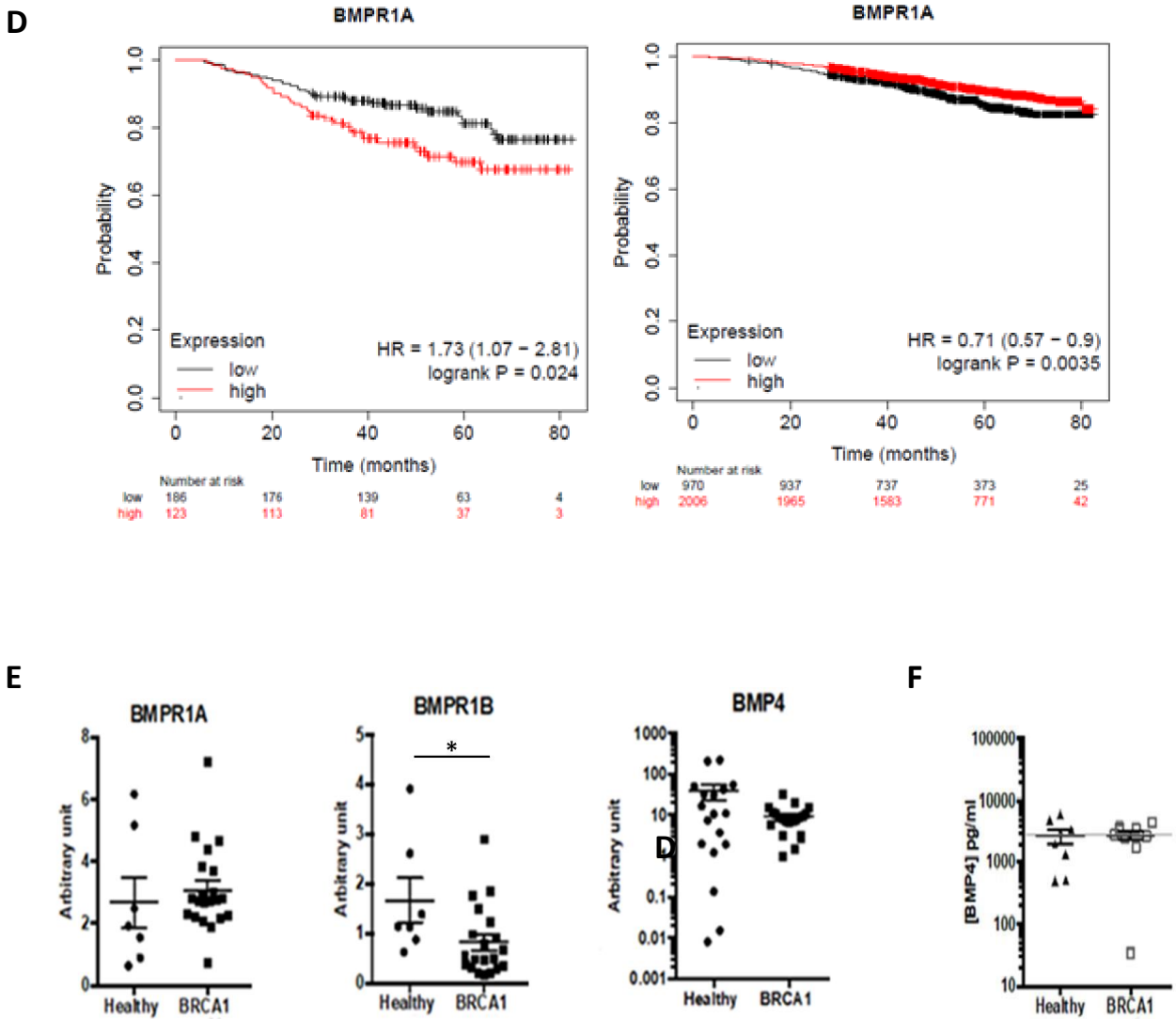


Figure 1 BMPR1A, BMPR1B, BMP2 and BMP4 mRNA expression in different breast cancer molecular subtypes, compared with healthy and peri-tumoral control tissues in the TCGA-Breast Cancer and GTEx cohorts (A). BMPR1A, BMPR1B, BMP2 and BMP4 mRNA expression in different breast cancer molecular subtypes, compared with healthy and peri-tumoral control tissues in the GOBO cohort (B). Correlation analysis related to BMPR1A transcriptional expression in the TCGA Breast Cancer cohort. Genes differentially expressed under BMPR1A overexpression are classified into functional groups. The level of statistical significance is plotted on the left, and the number of differentially expressed genes associated with each functional group is plotted on the right (C). Kaplan Meier curves representing overall survival according to BMPR1A transcriptional expression in the TCGA cohort, among basal-like cancers (left curve) and all molecular subtypes (right curve) (D). RT-qPCR analysis of BMPR1A and BMPR1B transcriptional expression in healthy BRCA1 mutated tissues, compared to healthy non-mutated control tissues (E). ELISA analysis of BMP4 expression in the supernatant of healthy BRCA1 mutated tissues, compared to healthy non-mutated control tissues (F). Error bars represent standard error to the mean. *p<0,05.

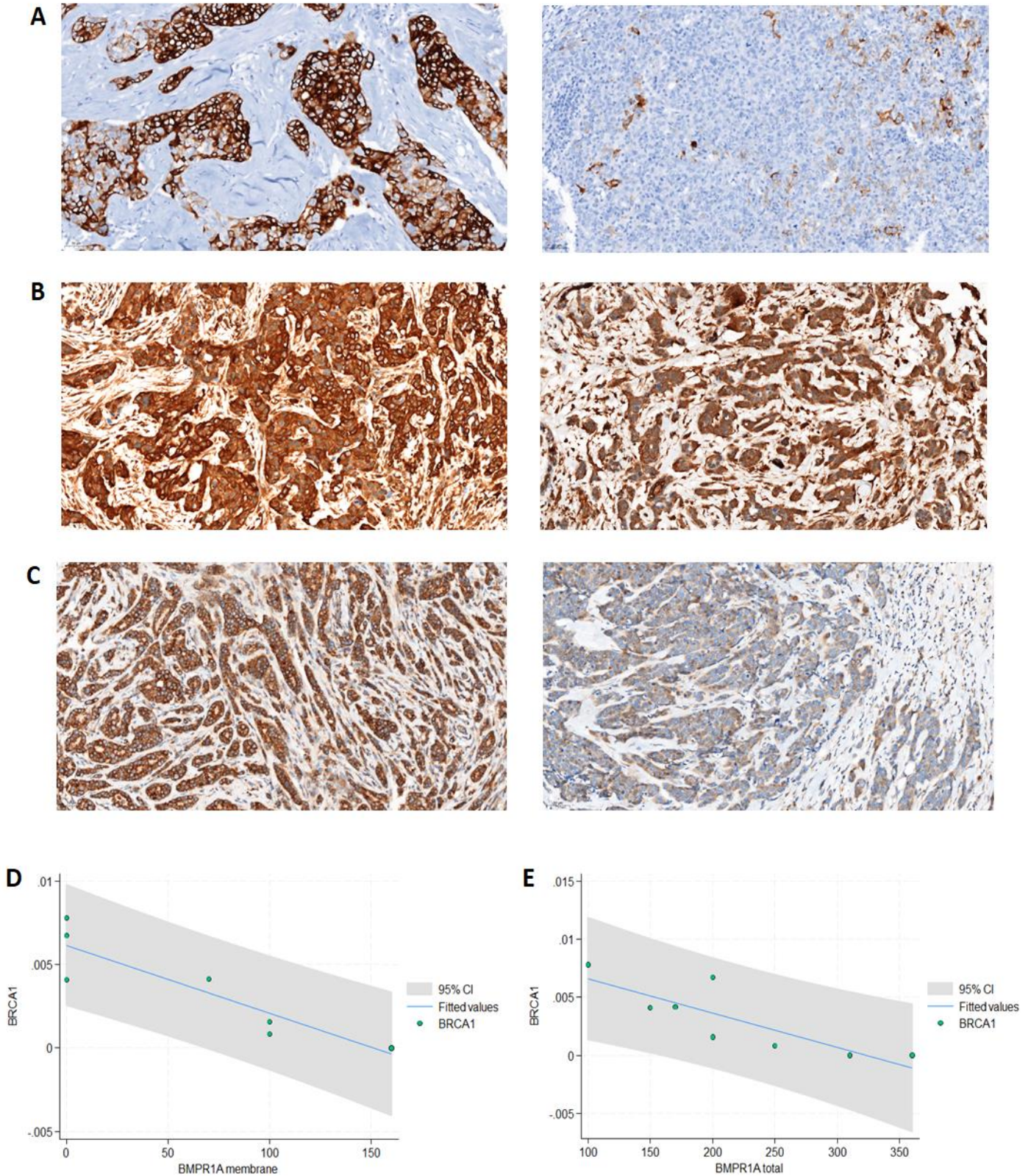


Figure 2 IHC analysis of CK14 membrane expression in TNBC cases. Left: strong staining, right: weak staining. Magnification x20 (A). IHC analysis of BMPR1A expression in TNBC. Left: strong cytosolic and membrane staining, right: weak cytosolic staining. Magnification x20 (B). IHC analysis of cytosolic BMP4 expression in TNBC. Left: strong staining, right: weak staining. Magnification x20 (C). Univariate linear regression model showing the relationship between BRCA1 transcriptional expression (rationalized on ACTB1 gene expression) and BMPR1A membrane expression assessed according to a score defined by the percentage of positive cells x staining intensity. R-squared = 0.8438; p = 0.001 (D). Univariate linear regression model showing the relationship between BRCA1 transcriptional expression (rationalized on ACTB1 gene expression) and BMPR1A overall expression assessed according to a score defined by the percentage of positive cells x staining intensity. R-squared = 0.6442; p = 0.01 (E).

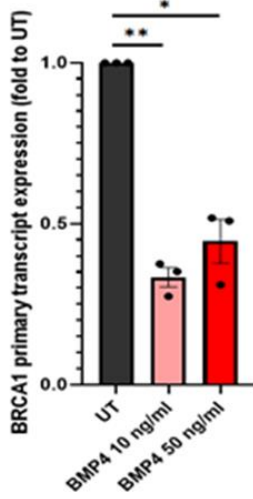
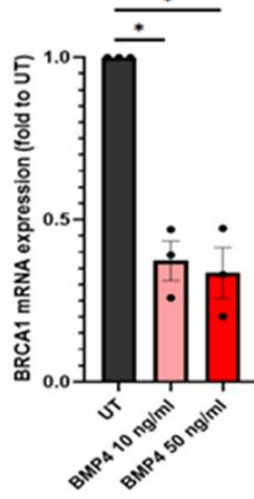
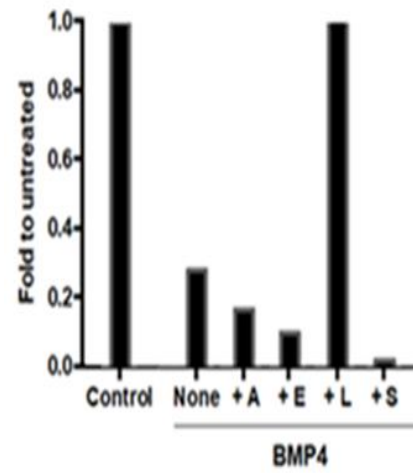
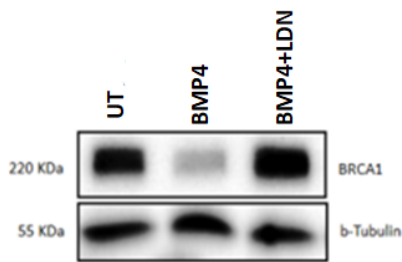
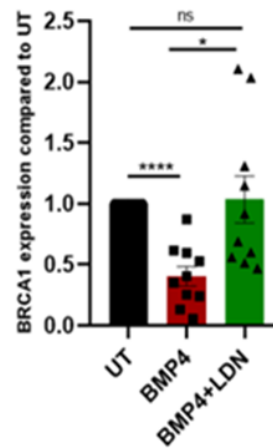
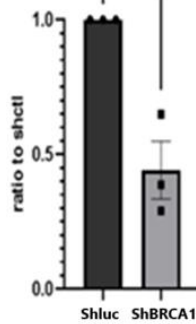
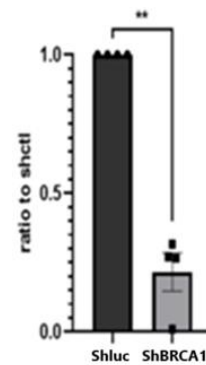
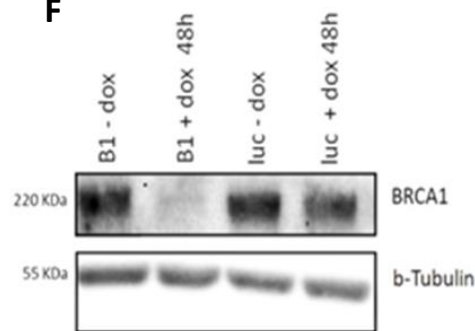
A

Adjustment variable	BMPR1A membrane R-squared	Coefficient	95% CI	P-value
Age	0.8526	-.0000416	-.0000618 -.0000214	0.003
Stage	0.8875	-.000042	-.0000603 -.0000237	0.002
BMPR1A cytosolic expression	0.8473	-.0000403	-.000061 -.0000195	0.004
BMP4 cytosolic expression	0.8438	-.0000407	-.0000626 -.0000189	0.005
CK14 membrane expression	0.8584	-.0000399	-.0000583 -.0000216	0.003

B

Adjustment variable	BMPR1A total R-squared	Coefficient	95% CI	P-value
Age	0.7148	-.0000309	-.0000489 -.000013	0.007
Stage	0.6956	-.0000296	-.000046 -.0000132	0.006
BMP4 cytosolic expression	0.6956	-.0000293	-.0000452 -.0000134	0.005
CK14 membrane expression	0.8193	-.000031	-.0000384 -.0000237	<0.0001

Table 1 Bivariate linear regression showing the relationship between BRCA1 transcriptional expression and membrane (A) or overall (B) BMPR1A expression after adjustment for several potentially confounding factors.

Aone-way ANOVA $p = 0,0081$ one-way ANOVA $p = 0,0017$ **B****C**one-way ANOVA $p = 0,0059$ **D****E****F**

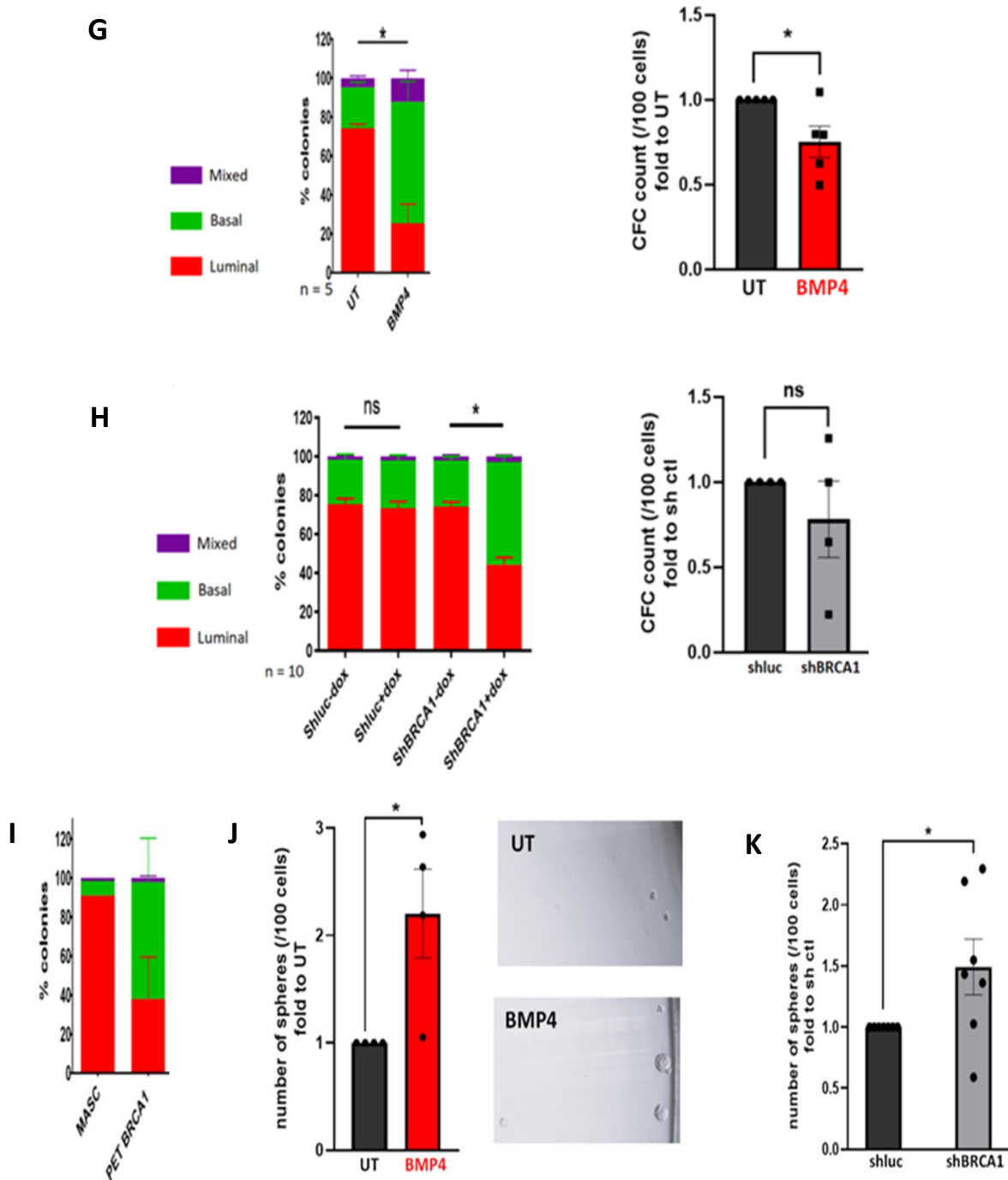
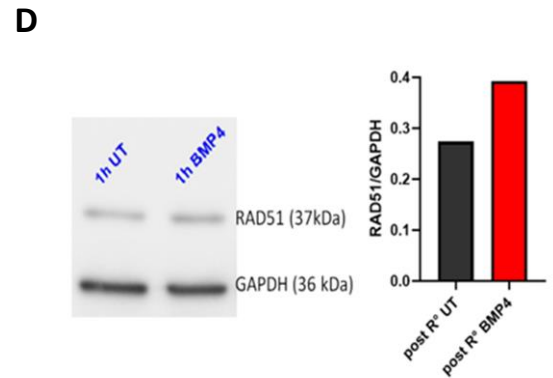
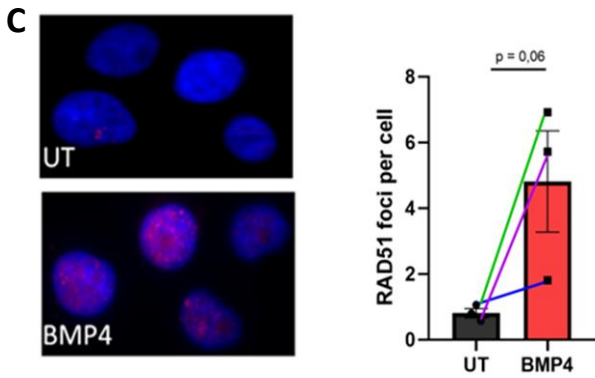
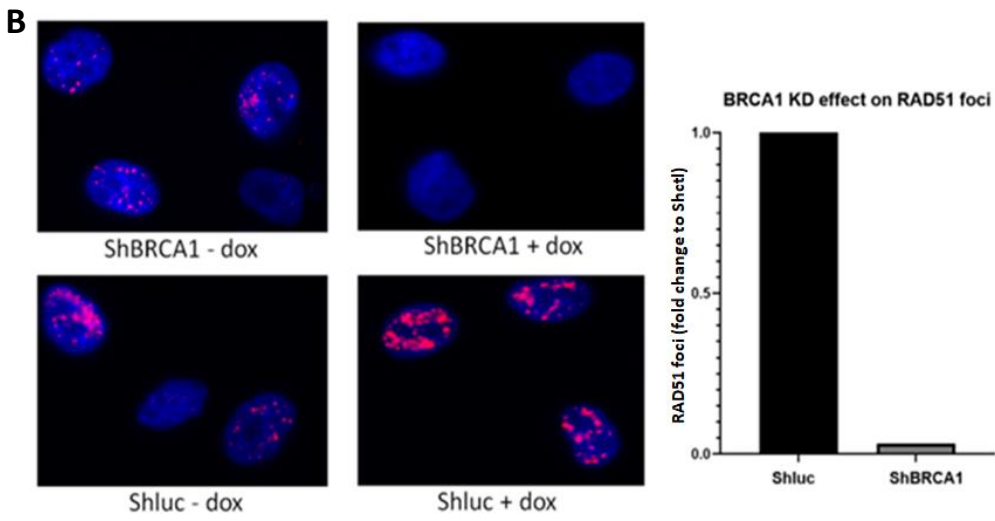
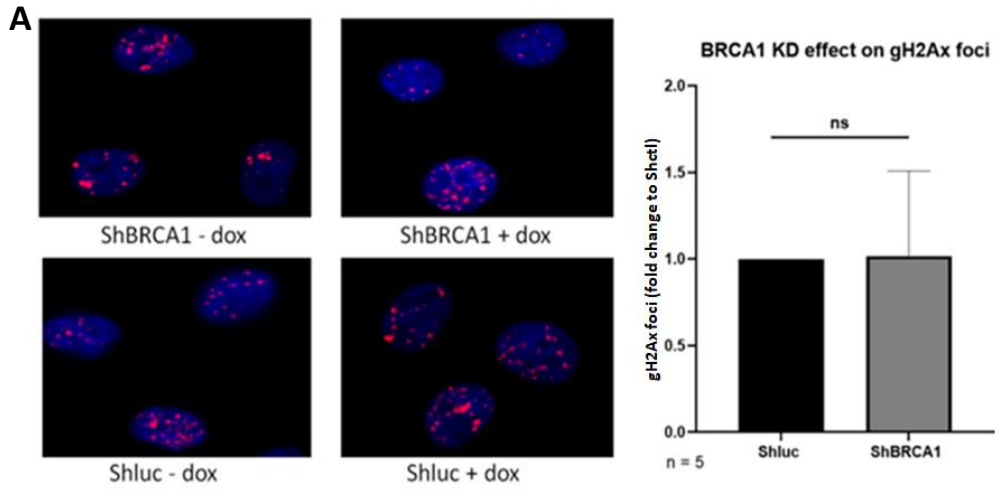


Figure 3 RT-qPCR analysis of BRCA1 primary transcript (left hand graph) and messenger RNA (right hand graph) expression in MCF10A cells exposed for 48 h to BMP4 (10 and 50 ng/ml) (A). RT-qPCR analysis of BRCA1 messenger RNA expression in MCF10A cells exposed for 24h to BMP4 (50 ng/ml) combined with different inhibitors of the BMP pathway. A = AG490 (JAK2-EGFR inhibitor, 25 μ mol/l), E = E6201 (BMPR1B-MEK inhibitor, 100 nmol/l), L = LDN-193189 (BMPR1A-SMAD1/5/8 inhibitor, 100 ng/ml), S = SCH772984 (ERK inhibitor, 1 μ mol/l). Inhibitors were introduced 2 h before BMP4 and maintained for 24 h (B). Western blot analysis of BRCA1 protein expression in response to 48 h exposure to BMP4 (20 ng/ml) +/- LDN-193189 (100 ng/ml) added 2 h before BMP4 and maintained for 48 h. The right-hand graph represents the quantification of the various Western blots (C). Construction of the doxycycline-inducible ShBRCA1 (D). RT-qPCR analysis of BRCA1 transcriptional expression after ShBRCA1 induction in the MCF10A cell line, compared with controls (E). Western blot analysis of BRCA1 protein expression after ShBRCA1 induction in the MCF10A cell line, compared with controls (F). Percentage (left hand graph) and total number (clonogenicity) (right hand graph) of colonies formed in the E-CFC assay carried out on MCF10A cells exposed or not to BMP4 (20 ng/ml) (G). Percentage (left hand graph) and total number (clonogenicity) (right hand graph) of colonies formed in the E-CFC assay after ShBRCA1 induction in the MCF10A line, compared with controls (H). Percentage (left hand graph) of colonies formed in the E-CFC assay in non transformed BRCA1 mutated tissue (PET BRCA1) compared with healthy unmutated control tissue (MASc) (I). Number of spheres formed in the mammosphere assay in MCF10A cells exposed or not to BMP4 (20 ng/ml) (J). Number of spheres formed in the mammosphere assay after ShBRCA1 induction in the MCF10A cell line, compared with controls (K). Error bars represent standard error to the mean. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.



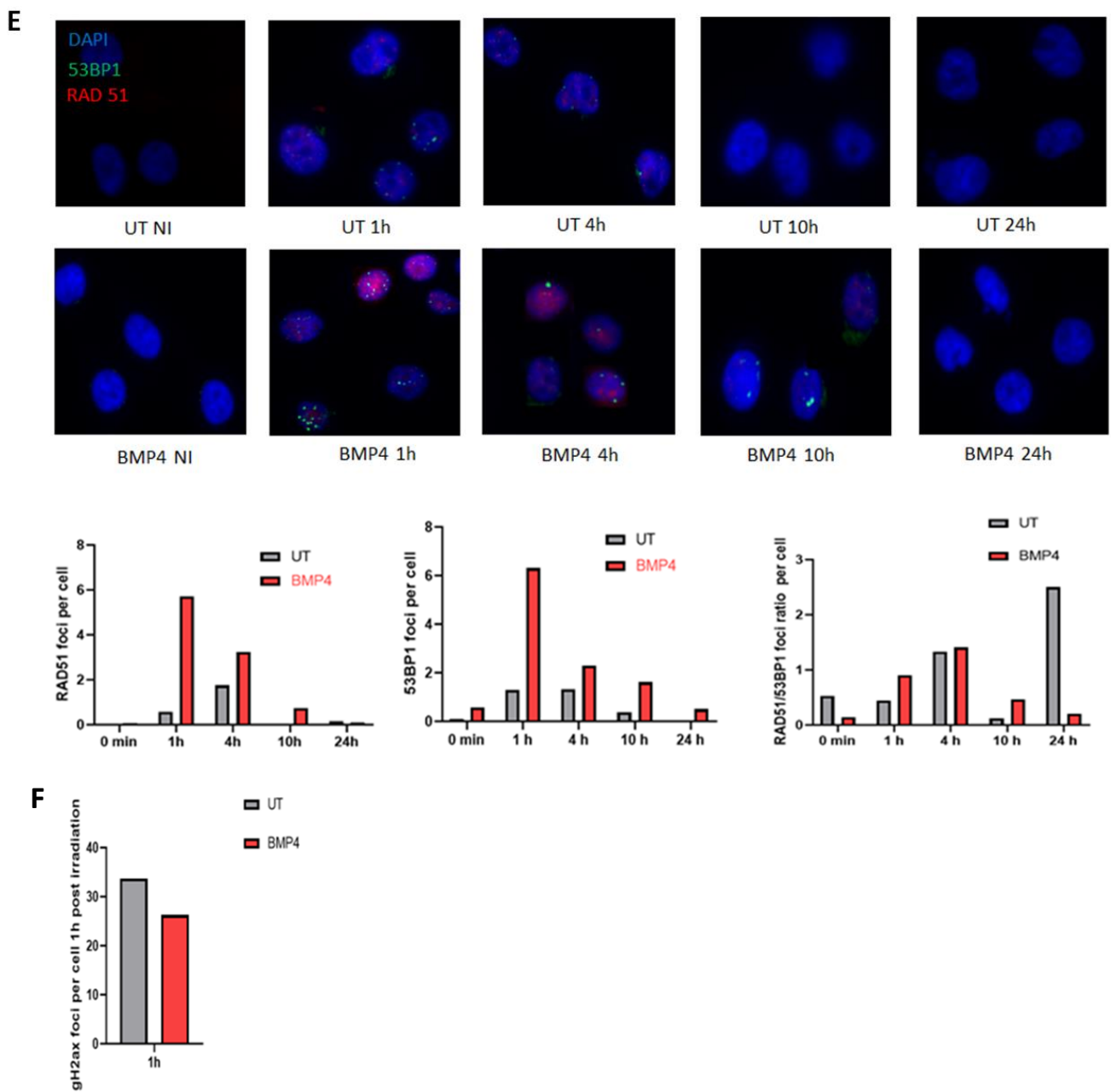


Figure 4 Immunofluorescence showing the number of YH2Ax foci formed 1 hour after a 2 Gy irradiation of MCF10A shBRCA1 and Shcontrol cells with or without doxycycline induction. The left hand picture is taken with a ZEISS epifluorescence microscope at x100 magnification. The right hand graph is a quantification of the γ H2Ax foci number per condition (A). Immunofluorescence showing the number of RAD51 foci formed 1 hour after a 2 Gy irradiation of MCF10A shBRCA1 and Shcontrol cells with or without doxycycline induction. The left hand picture is taken with a ZEISS epifluorescence microscope at x100 magnification. The right hand graph is a quantification of the γ H2Ax foci number per condition (B). Immunofluorescence showing the number of RAD51 foci formed 1 hour after a 2 Gy irradiation of MCF10A cells pre-exposed or not to BMP4 (20 ng/ml). The left hand picture is taken with a ZEISS epifluorescence microscope at x100 magnification. The right hand graph is a quantification of the YH2Ax foci number per condition (C). Wester blot analysis of RAD 51 protein expression 1 hour after a 2 Gy irradiation of MCF10A cells pre-exposed or not to BMP4 (20 ng/ml) (D). Immunofluorescence showing the number of RAD51 and 53BP1 foci formed 1 hour, 4 hours, 10 hours and 24 hours after a 2 Gy irradiation of MCF10A cells pre-exposed or not to BMP4 (20 ng/ml). The top pictures are taken with a ZEISS epifluorescence microscope at x100 magnification at different post-irradiation time points. The lower graphs represent the corresponding quantifications (E). Immunofluorescence showing the number of YH2Ax foci formed 1 hour after a 2 Gy irradiation of MCF10A cells exposed or not to BMP4 (20 ng/ml) (F). Error bars represent standard error to the mean.

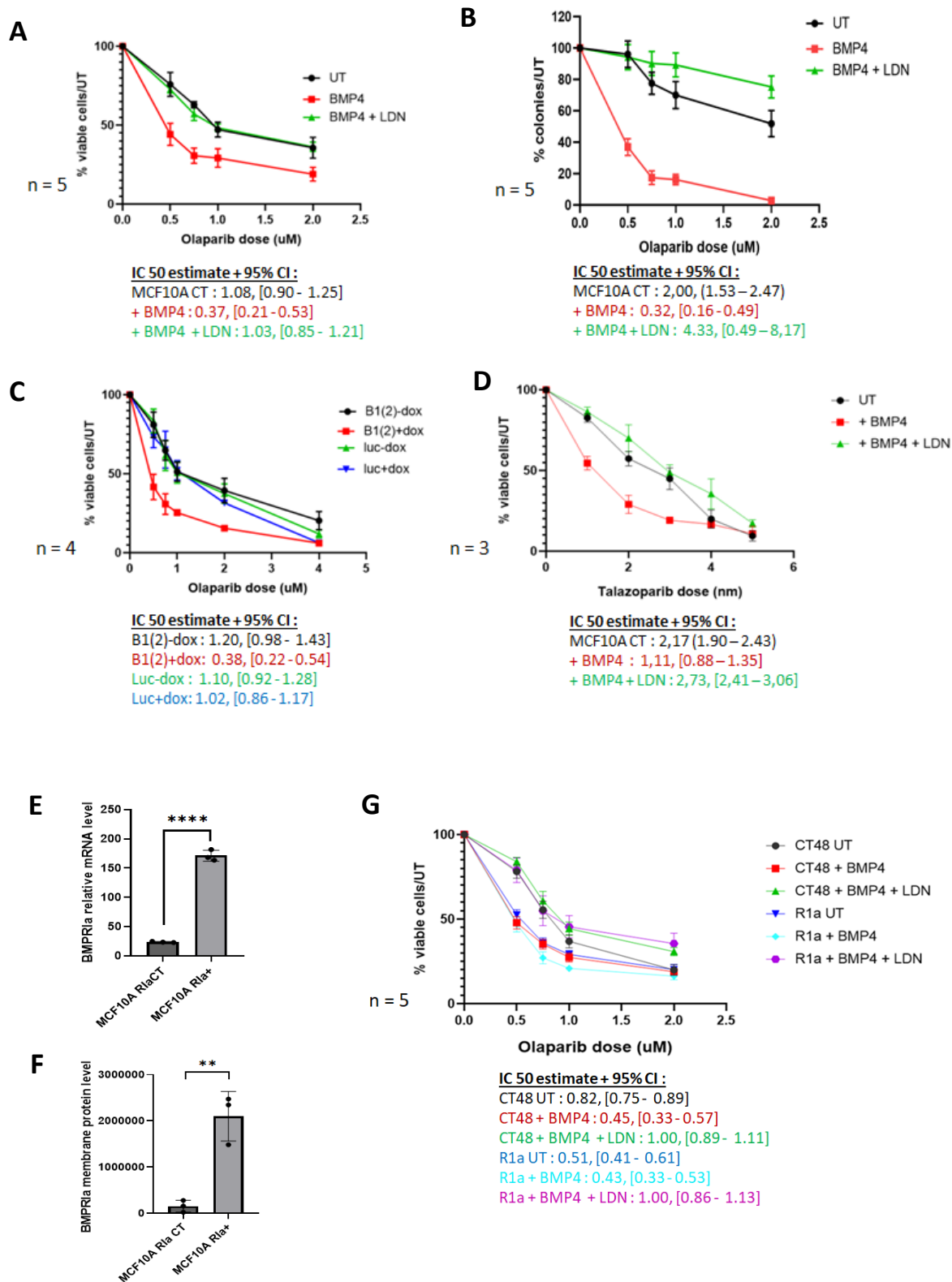
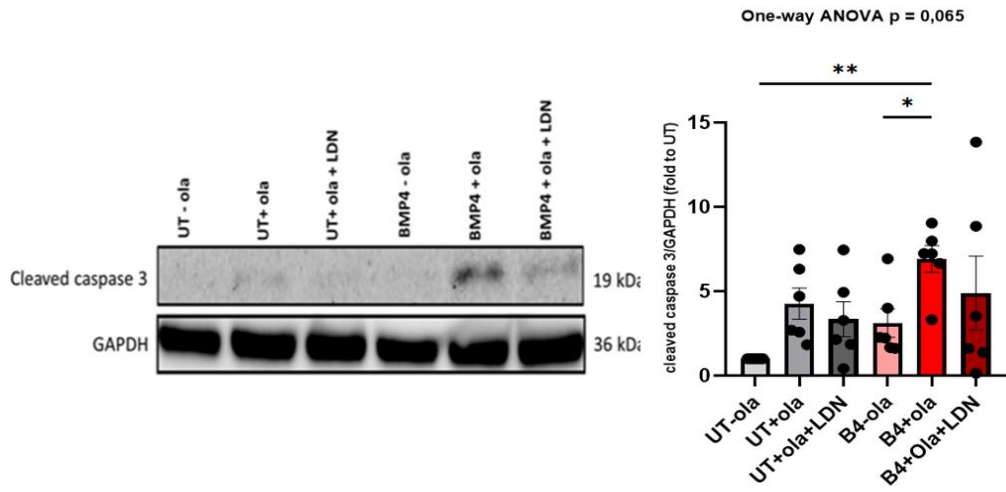
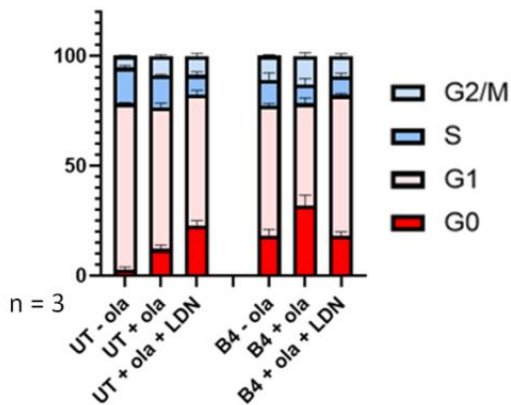
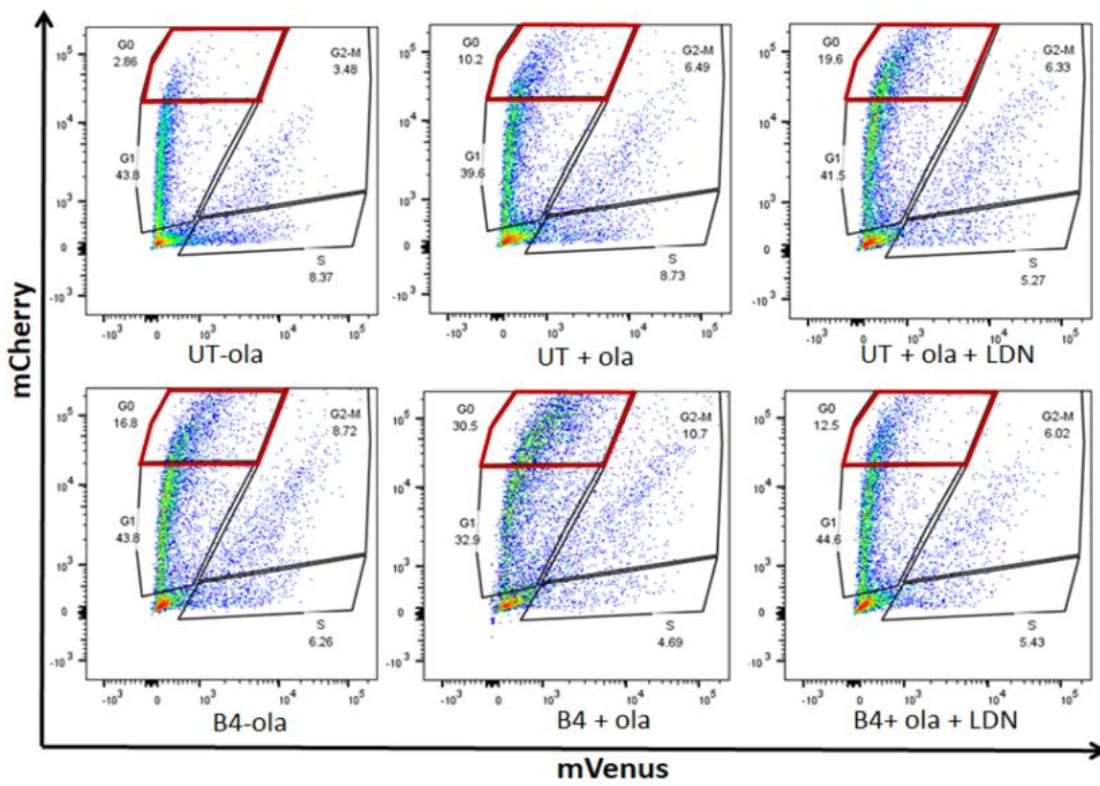


Figure 5 Proliferation assay of MCF10A cells exposed or not to BMP4 (20ng/ml) and LDN-193189 (100 ng/ml) and treated for 7 days with increasing doses of Olaparib (A). Clonogenic assay of MCF10A cells exposed or not to BMP4 (20ng/ml) and LDN-193189 (100 ng/ml) and treated for 7 days with increasing doses of Olaparib (B). Proliferation assay of MCF10A cells with and without induction of ShBRCA1 and Shcontrol (C). Proliferation assay of MCF10A cells exposed or not to BMP4 (20ng/ml) and LDN-193189 (100 ng/ml) and treated for 7 days with increasing doses of Talazoparib (D). Transcriptional expression of BMPR1A in the BMPR1A overexpressing cell line compared with the control cell line (E). Membrane protein expression of BMPR1A in the BMPR1A-overexpressing cell line compared with the control cell line (F). Proliferation assay of MCF10A cells, overexpressing or not BMPR1A, exposed or not to BMP4 (20ng/ml) and LDN-193189 (100 ng/ml) and treated for 7 days with increasing doses of Olaparib (G). Error bars represent standard error to the mean. IC50 estimates were generated using a 4-parameter Weibull model.

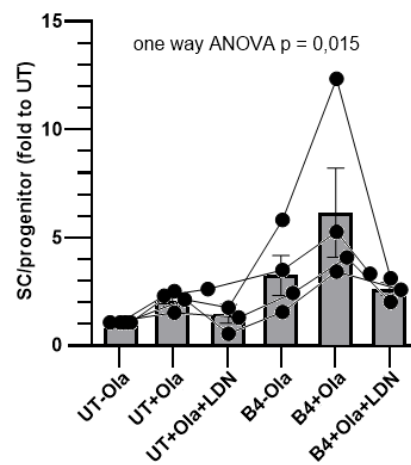
A



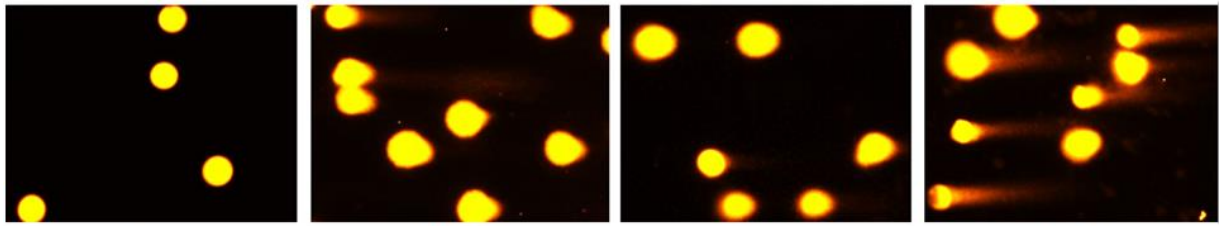
B



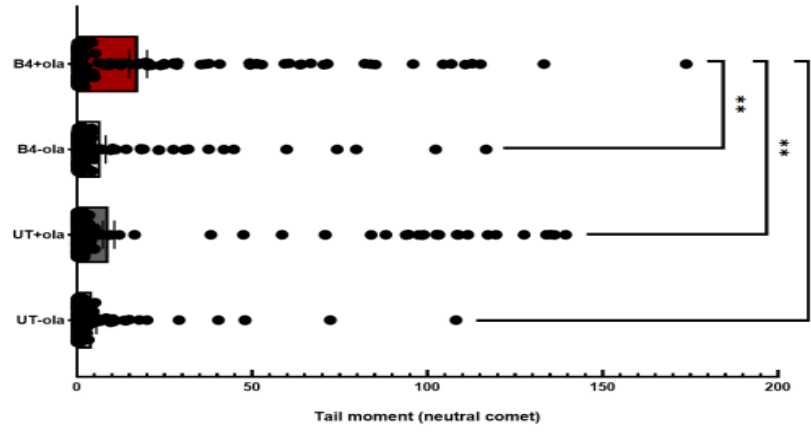
C



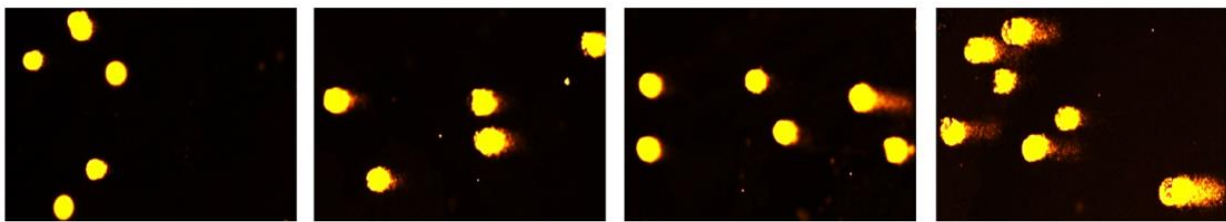
D



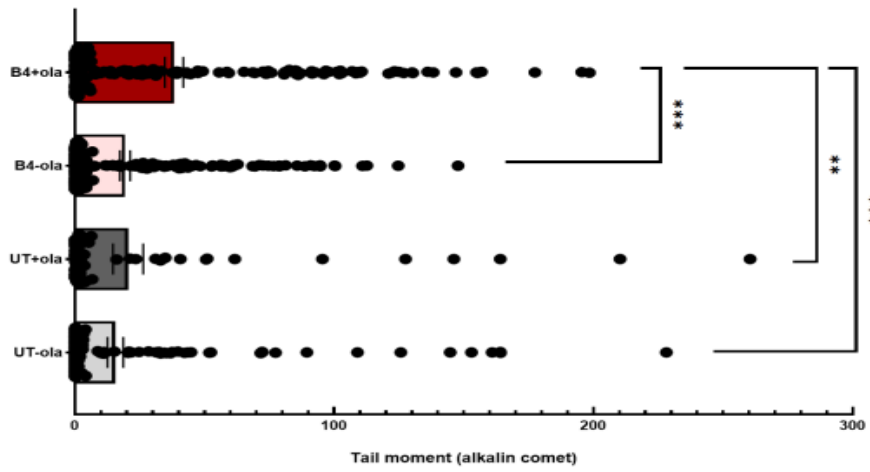
UT - ola UT + ola B4 - ola B4 + ola



E



UT - ola UT + ola B4 - ola B4 + ola



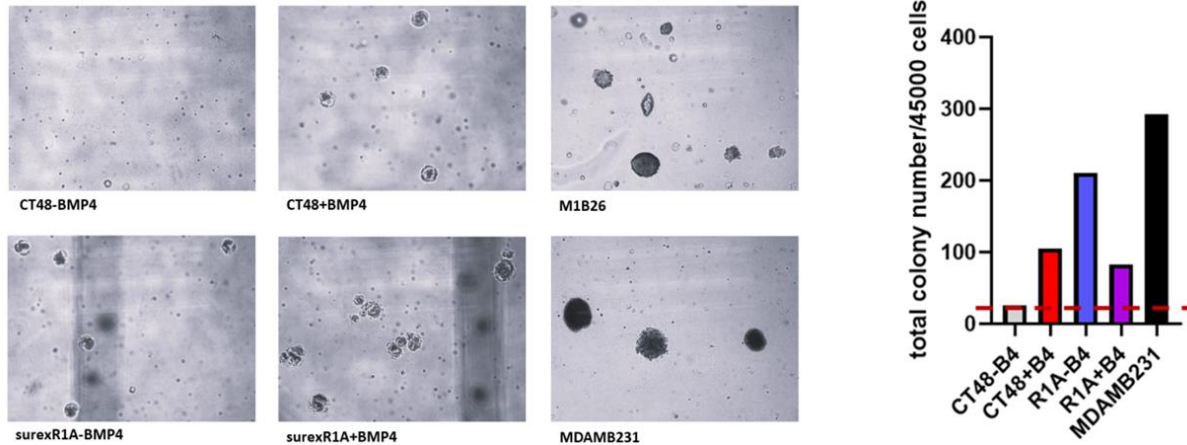
F

Figure 6 Apoptosis evaluation by Western blot analysis of cleaved caspase 3 protein expression in MCF10A cells exposed or not to BMP4 (20ng/ml) and LDN-193189 (100 ng/ml) and treated or not with Olaparib (0.75 μ M) for 7 days. GAPDH was used as a reporter protein. The right hand graph is a quantification of different Western blots (A). Analysis, based on the fucci system, of the distribution in the different phases of the cell cycle of MCF10A cells exposed or not to BMP4 (20ng/ml) and LDN-193189 (100 ng/ml) and treated or not with Olaparib (0.75 μ M) for 7 days. At bottom, quantification of the various FACS analyses performed (B). Ratio between the number of stem cells (estimated by the mammospheres assay) and the number of progenitors (estimated by the E-CFC assay) under each experimental condition (MCF10A cells exposed or not to BMP4 (20ng/ml) and LDN-193189 (100 ng/ml) and treated or not with Olaparib (0.75 μ M) for 7 days) (C). Neutral comet assay conducted on MCF10A cells exposed or not to BMP4 (20ng/ml) and persisting after 7 days of Olaparib (0.75 μ M) treatment, compared with the same untreated cells (D). Alkaline comet assay performed on MCF10A cells exposed or not to BMP4 (20ng/ml) and persisting after 7 days of Olaparib (0.75 μ M) treatment, compared with the same untreated cells (E). Number of colonies formed in a Soft Agar culture by MCF10A cells overexpressing or not BMPR1A and exposed or not to BMP4 for 20 weeks. M1B26 and MDA-MB-231 cell lines were used as positive controls (F). Error bars represent standard error to mean. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

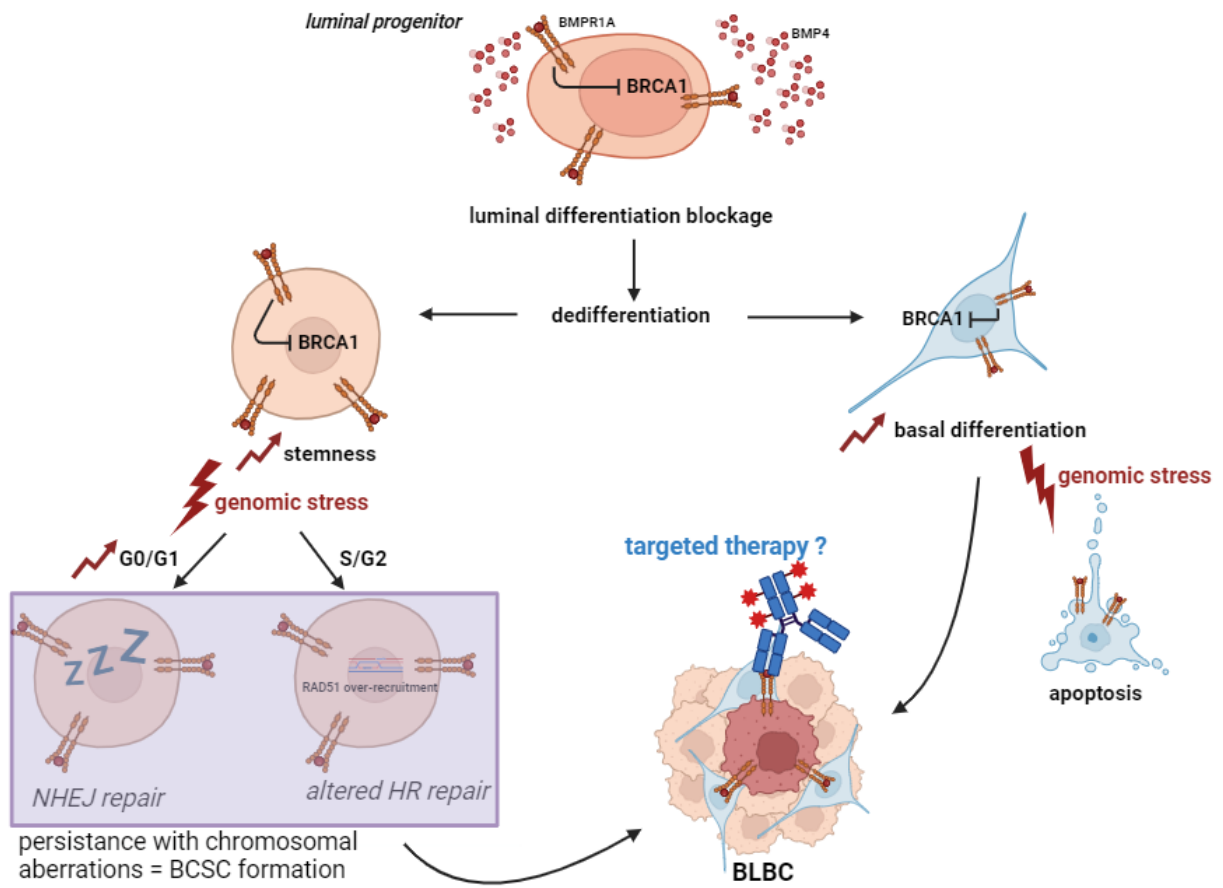
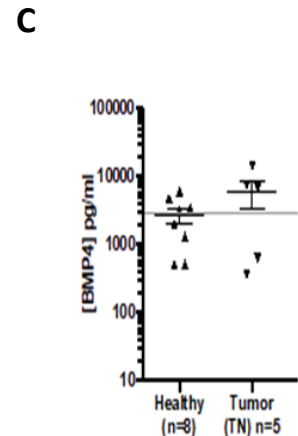
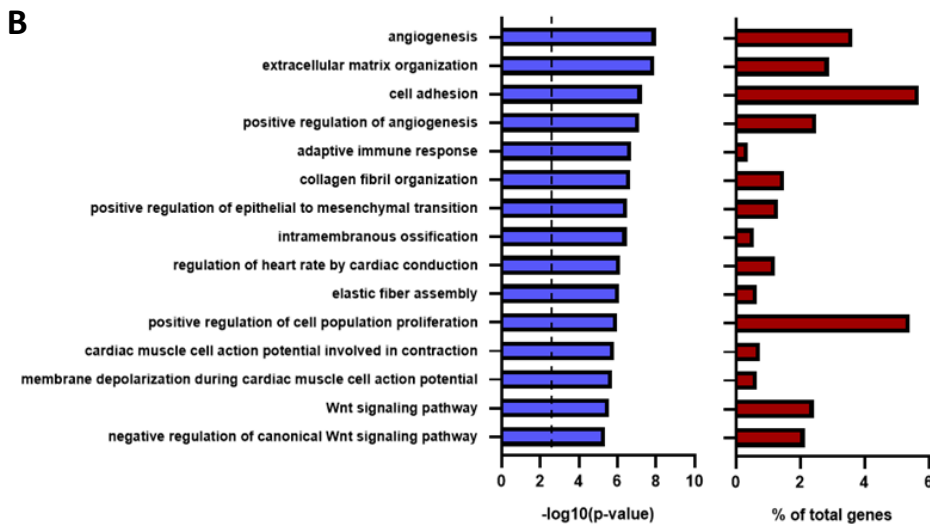
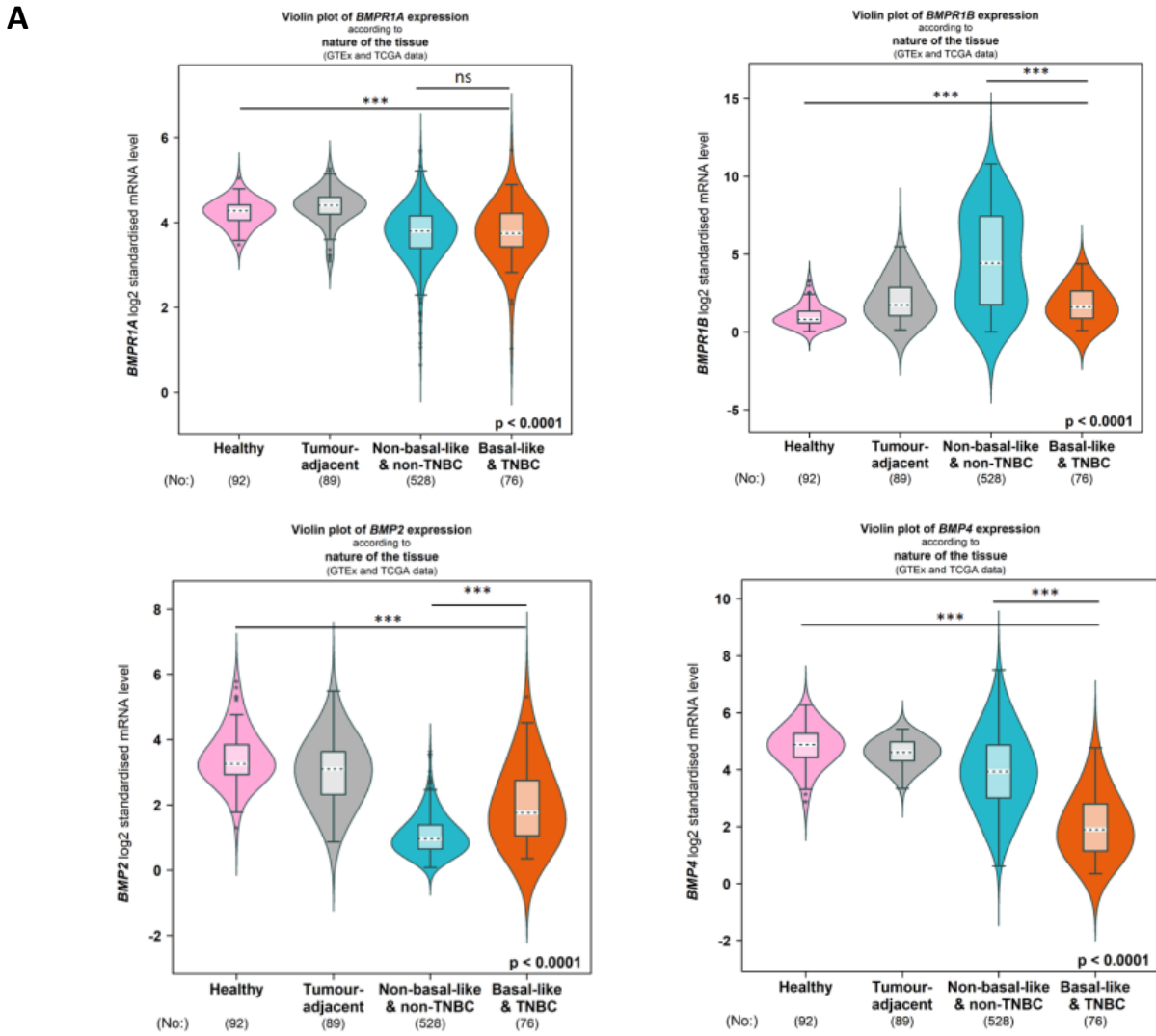
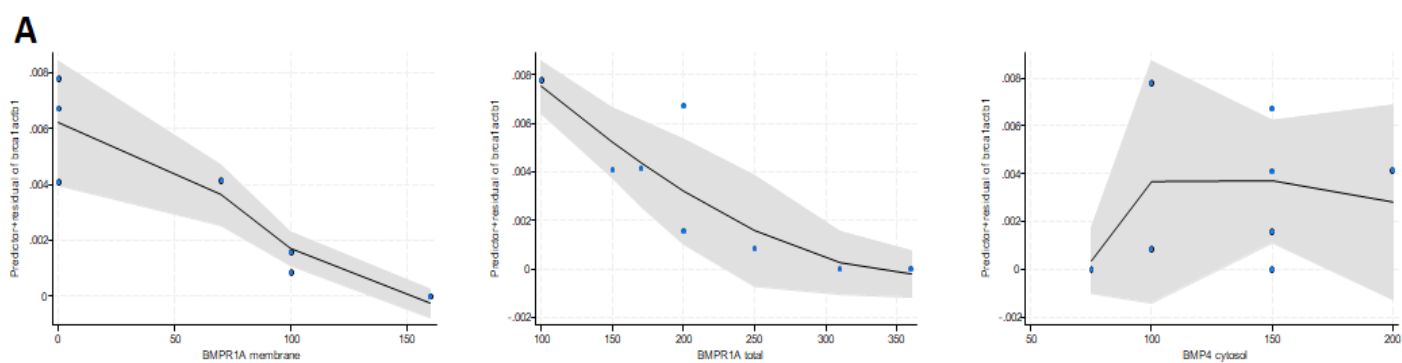


Figure 7 Functional consequences of the BMP4/BMPRI1A axis on stemness, differentiation, genetic stability and transforming potential of immature mammary cells.



Supp 1 BMPR1A, BMPR1B, BMP2 and BMP4 messenger RNA expression in basal-like breast cancers compared with non-basal-like breast cancers and healthy + peri-tumoral control tissues in the TCGA-Breast Cancer and GTEx cohorts (A). ELISA analysis of BMP4 expression in the supernatant of triple-negative breast cancers, compared with normal control tissue (B). Correlation analysis related to BMP4 transcriptional expression in the TCGA Breast Cancer cohort. Genes differentially expressed upon BMPR1A overexpression are classified into functional groups. The level of statistical significance is plotted on the left hand graph, and the number of differentially expressed genes associated with each functional group is plotted on the right hand graph (C).



B

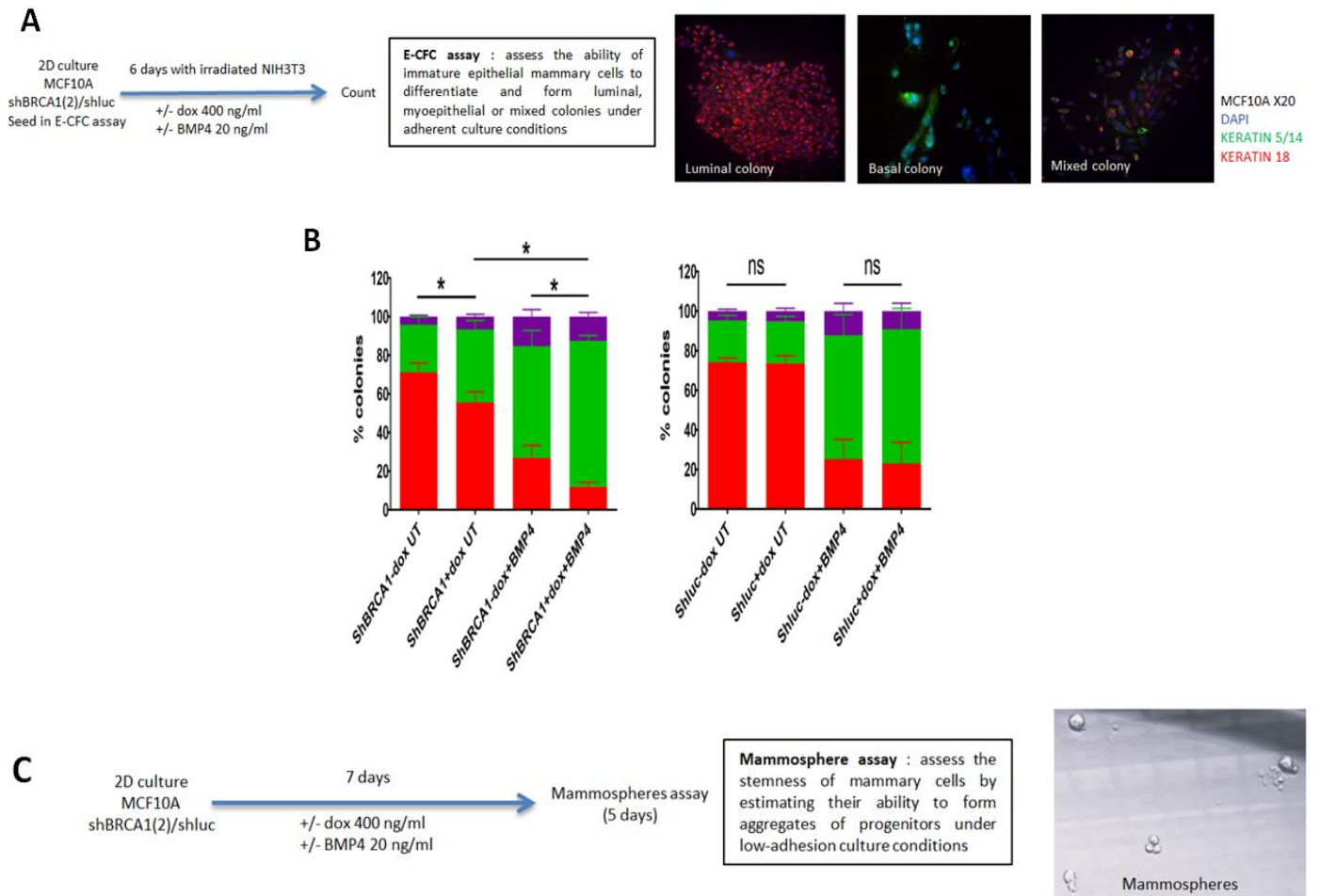
Rank	Analytical PMP	Model Size
1	.5121	1 BMPR1A membrane
2	.087	2 BMPR1A membrane + stage
3	.04538	0
4	.04496	2 BMPR1A membrane + CK14 positivity
5	.04001	2 BMPR1A membrane + age

C

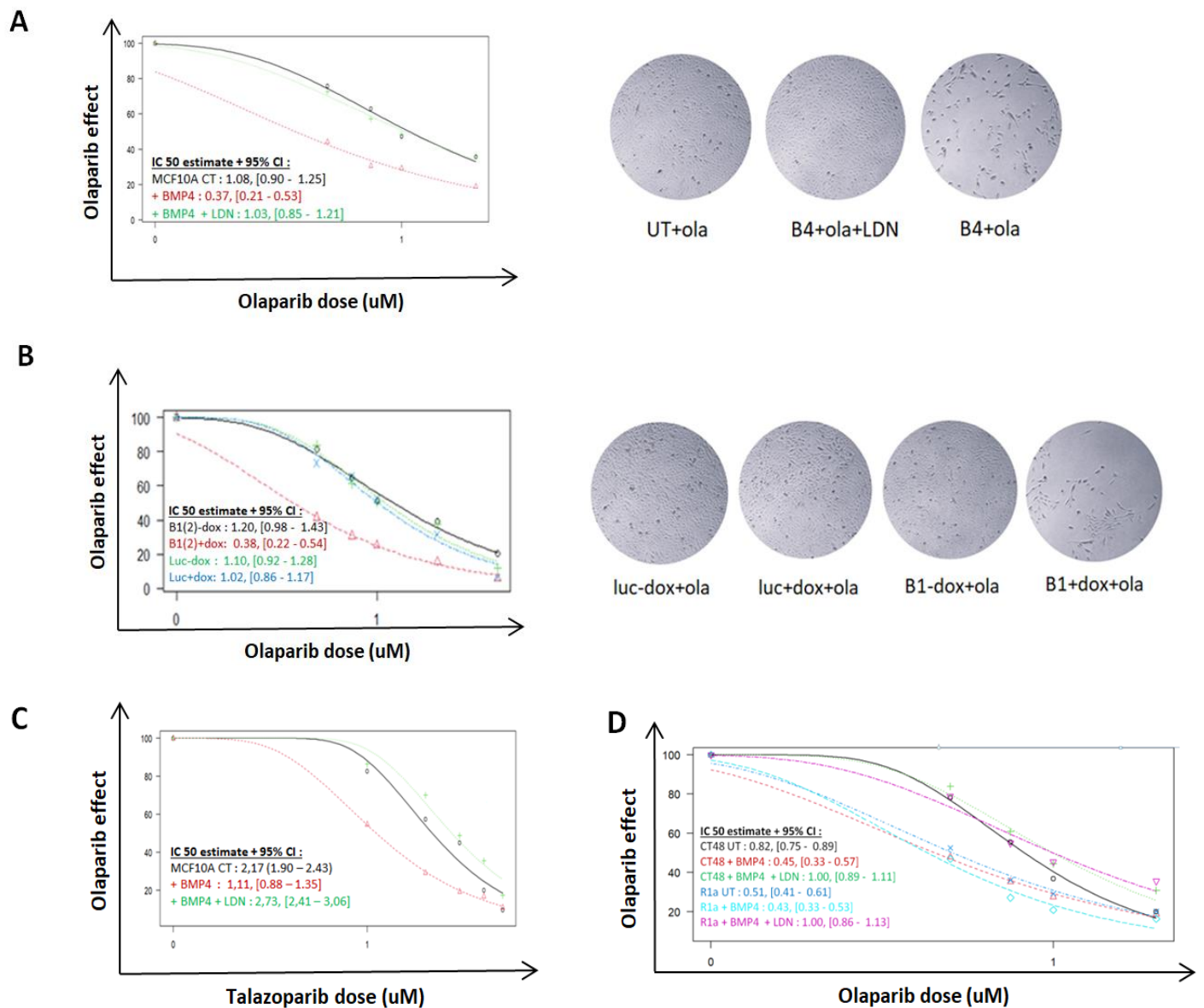
Model Comparison

Models	P(M)	P(M data)	BF _M	BF ₁₀	R ²
Null model	0.125	8.045×10^{-4}	0.006	1.000	0.000
BMPR1A membrane	0.125	0.497	6.913	617.579	0.844
BMPR1A membrane + age	0.125	0.231	2.100	286.802	0.853
BMPR1A membrane + BMP4 cytosol	0.125	0.183	1.568	227.415	0.844
BMPR1A membrane + age + BMP4 cytosol	0.125	0.088	0.674	109.145	0.854
BMP4 cytosol	0.125	3.485×10^{-4}	0.002	0.433	0.040
Age	0.125	3.084×10^{-4}	0.002	0.383	0.010
Age + BMP4 cytosol	0.125	1.413×10^{-4}	9.892×10^{-4}	0.176	0.063

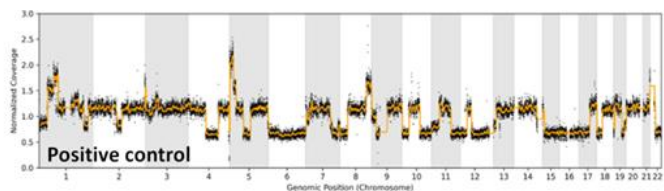
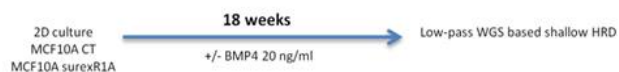
Supp 2 Non-linearity test using fractional polynomials exploring the relationship between BRCA1 transcriptional expression (rationalized on ACTB1 expression) and (from left to right) BMPR1A membrane expression, BMPR1A global expression, BMP4 cytosolic expression (A). Bayesian Model Averaging approach to identify the most plausible models given the data (B). Estimation of Bayes factors to quantify the evidence provided by the data in favor of one statistical model over another (C).



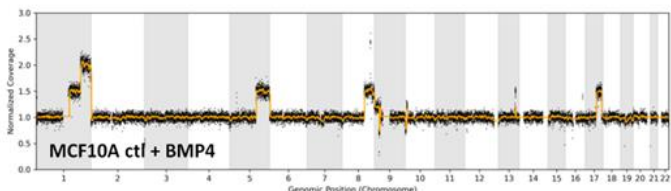
Supp 3 E-CFC assay design. The right picture is an immunofluorescence representation of luminal, basal (myoepithelial) and mixed colonies. Cytokeratin 18 was used as a marker of luminal differentiation and cytokeratin 5/14 as a marker of basal differentiation. Nuclei were marked with DAPI. Colonies were observed under a ZEISS epifluorescence microscope at x20 magnification (A). Percentage of colonies formed in the CFC assay after induction of ShBRCA1 and exposure to BMP4 (20 ng/ml) in the MCF10A cell line, compared with controls (B). Design of the mammosphere assay and example of sphere morphology that can be found in this assay with the MCF10A cell line (C).



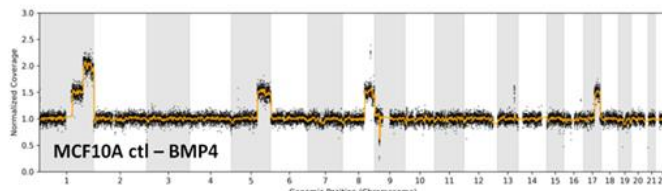
Supp 4 Weibull model assessing the dose-response relationship and IC50 associated with 7-day olaparib treatment of MCF10A cells exposed or not to BMP4 (20 ng/ml) and LDN-193189 (100 ng/ml). The effect here corresponds to proliferation, as can be seen in the pictures on the right (A). Weibull model assessing the dose-response relationship and IC50 associated with 7-day olaparib treatment under ShBRCA1/sh control induction in MCF10A cells. The effect here corresponds to proliferation, as can be seen in the pictures on the right (B). Weibull model assessing the dose-response relationship and IC50 associated with 7-day Talazoparib treatment of MCF10A cells exposed or not to BMP4 (20 ng/ml) and LDN-193189 (100 ng/ml). The effect here corresponds to proliferation (C). Weibull model assessing the dose-response and IC50 associated with 7-day olaparib treatment of MCF10A cells overexpressing or not BMPR1A and exposed or not to BMP4 (20 ng/ml) and LDN-193189 (100 ng/ml). The effect here corresponds to proliferation (D).



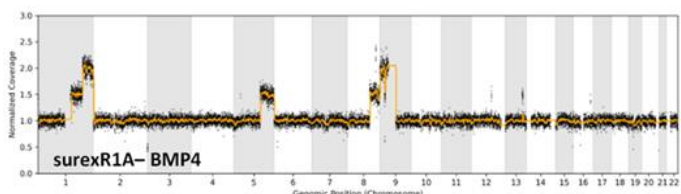
Normalized WGS coverage profile (black) and smoothed normalized WGS coverage profile (orange).
White and gray shading denotes chromosome boundaries. QA status: High, GI index: 11.3, GI status: Positive



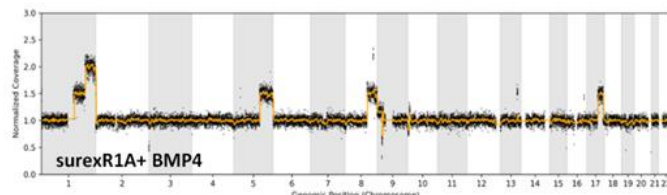
Normalized WGS coverage profile (black) and smoothed normalized WGS coverage profile (orange).
White and gray shading denotes chromosome boundaries. QA status: High, GI index: -15.1, GI status: Negative



Normalized WGS coverage profile (black) and smoothed normalized WGS coverage profile (orange).
White and gray shading denotes chromosome boundaries. QA status: High, GI index: -14.2, GI status: Negative



Normalized WGS coverage profile (black) and smoothed normalized WGS coverage profile (orange).
White and gray shading denotes chromosome boundaries. QA status: High, GI index: -14.9, GI status: Negative



Normalized WGS coverage profile (black) and smoothed normalized WGS coverage profile (orange).
White and gray shading denotes chromosome boundaries. QA status: High, GI index: -14.5, GI status: Negative

Supp 5 Shallow-HRD assay performed on MCF10A cells overexpressing or not BMPR1A and exposed or not to BMP4 (20 ng/ml) for 18 weeks. Positive control corresponds to BRCA1-mutated triple-negative breast carcinoma.

CHAPITRE 3 : Discussion

Dérégulation de la voie BMP dans les cancers basal-like

Les récepteurs BMPR1A/BMPR1B

Les analyses *in silico* rapportées dans ce manuscrit suggèrent une inversion du signal médié par les récepteurs aux BMP de type I dans les cancers basal-like comparativement aux carcinomes mammaires de sous-type luminal. Ainsi, d'un point de vue transcriptionnel, le rapport BMPR1A/BMPR1B semble positif dans les cancers basal-like et négatif dans les cancers de type luminal. Dans les différentes cohortes analysées, cette inversion du rapport BMPR1A/BMPR1B semble essentiellement liée aux variations d'expression de BMPR1B. En effet le niveau d'expression de BMPR1A paraît finalement relativement stable entre les différents sous-types moléculaires de cancers du sein. A l'inverse, l'expression de BMPR1B semble d'une part significativement augmentée dans les tumeurs lumineuses et diminuée dans les tumeurs basal-like. Dans un travail antérieur, notre équipe avait d'ailleurs montré des données similaires sur une cohorte locale avec une expression transcriptionnelle de BMPR1B significativement augmentée dans les tumeurs lumineuses comparativement aux tumeurs basales et une tendance à la surexpression de BMPR1A dans les tumeurs basales, non significative cependant ($p = 0,056$) (Chapellier et al., 2015). Une surexpression en IHC de BMPR1B par le contingent épithélial des tumeurs lumineuses avait également été décrite dans cette même étude. Par ailleurs, l'étude de Balboni a retrouvé en IHC une surexpression de BMPR1A dans un échantillon de tumeurs dites « basal-like » comparativement à des tissus contrôles sains et des tumeurs non basal-like (Balboni et al., 2013) (Figure 35). Cependant, le phénotype basal-like était déterminé dans cette étude selon le statut triple négatif des tumeurs. Or nous avons vu précédemment en introduction que les phénotypes basal-like et triple-négatif ne sont pas synonymes.

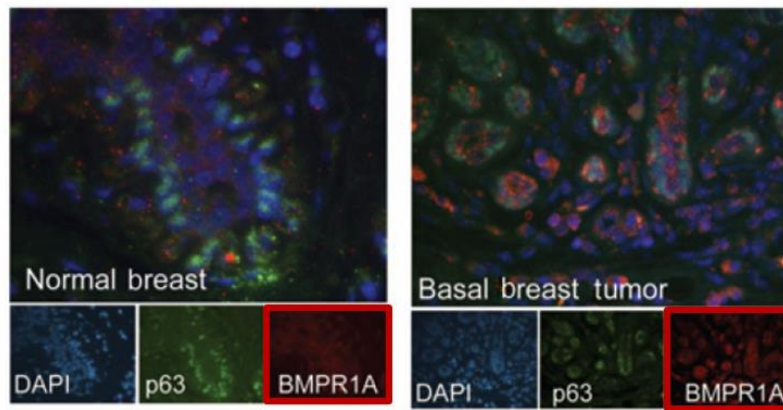


Figure 35. Expression immunohistochimique de BMPR1A dans une tumeur basal-like (triple-négative) comparativement à une glande mammaire non tumorale. D'après Balboni 2013.

Nous avons donc jugé pertinent d'analyser le niveau d'expression protéique de BMPR1A dans des tumeurs déterminées comme basal-like non seulement sur leur statut triple-négatif mais également sur l'expression positive de la CK14 qui a démontré dans plusieurs travaux son intérêt en termes de spécificité (Botti et al., 2019; Sousa et al., 2010; Thike et al., 2010). Dans notre travail, 62,5% des tumeurs triple-négatives et 50% des tumeurs considérées comme basal-like présentaient une expression membranaire diffuse et/ou intense de BMPR1A et 100% des cas en présentaient une expression cytosolique diffuse. Malheureusement, ces niveaux d'expression élevés de BMPR1A n'ont pas pu être comparés à des tissus contrôles non tumoraux ou à d'autres sous-types moléculaires du fait de la structure des échantillons sélectionnés sur un TMA pré-établi. Quoi qu'il en soit, à ce stade, bien que nos travaux évoquent un niveau d'expression protéique élevé et un rôle pour BMPR1A dans la tumorigenèse des cancers du sein basal-like, les données *in silico* d'expression du récepteur dans ces tumeurs comparativement aux tissus sains suggèrent qu'il ne peut pas être proposé comme biomarqueur diagnostique de cancer du sein basal-like ni comme cible de traitements innovants de type anticorps bispécifiques ou anticorps conjugués. D'autres biomarqueurs avec un niveau d'expression plus spécifique de la tumeur comparativement aux tissus sains doivent donc être recherchés dans ce but.

Par contre, BMPR1A semble être un biomarqueur pronostique intéressant puisque sa surexpression transcriptionnelle est statistiquement corrélée à une moindre survie globale spécifiquement dans la population basal-like. En effet, cette corrélation n'est pas établie s'agissant des autres sous-types moléculaires (Figure 36A). Réciproquement, dans les

cancers basal-like, la répression transcriptionnelle de BMPR1B a également montré une tendance, néanmoins non significative, à une survie globale plus défavorable (Figure 36B). Ceci conforte le caractère antagoniste de ces récepteurs en ce qui concerne les données de survie et amène à envisager l'impact pronostique de la signalisation BMP selon un ratio BMPR1A/BMPR1B.

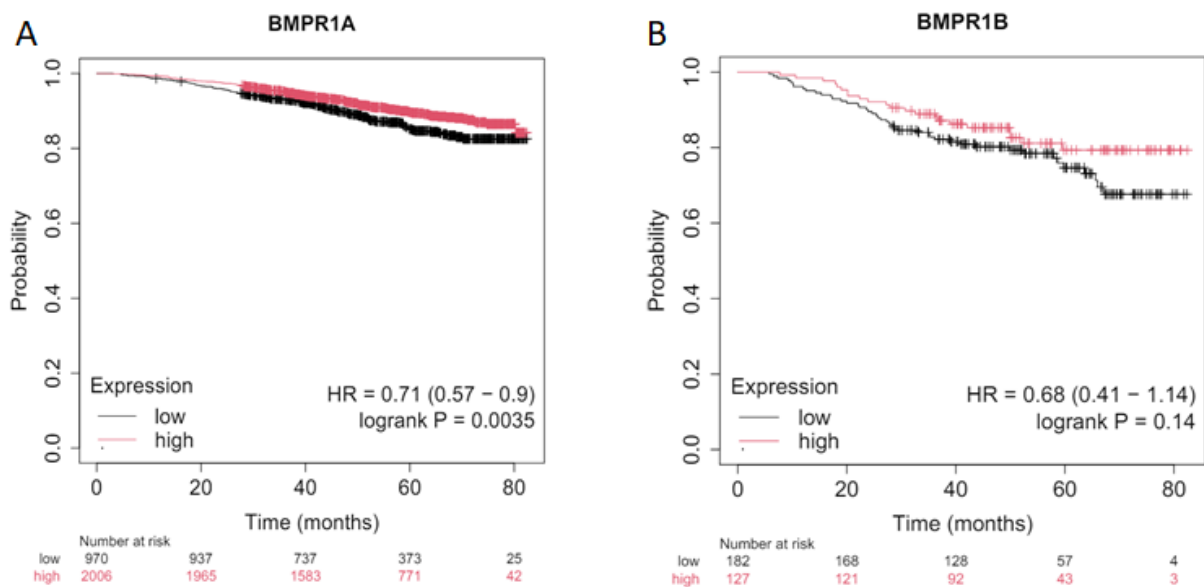


Figure 36. Survie globale selon le niveau d'expression transcriptionnelle de BMPR1A, tous sous-types moléculaires de cancer du sein confondus (A). Survie globale selon le niveau d'expression de BMPR1B spécifiquement dans les cancers du sein définis comme basal-like selon la classification PAM50 (B). D'après l'outil en ligne Kmploster.

Les ligands BMP2/BMP4

Dans le modèle des cancers du sein de sous-type luminal, notre équipe a mis en évidence en IHC et par une analyse ELISA du surnageant des tumeurs une surproduction du ligand BMP2 par les cellules du micro-environnement tumoral (notamment les cellules endothéliales et stromales) comparativement aux tissus sains et aux tumeurs basales, aboutissant à une répression de la synthèse du ligand par l'épithélium tumoral selon une boucle de rétro-contrôle négatif. L'interprétation des analyses in silico d'expression des ligands est difficile car elle concerne le bulk tumoral dans son ensemble, sans discrimination de la contribution respective de l'épithélium et du micro-environnement tumoral. Néanmoins, la diminution de l'expression de BMP2 dans les tumeurs lumorales comparativement aux tumeurs basales et aux tissus sains pourrait s'expliquer par ces phénomènes de rétro-contrôle négatif en réponse à une exposition paracrine à BMP2. De manière intéressante, le phénomène inverse

est retrouvé avec BMP4 avec une répression au sein des tumeurs basales comparativement aux tumeurs luminales et aux tissus normaux, suggérant ainsi une surproduction du ligand par le micro-environnement des tumeurs basal-like. En faveur de cette hypothèse, on retrouve une tendance (néanmoins non significative) à la surexpression de BMP4 dans le surnageant de tumeurs triple-négatives comparativement à des tissus sains contrôles. Cependant, le faible nombre et le caractère triple-négatif (et non strictement basal-like) des échantillons testés réduit la portée de ces résultats préliminaires. De manière surprenante, dans nos analyses en IHC de l'expression de BMP4, 100% des tumeurs triple-négatives et basal-like (sur l'expression additionnelle de la CK14) présentaient, s'agissant de leur contingent épithélial, une expression cytosolique diffuse et/ou intense de BMP4. Ces résultats sont différents de ceux obtenus *in silico*, ayant étudié l'expression transcriptionnelle du ligand. Ils suggèrent que, dans certains cas de cancers basal-like, l'épithélium tumoral lui-même, en plus de son micro-environnement, peut synthétiser BMP4 dans des proportions relativement importantes. Néanmoins le nombre modeste de cas étudiés dans notre étude nous incite à élargir la cohorte afin de discriminer de manière plus précise la contribution du micro-environnement et de l'épithélium tumoral dans l'expression du ligand.

Dérégulation de la voie BMP dans les tissus sains mutés pour BRCA1

Le choix des tissus sains mutés pour BRCA1 comme modèle de prédisposition aux cancers basal-like (Figures 1E et 1F de l'article original) repose sur la fréquence du phénotype basal-like parmi les cancers du sein développés dans ce contexte mutationnel. De manière intéressante, dans ces tissus, le rapport d'expression transcriptionnelle BMPR1A/BMPR1B et le niveau d'expression de BMP4 sont similaires à ce qui a été observé dans les cancers basal-like, suggérant que ces dérégulations de la voie BMP sont un événement précoce dans la tumorigenèse de ces cancers du sein éventuellement en coopération avec l'haplo-insuffisance préexistante pour BRCA1. Cette hypothèse nous a conduits à tester l'impact de l'axe BMPR1A/BMP4 sur l'expression de BRCA1. Néanmoins, d'autres lésions de prédisposition auraient pu être utilisées, par exemple des cancers du sein basal-like *in situ* comme décrit par plusieurs équipes (Bryan et al., 2006; Livasy et al., 2006b). L'accès à de tels échantillons est néanmoins plus difficile.

Répression de BRCA1 par BMP4

Dans ce travail, l'exposition des cellules MCF10A à BMP4 induit une baisse significative de l'expression transcriptionnelle et protéique de BRCA1 (de plus de 50%) mimant à minima un phénomène d'haplo-insuffisance. Cette répression semble être médiée par le récepteur BMPR1A et la voie canonique des SMAD si l'on se réfère à la réversion de cet effet médiée par l'ajout de LDN-193189. En effet le LDN-193189 a été décrit comme inhibiteur de BMPR1A et des SMAD1/5/8. Néanmoins, comme démontré par Santivale et al., il est également capable de réprimer l'activité kinase d'autres récepteurs de la voie BMP notamment ALK1 et ALK 2 (Sanvitale et al., 2013) (**Figure 37A**). Malgré tout dans cette étude, l'IC₅₀ associé à BMPR1A (5,3 nM) est environ 3 fois moindre que celui associé à BMPR1B (16,7nM) soulignant la meilleure spécificité du LDN193189 pour BMPR1A (**Figure 37B**). Cependant, à la concentration utilisée (100ng/ml soit 246 nM), il est possible que les 2 récepteurs soient inhibés de manière équivalente, bien que des variations entre lignées cellulaires soient envisageables.

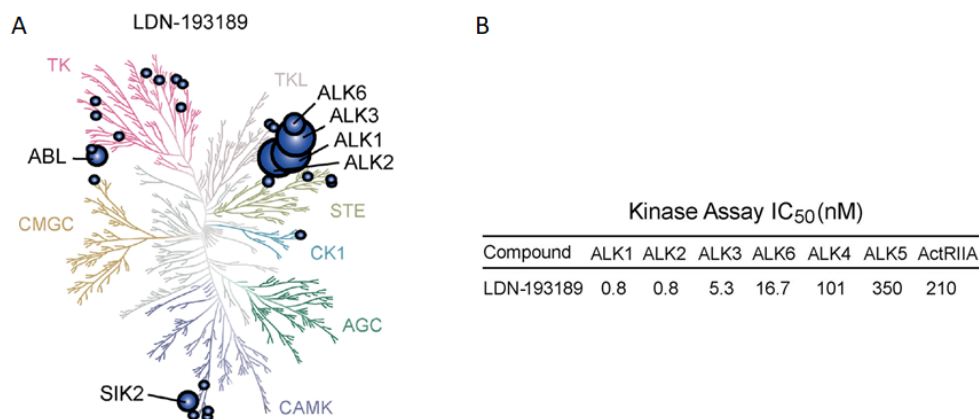


Figure37. Kinome du LDN-193189 (A). IC₅₀ associé au LDN-193189 déterminé par kinase Assay (B). D'après Santivale 2013.

Par ailleurs, l'E6201 est également un inhibiteur de la voie BMP ayant montré dans l'étude de Fortin et al. une capacité d'inhibition de BMPR1B largement supérieure à celle de BMPR1A (IC₅₀ à 0,45 et 36 nM respectivement). Contrairement au LDN-193189, l'utilisation de cet inhibiteur ne permet pas de restaurer l'expression de BRCA1 suite à une exposition à

BMP4 dans notre modèle cellulaire. Ceci conforte de manière indirecte l'hypothèse selon laquelle BMPR1A est le récepteur impliqué dans la répression transcriptionnelle de BRCA1 en réponse à BMP4.

Par ailleurs, le LDN-193189 a également été décrit comme un inhibiteur robuste de SMAD1/5/8 (**Figure 38**) comme rapporté par Santivale et al. et Boergermann et al. (Boergermann et al., 2010; Santivale et al., 2013). Il inhibe également certaines protéines impliquées dans les voies non canoniques telles que p38 et AKT, avec toutefois des capacités inhibitrices de bien moindre importance (Boergermann et al., 2010). D'autre part, nous avons démontré que les inhibiteurs de la voie non canonique SCH772984 (inhibiteur d'ERK), E6201 (inhibiteur de MEK), SB203580 (inhibiteur de p38 et AKT) sont inefficaces dans la restauration de l'expression de BRCA1 réprimée par BMP4. Ces éléments suggèrent une implication de la voie canonique dans cet effet répressif.

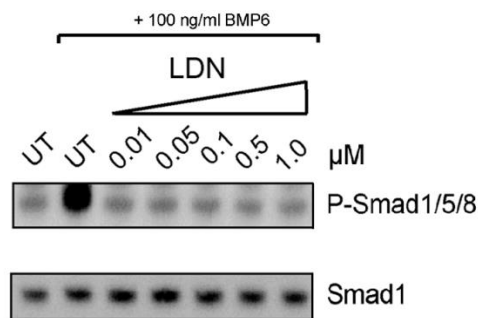


Figure 38. Western Blot illustrant l'effet inhibiteur du LDN-193189 sur la phosphorylation des Smad1/5/8 en réponse à BMP6 dans la lignée cellulaire C2C12. D'après Santivale 2013.

Au-delà de la voie canonique, les effecteurs impliqués dans la répression de BRCA1 sont inconnus. Comme nous l'avons vu en introduction, ID4 est un gène cible de la voie BMP dont le produit protéique est un régulateur négatif de l'expression de BRCA1. Néanmoins, à ce stade nous n'avons pas réussi à démontrer que la signalisation BMP4 induit l'expression d'ID4 dans le modèle MCF10A. Par contre nos données confirment bien l'induction de l'expression des autres membres de la famille ID (notamment ID1 et ID3) en réponse à BMP4 dans ce même modèle (**Figure 39**) même si leur rôle dans la régulation de BRCA1 n'a jamais été explicitement décrit (Candia et al., 2004). En revanche leur implication dans la biologie

de cancers du sein basal-like/triple-négatifs a été suggérée par plusieurs études. Ainsi, Yasmeen et al. ont démontré *in vitro* une corrélation inverse entre l'expression de BRCA1 et ID1 dans la lignée cellulaire BB2 (Yasmeen et al., 2008). *In vivo*, Garcia Escolano et al. ont montré qu'ID1 (en plus d'ID4) est régulièrement surexprimé dans les cancers du sein triple-négatifs/basal-like et associé à des caractéristiques clinico-pathologiques défavorables et à un mauvais pronostic en termes de survie sans rechute et survie globale (Garcia-Escolano et al., 2021). Teo et al., Shin et al., Kim et al. et Thankomony et al. ont démontré *in vitro* et *in vivo* l'implication d'ID1 et ID3 dans la formation et le maintien des cellules souches cancéreuses mammaires dans les cancers du sein triple-négatifs, de manière essentiellement dépendante de c-Myc (M. Kim et al., 2022; Shin et al., 2015; Teo et al., 2020; Thankamony et al., 2020). Enfin, Shao et al. (2014) ont montré que la surexpression d'ID2 dans les cancers du sein triple-négatifs est corrélé aux capacités de migration des cellules épithéliales mammaires et à un pronostic défavorable en termes de survie sans récurrence (Shao et al., 2014).

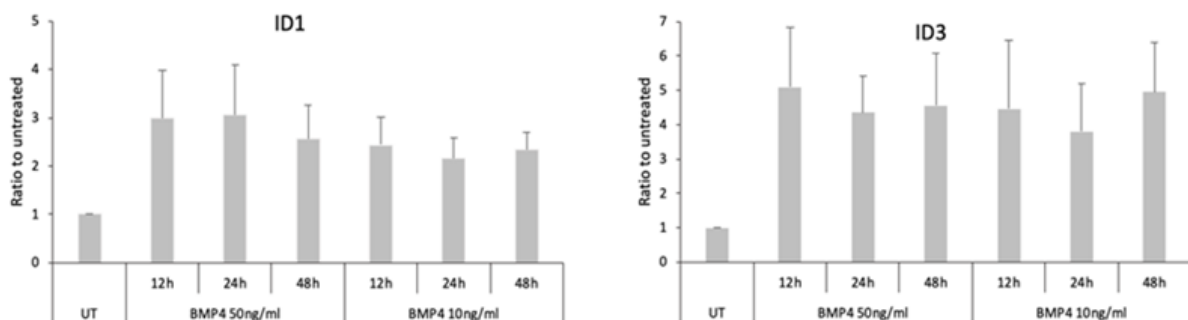


Figure 39. Analyse par RT-qPCR de l'expression transcriptionnelle d'ID1 et ID3 par les cellules MCF10A en réponse à une exposition à BMP4 (10 et 50 ng/ml pendant 12, 24 et 48h). Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type à la moyenne. n = 3.

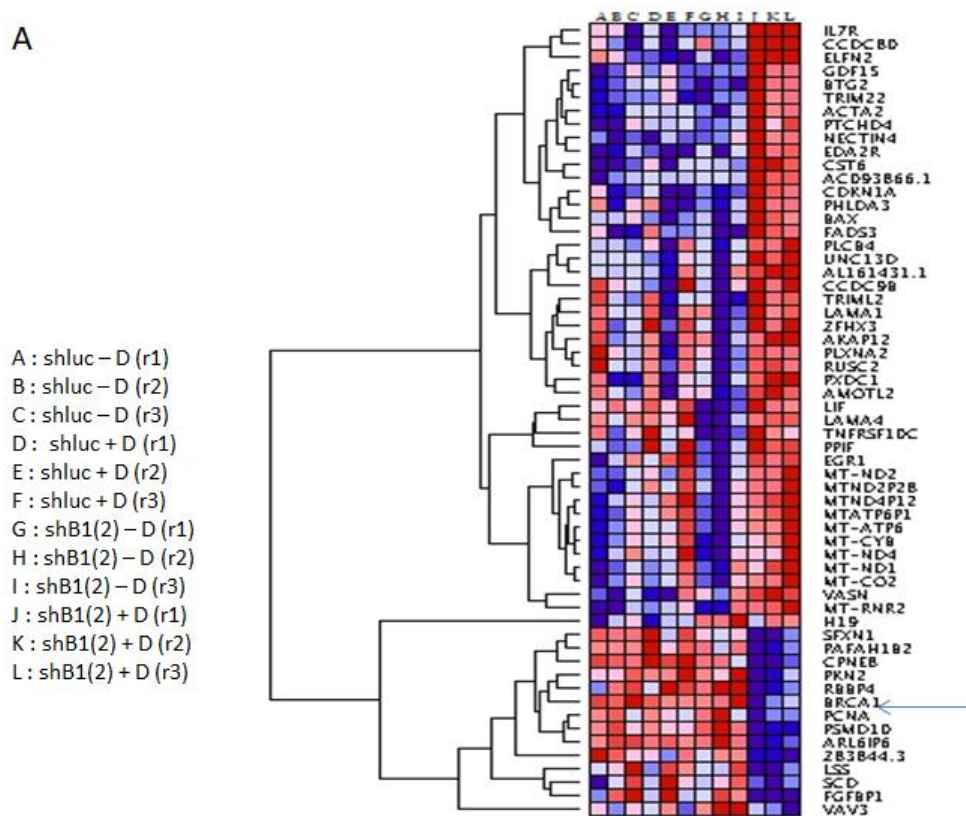
Conséquences fonctionnelles de la répression de BRCA1 par BMP4 dans le modèle MCF10A

Différenciation et stemness

La mise au point d'un shRNA dirigé contre BRCA1 a permis d'obtenir dans les cellules MCF10A une répression de BRCA1 similaire à celle médiée par BMP4. L'induction du shBRCA1 nous a permis d'étudier les effets propres de la répression de BRCA1 dans ces

cellules. Comme rapporté dans d'autres études, la répression de BRCA1 semble favoriser ici le blocage de la différenciation luminaire des progéniteurs luminaux associée à leur dédifférenciation/transdifférenciation conduisant d'une part à une augmentation du contingent de cellules souches et d'autre part à une augmentation du contingent de cellules engagées dans la différenciation basale. Nous avons mené une analyse transcriptomique qui a permis d'identifier les gènes différentiellement exprimés en situation de répression de BRCA1 (induction du shBRCA1) comparativement à une situation de normo-expression de BRCA1 (pas d'induction du shBRCA1). Ces gènes constituent des médiateurs potentiels du blocage de la différenciation luminaire et de la dédifférenciation/transdifférenciation des progéniteurs luminaux induits par la répression de BRCA1 (**Figure 40**). Cette hypothèse mériterait d'être explorée d'avantage dans une démarche mécanistique.

A



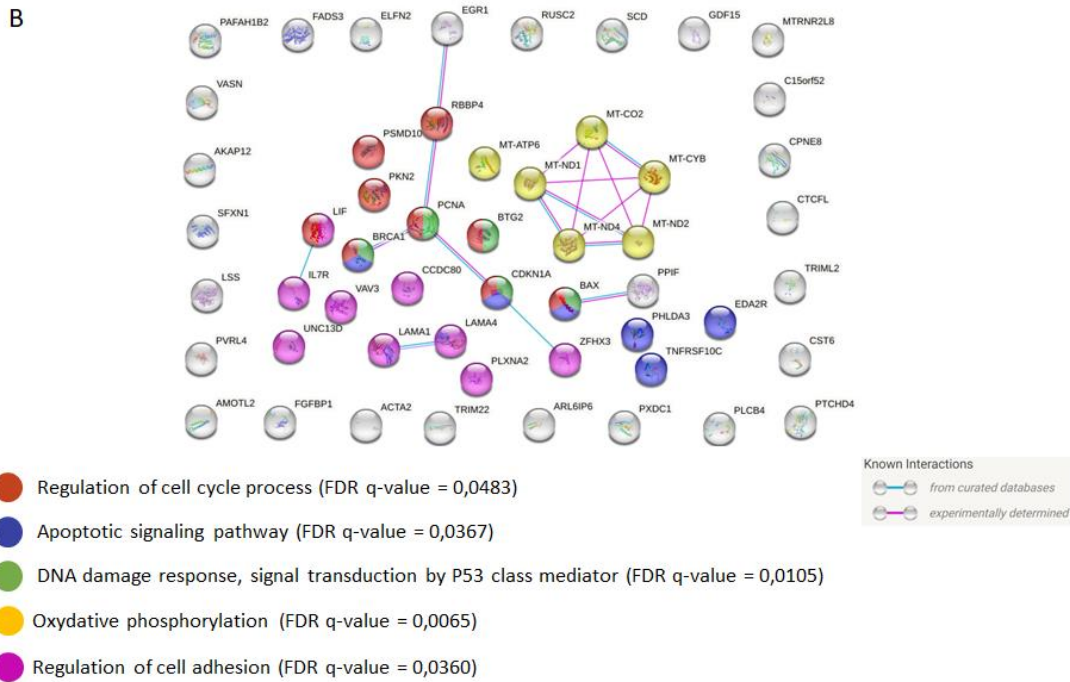


Figure 40. Heatmap représentant les gènes différentiellement exprimés dans la lignée ShBRCA1 + doxycycline comparativement aux conditions contrôles. 3 réplicats biologiques par conditions ont été générés. La surexpression transcriptionnelle est représentée en rouge, la répression en bleu (A). Analyse de type Gene Ontology représentant l'interactome des gènes différentiellement exprimés dans la lignée MCF10A ShBRCA1 + doxycycline comparativement aux contrôles (B).

Dans notre travail, nous montrons que l'exposition à BMP4 favorise la stemness et l'engagement vers la différenciation basale, de manière plus marquée que la répression de BRCA1 via l'induction du shBRCA1. Ceci suggère un effet propre de BMP4 dans ce mécanisme, au-delà de la seule répression de BRCA1. D'ailleurs, la combinaison de l'exposition à BMP4 et de l'induction du shBRCA1 aboutit à une accentuation significative de la différenciation basale, ce qui conforte cette dernière hypothèse.

Statut de la recombinaison homologue

Comme rapporté dans la figure 1B de l'article original, la réduction de l'expression de BRCA1 (de l'ordre de 55% pour le transcrite et 80% pour la protéine) induite par l'induction du shBRCA1 était suffisante pour drastiquement contraindre le recrutement de RAD51. Ceci est concordant avec plusieurs études qui ont démontré qu'une répression seulement partielle de BRCA1, notamment en condition d'haploinsuffisance, est suffisante pour impacter significativement le recrutement de RAD51 en réponse à des cassures double-brin de l'ADN (Bermes et al., 2023; Sioftanos et al., 2010; Vaclová et al., 2015). A l'inverse, de manière surprenante, l'exposition à BMP4 n'a pas induit de défaut de recrutement de RAD51 après

irradiation. Ceci suggère que dans cette situation, des mécanismes compensateurs de la répression de BRCA1 pourraient se mettre en place, aboutissant à un sur-recrutement aberrant de RAD51 aux sites de cassure, dépendant de BMP4. Or plusieurs études ont mis en évidence qu'un recrutement nucléaire aberrant de RAD51 pouvait être à l'origine d'instabilité génomique en promouvant un phénotype d'hyper-recombinaison vecteur d'aberrations chromosomiques (Elango et al., 2017; Francis & Richardson, 2007; Guirouilh-Barbat et al., 2019; P. M. Kim, 2001; Klein, 2008; Marsden et al., 2016; Martin et al., 2007; Richardson et al., 2004; Worrillow & Allan, 2006). Par exemple, Alvaro-Aranda et al. ont récemment démontré que le variant R2645G induit de tels phénomènes (Alvaro-Aranda et al., 2023).

Sensibilité aux inhibiteurs de PARP

Dans le cas de l'induction du shBRCA1, le défaut de recrutement de RAD51 qui en résulte induit une HRD qui se traduit par une sensibilité aux iPARP Olaparib et Talazoparib. Ceci confirme une répression de BRCA1 par le shBRCA1 supérieure à 50% puisqu'il a été démontré que l'haplo-insuffisance pour BRCA1 n'est pas suffisante pour induire une sensibilité significative aux iPARP (Sokol et al., 2022).

Dans le cas de l'exposition à BMP4, les courbes de prolifération en condition de traitement par Olaparib sont superposables à celle en rapport avec l'induction du shBRCA1, malgré l'absence de défaut de recrutement de RAD51 dans cette situation. A ce stade, plusieurs hypothèses explicatives peuvent être formulées. La première propose que le recrutement aberrant de RAD51 est délétère pour la bonne exécution de la recombinaison homologue. Dans ce postulat, le sur-recrutement de RAD51 suite à l'exposition aux iPARP induit une accumulation de cassures double brins de l'ADN mal réparées conduisant à la mort cellulaire par apoptose. La deuxième hypothèse propose que le sur-recrutement de RAD51 n'impacte pas quantitativement le taux de RH mais favorise dans le même temps des événements accessoires de recombinaison non homologues vecteurs d'instabilité génomique. La troisième hypothèse propose une entrée en dormance des cellules MCF10A en réponse à l'exposition conjointe aux iPARP et à BMP4. La positivité du test des comet assay est en faveur des deux premières hypothèses. Néanmoins, l'absence de diminution quantitative du taux de RH en condition d'exposition à BMP4 (**Figure 41**), estimé par analyse de rapporteurs fluorescents (Seluanov et al., 2010) plaide plutôt pour la deuxième hypothèse.

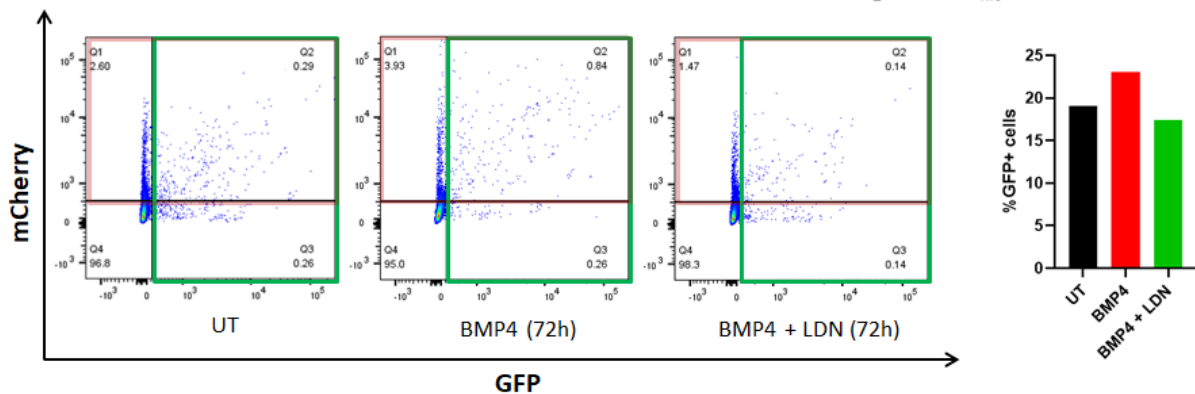


Figure 41. HR test mené selon Seluanov et al. testant le pourcentage de cellules ayant eu recours à la recombinaison homologue (encadré vert) comme voie de réparation de cassures doubles brins de l'ADN induite par l'endonucléase I-SceI.

Par ailleurs, le test de shallow HRD mené sur les cellules MCF10A chroniquement exposées à BMP4 n'a pas permis d'identifier d'aberrations chromosomiques spécifiques de l'HRD. Ceci suggère, conformément à la première hypothèse, que l'instabilité génomique médiée par le recrutement aberrant de RAD51 n'est pas suffisante pour générer des aberrations chromosomiques associées à l'HRD, étant donné par ailleurs que l'haplo-insuffisance pour BRCA1 n'est pas suffisante pour induire un profil LOH d'HRD (Sokol et al., 2020, 2022; Westphalen et al., 2022). Ceci suggère alternativement, conformément à la deuxième hypothèse, que l'instabilité génomique médiée par le recrutement aberrant de RAD51 ne correspond pas à un phénotype HRD ou encore que le temps d'exposition à la cytokine a été insuffisant pour voir se former de telles anomalies. Une autre limite également est que ce test de Shallow HRD n'a pas été développé pour détecter l'HRD dans les phases initiales de la tumorigenèse, avant l'apparition d'une tumeur constituée.

Pour affiner nos trois hypothèses nous avons en tous les cas mené des analyses de cycle cellulaire et d'apoptose. L'analyse du cycle cellulaire via le système Fucci a montré une accumulation en G0 des cellules exposées à BMP4 et à l'Olaparib confortant la troisième hypothèse pour une partie des cellules étudiées. Concernant l'apoptose, nos données de Western Blots basés sur la détection de la caspase 3 confirment que la co-exposition des MCF10A à BMP4 et à l'Olaparib induit un niveau d'apoptose statistiquement supérieur au contrôle non traité, contrairement aux autres conditions testant différentes associations de

traitements. Une tendance similaire, quoique non significative, a été observée par l'analyse en FACS du pourcentage de cellules apoptotiques et secondairement nécrotiques dans les mêmes conditions (**Figure 42**). Ceci suggère qu'une partie des cellules étudiées meurt de l'incapacité médiée par BMP4 à réparer fidèlement les cassures double brins générées de manière exogène. Toutefois, ceci montre également qu'une partie de ces cellules immatures rendues génétiquement instables persiste malgré cette instabilité, les rendant plus susceptibles de se transformer en cellules souches cancéreuses. Ces données évoquent donc une situation dans laquelle les trois hypothèses précédemment mentionnées se vérifient dans une partie des MCF10A étudiées. Ceci pourrait s'expliquer par la diversité cellulaire de la lignée MCF10A qui regroupe en son sein des cellules épithéliales immatures mammaires de nature différente (cellules souches mammaires et différents progéniteurs), ce qui pourrait avoir une incidence sur le devenir différent de ces cellules en réponse à un stimulus identique.

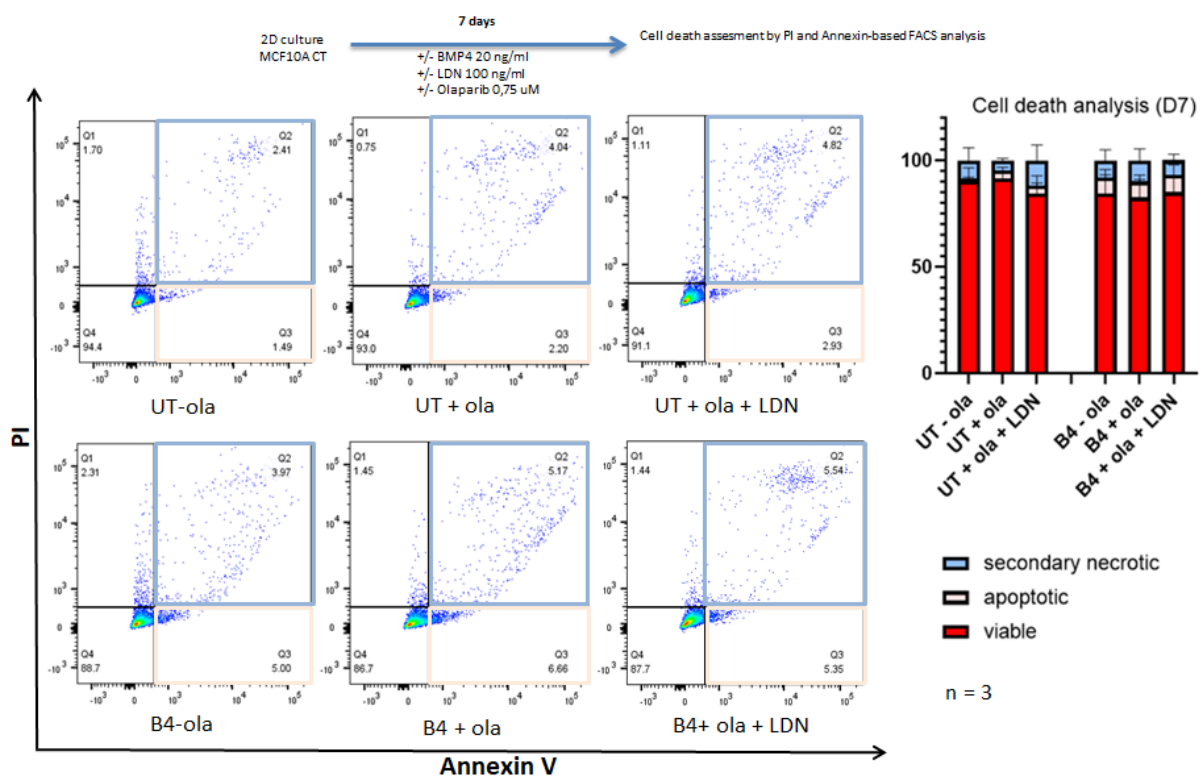


Figure 42. Analyse en cytométrie de flux de la mort cellulaire (apoptose et nécrose secondaire) en réponse à une exposition à BMP4 et à l'Olaparib. Les cellules positives pour l'Annexin V et négatives pour le PI sont considérées comme apoptotiques. Les cellules double positives sont considérées comme secondairement nécrotiques. Les autres sont considérées comme viables. n = 3. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart standardisé à la moyenne.

Transformation tumorale

Nous avons vu dans les chapitres précédents que l'axe BMP4/BMPR1A semble impliqué dans l'émergence et la persistance après stress génomique de cellules souches mammaires génétiquement instables. Nous avons donc cherché à étudier l'impact de cette instabilité génomique sur la transformation de ces cellules souches en cellules souches cancéreuses. Ainsi nous avons, sur le long terme, exposé les cellules MCF10A (surexprimant ou non BMPR1A) au ligand BMP4 et analysé l'impact de ce traitement chronique sur leur transformation via le test de culture en Agar mou. A 18 semaines de traitement on commence à voir se développer des petits clones en condition d'exposition à BMP4 et/ou en condition de surexpression de BMPR1A suggérant un potentiel tumorigène de l'axe BMP4/BMPR1A qui sera à confirmer sur des expositions à plus long terme et éventuellement sur des greffes de souris immuno-déprimées.

Perspectives

Ce travail permet de préciser le rôle de la voie BMP, particulièrement de l'axe BMP4/BMPR1A, dans l'émergence de cellules souches cancéreuses associées aux cancers du sein basal-like. La compréhension la plus fine possible des mécanismes impliqués dans la biologie de ce cancer agressif est nécessaire afin d'en favoriser la prise en charge diagnostique et thérapeutique. Si nous avons vu que la mise en évidence de la voie BMP dans ces cancers ne semble pas être un outil diagnostique de haute spécificité, son ciblage thérapeutique pourrait être d'intérêt dans une optique translationnelle. Nous avons vu plus haut que plusieurs inhibiteurs de la voie BMP, notamment la Dorsomorphin et le LDN-193189 (analogue de la Dorsomorphin de première génération), ont été testés in vitro dans d'autres études avec un potentiel de réversion de certaines propriétés associées à l'agressivité notamment la migration et l'invasion. Nous montrons par ailleurs tout au long de ce travail que le LDN-193189 induit de manière constante une réversion des effets biologiques observés en réponse à BMP4. Il s'oppose notamment à la répression de BRCA1 et à la stemness. Néanmoins, le LDN-193189 est un inhibiteur de spécificité imparfaite, avec de nombreux effets off-target liés à l'inhibition concomitante du récepteur au TGF β de type 1 et 2, de la kinase activée par l'AMP, du récepteur au VEGF de type II, faisant anticiper des effets secondaires potentiellement importants en cas d'utilisation en pratique clinique.

Quelques études pré-cliniques et de phase précoce étudiant des inhibiteurs plus sélectifs de la voie BMP ont été précédemment publiées mais ceci n'a pas conduit au développement de molécules innovantes en phases avancées. Par exemple le DMH1 (Dorsomorphin Homolog 1) est un analogue de seconde génération de la Dorsomorphin inhibant de manière sélective les BMPR avec une affinité particulière pour BMPR1A (IC50 <4 nM pour BMPR1A comparativement à 48 nM pour BMPR1B, 27 nM pour ALK1 et 108 nM pour ALK2) et sans effets sur les récepteurs au TGF β de type 1 et 2, la kinase activée par l'AMP, et le récepteur au VEGF de type II. Owens et al. ont donc montré dans un modèle de carcinome mammaire murin que l'exposition systémique au DMH1 dans la tumeur et son micro-environnement réduit la dissémination métastatique pulmonaire (Owens et al., 2015). Quelque temps plus tard, Di et al. ont démontré in vitro et dans un autre modèle de carcinome mammaire triple-négatif murin un effet anti-tumoral d'un autre inhibiteur des récepteurs aux TGF β et BMP, le ZL 170. Celui-ci a donc démontré un effet répressif sur l'EMT, la stemness et la dissémination métastatique (Di et al., 2019). Ainsi ces rares études, même si elles n'ont pas rapidement donné lieu à des innovations thérapeutiques significatives, suggèrent que l'utilisation d'un inhibiteur de la voie BMP, seul ou en concomitance avec un traitement cytotoxique usuel, est non seulement faisable mais également prometteur. Parmi les récepteurs potentiels à cibler, BMPR1A semble être un bon candidat de par son implication dans l'émergence de cellules souches cancéreuses. En effet, notre modèle MCF10A surexprimant BMPR1A a permis de mettre en évidence via le test des CFC le probable rôle de BMPR1A dans le blocage de la différenciation luminale (**Figure 43**), même si ceci mériterait de réaliser plusieurs réplicats biologiques.

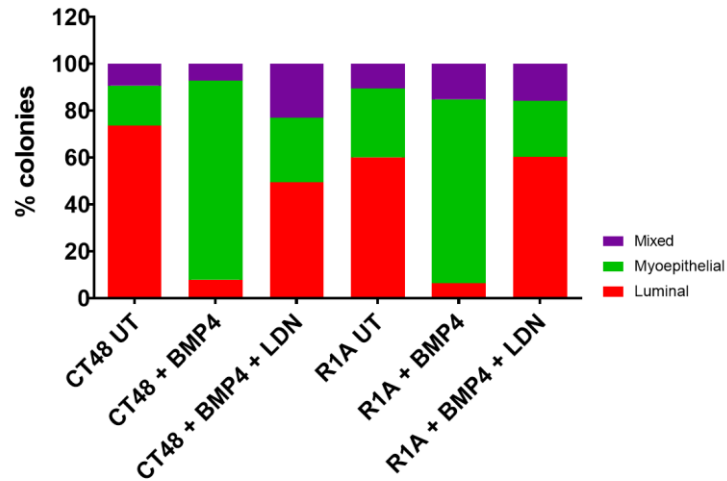


Figure 43. Test des CFC représentant le pourcentage de colonies lumineales, myoépithéliales et mixtes induites par une exposition à BMP4 +/- LDN-193189 dans les lignées MCF10A surexprimant ou non BMPR1A.

Le même modèle a permis de suggérer le rôle de BMPR1A dans la réponse différentielle aux inhibiteurs de PARP avec des courbes de relation dose-effet similaires à celle observée en condition de co-exposition BMP4 et Olaparib. Pour tenter de mettre en lumière les gènes impliqués dans ces effets fonctionnels de BMPR1A, nous avons réalisé une nouvelle analyse transcriptionnelle permettant d'isoler les gènes différentiellement exprimés entre la condition surexprimant BMPR1A et la condition contrôle. Ces gènes ont été organisés par fonctionnalité selon un processus de gene ontology et les grandes fonctions répertoriées comportent la différenciation, la régulation de l'apoptose et la régulation de la mobilité cellulaire (**Figure 44**).

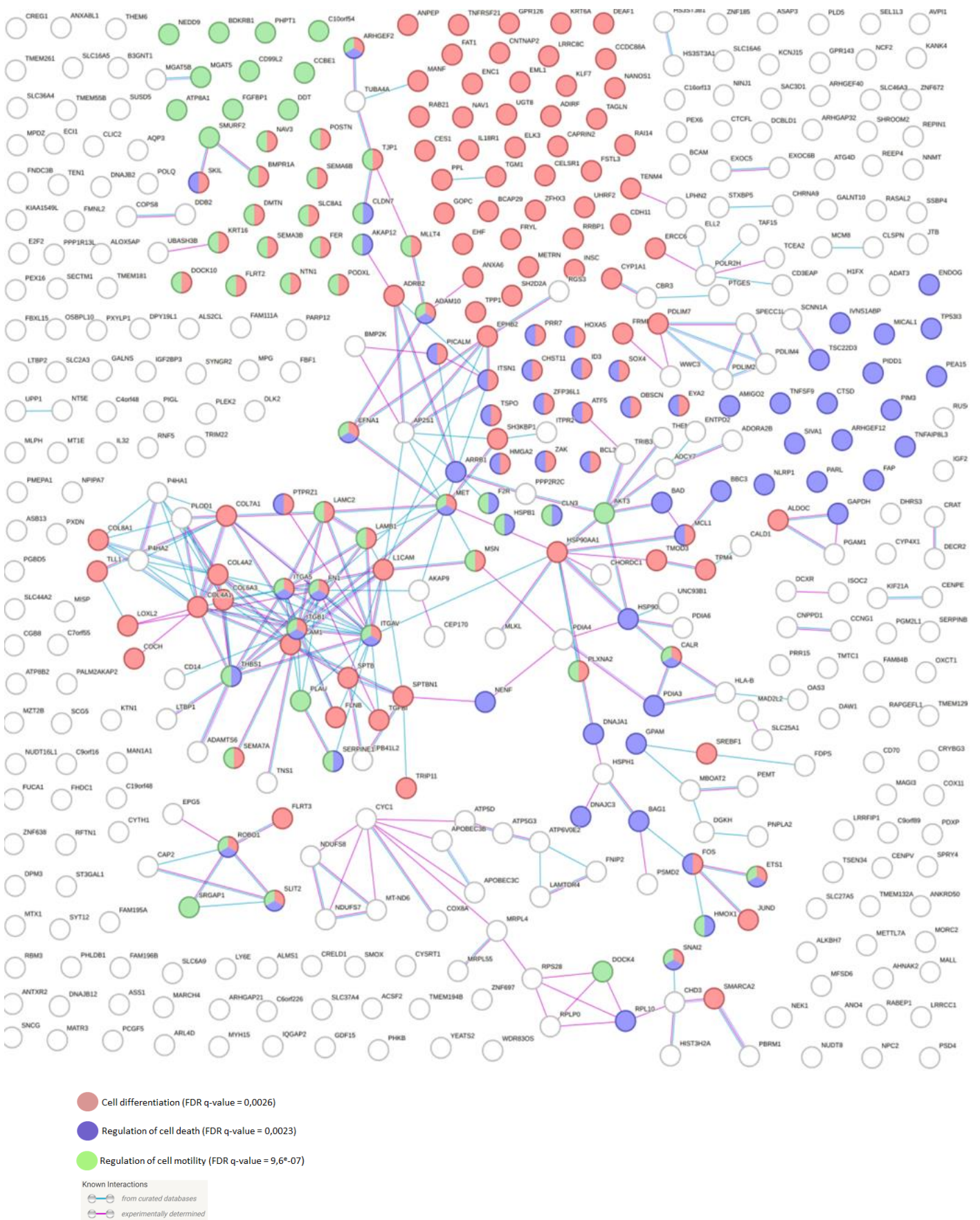


Figure 44. Analyse de type Gene Ontology représentant l'interactome des gènes différentiellement exprimés dans la lignée MCF10A surexprimant BMPR1A comparativement à la lignée MCF10A contrôle.

Ces fonctions confortent l'hypothèse selon laquelle BMRP1A est impliqué dans l'initiation des cellules souches cancéreuses au sein des carcinomes mammaires basal-like.

Enfin, nos données permettent également d'envisager sous un angle élargi la question de la résistance aux iPARP. En effet, la résistance, primaire ou secondaire, aux iPARP, est une cause majeure de progression tumorale. Plusieurs causes de résistance aux iPARP ont déjà été décrites, notamment passées en revue par Dias et al. (Dias et al., 2021). En premier lieu, nous pouvons citer les mécanismes de restauration de la voie de la RH notamment les mutations de réversion de BRCA1/2, RAD51C, RAD51D ou encore PALB2 (en cas de mutation délétère initiale) mais également les altérations associées à une perte de fonction de certains éléments constitutifs de la voie NHEJ notamment 53BP1 ainsi que d'autres protéines agissant en aval de la voie telles que REV7, RIF1 et les éléments constitutifs du complexe Shieldin. Les autres causes de résistance aux iPARP incluent la stabilisation de la fourche de réplication, les mutations de la cible (notamment de PARP1), la surexpression des pompes à efflux. Dans notre travail, la persistance après traitement par iPARP de certaines cellules présentant une expression limitée de BRCA1 permet de suggérer des mécanismes additionnels de résistance aux iPARP associés à l'acquisition d'un phénotype de cellule souche cancéreuse. Ces mécanismes pourraient comprendre la restauration (imparfaite) de la recombinaison homologue par sur-recrutement de RAD51, comme évoqué dans d'autres travaux (King et al., 2017; Martin et al., 2007), mais également l'accumulation en phase de dormance. Ainsi cibler ces processus pourrait permettre de contrecarrer les phénomènes de résistance intrinsèque aux iPARP et donc améliorer la survie des patients.

Conclusion

Récemment, les cancers du sein triple-négatifs ont gagné en visibilité auprès du grand public grâce à une médiatisation croissante, au dynamisme des associations de patientes et aux efforts de communication de la communauté médico-scientifique. Ainsi, le mauvais pronostic de ces cancers, notamment au stade métastatique, est désormais bien établi et connu de tous. Les connaissances sur le comportement biologique de ces tumeurs s'améliorent également, notamment grâce à l'apport des analyses multi-omiques qui ont permis d'identifier plusieurs sous-types de cancers du sein triple-négatifs. Parmi eux, près de 80% sont de phénotype basal-like. Définis par leur profil d'expression génique, ces cancers basal-like sont caractérisés par un enrichissement en cellules souches cancéreuses et des altérations de la voie de la recombinaison homologue. Notre étude s'intéresse donc aux mécanismes biologiques qui font le lien entre la stemness et les altérations de la recombinaison homologues à l'origine de l'émergence de cellules souches cancéreuses génétiquement instables soutenant la carcinogenèse basal-like. De manière intéressante, nous avons identifié l'axe BMP4/BMPR1A comme l'un des éléments participant à ce phénomène, ouvrant la porte à une meilleure compréhension de la maladie, condition préalable au développement de toute nouvelle stratégie de traitement innovant.

Bibliographie

- Abad, E., Graifer, D., & Lyakhovich, A. (2020). DNA damage response and resistance of cancer stem cells. *Cancer Letters*, 474, 106-117. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.01.008>
- Abkevich, V., Timms, K. M., Hennessy, B. T., Potter, J., Carey, M. S., Meyer, L. A., Smith-McCune, K., Broaddus, R., Lu, K. H., Chen, J., Tran, T. V., Williams, D., Iliev, D., Jammulapati, S., FitzGerald, L. M., Krivak, T., DeLoia, J. A., Gutin, A., Mills, G. B., & Lanchbury, J. S. (2012). Patterns of genomic loss of heterozygosity predict homologous recombination repair defects in epithelial ovarian cancer. *British Journal of Cancer*, 107(10), 1776-1782. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.451>
- Abraham, B. K., Fritz, P., McClellan, M., Hauptvogel, P., Athellogou, M., & Brauch, H. (s. d.). *Prevalence of CD44+/CD24À/low Cells in Breast Cancer May Not Be Associated with Clinical Outcome but May Favor Distant Metastasis*.
- Adélaïde, J., Finetti, P., Bekhouche, I., Repellini, L., Geneix, J., Sircoulomb, F., Charafe-Jauffret, E., Cervera, N., Desplans, J., Parzy, D., Schoenmakers, E., Viens, P., Jacquemier, J., Birnbaum, D., Bertucci, F., & Chaffanet, M. (2007). Integrated Profiling of Basal and Luminal Breast Cancers. *Cancer Research*, 67(24), 11565-11575. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2536>
- Agur, Z., Kirnasovsky, O. U., Vasserman, G., Tencer-Hershkowicz, L., Kogan, Y., Harrison, H., Lamb, R., & Clarke, R. B. (2011). Dickkopf1 Regulates Fate Decision and Drives Breast Cancer Stem Cells to Differentiation : An Experimentally Supported Mathematical Model. *PLoS ONE*, 6(9), e24225. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024225>
- Ai, L., Tao, Q., Zhong, S., Fields, C. R., Kim, W.-J., Lee, M. W., Cui, Y., Brown, K. D., & Robertson, K. D. (2006). Inactivation of Wnt inhibitory factor-1 (WIF1) expression by epigenetic silencing is a common event in breast cancer. *Carcinogenesis*, 27(7), 1341-1348. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgi379>
- Alarmo, E.-L., Huhtala, H., Korhonen, T., Pylkkänen, L., Holli, K., Kuukasjärvi, T., Parkkila, S., & Kallioniemi, A. (2013). Bone morphogenetic protein 4 expression in multiple normal and tumor tissues reveals its importance beyond development. *Modern Pathology*, 26(1), 10-21. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2012.128>
- Alarmo, E.-L., & Kallioniemi, A. (2010). Bone morphogenetic proteins in breast cancer : Dual role in tumorigenesis? *Endocrine-Related Cancer*, 17(2), R123-R139. <https://doi.org/10.1677/ERC-09-0273>
- Alarmo, E.-L., Kuukasjärvi, T., Karhu, R., & Kallioniemi, A. (2007). A comprehensive expression survey of bone morphogenetic proteins in breast cancer highlights the importance of BMP4 and BMP7. *Breast Cancer Research and Treatment*, 103(2), 239-246. <https://doi.org/10.1007/s10549-006-9362-1>
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7), 3983-3988. <https://doi.org/10.1073/pnas.0530291100>
- Alvaro-Aranda, L., Petitalot, A., Djeghmoum, Y., Panigada, D., Singh, J. K., Ehlén, Å., Vugic, D., Martin, C., Miron, S., Contreras-Perez, A., Nhiri, N., Boucherit, V., Lafitte, P., Dumoulin, I., Quiles, F., Rouleau, E., Jacquet, E., Feliubadaló, L., del Valle, J., ... Carreira, A. (2023). The BRCA2 R2645G variant increases DNA binding and induces hyper-recombination. *Nucleic Acids Research*, gkad1222. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad1222>
- Ampuja, M., Alarmo, E. L., Owens, P., Havunen, R., Gorska, A. E., Moses, H. L., & Kallioniemi, A. (2016). The impact of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) on breast cancer metastasis in a mouse xenograft model. *Cancer Letters*, 375(2), 238-244. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.03.008>
- Ampuja, M., Jokimäki, R., Juuti-Uusitalo, K., Rodriguez-Martinez, A., Alarmo, E.-L., & Kallioniemi, A. (2013). BMP4 inhibits the proliferation of breast cancer cells and induces an MMP-dependent migratory phenotype in MDA-MB-231 cells in 3D environment. *BMC Cancer*, 13(1), 429. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-429>
- Ampuja, M., Rantapero, T., Rodriguez-Martinez, A., Palmroth, M., Alarmo, E. L., Nykter, M., & Kallioniemi, A. (2017). Integrated RNA-seq and DNase-seq analyses identify phenotype-specific BMP4 signaling in breast cancer. *BMC Genomics*, 18(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3428-1>
- Anders, C. K., Hsu, D. S., Broadwater, G., Acharya, C. R., Foekens, J. A., Zhang, Y., Wang, Y., Marcom, P. K., Marks, J. R., Febbo, P. G., Nevins, J. R., Potti, A., & Blackwell, K. L. (2008). Young Age at Diagnosis Correlates With Worse Prognosis and Defines a Subset of Breast Cancers With Shared Patterns of Gene Expression. *Journal of Clinical Oncology*, 26(20), 3324-3330. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.2471>
- Andres, A.-C., & Strange, R. (s. d.). *Apoptosis in the Estrous and Menstrual Cycles*.

- Antoniou, A. C., Casadei, S., Heikkinen, T., Barrowdale, D., Pylkäs, K., Roberts, J., Lee, A., Subramanian, D., De Leeneer, K., Fostira, F., Tomiak, E., Neuhausen, S. L., Teo, Z. L., Khan, S., Aittomäki, K., Moilanen, J. S., Turnbull, C., Seal, S., Mannermaa, A., ... Tischkowitz, M. (2014). Breast-Cancer Risk in Families with Mutations in *PALB2*. *New England Journal of Medicine*, 371(6), 497-506. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1400382>
- Arendt, L. M., Keller, P. J., Skibinski, A., Goncalves, K., Naber, S. P., Buchsbaum, R. J., Gilmore, H., Come, S. E., & Kuperwasser, C. (2014). Anatomical localization of progenitor cells in human breast tissue reveals enrichment of uncommitted cells within immature lobules. *Breast Cancer Research*, 16(5), 453. <https://doi.org/10.1186/s13058-014-0453-3>
- Armstrong, W. E., & Hatton, G. I. (2006). The puzzle of pulsatile oxytocin secretion during lactation : Some new pieces. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 291(1), R26-R28. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00879.2005>
- Arnold, M., Morgan, E., Rungay, H., Mafra, A., Singh, D., Laversanne, M., Vignat, J., Gralow, J. R., Cardoso, F., Siesling, S., & Soerjomataram, I. (2022). Current and future burden of breast cancer : Global statistics for 2020 and 2040. *The Breast*, 66, 15-23. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2022.08.010>
- Asakawa, H., Koizumi, H., Koike, A., Takahashi, M., Wu, W., Iwase, H., Fukuda, M., & Ohta, T. (2010). Prediction of breast cancer sensitivity to neoadjuvant chemotherapy based on status of DNA damage repair proteins. *Breast Cancer Research*, 12(2), R17. <https://doi.org/10.1186/bcr2486>
- Aupperlee, M. D., Leipprandt, J. R., Bennett, J. M., Schwartz, R. C., & Haslam, S. Z. (2013). Amphiregulin mediates progesterone-induced mammary ductal development during puberty. *Breast Cancer Research*, 15(3), R44. <https://doi.org/10.1186/bcr3431>
- Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative, ICGC Breast Cancer Consortium, ICGC MMML-Seq Consortium, ICGC PedBrain, Alexandrov, L. B., Nik-Zainal, S., Wedge, D. C., Aparicio, S. A. J. R., Behjati, S., Biankin, A. V., Bignell, G. R., Bolli, N., Borg, A., Børresen-Dale, A.-L., Boyault, S., Burkhardt, B., Butler, A. P., Caldas, C., Davies, H. R., ... Stratton, M. R. (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*, 500(7463), 415-421. <https://doi.org/10.1038/nature12477>
- Babitt, J. L., Huang, F. W., Wrighting, D. M., Xia, Y., Sidis, Y., Samad, T. A., Campagna, J. A., Chung, R. T., Schneyer, A. L., Woolf, C. J., Andrews, N. C., & Lin, H. Y. (2006). Bone morphogenetic protein signaling by heparan sulfate regulates hepcidin expression. *Nature Genetics*, 38(5), 531-539. <https://doi.org/10.1038/ng1777>
- Babitt, J. L., Zhang, Y., Samad, T. A., Xia, Y., Tang, J., Campagna, J. A., Schneyer, A. L., Woolf, C. J., & Lin, H. Y. (2005). Repulsive Guidance Molecule (RGMa), a DRAGON Homologue, Is a Bone Morphogenetic Protein Co-receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 280(33), 29820-29827. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503511200>
- Bachelard-Cascales, E., Chapellier, M., Delay, E., & Maguer-Satta, V. (2012). A Protocol to Quantify Mammary Early Common Progenitors from Long-Term Mammosphere Culture. *Current Protocols in Stem Cell Biology*, 20(1). <https://doi.org/10.1002/9780470151808.sc01e07s20>
- Bachelard-Cascales, E., Chapellier, M., Delay, E., Pochon, G., Voeltzel, T., Puisieux, A., Caron De Fromentel, C., & Maguer-Satta, V. (2010). The CD10 Enzyme Is a Key Player to Identify and Regulate Human Mammary Stem Cells. *Stem Cells*, 28(6), 1081-1088. <https://doi.org/10.1002/stem.435>
- Bai, L., & Rohrschneider, L. R. (2010). S-SHIP promoter expression marks activated stem cells in developing mouse mammary tissue. *Genes & Development*, 24(17), 1882-1892. <https://doi.org/10.1101/gad.1932810>
- Baker, L. A., Holliday, H., Roden, D., Krisp, C., Wu, S. Z., Junankar, S., Serandour, A. A., Mohammed, H., Nair, R., Sankaranarayanan, G., Law, A. M. K., McFarland, A., Simpson, P. T., Lakhani, S., Dodson, E., Selinger, C., Anderson, L., Samimi, G., Hacker, N. F., ... Swarbrick, A. (2020). Proteogenomic analysis of Inhibitor of Differentiation 4 (ID4) in basal-like breast cancer. *Breast Cancer Research*, 22(1), 63. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01306-6>
- Balboni, A. L., Hutchinson, J. A., DeCastro, A. J., Cherukuri, P., Liby, K., Sporn, M. B., Schwartz, G. N., Wells, W. A., Sempere, L. F., Yu, P. B., & DiRenzo, J. (2013). Δ Np63 α -Mediated Activation of Bone Morphogenetic Protein Signaling Governs Stem Cell Activity and Plasticity in Normal and Malignant Mammary Epithelial Cells. *Cancer Research*, 73(2), 1020-1030. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2862>
- Baldassarre, G., Battista, S., Belletti, B., Thakur, S., Pentimalli, F., Trapasso, F., Fedele, M., Pierantoni, G., Croce, C. M., & Fusco, A. (2003). Negative Regulation of *BRCA1* Gene Expression by HMGA1 Proteins Accounts for the Reduced *BRCA1* Protein Levels in Sporadic Breast Carcinoma. *Molecular and Cellular Biology*, 23(7), 2225-2238. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.7.2225-2238.2003>

- Balemans, W., & Van Hul, W. (2002). Extracellular Regulation of BMP Signaling in Vertebrates : A Cocktail of Modulators. *Developmental Biology*, 250(2), 231-250. <https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0779>
- Balic, M., Lin, H., Young, L., Hawes, D., Giuliano, A., McNamara, G., Datar, R. H., & Cote, R. J. (2006). Most Early Disseminated Cancer Cells Detected in Bone Marrow of Breast Cancer Patients Have a Putative Breast Cancer Stem Cell Phenotype. *Clinical Cancer Research*, 12(19), 5615-5621. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0169>
- Bane, A. L., Mulligan, A. M., Pinnaduwege, D., O'Malley, F. P., & Andrulis, I. L. (2011). EMSY and CCND1 amplification in familial breast cancer : From the Ontario site of the Breast Cancer Family Registry. *Breast Cancer Research and Treatment*, 127(3), 831-839. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1380-y>
- Bane, A., Vilorio-Petit, A., Pinnaduwege, D., Mulligan, A. M., O'Malley, F. P., & Andrulis, I. L. (2013). Clinical-pathologic significance of cancer stem cell marker expression in familial breast cancers. *Breast Cancer Research and Treatment*, 140(1), 195-205. <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2591-1>
- Banerjee, S. (2006). Basal-like breast carcinomas : Clinical outcome and response to chemotherapy. *Journal of Clinical Pathology*, 59(7), 729-735. <https://doi.org/10.1136/jcp.2005.033043>
- Bardia, A., Hurvitz, S. A., Tolane, S. M., Loirat, D., Punie, K., Oliveira, M., Brufsky, A., Sardesai, S. D., Kalinsky, K., Zelnak, A. B., Weaver, R., Traina, T., Dalenc, F., Aftimos, P., Lynce, F., Diab, S., Cortés, J., O'Shaughnessy, J., Diéras, V., ... ASCENT Clinical Trial Investigators. (2021). Sacituzumab Govitecan in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 384(16), 1529-1541. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2028485>
- Barnard, M. E., Boeke, C. E., & Tamimi, R. M. (2015). Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1856(1), 73-85. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.06.002>
- Basson, M. A. (2012). Signaling in Cell Differentiation and Morphogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(6), a008151-a008151. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008151>
- Beça, F. F. D., Caetano, P., Gerhard, R., Alvarenga, C. A., Gomes, M., Paredes, J., & Schmitt, F. (2013). Cancer stem cells markers CD44, CD24 and ALDH1 in breast cancer special histological types. *Journal of Clinical Pathology*, 66(3), 187-191. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2012-201169>
- Beger, C., Pierce, L. N., Krüger, M., Marcusson, E. G., Robbins, J. M., Welch, P. J., Welch, P. J., Welte, K., King, M.-C., Barber, J. R., & Wong-Staal, F. (2001). Identification of *Id4* as a regulator of *BRCA1* expression by using a ribozyme-library-based inverse genomics approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(1), 130-135. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.1.130>
- Begicevic, R.-R., & Falasca, M. (2017). ABC Transporters in Cancer Stem Cells : Beyond Chemoresistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 2362. <https://doi.org/10.3390/ijms18112362>
- Beleut, M., Rajaram, R. D., Caikovski, M., Ayyanan, A., Germano, D., Choi, Y., Schneider, P., Brisken, C., & Chambón, P. (2010). Two Distinct Mechanisms Underlie Progesterone-induced Proliferation in the Mammary Gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(7), 2989-2994.
- Benefield, H. C., Zirpoli, G. R., Allott, E. H., Shan, Y., Hurson, A. N., Omilian, A. R., Khoury, T., Hong, C.-C., Olshan, A. F., Bethea, T. N., Bandera, E. V., Palmer, J. R., Ambrosone, C. B., & Troester, M. A. (2021). Epidemiology of Basal-like and Luminal Breast Cancers among Black Women in the AMBER Consortium. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 30(1), 71-79. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-20-0556>
- Bergamaschi, A., Kim, Y. H., Wang, P., Sørli, T., Hernandez-Boussard, T., Lonning, P. E., Tibshirani, R., Børresen-Dale, A.-L., & Pollack, J. R. (2006). Distinct patterns of DNA copy number alteration are associated with different clinicopathological features and gene-expression subtypes of breast cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 45(11), 1033-1040. <https://doi.org/10.1002/gcc.20366>
- Bermes, M., Rodriguez, M. J., De Toledo, M. A. S., Ernst, S., Müller-Newen, G., Brümmendorf, T. H., Chatain, N., Koschmieder, S., & Baumeister, J. (2023). Exploiting Synthetic Lethality between Germline BRCA1 Haploinsufficiency and PARP Inhibition in JAK2V617F-Positive Myeloproliferative Neoplasms. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(24), 17560. <https://doi.org/10.3390/ijms242417560>
- Bertucci, F., Finetti, P., Cervera, N., Esterni, B., Hermitte, F., Viens, P., & Birnbaum, D. (2008). How basal are triple-negative breast cancers? *International Journal of Cancer*, 123(1), 236-240. <https://doi.org/10.1002/ijc.23518>
- Bhuvanlakshmi, G., Basappa, Rangappa, K. S., Dharmarajan, A., Sethi, G., Kumar, A. P., & Warriar, S. (2017). Breast Cancer Stem-Like Cells Are Inhibited by Diosgenin, a Steroidal Saponin, by the Attenuation of the Wnt β -Catenin Signaling via the Wnt Antagonist Secreted Frizzled Related Protein-4. *Frontiers in Pharmacology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00124>

- Birkbak, N. J., Wang, Z. C., Kim, J.-Y., Eklund, A. C., Li, Q., Tian, R., Bowman-Colin, C., Li, Y., Greene-Colozzi, A., Iglehart, J. D., Tung, N., Ryan, P. D., Garber, J. E., Silver, D. P., Szallasi, Z., & Richardson, A. L. (2012). Telomeric Allelic Imbalance Indicates Defective DNA Repair and Sensitivity to DNA-Damaging Agents. *Cancer Discovery*, 2(4), 366-375. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-11-0206>
- Blaas, L., Pucci, F., Messal, H. A., Andersson, A. B., Josue Ruiz, E., Gerling, M., Douagi, I., Spencer-Dene, B., Musch, A., Mitter, R., Bhaw, L., Stone, R., Bornhorst, D., Sesay, A. K., Jonkers, J., Stamp, G., Malanchi, I., Toftgård, R., & Behrens, A. (2016). Lgr6 labels a rare population of mammary gland progenitor cells that are able to originate luminal mammary tumours. *Nature Cell Biology*, 18(12), 1346-1356. <https://doi.org/10.1038/ncb3434>
- Blanpain, C., Mohrin, M., Sotiropoulou, P. A., & Passegué, E. (2011). DNA-Damage Response in Tissue-Specific and Cancer Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 8(1), 16-29. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.12.012>
- Blokzijl, F., De Ligt, J., Jager, M., Sasselli, V., Roerink, S., Sasaki, N., Huch, M., Boymans, S., Kuijk, E., Prins, P., Nijman, I. J., Martincorena, I., Mokry, M., Wiegerinck, C. L., Middendorp, S., Sato, T., Schwank, G., Nieuwenhuis, E. E. S., Versteegen, M. M. A., ... Van Boxtel, R. (2016). Tissue-specific mutation accumulation in human adult stem cells during life. *Nature*, 538(7624), 260-264. <https://doi.org/10.1038/nature19768>
- Bodily, W. R., Shirts, B. H., Walsh, T., Gulsuner, S., King, M.-C., Parker, A., Roosan, M., & Piccolo, S. R. (2020). Effects of germline and somatic events in candidate BRCA-like genes on breast-tumor signatures. *PLOS ONE*, 15(9), e0239197. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239197>
- Boergermann, J. H., Kopf, J., Yu, P. B., & Knaus, P. (2010). Dorsomorphin and LDN-193189 inhibit BMP-mediated Smad, p38 and Akt signalling in C2C12 cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(11), 1802-1807. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.07.018>
- Bokobza, S. M., Ye, L., Kynaston, H. E., Mansel, R. E., & Jiang, W. G. (2009). Reduced Expression of BMPR-IB Correlates with Poor Prognosis and Increased Proliferation of Breast Cancer Cells. *CANCER GENOMICS*.
- Boras-Granic, K., Dann, P., & Wyslomerski, J. J. (2014). Embryonic cells contribute directly to the quiescent stem cell population in the adult mouse mammary gland. *Breast Cancer Research*, 16(6), 487. <https://doi.org/10.1186/s13058-014-0487-6>
- Botti, G., Cantile, M., Collina, F., Cerrone, M., Sarno, S., Anniciello, A., & Di Bonito, M. (2019). Morphological and pathological features of basal-like breast cancer. *Translational Cancer Research*, 8(S5), S503-S509. <https://doi.org/10.21037/tcr.2019.06.50>
- Boulanger, C. A., Wagner, K.-U., & Smith, G. H. (2005). Parity-induced mouse mammary epithelial cells are pluripotent, self-renewing and sensitive to TGF- β 1 expression. *Oncogene*, 24(4), 552-560. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208185>
- Bragdon, B., Moseychuk, O., Saldanha, S., King, D., Julian, J., & Nohe, A. (2011). Bone Morphogenetic Proteins : A critical review. *Cellular Signalling*, 23(4), 609-620. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.10.003>
- Branham, M. T., Campoy, E., Laurito, S., Branham, R., Urrutia, G., Orozco, J., Gago, F., Urrutia, R., & Roqué, M. (2016). Epigenetic regulation of ID4 in the determination of the BRCAness phenotype in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 155(1), 13-23. <https://doi.org/10.1007/s10549-015-3648-0>
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Me, J. F., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Dvm, A. J. (2022). *Global cancer statistics 2022 : GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*.
- Brianese, R. C., Nakamura, K. D. de M., Almeida, F. G. dos S. R., Ramalho, R. F., Barros, B. D. de F., Ferreira, E. N. e, Formiga, M. N. da C., de Andrade, V. P., de Lima, V. C. C., & Carraro, D. M. (2018). BRCA1 deficiency is a recurrent event in early-onset triple-negative breast cancer : A comprehensive analysis of germline mutations and somatic promoter methylation. *Breast Cancer Research and Treatment*, 167(3), 803-814. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4552-6>
- Briskin, C. (2002). Hormonal Control of Alveolar Development and Its Implications for Breast Carcinogenesis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*.
- Briskin, C., Heineman, A., Chavarria, T., Elenbaas, B., Tan, J., Dey, S. K., McMahon, J. A., McMahon, A. P., & Weinberg, R. A. (2000). Essential function of *Wnt-4* in mammary gland development downstream of progesterone signaling. *Genes & Development*, 14(6), 650-654. <https://doi.org/10.1101/gad.14.6.650>
- Briskin, C., & O'Malley, B. (2010). Hormone Action in the Mammary Gland. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(12), a003178-a003178. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003178>
- Briskin, C., Park, S., Vass, T., Lydon, J. P., O'Malley, B. W., & Weinberg, R. A. (1998). A Paracrine Role for the Epithelial Progesterone Receptor in Mammary Gland Development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(9), 5076-5081.

- Brownfield, D. G., Venugopalan, G., Lo, A., Mori, H., Tanner, K., Fletcher, D. A., & Bissell, M. J. (2013). Patterned Collagen Fibers Orient Branching Mammary Epithelium through Distinct Signaling Modules. *Current Biology*, 23(8), 703-709. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.03.032>
- Bryan, B. B., Schnitt, S. J., & Collins, L. C. (2006). Ductal carcinoma in situ with basal-like phenotype : A possible precursor to invasive basal-like breast cancer. *Modern Pathology*, 19(5), 617-621. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800570>
- Bryant, H. E., Schultz, N., Thomas, H. D., Parker, K. M., Flower, D., Lopez, E., Kyle, S., Meuth, M., Curtin, N. J., & Helleday, T. (2005). *Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase*. 434.
- Buijs, J. T., van der Horst, G., van den Hoogen, C., Cheung, H., de Rooij, B., Kroon, J., Petersen, M., van Overveld, P. G. M., Pelger, R. C. M., & van der Pluijm, G. (2012). The BMP2/7 heterodimer inhibits the human breast cancer stem cell subpopulation and bone metastases formation. *Oncogene*, 31(17), 2164-2174. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.400>
- Burstein, M. D., Tsimelzon, A., Poage, G. M., Covington, K. R., Contreras, A., Fuqua, S. A. W., Savage, M. I., Osborne, C. K., Hilsenbeck, S. G., Chang, J. C., Mills, G. B., Lau, C. C., & Brown, P. H. (2015). Comprehensive Genomic Analysis Identifies Novel Subtypes and Targets of Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 21(7), 1688-1698. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0432>
- Byrski, T., Dent, R., Blecharz, P., Foszczynska-Kloda, M., Gronwald, J., Huzarski, T., Cybulski, C., Marczyk, E., Chrzan, R., Eisen, A., Lubinski, J., & Narod, S. A. (2012). Results of a phase II open-label, non-randomized trial of cisplatin chemotherapy in patients with BRCA1-positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research*, 14(4), R110. <https://doi.org/10.1186/bcr3231>
- Byrski, T., Huzarski, T., Dent, R., Marczyk, E., Jasiowka, M., Gronwald, J., Jakubowicz, J., Cybulski, C., Wisniowski, R., Godlewski, D., Lubinski, J., & Narod, S. A. (2014). Pathologic complete response to neoadjuvant cisplatin in BRCA1-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, 147(2), 401-405. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-3100-x>
- Cai, S., Kalisky, T., Sahoo, D., Dalerba, P., Feng, W., Lin, Y., Qian, D., Kong, A., Yu, J., Wang, F., Chen, E. Y., Scheeren, F. A., Kuo, A. H., Sikandar, S. S., Hisamori, S., Van Weele, L. J., Heiser, D., Sim, S., Lam, J., ... Clarke, M. F. (2017). A Quiescent Bcl11b High Stem Cell Population Is Required for Maintenance of the Mammary Gland. *Cell Stem Cell*, 20(2), 247-260.e5. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.11.007>
- Canalis, E., Economides, A. N., & Gaggero, E. (2003). Bone Morphogenetic Proteins, Their Antagonists, and the Skeleton. *Endocrine Reviews*, 24(2), 218-235. <https://doi.org/10.1210/er.2002-0023>
- Candia, P. D., Benera, R., & Solit, D. B. (2004). A Role for Id Proteins in Mammary Gland Physiology and Tumorigenesis. In *Advances in Cancer Research* (Vol. 92, p. 81-94). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(04\)92004-0](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(04)92004-0)
- Cao, A.-Y., Huang, J., Hu, Z., Li, W.-F., Ma, Z.-L., Tang, L.-L., Zhang, B., Su, F.-X., Zhou, J., Di, G.-H., Shen, K.-W., Wu, J., Lu, J.-S., Luo, J.-M., Yuan, W.-T., Shen, Z.-Z., Huang, W., & Shao, Z.-M. (2009). The prevalence of PALB2 germline mutations in BRCA1/BRCA2 negative Chinese women with early onset breast cancer or affected relatives. *Breast Cancer Research and Treatment*, 114(3), 457-462. <https://doi.org/10.1007/s10549-008-0036-z>
- Cao, Y., Bonizzi, G., Seagroves, T. N., Greten, F. R., Johnson, R., Schmidt, E. V., & Karin, M. (s. d.). *IKK γ Provides an Essential Link between RANK Signaling and Cyclin D1 Expression during Mammary Gland Development*.
- Cardiff, R. D., & Wellings, S. R. (s. d.). *The Comparative Pathology of Human and Mouse Mammary Glands*.
- Carey, L. A., Perou, C. M., Livasy, C. A., Dressler, L. G., Cowan, D., Conway, K., Karaca, G., Troester, M. A., Tse, C. K., Edmiston, S., Deming, S. L., Geradts, J., Cheang, M. C. U., Nielsen, T. O., Moorman, P. G., Earp, H. S., & Millikan, R. C. (s. d.). *Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study*.
- Carr, J. R., Kiefer, M. M., Park, H. J., Li, J., Wang, Z., Fontanarosa, J., DeWaal, D., Kopanja, D., Benevolenskaya, E. V., Guzman, G., & Raychaudhuri, P. (2012). FoxM1 Regulates Mammary Luminal Cell Fate. *Cell Reports*, 1(6), 715-729. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.05.005>
- Castroviejo-Bermejo, M., Cruz, C., Llop-Guevara, A., Gutiérrez-Enríquez, S., Ducy, M., Ibrahim, Y. H., Gris-Oliver, A., Pellegrino, B., Bruna, A., Guzmán, M., Rodríguez, O., Grueso, J., Bonache, S., Moles-Fernández, A., Villacampa, G., Viaplana, C., Gómez, P., Vidal, M., Peg, V., ... Serra, V. (2018). A RAD 51 assay feasible in routine tumor samples calls PARP inhibitor response beyond BRCA mutation. *EMBO Molecular Medicine*, 10(12). <https://doi.org/10.15252/emmm.201809172>
- Catteau, A., Harris, W. H., Xu, C.-F., & Solomon, E. (1999). Methylation of the BRCA1 promoter region in sporadic breast and ovarian cancer : Correlation with disease characteristics. *Oncogene*, 18(11), 1957-1965. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202509>

- Celis, J. E., Moreira, J. M. A., Cabezón, T., Gromov, P., Friis, E., Rank, F., & Gromova, I. (2005). Identification of Extracellular and Intracellular Signaling Components of the Mammary Adipose Tissue and Its Interstitial Fluid in High Risk Breast Cancer Patients. *Molecular & Cellular Proteomics*, 4(4), 492-522. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500030-MCP200>
- Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B. E., Sumer, S. O., Aksoy, B. A., Jacobsen, A., Byrne, C. J., Heuer, M. L., Larsson, E., Antipin, Y., Reva, B., Goldberg, A. P., Sander, C., & Schultz, N. (2012). The cBio Cancer Genomics Portal : An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data. *Cancer Discovery*, 2(5), 401-404. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0095>
- Chapellier, M., Bachelard-Cascales, E., Schmidt, X., Clément, F., Treilleux, I., Delay, E., Jammot, A., Ménétrier-Caux, C., Pochon, G., Besançon, R., Voeltzel, T., Caron de Fromentel, C., Caux, C., Blay, J.-Y., Iggo, R., & Maguer-Satta, V. (2015). Disequilibrium of BMP2 Levels in the Breast Stem Cell Niche Launches Epithelial Transformation by Overamplifying BMPR1B Cell Response. *Stem Cell Reports*, 4(2), 239-254. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.12.007>
- Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., Iovino, F., Tarpin, C., Diebel, M., Esterni, B., Houvenaeghel, G., Extra, J.-M., Bertucci, F., Jacquemier, J., Xerri, L., Dontu, G., Stassi, G., Xiao, Y., Barsky, S. H., Birnbaum, D., Viens, P., & Wicha, M. S. (2010). Aldehyde Dehydrogenase 1–Positive Cancer Stem Cells Mediate Metastasis and Poor Clinical Outcome in Inflammatory Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 16(1), 45-55. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1630>
- Cheang, M. C. U., Voduc, D., Bajdik, C., Leung, S., McKinney, S., Chia, S. K., Perou, C. M., & Nielsen, T. O. (2008). Basal-Like Breast Cancer Defined by Five Biomarkers Has Superior Prognostic Value than Triple-Negative Phenotype. *Clinical Cancer Research*, 14(5), 1368-1376. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1658>
- Chen, Y., Li, D., Wang, D., Liu, X., Yin, N., Song, Y., Lu, S. H., Ju, Z., & Zhan, Q. (2012). Quiescence and attenuated DNA damage response promote survival of esophageal cancer stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(12), 3643-3652. <https://doi.org/10.1002/jcb.24228>
- Chen, Y., Zhou, J., Xu, Y., Li, Z., Wen, X., Yao, L., Xie, Y., & Deng, D. (2009). *BRCA1* promoter methylation associated with poor survival in Chinese patients with sporadic breast cancer. *Cancer Science*, 100(9), 1663-1667. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01225.x>
- Cheng, L., Wu, Q., Huang, Z., Guryanova, O. A., Huang, Q., Shou, W., Rich, J. N., & Bao, S. (2011). L1CAM regulates DNA damage checkpoint response of glioblastoma stem cells through NBS1 : L1CAM regulates checkpoint of GBM stem cells. *The EMBO Journal*, 30(5), 800-813. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.10>
- Chin, K., DeVries, S., Fridlyand, J., Spellman, P. T., Roydasgupta, R., Kuo, W.-L., Lapuk, A., Neve, R. M., Qian, Z., Ryder, T., Chen, F., Feiler, H., Tokuyasu, T., Kingsley, C., Dairkee, S., Meng, Z., Chew, K., Pinkel, D., Jain, A., ... Gray, J. W. (2006). Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies. *Cancer Cell*, 10(6), 529-541. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.009>
- Choi, S., Yu, J., Park, A., Dubon, M. J., Do, J., Kim, Y., Nam, D., Noh, J., & Park, K.-S. (2019). BMP-4 enhances epithelial mesenchymal transition and cancer stem cell properties of breast cancer cells via Notch signaling. *Scientific Reports*, 9(1), 11724. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48190-5>
- Choo, J. R., & Nielsen, T. O. (2010). Biomarkers for Basal-like Breast Cancer. *Cancers*, 2(2), 1040-1065. <https://doi.org/10.3390/cancers2021040>
- Chopra, N., Tovey, H., Pearson, A., Cutts, R., Toms, C., Proszek, P., Hubank, M., Dowsett, M., Dodson, A., Daley, F., Kriplani, D., Gevensleben, H., Davies, H. R., Degasperis, A., Roynance, R., Chan, S., Tutt, A., Skene, A., Evans, A., ... Turner, N. C. (2020). Homologous recombination DNA repair deficiency and PARP inhibition activity in primary triple negative breast cancer. *Nature Communications*, 11(1), 2662. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16142-7>
- Choy, L., Hagenbeek, T. J., Solon, M., French, D., Finkle, D., Shelton, A., Venook, R., Brauer, M. J., & Siebel, C. W. (2017). Constitutive NOTCH3 Signaling Promotes the Growth of Basal Breast Cancers. *Cancer Research*, 77(6), 1439-1452. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1022>
- Colavito, S. A., Zou, M. R., Yan, Q., Nguyen, D. X., & Stern, D. F. (2014). Significance of glioma-associated oncogene homolog 1 (GLI1) expression in claudin-low breast cancer and crosstalk with the nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NFκB) pathway. *Breast Cancer Research*, 16(5), 444. <https://doi.org/10.1186/s13058-014-0444-4>
- Coleman, R. L., Fleming, G. F., Brady, M. F., Swisher, E. M., Steffensen, K. D., Friedlander, M., Okamoto, A., Moore, K. N., Efrat Ben-Baruch, N., Werner, T. L., Cloven, N. G., Oaknin, A., DiSilvestro, P. A., Morgan, M. A., Nam, J.-H., Leath, C. A., Nicum, S., Hagemann, A. R., Littell, R. D., ... Bookman, M. A. (2019).

- Veliparib with First-Line Chemotherapy and as Maintenance Therapy in Ovarian Cancer. *New England Journal of Medicine*, 381(25), 2403-2415. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1909707>
- Colleluori, G., Perugini, J., Barbatelli, G., & Cinti, S. (2021). Mammary gland adipocytes in lactation cycle, obesity and breast cancer. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 22(2), 241-255. <https://doi.org/10.1007/s11154-021-09633-5>
- Conneely, O. M., Jericevic, B. M., & Lydon, J. P. (2003). Progesterone Receptors in Mammary Gland Development and Tumorigenesis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*.
- Corradini, E., Babitt, J. L., & Lin, H. Y. (2009). The RGM/DRAGON family of BMP co-receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 20(5-6), 389-398. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.10.008>
- Cortés, J., Cescon, D. W., Rugo, H. S., Im, S.-A., Md Yusof, M., Gallardo, C., Lipatov, O., Barrios, C. H., Perez-Garcia, J., Iwata, H., Masuda, N., Torregroza Otero, M., Gokmen, E., Loi, S., Guo, Z., Zhou, X., Karantza, V., Pan, W., & Schmid, P. (2021). LBA16 KEYNOTE-355 : Final results from a randomized, double-blind phase III study of first-line pembrolizumab + chemotherapy vs placebo + chemotherapy for metastatic TNBC. *Annals of Oncology*, 32, S1289-S1290. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.08.2089>
- Couch, F. J., Hart, S. N., Sharma, P., Toland, A. E., Wang, X., Miron, P., Olson, J. E., Godwin, A. K., Pankratz, V. S., Olswold, C., Slettedahl, S., Hallberg, E., Guidugli, L., Davila, J. I., Beckmann, M. W., Janni, W., Rack, B., Ekici, A. B., Slamon, D. J., ... Fasching, P. A. (2015). Inherited Mutations in 17 Breast Cancer Susceptibility Genes Among a Large Triple-Negative Breast Cancer Cohort Unselected for Family History of Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 33(4), 304-311. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.57.1414>
- Cousineau, I., & Belmaaza, A. (2007). BRCA1 Haploinsufficiency, but not Heterozygosity for a BRCA1-truncating Mutation, Deregulates Homologous Recombination. *Cell Cycle*, 6(8), 962-971. <https://doi.org/10.4161/cc.6.8.4105>
- Cousineau, I., & Belmaaza, A. (2011). EMSY overexpression disrupts the BRCA2/RAD51 pathway in the DNA-damage response : Implications for chromosomal instability/recombination syndromes as checkpoint diseases. *Molecular Genetics and Genomics*, 285(4), 325-340. <https://doi.org/10.1007/s00438-011-0612-5>
- Croker, A. K., & Allan, A. L. (2012). Inhibition of aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity reduces chemotherapy and radiation resistance of stem-like ALDHhiCD44+ human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 133(1), 75-87. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1692-y>
- Croker, A. K., Goodale, D., Chu, J., Postenka, C., Hedley, B. D., Hess, D. A., & Allan, A. L. (2009). High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(8b), 2236-2252. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00455.x>
- Cruz, C., Castroviejo-Bermejo, M., Gutiérrez-Enríquez, S., Llop-Guevara, A., Ibrahim, Y. H., Gris-Oliver, A., Bonache, S., Morancho, B., Bruna, A., Rueda, O. M., Lai, Z., Polanska, U. M., Jones, G. N., Kristel, P., de Bustos, L., Guzman, M., Rodríguez, O., Grueso, J., Montalban, G., ... Serra, V. (2018). RAD51 foci as a functional biomarker of homologous recombination repair and PARP inhibitor resistance in germline BRCA-mutated breast cancer. *Annals of Oncology*, 29(5), 1203-1210. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy099>
- Daemen, A., Wolf, D. M., Korkola, J. E., Griffith, O. L., Frankum, J. R., Brough, R., Jakkula, L. R., Wang, N. J., Natrajan, R., Reis-Filho, J. S., Lord, C. J., Ashworth, A., Spellman, P. T., Gray, J. W., & van't Veer, L. J. (2012). Cross-platform pathway-based analysis identifies markers of response to the PARP inhibitor olaparib. *Breast Cancer Research and Treatment*, 135(2), 505-517. <https://doi.org/10.1007/s10549-012-2188-0>
- Daniel, C. W. (s. d.). *The Role of TGF-13 in Patterning and Growth of the Mammary Ductal Tree*.
- Dansonka-Mieszkowska, A., Kluska, A., Moes, J., Dabrowska, M., Nowakowska, D., Niwinska, A., Derlatka, P., Cendrowski, K., & Kupryjanczyk, J. (2010). A novel germline PALB2 deletion in Polish breast and ovarian cancer patients. *BMC Medical Genetics*, 11(1), 20. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-11-20>
- Davies, H., Glodzik, D., Morganella, S., Yates, L. R., Staaf, J., Zou, X., Ramakrishna, M., Martin, S., Boyault, S., Sieuwerts, A. M., Simpson, P. T., King, T. A., Raine, K., Eyfjord, J. E., Kong, G., Borg, Å., Birney, E., Stunnenberg, H. G., van de Vijver, M. J., ... Nik-Zainal, S. (2017). HRDetect is a predictor of BRCA1 and BRCA2 deficiency based on mutational signatures. *Nature Medicine*, 23(4), 517-525. <https://doi.org/10.1038/nm.4292>
- De Summa, S., Pinto, R., Pilato, B., Sambiasi, D., Porcelli, L., Guida, G., Mattioli, E., Paradiso, A., Merla, G., Micale, L., De Nittis, P., & Tommasi, S. (2014). Expression of base excision repair key factors and miR17

- in familial and sporadic breast cancer. *Cell Death & Disease*, 5(2), e1076-e1076. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.30>
- De Summa, S., Pinto, R., Sambiasi, D., Petriella, D., Paradiso, V., Paradiso, A., & Tommasi, S. (2013). BRCAness : A deeper insight into basal-like breast tumors. *Annals of Oncology*, 24, viii13-viii21. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt306>
- De Visser, K. E., Ciampricotti, M., Michalak, E. M., Tan, D. W., Speksnijder, E. N., Hau, C., Clevers, H., Barker, N., & Jonkers, J. (2012). Developmental stage-specific contribution of LGR5⁺ cells to basal and luminal epithelial lineages in the postnatal mammary gland. *The Journal of Pathology*, 228(3), 300-309. <https://doi.org/10.1002/path.4096>
- de Bono, J., Mateo, J., Fizazi, K., Saad, F., Shore, N., Sandhu, S., Chi, K. N., Sartor, O., Agarwal, N., Olmos, D., Thiery-Vuillemin, A., Twardowski, P., Mehra, N., Goessl, C., Kang, J., Bургents, J., Wu, W., Kohlmann, A., Adelman, C. A., & Hussain, M. (2020). Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*, 382(22), 2091-2102. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1911440>
- Deome, K. B., Faulkin, L. J., Bern, H. A., & Blair, P. B. (1959). Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice. *Cancer Research*, 19(5), 515-520.
- Derynck, R., & Zhang, Y. E. (2003). *Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling*. 425.
- Desai, A., Webb, B., & Gerson, S. L. (2014). CD133+ cells contribute to radioresistance via altered regulation of DNA repair genes in human lung cancer cells. *Radiotherapy and Oncology*, 110(3), 538-545. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.10.040>
- Deshmukh, A., Arfuso, F., Newsholme, P., & Dharmarajan, A. (2018). Regulation of Cancer Stem Cell Metabolism by Secreted Frizzled-Related Protein 4 (sFRP4). *Cancers*, 10(2), 40. <https://doi.org/10.3390/cancers10020040>
- Deshmukh, A. P., den Hollander, P., Kuburich, N. A., Vasaikar, S., Joseph, R., & Mani, S. A. (2022). Enrichment of Cancer Stem Cells in a Tumorsphere Assay. In N. Kannan & P. Beer (Éds.), *Stem Cell Assays : Methods and Protocols* (p. 501-507). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1979-7_34
- Deugnier, M.-A., Teulière, J., Faraldo, M. M., Thiery, J. P., & Glukhova, M. A. (2002). The importance of being a myoepithelial cell. *Breast Cancer Research*, 4(6), 224. <https://doi.org/10.1186/bcr459>
- Dev, H., Chiang, T.-W. W., Lescale, C., De Krijger, I., Martin, A. G., Pilger, D., Coates, J., Sczaniecka-Clift, M., Wei, W., Ostermaier, M., Herzog, M., Lam, J., Shea, A., Demir, M., Wu, Q., Yang, F., Fu, B., Lai, Z., Balmus, G., ... Jackson, S. P. (2018). Shieldin complex promotes DNA end-joining and counters homologous recombination in BRCA1-null cells. *Nature Cell Biology*, 20(8), 954-965. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0140-1>
- Di, L., Liu, L.-J., Yan, Y.-M., Fu, R., Li, Y., Xu, Y., Cheng, Y.-X., & Wu, Z.-Q. (2019). Discovery of a natural small-molecule compound that suppresses tumor EMT, stemness and metastasis by inhibiting TGF β /BMP signaling in triple-negative breast cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1), 134. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1130-2>
- Dias, M. P., Moser, S. C., Ganesan, S., & Jonkers, J. (2021). Understanding and overcoming resistance to PARP inhibitors in cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 18(12), 773-791. <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00532-x>
- Diehn, M., Cho, R. W., Lobo, N. A., Kalisky, T., Dorie, M. J., Kulp, A. N., Qian, D., Lam, J. S., Ailles, L. E., Wong, M., Joshua, B., Kaplan, M. J., Wapnir, I., Dirbas, F. M., Somlo, G., Garberoglio, C., Paz, B., Shen, J., Lau, S. K., ... Clarke, M. F. (2009). Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature*, 458(7239), 780-783. <https://doi.org/10.1038/nature07733>
- Diéras, V., Han, H. S., Kaufman, B., Wildiers, H., Friedlander, M., Ayoub, J.-P., Puhalla, S. L., Bondarenko, I., Campone, M., Jakobsen, E. H., Jalving, M., Oprean, C., Palácová, M., Park, Y. H., Shparyk, Y., Yañez, E., Khandelwal, N., Kundu, M. G., Dudley, M., ... Arun, B. K. (2020). Veliparib with carboplatin and paclitaxel in BRCA-mutated advanced breast cancer (BROCADE3): A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 21(10), 1269-1282. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30447-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30447-2)
- DiMeo, T. A., Anderson, K., Phadke, P., Feng, C., Perou, C. M., Naber, S., & Kuperwasser, C. (2009). A Novel Lung Metastasis Signature Links Wnt Signaling with Cancer Cell Self-Renewal and Epithelial-Mesenchymal Transition in Basal-like Breast Cancer. *Cancer Research*, 69(13), 5364-5373. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4135>
- Dionísio, M. R., Vieira, A. F., Carvalho, R., Conde, I., Oliveira, M., Gomes, M., Pinto, M. T., Pereira, P., Pimentel, J., Souza, C., Marques, M. M. C., Duval Da Silva, V., Barroso, A., Preto, D., Cameselle-Teijeiro, J. F.,

- Schmitt, F., Ribeiro, A. S., & Paredes, J. (2020). BR-BCSC Signature : The Cancer Stem Cell Profile Enriched in Brain Metastases that Predicts a Worse Prognosis in Lymph Node-Positive Breast Cancer. *Cells*, 9(11), 2442. <https://doi.org/10.3390/cells9112442>
- Domagala, P., Huzarski, T., Lubinski, J., Gugala, K., & Domagala, W. (2011). Immunophenotypic predictive profiling of BRCA1-associated breast cancer. *Virchows Archiv*, 458(1), 55-64. <https://doi.org/10.1007/s00428-010-0988-3>
- Domenici, G., Aurrekoetxea-Rodríguez, I., Simões, B. M., Rábano, M., Lee, S. Y., Millán, J. S., Comaills, V., Oliemuller, E., López-Ruiz, J. A., Zabalza, I., Howard, B. A., Kypta, R. M., & Vivanco, M. dM. (2019). A Sox2–Sox9 signalling axis maintains human breast luminal progenitor and breast cancer stem cells. *Oncogene*, 38(17), 3151-3169. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0656-7>
- Dontu, G., Abdallah, W. M., Foley, J. M., Jackson, K. W., Clarke, M. F., Kawamura, M. J., & Wicha, M. S. (2003). In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes & Development*, 17(10), 1253-1270. <https://doi.org/10.1101/gad.1061803>
- Dunbar, M. E., & Wysolmerski, J. J. (s. d.). *Parathyroid Hormone-Related Protein : A Developmental Regulatory Molecule Necessary for Mammary Gland Development*.
- Easton, D. F., Pharoah, P. D. P., Antoniou, A. C., Tischkowitz, M., Tavtigian, S. V., Nathanson, K. L., Devilee, P., Meindl, A., Couch, F. J., Southey, M., Goldgar, D. E., Evans, D. G. R., Chenevix-Trench, G., Rahman, N., Robson, M., Domchek, S. M., & Foulkes, W. D. (2015). Gene-Panel Sequencing and the Prediction of Breast-Cancer Risk. *New England Journal of Medicine*, 372(23), 2243-2257. <https://doi.org/10.1056/NEJMSr1501341>
- Eckhardt, B. L., Cao, Y., Redfern, A. D., Chi, L. H., Burrows, A. D., Roslan, S., Sloan, E. K., Parker, B. S., Loi, S., Ueno, N. T., Lau, P. K. H., Latham, B., & Anderson, R. L. (2020). Activation of Canonical BMP4-SMAD7 Signaling Suppresses Breast Cancer Metastasis. *Cancer Research*, 80(6), 1304-1315. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0743>
- Eeckhoutte, A., Houy, A., Manié, E., Reverdy, M., Bièche, I., Marangoni, E., Goundiam, O., Vincent-Salomon, A., Stoppa-Lyonnet, D., Bidard, F.-C., Stern, M.-H., & Popova, T. (2020). ShallowHRD : Detection of homologous recombination deficiency from shallow whole genome sequencing. *Bioinformatics*, 36(12), 3888-3889. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa261>
- Eikesdal, H. P., Yndestad, S., Elzawahry, A., Llop-Guevara, A., Gilje, B., Blix, E. S., Espelid, H., Lundgren, S., Geisler, J., Vagstad, G., Venizelos, A., Minsaas, L., Leirvaag, B., Gudlaugsson, E. G., Vintermyr, O. K., Aase, H. S., Aas, T., Balmaña, J., Serra, V., ... Lønning, P. E. (2021). Olaparib monotherapy as primary treatment in unselected triple negative breast cancer. *Annals of Oncology*, 32(2), 240-249. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.11.009>
- Eirew, P., Stingl, J., Raouf, A., Turashvili, G., Aparicio, S., Emerman, J. T., & Eaves, C. J. (2008). A method for quantifying normal human mammary epithelial stem cells with in vivo regenerative ability. *Nature Medicine*, 14(12), 1384-1389. <https://doi.org/10.1038/nm.1791>
- Elango, R., Sheng, Z., Jackson, J., DeCata, J., Ibrahim, Y., Pham, N. T., Liang, D. H., Sakofsky, C. J., Vindigni, A., Lobachev, K. S., Ira, G., & Malkova, A. (2017). Break-induced replication promotes formation of lethal joint molecules dissolved by Srs2. *Nature Communications*, 8(1), 1790. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01987-2>
- Elias, S., Morgan, M. A., Bikoff, E. K., & Robertson, E. J. (2017). Long-lived unipotent Blimp1-positive luminal stem cells drive mammary gland organogenesis throughout adult life. *Nature Communications*, 8(1), 1714. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01971-w>
- Elston, C. W., & Ellis, I. O. (1991). pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer : Experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 19(5), 403-410. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x>
- Erkko, H., Xia, B., Nikkilä, J., Schleutker, J., Syrjäkoski, K., Mannermaa, A., Kallioniemi, A., Pykäs, K., Karppinen, S.-M., Rapakko, K., Miron, A., Sheng, Q., Li, G., Mattila, H., Bell, D. W., Haber, D. A., Grip, M., Reiman, M., Jukkola-Vuorinen, A., ... Winqvist, R. (2007). A recurrent mutation in PALB2 in Finnish cancer families. *Nature*, 446(7133), 316-319. <https://doi.org/10.1038/nature05609>
- Esteller, M. (2000). Promoter Hypermethylation and BRCA1 Inactivation in Sporadic Breast and Ovarian Tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(7), 564-569. <https://doi.org/10.1093/jnci/92.7.564>
- Fallahpour, S., Navaneelan, T., De, P., & Borgo, A. (2017). Breast cancer survival by molecular subtype : A population-based analysis of cancer registry data. *CMAJ Open*, 5(3), E734-E739. <https://doi.org/10.9778/cmajo.20170030>

- Fan, C., & Weigelt, B. (2006). Concordance among Gene-Expression–Based Predictors for Breast Cancer. *N Engl J Med*.
- Farmer, H., McCabe, N., Lord, C. J., Tutt, A. N. J., Johnson, D. A., Richardson, T. B., Santarosa, M., Dillon, K. J., Hickson, I., Knights, C., Martin, N. M. B., Jackson, S. P., Smith, G. C. M., & Ashworth, A. (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*, *434*(7035), 917-921. <https://doi.org/10.1038/nature03445>
- Fasching, P. A., Link, T., Hauke, J., Seither, F., Jackisch, C., Klare, P., Schmatloch, S., Hanusch, C., Huober, J., Stefek, A., Seiler, S., Schmitt, W. D., Uleer, C., Doering, G., Rhiem, K., Schneeweiss, A., Engels, K., Denkert, C., Schmutzler, R. K., ... Loibl, S. (2021). Neoadjuvant paclitaxel/olaparib in comparison to paclitaxel/carboplatinum in patients with HER2-negative breast cancer and homologous recombination deficiency (GeparOLA study). *Annals of Oncology*, *32*(1), 49-57. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.10.471>
- Feng, L., Li, N., Li, Y., Wang, J., Gao, M., Wang, W., & Chen, J. (2015). Cell cycle-dependent inhibition of 53BP1 signaling by BRCA1. *Cell Discovery*, *1*(1), 15019. <https://doi.org/10.1038/celldisc.2015.19>
- Fillmore, C. M., & Kuperwasser, C. (2008). Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Research*, *10*(2), R25. <https://doi.org/10.1186/bcr1982>
- Fkih M'hamed, I., Privat, M., Ponelle, F., Penault-Llorca, F., Kenani, A., & Bignon, Y.-J. (2015). Identification of miR-10b, miR-26a, miR-146a and miR-153 as potential triple-negative breast cancer biomarkers. *Cellular Oncology*, *38*(6), 433-442. <https://doi.org/10.1007/s13402-015-0239-3>
- Fontaine, C., Renard, V., Van den Bulk, H., Vuylsteke, P., Glorieux, P., Dopchie, C., Decoster, L., Vanacker, L., de Azambuja, E., De Greve, J., Awada, A., & Wildiers, H. (2019). Weekly carboplatin plus neoadjuvant anthracycline-taxane-based regimen in early triple-negative breast cancer : A prospective phase II trial by the Breast Cancer Task Force of the Belgian Society of Medical Oncology (BSMO). *Breast Cancer Research and Treatment*, *176*(3), 607-615. <https://doi.org/10.1007/s10549-019-05259-z>
- Forget, M.-A., Turcotte, S., Beauseigle, D., Godin-Ethier, J., Pelletier, S., Martin, J., Tanguay, S., & Lapointe, R. (2007). The Wnt pathway regulator DKK1 is preferentially expressed in hormone-resistant breast tumours and in some common cancer types. *British Journal of Cancer*, *96*(4), 646-653. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603579>
- Foulkes, W. D. (2003). Germline BRCA1 Mutations and a Basal Epithelial Phenotype in Breast Cancer. *CancerSpectrum Knowledge Environment*, *95*(19), 1482-1485. <https://doi.org/10.1093/jnci/djg050>
- Foulkes, W. D., Ghadirian, P., Akbari, M. R., Hamel, N., Giroux, S., Sabbaghian, N., Darnel, A., Royer, R., Poll, A., Fafard, E., Robidoux, A., Martin, G., Bismar, T. A., Tischkowitz, M., Rousseau, F., & Narod, S. A. (2007). Identification of a novel truncating PALB2 mutation and analysis of its contribution to early-onset breast cancer in French-Canadian women. *Breast Cancer Research*, *9*(6), R83. <https://doi.org/10.1186/bcr1828>
- Francis, R., & Richardson, C. (2007). Multipotent hematopoietic cells susceptible to alternative double-strand break repair pathways that promote genome rearrangements. *Genes & Development*, *21*(9), 1064-1074. <https://doi.org/10.1101/gad.1522807>
- French, R., Hayward, O., Jones, S., Yang, W., & Clarkson, R. (2015). Cytoplasmic levels of cFLIP determine a broad susceptibility of breast cancer stem/progenitor-like cells to TRAIL. *Molecular Cancer*, *14*(1), 209. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0478-y>
- Fu, N. Y., Rios, A. C., Pal, B., Law, C. W., Jamieson, P., Liu, R., Vaillant, F., Jackling, F., Liu, K. H., Smyth, G. K., Lindeman, G. J., Ritchie, M. E., & Visvader, J. E. (2017). Identification of quiescent and spatially restricted mammary stem cells that are hormone responsive. *Nature Cell Biology*, *19*(3), 164-176. <https://doi.org/10.1038/ncb3471>
- Fulford, L. G., Easton, D. F., Reis-Filho, J. S., Sofronis, A., Gillett, C. E., Lakhani, S. R., & Hanby, A. (2006). Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. *Histopathology*, *49*(1), 22-34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2006.02453.x>
- Fulford, L. G., Reis-Filho, J. S., Ryder, K., Jones, C., Gillett, C. E., Hanby, A., Easton, D., & Lakhani, S. R. (2007). Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast : Patterns of metastasis and long-term survival. *Breast Cancer Research*, *9*(1), R4. <https://doi.org/10.1186/bcr1636>
- Furuta, S., Jiang, X., Gu, B., Cheng, E., Chen, P.-L., & Lee, W.-H. (2005). Depletion of BRCA1 impairs differentiation but enhances proliferation of mammary epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(26), 9176-9181. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503793102>
- Garcia, A. I., Buisson, M., Bertrand, P., Rimokh, R., Rouleau, E., Lopez, B. S., Lidereau, R., Mikaélian, I., & Mazoyer, S. (2011). Down-regulation of BRCA1 expression by miR-146a and miR-146b-5p in triple

- negative sporadic breast cancers. *EMBO Molecular Medicine*, 3(5), 279-290. <https://doi.org/10.1002/emmm.201100136>
- García, M. J., Fernández, V., Osorio, A., Barroso, A., Llorca, G., Lázaro, C., Blanco, I., Caldés, T., de la Hoya, M., Ramón y Cajal, T., Alonso, C., Tejada, M.-I., San Román, C., Robles-Díaz, L., Urioste, M., & Benítez, J. (2009). Analysis of FANCB and FANCN/PALB2 Fanconi Anemia genes in BRCA1/2-negative Spanish breast cancer families. *Breast Cancer Research and Treatment*, 113(3), 545-551. <https://doi.org/10.1007/s10549-008-9945-0>
- García-Escolano, M., Montoyo-Pujol, Y. G., Ortiz-Martínez, F., Ponce, J. J., Delgado-García, S., Martín, T. A., Ballester, H., Aranda, F. I., Castellón-Molla, E., Sempere-Ortells, J. M., & Peiro, G. (2021). ID1 and ID4 Are Biomarkers of Tumor Aggressiveness and Poor Outcome in Immunophenotypes of Breast Cancer. *Cancers*, 13(3), 492. <https://doi.org/10.3390/cancers13030492>
- Garulli, C., Kalogris, C., Pietrella, L., Bartolacci, C., Andreani, C., Falconi, M., Marchini, C., & Amici, A. (2014). Dorsomorphin reverses the mesenchymal phenotype of breast cancer initiating cells by inhibition of bone morphogenetic protein signaling. *Cellular Signalling*, 26(2), 352-362. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.11.022>
- Gelmon, K. A., Tischkowitz, M., Mackay, H., Swenerton, K., Robidoux, A., Tonkin, K., Hirte, H., Huntsman, D., Clemons, M., Gilks, B., Yerushalmi, R., Macpherson, E., Carmichael, J., & Oza, A. (2011). Olaparib in patients with recurrent high-grade serous or poorly differentiated ovarian carcinoma or triple-negative breast cancer : A phase 2, multicentre, open-label, non-randomised study. *The Lancet Oncology*, 12(9), 852-861. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70214-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70214-5)
- Gennari, A., André, F., Barrios, C. H., Cortés, J., De Azambuja, E., DeMichele, A., Dent, R., Fenlon, D., Gligorov, J., Hurvitz, S. A., Im, S.-A., Krug, D., Kunz, W. G., Loi, S., Penault-Llorca, F., Ricke, J., Robson, M., Rugo, H. S., Saura, C., ... Harbeck, N. (2021). ESMO Clinical Practice Guideline for the diagnosis, staging and treatment of patients with metastatic breast cancer. *Annals of Oncology*, 32(12), 1475-1495. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.09.019>
- Geyer, C. E., Garber, J. E., Gelber, R. D., Yothers, G., Taboada, M., Ross, L., Rastogi, P., Cui, K., Arahmani, A., Aktan, G., Armstrong, A. C., Arnedos, M., Balmaña, J., Bergh, J., Bliss, J., Delalogue, S., Domchek, S. M., Eisen, A., Elsayf, F., ... Cho, E. K. (2022). Overall survival in the OlympiA phase III trial of adjuvant olaparib in patients with germline pathogenic variants in BRCA1/2 and high-risk, early breast cancer. *Annals of Oncology*, 33(12), 1250-1268. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.09.159>
- Geyer, F. C., Lacroix-Triki, M., Savage, K., Arnedos, M., Lambros, M. B., MacKay, A., Natrajan, R., & Reis-Filho, J. S. (2011). β -Catenin pathway activation in breast cancer is associated with triple-negative phenotype but not with CTNNB1 mutation. *Modern Pathology*, 24(2), 209-231. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.205>
- Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Fiska, A., & Koukourakis, M. I. (2011). The CD44+/CD24- phenotype relates to 'triple-negative' state and unfavorable prognosis in breast cancer patients. *Medical Oncology*, 28(3), 745-752. <https://doi.org/10.1007/s12032-010-9530-3>
- Ginestier, C., Hur, M. H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Jacquemier, J., Viens, P., Kleer, C. G., Liu, S., Schott, A., Hayes, D., Birnbaum, D., Wicha, M. S., & Dontu, G. (2007). ALDH1 is a Marker of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome. *Cell Stem Cell*, 1(5), 555-567. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.08.014>
- Ginestier, C., Liu, S., Diebel, M. E., Korkaya, H., Luo, M., Brown, M., Wicinski, J., Cabaud, O., Charafe-Jauffret, E., Birnbaum, D., Guan, J.-L., Dontu, G., & Wicha, M. S. (2010). CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts. *Journal of Clinical Investigation*, 120(2), 485-497. <https://doi.org/10.1172/JCI39397>
- Girardi, R. R., Chung, C.-Y., Heinz, R. E., Balcioglu, O., Novotny, M., Trejo, C. L., Dravis, C., Hagos, B. M., Mehrabad, E. M., Rodewald, L. W., Hwang, J. Y., Fan, C., Lasken, R., Varley, K. E., Perou, C. M., Wahl, G. M., & Spike, B. T. (2018). Single-Cell Transcriptomes Distinguish Stem Cell State Changes and Lineage Specification Programs in Early Mammary Gland Development. *Cell Reports*, 24(6), 1653-1666.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.025>
- Gluz, O., Nitz, U., Kolberg-Liedtke, C., Prat, A., Christgen, M., Kuemmel, S., Mohammadian, M. P., Gebauer, D., Kates, R., Paré, L., Grischke, E.-M., Forstbauer, H., Braun, M., Warm, M., Hackmann, J., Uleer, C., Aktas, B., Schumacher, C., Wuerstlein, R., ... on behalf of the ADAPT TN investigators. (2022). De-escalated Neoadjuvant Chemotherapy in Early Triple-Negative Breast Cancer (TNBC): Impact of Molecular Markers and Final Survival Analysis of the WSG-ADAPT-TN Trial. *Clinical Cancer Research*, 28(22), 4995-5003. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-22-0482>

- Goel, H. L., Pursell, B., Chang, C., Shaw, L. M., Mao, J., Simin, K., Kumar, P., Kooi, C. W. V., Shultz, L. D., Greiner, D. L., Norum, J. H., Toftgard, R., Kuperwasser, C., & Mercurio, A. M. (2013). GLI1 regulates a novel neuropilin-2/ α 6 β 1 integrin based autocrine pathway that contributes to breast cancer initiation. *EMBO Molecular Medicine*, 5(4), 488-508. <https://doi.org/10.1002/emmm.201202078>
- Gomes, A. M., Bhat, R., Correia, A. L., Mott, J. D., Ilan, N., Vlodavsky, I., Pavão, M. S. G., & Bissell, M. (2015). Mammary Branching Morphogenesis Requires Reciprocal Signaling by Heparanase and MMP-14 : HEPARANASE REGULATES MAMMARY BRANCHING MORPHOGENESIS. *Journal of Cellular Biochemistry*, 116(8), 1668-1679. <https://doi.org/10.1002/jcb.25127>
- Gonzalez, M. E., Moore, H. M., Li, X., Toy, K. A., Huang, W., Sabel, M. S., Kidwell, K. M., & Kleer, C. G. (2014). EZH2 expands breast stem cells through activation of NOTCH1 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(8), 3098-3103. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308953111>
- Gonzalez-Angulo, A. M., Timms, K. M., Liu, S., Chen, H., Litton, J. K., Potter, J., Lanchbury, J. S., Stemke-Hale, K., Hennessy, B. T., Arun, B. K., Hortobagyi, G. N., Do, K.-A., Mills, G. B., & Meric-Bernstam, F. (2011). Incidence and Outcome of BRCA Mutations in Unselected Patients with Triple Receptor-Negative Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 17(5), 1082-1089. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2560>
- González-Martín, A., Pothuri, B., Vergote, I., DePont Christensen, R., Graybill, W., Mirza, M. R., McCormick, C., Lorusso, D., Hoskins, P., Freyer, G., Baumann, K., Jardon, K., Redondo, A., Moore, R. G., Vulsteke, C., O’Cearbhaill, R. E., Lund, B., Backes, F., Barretina-Ginesta, P., ... Monk, B. J. (2019). Niraparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *New England Journal of Medicine*, 381(25), 2391-2402. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1910962>
- Goundiam, O., Gestraud, P., Popova, T., De la Motte Rouge, T., Fourchotte, V., Gentien, D., Hupé, P., Becette, V., Houdayer, C., Roman-Roman, S., Stern, M.-H., & Sastre-Garau, X. (2015). Histo-genomic stratification reveals the frequent amplification/overexpression of CCNE1 and BRD4 genes in non-BRCAness high grade ovarian carcinoma. *International Journal of Cancer*, 137(8), 1890-1900. <https://doi.org/10.1002/ijc.29568>
- Gouon-Evans, V., Lin, E. Y., & Pollard, J. W. (2002). Requirement of macrophages and eosinophils and their cytokines/chemokines for mammary gland development. *Breast Cancer Research*, 4(4), 155. <https://doi.org/10.1186/bcr441>
- Graeser, M., McCarthy, A., Lord, C. J., Savage, K., Hills, M., Salter, J., Orr, N., Parton, M., Smith, I. E., Reis-Filho, J. S., Dowsett, M., Ashworth, A., & Turner, N. C. (2010). A Marker of Homologous Recombination Predicts Pathologic Complete Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Primary Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 16(24), 6159-6168. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1027>
- Grier, D., Thompson, A., Kwasniewska, A., McGonigle, G., Halliday, H., & Lappin, T. (2005). The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. *The Journal of Pathology*, 205(2), 154-171. <https://doi.org/10.1002/path.1710>
- Gudjonsson, T., Adriance, M. C., Sternlicht, M. D., Petersen, O. W., & Bissell, M. J. (2005). Myoepithelial Cells : Their Origin and Function in Breast Morphogenesis and Neoplasia. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 10(3), 261-272. <https://doi.org/10.1007/s10911-005-9586-4>
- Gudjonsson, T., Villadsen, R., Nielsen, H. L., Rønnow-Jessen, L., Bissell, M. J., & Petersen, O. W. (2002). Isolation, immortalization, and characterization of a human breast epithelial cell line with stem cell properties. *Genes & Development*, 16(6), 693-706. <https://doi.org/10.1101/gad.952602>
- Guirouilh-Barbat, J., Yu, W., Babin, L., Galende, E. Y., Popova, T., So, A., Lescale, C., Stern, M.-H., Brunet, E., Deriano, L., & Lopez, B. S. (2019). RAD51 promotes non-homologous genetic rearrangements that are prevented by 53BP1 [Preprint]. *Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1101/768788>
- Gulhan, D. C., Lee, J. J.-K., Melloni, G. E. M., Cortés-Ciriano, I., & Park, P. J. (2019). Detecting the mutational signature of homologous recombination deficiency in clinical samples. *Nature Genetics*, 51(5), 912-919. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0390-2>
- Guo, D., Huang, J., & Gong, J. (2012). Bone morphogenetic protein 4 (BMP4) is required for migration and invasion of breast cancer. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 363(1-2), 179-190. <https://doi.org/10.1007/s11010-011-1170-1>
- Guo, W., Keckesova, Z., Donaher, J. L., Shibue, T., Tischler, V., Reinhardt, F., Itzkovitz, S., Noske, A., Zürcher-Härdi, U., Bell, G., Tam, W. L., Mani, S. A., van Oudenaarden, A., & Weinberg, R. A. (2012). Slug and Sox9 Cooperatively Determine the Mammary Stem Cell State. *Cell*, 148(5), 1015-1028. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.008>

- Gwak, J. M., Kim, M., Kim, H. J., Jang, M. H., & Park, S. Y. (2017). Expression of embryonal stem cell transcription factors in breast cancer : Oct4 as an indicator for poor clinical outcome and tamoxifen resistance. *Oncotarget*, *8*(22), 36305-36318. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16750>
- Han, B., Qu, Y., Jin, Y., Yu, Y., Deng, N., Wawrowsky, K., Zhang, X., Li, N., Bose, S., Wang, Q., Sakthiah, S., Abrol, R., Jensen, T. W., Berman, B. P., Tanaka, H., Johnson, J., Gao, B., Hao, J., Liu, Z., ... Cui, X. (2015). FOXC1 Activates Smoothed-Independent Hedgehog Signaling in Basal-like Breast Cancer. *Cell Reports*, *13*(5), 1046-1058. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.063>
- Hardt, O., Wild, S., Oerlecke, I., Hofmann, K., Luo, S., Wienczek, Y., Kantelhardt, E., Vess, C., Smith, G. P., Schroth, G. P., Bosio, A., & Dittmer, J. (2012). Highly sensitive profiling of CD44+/CD24- breast cancer stem cells by combining global mRNA amplification and next generation sequencing : Evidence for a hyperactive PI3K pathway. *Cancer Letters*, *325*(2), 165-174. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.06.010>
- Harrison, H., Farnie, G., Howell, S. J., Rock, R. E., Stylianou, S., Brennan, K. R., Bundred, N. J., & Clarke, R. B. (2010). Regulation of Breast Cancer Stem Cell Activity by Signaling through the Notch4 Receptor. *Cancer Research*, *70*(2), 709-718. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1681>
- Hartman, A.-R., Kaldate, R. R., Sailer, L. M., Painter, L., Grier, C. E., Endsley, R. R., Griffin, M., Hamilton, S. A., Frye, C. A., Silberman, M. A., Wenstrup, R. J., & Sandbach, J. F. (2012). Prevalence of BRCA mutations in an unselected population of triple-negative breast cancer. *Cancer*, *118*(11), 2787-2795. <https://doi.org/10.1002/cncr.26576>
- Hartung, A., Bitton-Worms, K., Rechtman, M. M., Wenzel, V., Boergermann, J. H., Hassel, S., Henis, Y. I., & Knaus, P. (2006). Different Routes of Bone Morphogenic Protein (BMP) Receptor Endocytosis Influence BMP Signaling. *Molecular and Cellular Biology*, *26*(20), 7791-7805. <https://doi.org/10.1128/MCB.00022-06>
- Hassaine, Y., Jacquet, E., Seigneurin, A., & Delafosse, P. (2022). Evolution of breast cancer incidence in young women in a French registry from 1990 to 2018 : Towards a change in screening strategy? *Breast Cancer Research*, *24*(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s13058-022-01581-5>
- He, Z., Ghorayeb, R., Tan, S., Chen, K., Lorentzian, A. C., Botton, J., Aalam, S. M. M., Pujana, M. A., Lange, P. F., Kannan, N., Eaves, C. J., & Maxwell, C. A. (2022). Pathogenic BRCA1 variants disrupt PLK1-regulation of mitotic spindle orientation. *Nature Communications*, *13*(1), 2200. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29885-2>
- Heikkinen, T., Kärkkäinen, H., Aaltonen, K., Milne, R. L., Heikkilä, P., Aittomäki, K., Blomqvist, C., & Nevanlinna, H. (2009). The Breast Cancer Susceptibility Mutation *PALB2 1592delT* Is Associated with an Aggressive Tumor Phenotype. *Clinical Cancer Research*, *15*(9), 3214-3222. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-3128>
- Hens, J., Dann, P., Hiremath, M., Pan, T., Chodosh, L., & Wysolmerski, J. (2009). Analysis of gene expression in PTHrP^{-/-} mammary buds supports a role for BMP signaling and MMP2 in the initiation of ductal morphogenesis. *Developmental Dynamics*, *238*(11), 2713-2724. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22097>
- Hens, J. R., Dann, P., Zhang, J.-P., Harris, S., Robinson, G. W., & Wysolmerski, J. (2007). BMP4 and PTHrP interact to stimulate ductal outgrowth during embryonic mammary development and to inhibit hair follicle induction. *Development*, *134*(6), 1221-1230. <https://doi.org/10.1242/dev.000182>
- Hill, S. J., Clark, A. P., Silver, D. P., & Livingston, D. M. (2014). BRCA1 Pathway Function in Basal-Like Breast Cancer Cells. *Molecular and Cellular Biology*, *34*(20), 3828-3842. <https://doi.org/10.1128/MCB.01646-13>
- Hoey, T., Yen, W.-C., Axelrod, F., Basi, J., Donigian, L., Dylla, S., Fitch-Bruhns, M., Lazetic, S., Park, I.-K., Sato, A., Satyal, S., Wang, X., Clarke, M. F., Lewicki, J., & Gurney, A. (2009). DLL4 Blockade Inhibits Tumor Growth and Reduces Tumor-Initiating Cell Frequency. *Cell Stem Cell*, *5*(2), 168-177. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.019>
- Holm, K., Staaf, J., Jönsson, G., Vallon-Christersson, J., Gunnarsson, H., Arason, A., Magnusson, L., Barkardottir, R. B., Hegardt, C., Ringnér, M., & Borg, Å. (2012). Characterisation of amplification patterns and target genes at chromosome 11q13 in CCND1-amplified sporadic and familial breast tumours. *Breast Cancer Research and Treatment*, *133*(2), 583-594. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1817-3>
- Holstege, H., Horlings, H. M., Velds, A., Langerød, A., Børresen-Dale, A.-L., van de Vijver, M. J., Nederlof, P. M., & Jonkers, J. (2010). BRCA1-mutated and basal-like breast cancers have similar aCGH profiles and a high incidence of protein truncating TP53 mutations. *BMC Cancer*, *10*(1), 654. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-654>
- Honeth, G., Bendahl, P.-O., Ringnér, M., Saal, L. H., Gruvberger-Saal, S. K., Lövgren, K., Grabau, D., Fernö, M., Borg, Å., & Hegardt, C. (2008). The CD44+/CD24-phenotype is enriched in basal-like breast tumors. *Breast Cancer Research*, *10*(3), R53. <https://doi.org/10.1186/bcr2108>

- Hoshino, K. (1964). Regeneration and growth of quantitatively transplanted mammary glands of normal female mice. *The Anatomical Record*, 150(3), 221-235. <https://doi.org/10.1002/ar.1091500303>
- Hovey, R. C., Trott, J. F., & Vonderhaar, B. K. (2002). Establishing a Framework for the Functional Mammary Gland : From Endocrinology to Morphology. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*.
- Howlander, N., Cronin, K. A., Kurian, A. W., & Andridge, R. (2018). Differences in Breast Cancer Survival by Molecular Subtypes in the United States. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 27(6), 619-626. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-17-0627>
- Huang, C.-P., Tsai, M.-F., Chang, T.-H., Tang, W.-C., Chen, S.-Y., Lai, H.-H., Lin, T.-Y., Yang, J. C.-H., Yang, P.-C., Shih, J.-Y., & Lin, S.-B. (2013). ALDH-positive lung cancer stem cells confer resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Letters*, 328(1), 144-151. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.08.021>
- Hughes-Davies, L., Huntsman, D., Ruas, M., Fuks, F., Bye, J., Chin, S.-F., Milner, J., Brown, L. A., Hsu, F., Gilks, B., Nielsen, T., Schulzer, M., Chia, S., Ragaz, J., Cahn, A., Linger, L., Ozdag, H., Cattaneo, E., Jordanova, E. S., ... Kouzarides, T. (2003). EMSY Links the BRCA2 Pathway to Sporadic Breast and Ovarian Cancer. *Cell*, 115(5), 523-535. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00930-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00930-9)
- Humphreys, R. C. (s. d.). *Programmed Cell Death in the Terminal Endbud*.
- Humphreys, R. C., Lydon, J., O'Malley, B. W., & Rosen, J. M. (1997). *Mammary Gland Development Is Mediated by Both Stromal and Epithelial Progesterone Receptors*. 11(6).
- Humphreys, R. C., Lydon, J. P., O'Malley, B. W., & Rosen, J. M. (s. d.). *Use of PRKO Mice to Study the Role of Progesterone in Mammary Gland Development*.
- Imanishi, S., Naoi, Y., Shimazu, K., Shimoda, M., Kagara, N., Tanei, T., Miyake, T., Kim, S. J., & Noguchi, S. (2019). Clinicopathological analysis of homologous recombination-deficient breast cancers with special reference to response to neoadjuvant paclitaxel followed by FEC. *Breast Cancer Research and Treatment*, 174(3), 627-637. <https://doi.org/10.1007/s10549-018-05120-9>
- Inman, J. L., Robertson, C., Mott, J. D., & Bissell, M. J. (2015). Mammary gland development : Cell fate specification, stem cells and the microenvironment. *Development*, 142(6), 1028-1042. <https://doi.org/10.1242/dev.087643>
- Isakoff, S. J., Mayer, E. L., He, L., Traina, T. A., Carey, L. A., Krag, K. J., Rugo, H. S., Liu, M. C., Stearns, V., Come, S. E., Timms, K. M., Hartman, A.-R., Borger, D. R., Finkelstein, D. M., Garber, J. E., Ryan, P. D., Winer, E. P., Goss, P. E., & Ellisen, L. W. (2015). TBCRC009 : A Multicenter Phase II Clinical Trial of Platinum Monotherapy With Biomarker Assessment in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 33(17), 1902-1909. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.57.6660>
- Ito, Y., & Miyazono, K. (2003). RUNX transcription factors as key targets of TGF- β superfamily signaling. *Current Opinion in Genetics & Development*, 13(1), 43-47. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(03\)00007-8](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(03)00007-8)
- Jamieson, P. R., Dekkers, J. F., Rios, A. C., Fu, N. Y., Lindeman, G. J., & Visvader, J. E. (2016). Derivation of a robust mouse mammary organoid system for studying tissue dynamics. *Development*, dev.145045. <https://doi.org/10.1242/dev.145045>
- Janatova, M., Zikan, M., Dundr, P., Matous, B., & Pohlreich, P. (2005). Novel somatic mutations in the BRCA1 gene in sporadic breast tumors. *Human Mutation*, 25(3), 319-319. <https://doi.org/10.1002/humu.9308>
- Javed, A., & Lteif, A. (2013). Development of the Human Breast. *Seminars in Plastic Surgery*, 27(01), 005-012. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1343989>
- Jiang, Y.-Z., Ma, D., Suo, C., Shi, J., Xue, M., Hu, X., Xiao, Y., Yu, K.-D., Liu, Y.-R., Yu, Y., Zheng, Y., Li, X., Zhang, C., Hu, P., Zhang, J., Hua, Q., Zhang, J., Hou, W., Ren, L., ... Shao, Z.-M. (2019). Genomic and Transcriptomic Landscape of Triple-Negative Breast Cancers : Subtypes and Treatment Strategies. *Cancer Cell*, 35(3), 428-440.e5. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.02.001>
- Jong, D. S. de, Vaes, B. L. T., Dechering, K. J., Feijen, A., Hendriks, J. M. A., Wehrens, H. R. M. J., Mummery, C. L., Zoelen, E. J. J. van, Olijve, W., & Steegenga, W. T. (2004). Identification of Novel Regulators Associated With Early-Phase Osteoblast Differentiation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 19(6), 947-958. <https://doi.org/10.1359/JBMR.040216>
- Jönsson, G., Naylor, T. L., Vallon-Christersson, J., Staaf, J., Huang, J., Ward, M. R., Greshock, J. D., Luts, L., Olsson, H., Rahman, N., Stratton, M., Ringnér, M., Borg, Å., & Weber, B. L. (2005). Distinct Genomic Profiles in Hereditary Breast Tumors Identified by Array-Based Comparative Genomic Hybridization. *Cancer Research*, 65(17), 7612-7621. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0570>
- Joesse, S. A., Brandwijk, K. I. M., Mulder, L., Wesseling, J., Hannemann, J., & Nederlof, P. M. (2011). Genomic signature of BRCA1 deficiency in sporadic basal-like breast tumors. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 50(2), 71-81. <https://doi.org/10.1002/gcc.20833>

- Joose, S. A., van Beers, E. H., Tielen, I. H. G., Horlings, H., Peterse, J. L., Hoogerbrugge, N., Ligtenberg, M. J., Wessels, L. F. A., Axwijk, P., Verhoef, S., Hogervorst, F. B. L., & Nederlof, P. M. (2009). Prediction of BRCA1-association in hereditary non-BRCA1/2 breast carcinomas with array-CGH. *Breast Cancer Research and Treatment*, *116*(3), 479-489. <https://doi.org/10.1007/s10549-008-0117-z>
- Joshi, P. A., Waterhouse, P. D., Kannan, N., Narala, S., Fang, H., Di Grappa, M. A., Jackson, H. W., Penninger, J. M., Eaves, C., & Khokha, R. (2015). RANK Signaling Amplifies WNT-Responsive Mammary Progenitors through R-SPONDIN1. *Stem Cell Reports*, *5*(1), 31-44. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.05.012>
- Junankar, S., Baker, L. A., Roden, D. L., Nair, R., Elsworth, B., Gallego-Ortega, D., Lacaze, P., Cazet, A., Nikolic, I., Teo, W. S., Yang, J., McFarland, A., Harvey, K., Naylor, M. J., Lakhani, S. R., Simpson, P. T., Raghavendra, A., Saunus, J., Madore, J., ... Swarbrick, A. (2015). ID4 controls mammary stem cells and marks breast cancers with a stem cell-like phenotype. *Nature Communications*, *6*(1), 6548. <https://doi.org/10.1038/ncomms7548>
- Kaklamani, V. G., Jeruss, J. S., Hughes, E., Siziopikou, K., Timms, K. M., Gutin, A., Abkevich, V., Sangale, Z., Solimeno, C., Brown, K. L., Jones, J., Hartman, A.-R., Meservey, C., Jovanovic, B., Helenowski, I., Khan, S. A., Bethke, K., Hansen, N., Uthe, R., ... Gradishar, W. (2015). Phase II neoadjuvant clinical trial of carboplatin and eribulin in women with triple negative early-stage breast cancer (NCT01372579). *Breast Cancer Research and Treatment*, *151*(3), 629-638. <https://doi.org/10.1007/s10549-015-3435-y>
- Kawabata, M. (1998). Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *9*(1), 49-61. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(97\)00036-1](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(97)00036-1)
- Keller, P. J., Arendt, L. M., & Kuperwasser, C. (2011). Stem Cell Maintenance of the Mammary Gland : It Takes Two. *Cell Stem Cell*, *9*(6), 496-497. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.11.008>
- Kendrick, H., Regan, J. L., Magnay, F.-A., Grigoriadis, A., Mitsopoulos, C., Zvelebil, M., & Smalley, M. J. (2008). Transcriptome analysis of mammary epithelial subpopulations identifies novel determinants of lineage commitment and cell fate. *BMC Genomics*, *9*(1), 591. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-591>
- Ketola, J. M., Alarmo, E.-L., Tuominen, V. J., & Kallioniemi, A. (2010). Parallel inhibition of cell growth and induction of cell migration and invasion in breast cancer cells by bone morphogenetic protein 4. *Breast Cancer Research and Treatment*, *124*(2), 377-386. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-0808-0>
- Kim, M., Singh, M., Lee, B.-K., Hibbs, M., Richardson, K., Ellies, L., Wintle, L., Stuart, L. M., Wang, J. Y., Voon, D. C., Blancafort, P., Wang, J., Kim, J., Leedman, P. J., & Woo, A. J. (2022). A MYC-ZNF148-ID1/3 regulatory axis modulating cancer stem cell traits in aggressive breast cancer. *Oncogenesis*, *11*(1), 60. <https://doi.org/10.1038/s41389-022-00435-1>
- Kim, M.-J., Ro, J. Y., Ahn, S.-H., Kim, H. H., Kim, S.-B., & Gong, G. (2006). Clinicopathologic significance of the basal-like subtype of breast cancer: A comparison with hormone receptor and Her2/neu-overexpressing phenotypes. *Human Pathology*, *37*(9), 1217-1226. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2006.04.015>
- Kim, P. M. (2001). Overexpression of human RAD51 and RAD52 reduces double-strand break-induced homologous recombination in mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, *29*(21), 4352-4360. <https://doi.org/10.1093/nar/29.21.4352>
- Kim, S.-H., & Singh, S. V. (2015). The role of polycomb group protein Bmi-1 and Notch4 in breast cancer stem cell inhibition by benzyl isothiocyanate. *Breast Cancer Research and Treatment*, *149*(3), 681-692. <https://doi.org/10.1007/s10549-015-3279-5>
- King, H. O., Brend, T., Payne, H. L., Wright, A., Ward, T. A., Patel, K., Egnuni, T., Stead, L. F., Patel, A., Wurdak, H., & Short, S. C. (2017). RAD51 Is a Selective DNA Repair Target to Radiosensitize Glioma Stem Cells. *Stem Cell Reports*, *8*(1), 125-139. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.12.005>
- Klarmann, G. J., Decker, A., & Farrar, W. L. (2008). Epigenetic gene silencing in the Wnt pathway in breast cancer. *Epigenetics*, *3*(2), 59-63. <https://doi.org/10.4161/epi.3.2.5899>
- Klein, H. L. (2008). The consequences of Rad51 overexpression for normal and tumor cells. *DNA Repair*, *7*(5), 686-693. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.12.008>
- Kleinberg, D. L., & Barcellos-Hoff, M. H. (2011). The Pivotal Role of Insulin-Like Growth Factor I in Normal Mammary Development. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, *40*(3), 461-471. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2011.06.001>
- Klinowska, T. C. M., Soriano, J. V., Edwards, G. M., Oliver, J. M., Valentijn, A. J., Montesano, R., & Streuli, C. H. (1999). *Laminin and α 1 Integrins Are Crucial for Normal Mammary Gland Development in the Mouse.*
- Koike, Y., Ohta, Y., Saitoh, W., Yamashita, T., Kanomata, N., Moriya, T., & Kurebayashi, J. (2017). Anti-cell growth and anti-cancer stem cell activities of the non-canonical hedgehog inhibitor GANT61 in triple-negative breast cancer cells. *Breast Cancer*, *24*(5), 683-693. <https://doi.org/10.1007/s12282-017-0757-0>

- Konishi, H., Mohseni, M., Tamaki, A., Garay, J. P., Croessmann, S., Karnan, S., Ota, A., Wong, H. Y., Konishi, Y., Karakas, B., Tahir, K., Abukhdeir, A. M., Gustin, J. P., Cidado, J., Wang, G. M., Cosgrove, D., Cochran, R., Jelovac, D., Higgins, M. J., ... Park, B. H. (2011). Mutation of a single allele of the cancer susceptibility gene *BRCA1* leads to genomic instability in human breast epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(43), 17773-17778. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110969108>
- Konstantinopoulos, P. A., Spentzos, D., Karlan, B. Y., Taniguchi, T., Fountzilas, E., Francoeur, N., Levine, D. A., & Cannistra, S. A. (2010). Gene Expression Profile of *BRCA* genes That Correlates With Responsiveness to Chemotherapy and With Outcome in Patients With Epithelial Ovarian Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, *28*(22), 3555-3561. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.27.5719>
- Kouros-Mehr, H., Slorach, E. M., Sternlicht, M. D., & Werb, Z. (2006). GATA-3 Maintains the Differentiation of the Luminal Cell Fate in the Mammary Gland. *Cell*, *127*(5), 1041-1055. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.048>
- Kummar, S., Wade, J. L., Oza, A. M., Sullivan, D., Chen, A. P., Gandara, D. R., Ji, J., Kinders, R. J., Wang, L., Allen, D., Coyne, G. O., Steinberg, S. M., & Doroshow, J. H. (2016). Randomized phase II trial of cyclophosphamide and the oral poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor veliparib in patients with recurrent, advanced triple-negative breast cancer. *Investigational New Drugs*, *34*(3), 355-363. <https://doi.org/10.1007/s10637-016-0335-x>
- Kurtova, A. V., Xiao, J., Mo, Q., Pazhanisamy, S., Krasnow, R., Lerner, S. P., Chen, F., Roh, T. T., Lay, E., Ho, P. L., & Chan, K. S. (2015). Blocking PGE2-induced tumour repopulation abrogates bladder cancer chemoresistance. *Nature*, *517*(7533), 209-213. <https://doi.org/10.1038/nature14034>
- Lagadec, C., Vlashi, E., Della Donna, L., Dekmezian, C., & Pajonk, F. (2012). Radiation-Induced Reprogramming of Breast Cancer Cells. *STEM CELLS*, *30*(5), 833-844. <https://doi.org/10.1002/stem.1058>
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M. A., & Dick, J. E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, *367*(6464), 645-648. <https://doi.org/10.1038/367645a0>
- Larsen, M. J., Kruse, T. A., Tan, Q., Lænkholm, A.-V., Bak, M., Lykkesfeldt, A. E., Sørensen, K. P., Hansen, T. v. O., Ejlertsen, B., Gerdes, A.-M., & Thomassen, M. (2013). Classifications within Molecular Subtypes Enables Identification of *BRCA1/BRCA2* Mutation Carriers by RNA Tumor Profiling. *PLoS ONE*, *8*(5), e64268. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064268>
- Lee, J., Son, M. J., Woolard, K., Donin, N. M., Li, A., Cheng, C. H., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Walling, J., Ahn, S., Kim, M., Totonchy, M., Cusack, T., Ene, C., Ma, H., Su, Q., Zenklusen, J. C., Zhang, W., Maric, D., & Fine, H. A. (2008). Epigenetic-Mediated Dysfunction of the Bone Morphogenetic Protein Pathway Inhibits Differentiation of Glioblastoma-Initiating Cells. *Cancer Cell*, *13*(1), 69-80. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.12.005>
- Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., & Pietenpol, J. A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *Journal of Clinical Investigation*, *121*(7), 2750-2767. <https://doi.org/10.1172/JCI45014>
- Lehmann, B. D., Colaprico, A., Silva, T. C., Chen, J., An, H., Ban, Y., Huang, H., Wang, L., James, J. L., Balko, J. M., Gonzalez-Ericsson, P. I., Sanders, M. E., Zhang, B., Pietenpol, J. A., & Chen, X. S. (2021a). Multi-omics analysis identifies therapeutic vulnerabilities in triple-negative breast cancer subtypes. *Nature Communications*, *12*(1), 6276. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26502-6>
- Lehmann, B. D., Colaprico, A., Silva, T. C., Chen, J., An, H., Ban, Y., Huang, H., Wang, L., James, J. L., Balko, J. M., Gonzalez-Ericsson, P. I., Sanders, M. E., Zhang, B., Pietenpol, J. A., & Chen, X. S. (2021b). Multi-omics analysis identifies therapeutic vulnerabilities in triple-negative breast cancer subtypes. *Nature Communications*, *12*(1), 6276. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26502-6>
- Leis, O., Eguiara, A., Lopez-Arribillaga, E., Alberdi, M. J., Hernandez-Garcia, S., Elorriaga, K., Pandiella, A., Rezola, R., & Martin, A. G. (2012). Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells. *Oncogene*, *31*(11), 1354-1365. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.338>
- Li, D., Zhao, Y., Liu, C., Chen, X., Qi, Y., Jiang, Y., Zou, C., Zhang, X., Liu, S., Wang, X., Zhao, D., Sun, Q., Zeng, Z., Dress, A., Lin, M. C., Kung, H.-F., Rui, H., Liu, L.-Z., Mao, F., ... Lai, L. (2011). Analysis of MiR-195 and MiR-497 Expression, Regulation and Role in Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, *17*(7), 1722-1730. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1800>
- Lim, E., Vaillant, F., Wu, D., Forrest, N. C., Pal, B., Hart, A. H., Asselin-Labat, M.-L., Gyorki, D. E., Ward, T., Partanen, A., Feleppa, F., Huschtscha, L. I., Thorne, H. J., Fox, S. B., Yan, M., French, J. D., Brown, M. A., Smyth, G. K., ... Lindeman, G. J. (2009). Aberrant luminal progenitors as the candidate target

- population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nature Medicine*, 15(8), 907-913. <https://doi.org/10.1038/nm.2000>
- Lin, N. U., Claus, E., Sohl, J., Razzak, A. R., Arnaout, A., & Winer, E. P. (2008). Sites of distant recurrence and clinical outcomes in patients with metastatic triple-negative breast cancer : High incidence of central nervous system metastases. *Cancer*, 113(10), 2638-2645. <https://doi.org/10.1002/cncr.23930>
- Lips, E. H., Laddach, N., Savola, S. P., Vollebergh, M. A., Oonk, A. M., Imholz, A. L., Wessels, L. F., Wesseling, J., Nederlof, P. M., & Rodenhuis, S. (2011). Quantitative copy number analysis by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) of BRCA1-associated breast cancer regions identifies BRCAness. *Breast Cancer Research*, 13(5), R107. <https://doi.org/10.1186/bcr3049>
- Lips, E. H., Mulder, L., Hannemann, J., Laddach, N., Vrancken Peeters, M. T. F. D., van de Vijver, M. J., Wesseling, J., Nederlof, P. M., & Rodenhuis, S. (2011a). Indicators of homologous recombination deficiency in breast cancer and association with response to neoadjuvant chemotherapy. *Annals of Oncology*, 22(4), 870-876. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq468>
- Lips, E. H., Mulder, L., Hannemann, J., Laddach, N., Vrancken Peeters, M. T. F. D., van de Vijver, M. J., Wesseling, J., Nederlof, P. M., & Rodenhuis, S. (2011b). Indicators of homologous recombination deficiency in breast cancer and association with response to neoadjuvant chemotherapy. *Annals of Oncology*, 22(4), 870-876. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq468>
- Little, S. C., & Mullins, M. C. (2009). Bone morphogenetic protein heterodimers assemble heteromeric type I receptor complexes to pattern the dorsoventral axis. *Nature Cell Biology*, 11(5), 637-643. <https://doi.org/10.1038/ncb1870>
- Litton, J. K., Rugo, H. S., Ettl, J., Hurvitz, S. A., Gonçalves, A., Lee, K.-H., Fehrenbacher, L., Yerushalmi, R., Mina, L. A., Martin, M., Roché, H., Im, Y.-H., Quek, R. G. W., Markova, D., Tudor, I. C., Hannah, A. L., Eiermann, W., & Blum, J. L. (2018). Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline BRCA Mutation. *New England Journal of Medicine*, 379(8), 753-763. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1802905>
- Litton, J. K., Scoggins, M. E., Hess, K. R., Adrada, B. E., Murthy, R. K., Damodaran, S., DeSnyder, S. M., Brewster, A. M., Barcenas, C. H., Valero, V., Whitman, G. J., Schwartz-Gomez, J., Mittendorf, E. A., Thompson, A. M., Helgason, T., Ibrahim, N., Piwnica-Worms, H., Moulder, S. L., & Arun, B. K. (2020). Neoadjuvant Talazoparib for Patients With Operable Breast Cancer With a Germline BRCA Pathogenic Variant. *Journal of Clinical Oncology*, 38(5), 388-394. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.01304>
- Liu, B. Y., McDermott, S. P., Khwaja, S. S., & Alexander, C. M. (2004). The transforming activity of Wnt effectors correlates with their ability to induce the accumulation of mammary progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(12), 4158-4163. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400699101>
- Liu, H., Patel, M. R., Prescher, J. A., Patsialou, A., Qian, D., Lin, J., Wen, S., Chang, Y.-F., Bachmann, M. H., Shimono, Y., Dalerba, P., Adorno, M., Lobo, N., Bueno, J., Dirbas, F. M., Goswami, S., Somlo, G., Condeelis, J., Contag, C. H., ... Clarke, M. F. (2010). Cancer stem cells from human breast tumors are involved in spontaneous metastases in orthotopic mouse models. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(42), 18115-18120. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006732107>
- Liu, L., Zhou, W., Cheng, C.-T., Ren, X., Somlo, G., Fong, M. Y., Chin, A. R., Li, H., Yu, Y., Xu, Y., O'Connor, S. T. F., O'Connor, T. R., Ann, D. K., Stark, J. M., & Wang, S. E. (2014). TGFβ Induces "BRCAness" and Sensitivity to PARP Inhibition in Breast Cancer by Regulating DNA-Repair Genes. *Molecular Cancer Research*, 12(11), 1597-1609. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-14-0201>
- Liu, M., Liu, Y., Deng, L., Wang, D., He, X., Zhou, L., Wicha, M. S., Bai, F., & Liu, S. (2018). Transcriptional profiles of different states of cancer stem cells in triple-negative breast cancer. *Molecular Cancer*, 17(1), 65. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0809-x>
- Liu, S., Cong, Y., Wang, D., Sun, Y., Deng, L., Liu, Y., Martin-Trevino, R., Shang, L., McDermott, S. P., Landis, M. D., Hong, S., Adams, A., D'Angelo, R., Ginestier, C., Charafe-Jauffret, E., Clouthier, S. G., Birnbaum, D., Wong, S. T., Zhan, M., ... Wicha, M. S. (2014). Breast Cancer Stem Cells Transition between Epithelial and Mesenchymal States Reflective of their Normal Counterparts. *Stem Cell Reports*, 2(1), 78-91. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.11.009>
- Liu, S., Ginestier, C., Charafe-Jauffret, E., Foco, H., Kleer, C. G., Merajver, S. D., Dontu, G., & Wicha, M. S. (2008). BRCA1 regulates human mammary stem/progenitor cell fate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(5), 1680-1685. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711613105>
- Liu, Y., Burness, M. L., Martin-Trevino, R., Guy, J., Bai, S., Harouaka, R., Brooks, M. D., Shang, L., Fox, A., Luther, T. K., Davis, A., Baker, T. L., Colacino, J., Clouthier, S. G., Shao, Z., Wicha, M. S., & Liu, S. (2017). RAD51 Mediates Resistance of Cancer Stem Cells to PARP Inhibition in Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 23(2), 514-522. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1348>

- Livasy, C. A., Karaca, G., Nanda, R., Tretiakova, M. S., Olopade, O. I., Moore, D. T., & Perou, C. M. (2006a). Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Modern Pathology*, *19*(2), 264-271. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800528>
- Livasy, C. A., Karaca, G., Nanda, R., Tretiakova, M. S., Olopade, O. I., Moore, D. T., & Perou, C. M. (2006b). Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Modern Pathology*, *19*(2), 264-271. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800528>
- Llombart-Cussac, A., Bermejo, B., Villanueva, C., Delalogue, S., Morales, S., Balmaña, J., Amillano, K., Bonnefoi, H., Casas, A., Manso, L., Roché, H., Gonzalez-Santiago, S., Gavilá, J., Sánchez-Rovira, P., Di Cosimo, S., Harbeck, N., Charpentier, E., Garcia-Ribas, I., Radosevic-Robin, N., ... Baselga, J. (2015). SOLT1 NeoPARP : A phase II randomized study of two schedules of iniparib plus paclitaxel versus paclitaxel alone as neoadjuvant therapy in patients with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, *154*(2), 351-357. <https://doi.org/10.1007/s10549-015-3616-8>
- Loibl, S., André, F., Bachelot, T., Barrios, C. H., Bergh, J., Burstein, H. J., Cardoso, L. M. J., Carey, L. A., Dawood, S., Del Mastro, L., Denkert, C., Fallenberg, E. M., Francis, P. A., Gamal-Eldin, H., Gelmon, K., Geyer, C. E., Gnant, M., Guarnieri, V., Gupta, S., ... Harbeck, N. (2023). Early breast cancer : ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology*, S0923753423051049. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2023.11.016>
- Loibl, S., O'Shaughnessy, J., Untch, M., Sikov, W. M., Rugo, H. S., McKee, M. D., Huober, J., Golshan, M., von Minckwitz, G., Maag, D., Sullivan, D., Wolmark, N., McIntyre, K., Ponce Lorenzo, J. J., Metzger Filho, O., Rastogi, P., Symmans, W. F., Liu, X., & Geyer, C. E. (2018). Addition of the PARP inhibitor veliparib plus carboplatin or carboplatin alone to standard neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer (BrighTNess) : A randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, *19*(4), 497-509. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30111-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30111-6)
- Loibl, S., Weber, K. E., Timms, K. M., Elkin, E. P., Hahnen, E., Fasching, P. A., Lederer, B., Denkert, C., Schneeweiss, A., Braun, S., Salat, C. T., Rezaei, M., Blohmer, J. U., Zahm, D. M., Jackisch, C., Gerber, B., Klare, P., Kümmel, S., Schem, C., ... Untch, M. (2018). Survival analysis of carboplatin added to an anthracycline/taxane-based neoadjuvant chemotherapy and HRD score as predictor of response—Final results from GearSixto. *Annals of Oncology*, *29*(12), 2341-2347. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy460>
- Long, J., Badal, S. S., Wang, Y., Chang, B. H. J., Rodriguez, A., & Danesh, F. R. (2013). MicroRNA-22 Is a Master Regulator of Bone Morphogenetic Protein-7/6 Homeostasis in the Kidney. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(51), 36202-36214. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.498634>
- Lord, C. J., & Ashworth, A. (2016). BRCAness revisited. *Nature Reviews Cancer*, *16*(2), 110-120. <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.21>
- Luck, A. A., Evans, A. J., Green, A. R., Rakha, E. A., Paish, C., & Ellis, I. O. (2008). The Influence of Basal Phenotype on the Metastatic Pattern of Breast Cancer. *Clinical Oncology*, *20*(1), 40-45. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2007.10.002>
- Lydon, J. P., DeMayo, F. J., Funk, C. R., Mani, S. K., Hughes, A. R., Montgomery, C. A., Shyamala, G., Conneely, O. M., & O'Malley, B. W. (1995). Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes & Development*, *9*(18), 2266-2278. <https://doi.org/10.1101/gad.9.18.2266>
- Ma, D., Chen, S.-Y., Ren, J.-X., Pei, Y.-C., Jiang, C.-W., Zhao, S., Xiao, Y., Xu, X.-E., Liu, G.-Y., Hu, X., Liang, X.-Z., Yu, K.-D., Li, D.-Q., Jiang, Y.-Z., & Shao, Z.-M. (2021). Molecular Features and Functional Implications of Germline Variants in Triple-Negative Breast Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *113*(7), 884-892. <https://doi.org/10.1093/jnci/djaa175>
- Macintyre, G., Goranova, T. E., De Silva, D., Ennis, D., Piskorz, A. M., Eldridge, M., Sie, D., Lewsley, L.-A., Hanif, A., Wilson, C., Dowson, S., Glasspool, R. M., Lockley, M., Brockbank, E., Montes, A., Walther, A., Sundar, S., Edmondson, R., Hall, G. D., ... Brenton, J. D. (2018). Copy number signatures and mutational processes in ovarian carcinoma. *Nature Genetics*, *50*(9), 1262-1270. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0179-8>
- Madjd, Z., Akbari, M. E., Zarnani, A. H., Khayamzadeh, M., Kalantari, E., & Mojtabavi, N. (2014). Expression of EMSY, a Novel BRCA2-link Protein, is Associated with Lymph Node Metastasis and Increased Tumor Size in Breast Carcinomas. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *15*(4), 1783-1789. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.4.1783>
- Magnifico, A., Albano, L., Campaner, S., Delia, D., Castiglioni, F., Gasparini, P., Sozzi, G., Fontanella, E., Menard, S., & Tagliabue, E. (2009). Tumor-Initiating Cells of HER2-Positive Carcinoma Cell Lines Express the Highest Oncoprotein Levels and Are Sensitive to Trastuzumab. *Clinical Cancer Research*, *15*(6), 2010-2021. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1327>

- Mallepell, S. (s. d.). *Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor α is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland.*
- Maller, O., Martinson, H., & Schedin, P. (2010). Extracellular Matrix Composition Reveals Complex and Dynamic Stromal-Epithelial Interactions in the Mammary Gland. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 15(3), 301-318. <https://doi.org/10.1007/s10911-010-9189-6>
- Mamaeva, V., Niemi, R., Beck, M., Özliseli, E., Desai, D., Landor, S., Gronroos, T., Kronqvist, P., Pettersen, I. K. N., McCormack, E., Rosenholm, J. M., Linden, M., & Sahlgren, C. (2016). Inhibiting Notch Activity in Breast Cancer Stem Cells by Glucose Functionalized Nanoparticles Carrying γ -secretase Inhibitors. *Molecular Therapy*, 24(5), 926-936. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.42>
- Mani, S. A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E. Ng., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C. C., Shipitsin, M., Campbell, L. L., Polyak, K., Brisken, C., Yang, J., & Weinberg, R. A. (2008). The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell*, 133(4), 704-715. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.027>
- Manié, E., Popova, T., Battistella, A., Tarabeux, J., Caux-Moncoutier, V., Golmard, L., Smith, N. K., Mueller, C. R., Mariani, O., Sigal-Zafrani, B., Dubois, T., Vincent-Salomon, A., Houdayer, C., Stoppa-Lyonnet, D., & Stern, M.-H. (2016). Genomic hallmarks of homologous recombination deficiency in invasive breast carcinomas : Genomic hallmarks of homologous recombination defect. *International Journal of Cancer*, 138(4), 891-900. <https://doi.org/10.1002/ijc.29829>
- Mao, J., Song, B., Shi, Y., Wang, B., Fan, S., Yu, X., Tang, J., & Li, L. (2013). ShRNA targeting Notch1 sensitizes breast cancer stem cell to paclitaxel. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(6), 1064-1073. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.02.022>
- Mao, X., Omeogu, C., Karanth, S., Joshi, A., Meernik, C., Wilson, L., Clark, A., Deveaux, A., He, C., Johnson, T., Barton, K., Kaplan, S., & Akinyemiju, T. (2023). Association of reproductive risk factors and breast cancer molecular subtypes : A systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*, 23(1), 644. <https://doi.org/10.1186/s12885-023-11049-0>
- Marginean, F., Rakha, E. A., Ho, B. C., Ellis, I. O., & Lee, A. H. (2010). Histological features of medullary carcinoma and prognosis in triple-negative basal-like carcinomas of the breast. *Modern Pathology*, 23(10), 1357-1363. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.123>
- Marsden, C. G., Jensen, R. B., Zigelbaum, J., Rothenberg, E., Morrical, S. W., Wallace, S. S., & Sweasy, J. B. (2016). The Tumor-Associated Variant RAD51 G151D Induces a Hyper-Recombination Phenotype. *PLoS Genetics*, 12(8), e1006208. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006208>
- Marsell, R., & Einhorn, T. A. (2009). The role of endogenous bone morphogenetic proteins in normal skeletal repair. *Injury*, 40, S4-S7. [https://doi.org/10.1016/S0020-1383\(09\)70003-8](https://doi.org/10.1016/S0020-1383(09)70003-8)
- Martin, R. W., Orelli, B. J., Yamazoe, M., Minn, A. J., Takeda, S., & Bishop, D. K. (2007). RAD51 Up-regulation Bypasses BRCA1 Function and Is a Common Feature of BRCA1 -Deficient Breast Tumors. *Cancer Research*, 67(20), 9658-9665. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0290>
- Martinez-Ruiz, H., Illa-Bochaca, I., Omene, C., Hanniford, D., Liu, Q., Hernando, E., & Barcellos-Hoff, M. H. (2016). A TGF β -miR-182-BRCA1 axis controls the mammary differentiation hierarchy. *SCIENCE SIGNALING*.
- Massagué, J., Seoane, J., & Wotton, D. (2005). Smad transcription factors. *Genes & Development*, 19(23), 2783-2810. <https://doi.org/10.1101/gad.1350705>
- Massagué, J., & Wotton, D. (s. d.). *Transcriptional control by the TGF- β /Smad signaling system.*
- Masuda, H., Baggerly, K. A., Wang, Y., Zhang, Y., Gonzalez-Angulo, A. M., Meric-Bernstam, F., Valero, V., Lehmann, B. D., Pietenpol, J. A., Hortobagyi, G. N., Symmans, W. F., & Ueno, N. T. (2013). Differential Response to Neoadjuvant Chemotherapy Among 7 Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes. *Clinical Cancer Research*, 19(19), 5533-5540. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0799>
- Matros, E., Wang, Z. C., Lodeiro, G., Miron, A., Iglehart, J. D., & Richardson, A. L. (2005). BRCA1 promoter methylation in sporadic breast tumors : Relationship to gene expression profiles. *Breast Cancer Research and Treatment*, 91(2), 179-186. <https://doi.org/10.1007/s10549-004-7603-8>
- Maugeri-Saccà, M., Bartucci, M., & De Maria, R. (2012). DNA Damage Repair Pathways in Cancer Stem Cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(8), 1627-1636. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-1040>
- Mauvais-Jarvis, P., Kuttann, F., & Gompel, A. (1986). Estradiol/Progesterone Interaction in Normal and Pathologic Breast Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 464(1), 152-167. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1986.tb16002.x>
- Mayer, E. L., Abramson, V., Jankowitz, R., Falkson, C., Marcom, P. K., Traina, T., Carey, L., Rimawi, M., Specht, J., Miller, K., Stearns, V., Tung, N., Perou, C., Richardson, A. L., Componeschi, K., Trippa, L., Tan-Wasielewski, Z., Timms, K., Krop, I., ... Winer, E. P. (2020). TBCRC 030 : A phase II study of preoperative

- cisplatin versus paclitaxel in triple-negative breast cancer: evaluating the homologous recombination deficiency (HRD) biomarker. *Annals of Oncology*, 31(11), 1518-1525. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.08.2064>
- McCabe, N., Turner, N. C., Lord, C. J., Kluzek, K., Białkowska, A., Swift, S., Giavara, S., O'Connor, M. J., Tutt, A. N., Zdzienicka, M. Z., Smith, G. C. M., & Ashworth, A. (2006). Deficiency in the Repair of DNA Damage by Homologous Recombination and Sensitivity to Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibition. *Cancer Research*, 66(16), 8109-8115. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0140>
- McCready, J., Arendt, L. M., Rudnick, J. A., & Kuperwasser, C. (2010). The contribution of dynamic stromal remodeling during mammary development to breast carcinogenesis. *Breast Cancer Research*, 12(3), 205. <https://doi.org/10.1186/bcr2578>
- Meijer, T. G., Verkaik, N. S., Sieuwerts, A. M., van Riet, J., Naipal, K. A. T., van Deurzen, C. H. M., den Bakker, M. A., Sleddens, H. F. B. M., Dubbink, H.-J., den Toom, T. D., Dinjens, W. N. M., Lips, E., Nederlof, P. M., Smid, M., van de Werken, H. J. G., Kanaar, R., Martens, J. W. M., Jager, A., & van Gent, D. C. (2018). Functional *Ex Vivo* Assay Reveals Homologous Recombination Deficiency in Breast Cancer Beyond BRCA Gene Defects. *Clinical Cancer Research*, 24(24), 6277-6287. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0063>
- Mekonnen, N., Yang, H., & Shin, Y. K. (2022). Homologous Recombination Deficiency in Ovarian, Breast, Colorectal, Pancreatic, Non-Small Cell Lung and Prostate Cancers, and the Mechanisms of Resistance to PARP Inhibitors. *Frontiers in Oncology*, 12, 880643. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.880643>
- Melchor, L., Honrado, E., García, M. J., Álvarez, S., Palacios, J., Osorio, A., Nathanson, K. L., & Benítez, J. (2008). Distinct genomic aberration patterns are found in familial breast cancer associated with different immunohistochemical subtypes. *Oncogene*, 27(22), 3165-3175. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210975>
- Mendes-Pereira, A. M., Martin, S. A., Brough, R., McCarthy, A., Taylor, J. R., Kim, J., Waldman, T., Lord, C. J., & Ashworth, A. (2009). Synthetic lethal targeting of *PTEN* mutant cells with PARP inhibitors. *EMBO Molecular Medicine*, 1(6-7), 315-322. <https://doi.org/10.1002/emmm.200900041>
- Miles, D. W., Diéras, V., Cortés, J., Duenne, A.-A., Yi, J., & O'Shaughnessy, J. (2013). First-line bevacizumab in combination with chemotherapy for HER2-negative metastatic breast cancer : Pooled and subgroup analyses of data from 2447 patients. *Annals of Oncology*, 24(11), 2773-2780. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt276>
- Miller-Kleinhenz, J., Guo, X., Qian, W., Zhou, H., Bozeman, E. N., Zhu, L., Ji, X., Wang, Y. A., Styblo, T., O'Regan, R., Mao, H., & Yang, L. (2018). Dual-targeting Wnt and uPA receptors using peptide conjugated ultra-small nanoparticle drug carriers inhibited cancer stem-cell phenotype in chemo-resistant breast cancer. *Biomaterials*, 152, 47-62. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.10.035>
- Millikan, R. C., Newman, B., Tse, C.-K., Moorman, P. G., Smith, L. V., Lobbok, M. H., Geradts, J., Jackson, S., Nyante, S., Livasy, C., Carey, L., Shelton, H., & Perou, C. M. (2008). *Epidemiology of basal-like breast cancer*.
- Miyazono, K., Kamiya, Y., & Morikawa, M. (2010). Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *Journal of Biochemistry*, 147(1), 35-51. <https://doi.org/10.1093/jb/mvp148>
- Miyazono, K., & Miyazawa, K. (2002). Id : A Target of BMP Signaling. *Science's STKE*, 2002(151). <https://doi.org/10.1126/stke.2002.151.pe40>
- Modi, S., Jacot, W., Yamashita, T., Sohn, J., Vidal, M., Tokunaga, E., Tsurutani, J., Ueno, N. T., Prat, A., Chae, Y. S., Lee, K. S., Niikura, N., Park, Y. H., Xu, B., Wang, X., Gil-Gil, M., Li, W., Pierga, J.-Y., Im, S.-A., ... Cameron, D. A. (2022). Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Low Advanced Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 387(1), 9-20. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2203690>
- Molyneux, G., Geyer, F. C., Magnay, F.-A., McCarthy, A., Kendrick, H., Natrajan, R., MacKay, A., Grigoriadis, A., Tutt, A., Ashworth, A., Reis-Filho, J. S., & Smalley, M. J. (2010). BRCA1 Basal-like Breast Cancers Originate from Luminal Epithelial Progenitors and Not from Basal Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 7(3), 403-417. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.07.010>
- Morel, A.-P., Lièvre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S., & Puisieux, A. (2008). Generation of Breast Cancer Stem Cells through Epithelial-Mesenchymal Transition. *PLoS ONE*, 3(8), e2888. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002888>
- Moskwa, P., Buffa, F. M., Pan, Y., Panchakshari, R., Gottipati, P., Muschel, R. J., Beech, J., Kulshrestha, R., Abdelmohsen, K., Weinstock, D. M., Gorospe, M., Harris, A. L., Helleday, T., & Chowdhury, D. (2011). miR-182-Mediated Downregulation of BRCA1 Impacts DNA Repair and Sensitivity to PARP Inhibitors. *Molecular Cell*, 41(2), 210-220. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.12.005>

- Moumen, M., Chiche, A., Cagnet, S., Petit, V., Raymond, K., Faraldo, M. M., Deugnier, M.-A., & Glukhova, M. A. (2011). The mammary myoepithelial cell. *The International Journal of Developmental Biology*, 55(7-8-9), 763-771. <https://doi.org/10.1387/ijdb.113385mm>
- Moynahan, M. E., Pierce, A. J., & Jasin, M. (2001). BRCA2 Is Required for Homology-Directed Repair of Chromosomal Breaks. *Molecular Cell*, 7(2), 263-272. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00174-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00174-5)
- Mujoo, K., Pandita, R. K., Tiwari, A., Charaka, V., Chakraborty, S., Singh, D. K., Hambarde, S., Hittelman, W. N., Horikoshi, N., Hunt, C. R., Khanna, K. K., Kots, A. Y., Butler, E. B., Murad, F., & Pandita, T. K. (2017). Differentiation of Human Induced Pluripotent or Embryonic Stem Cells Decreases the DNA Damage Repair by Homologous Recombination. *Stem Cell Reports*, 9(5), 1660-1674. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.10.002>
- Mulac-Jericevic, B., Lydon, J. P., DeMayo, F. J., & Conneely, O. M. (2003). Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(17), 9744-9749. <https://doi.org/10.1073/pnas.1732707100>
- Muschler, J., & Streuli, C. H. (2010). Cell-Matrix Interactions in Mammary Gland Development and Breast Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(10), a003202-a003202. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003202>
- Mutter, R. W., Riaz, N., Ng, C. K., Delsite, R., Piscuoglio, S., Edelweiss, M., Martelotto, L. G., Sakr, R. A., King, T. A., Giri, D. D., Drobnjak, M., Brogi, E., Bindra, R., Bernheim, G., Lim, R. S., Bleucia, P., Desrichard, A., Higginson, D., Towers, R., ... Powell, S. N. (2017). Bi-allelic alterations in DNA repair genes underpin homologous recombination DNA repair defects in breast cancer: Homologous recombination defective breast cancers. *The Journal of Pathology*, 242(2), 165-177. <https://doi.org/10.1002/path.4890>
- Mylona, E., Giannopoulou, I., Fasomytakis, E., Nomikos, A., Magkou, C., Bakarakos, P., & Nakopoulou, L. (2008). The clinicopathologic and prognostic significance of CD44+/CD24-/low and CD44-/CD24+ tumor cells in invasive breast carcinomas. *Human Pathology*, 39(7), 1096-1102. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2007.12.003>
- Naipal, K. A. T., Verkaik, N. S., Ameziane, N., van Deurzen, C. H. M., ter Brugge, P., Meijers, M., Sieuwerts, A. M., Martens, J. W., O'Connor, M. J., Vrieling, H., Hoesjmakers, J. H. J., Jonkers, J., Kanaar, R., de Winter, J. P., Vreeswijk, M. P., Jager, A., & van Gent, D. C. (2014). Functional *Ex Vivo* Assay to Select Homologous Recombination-Deficient Breast Tumors for PARP Inhibitor Treatment. *Clinical Cancer Research*, 20(18), 4816-4826. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0571>
- Natrajan, R., Lambros, M. B., Rodríguez-Pinilla, S. M., Moreno-Bueno, G., Tan, D. S. P., Marchió, C., Vatcheva, R., Rayter, S., Mahler-Araujo, B., Fulford, L. G., Hungermann, D., Mackay, A., Grigoriadis, A., Fenwick, K., Tamber, N., Hardisson, D., Tutt, A., Palacios, J., Lord, C. J., ... Reis-Filho, J. S. (2009). Tiling Path Genomic Profiling of Grade 3 Invasive Ductal Breast Cancers. *Clinical Cancer Research*, 15(8), 2711-2722. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1878>
- Navazio, A. S., Rizzolo, P., Silvestri, V., Valentini, V., Zelli, V., Zanna, I., Masala, G., Bianchi, S., Tommasi, S., Palli, D., & Ottini, L. (2016). EMSY copy number variation in male breast cancers characterized for BRCA1 and BRCA2 mutations. *Breast Cancer Research and Treatment*, 160(1), 181-186. <https://doi.org/10.1007/s10549-016-3976-8>
- Neckmann, U., Wolowczyk, C., Hall, M., Almaas, E., Ren, J., Zhao, S., Johannessen, B., Skotheim, R. I., Bjørkøy, G., Ten Dijke, P., & Holien, T. (2019). GREM1 is associated with metastasis and predicts poor prognosis in ER-negative breast cancer patients. *Cell Communication and Signaling*, 17(1), 140. <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0467-7>
- Nelsen, S. M., & Christian, J. L. (2009). Site-specific Cleavage of BMP4 by Furin, PC6, and PC7. *Journal of Biological Chemistry*, 284(40), 27157-27166. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.028506>
- Nemer, G., & Nemer, M. (2003). Transcriptional activation of BMP-4 and regulation of mammalian organogenesis by GATA-4 and -6. *Developmental Biology*, 254(1), 131-148. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(02\)00026-X](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(02)00026-X)
- Neumeister, V., Agarwal, S., Bordeaux, J., Camp, R. L., & Rimm, D. L. (2010). In Situ Identification of Putative Cancer Stem Cells by Multiplexing ALDH1, CD44, and Cytokeratin Identifies Breast Cancer Patients with Poor Prognosis. *The American Journal of Pathology*, 176(5), 2131-2138. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090712>
- Neville, M. C., McFadden, T. B., & Forsyth, I. (2002). Hormonal Regulation of Mammary Differentiation and Milk Secretion. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*.

- Nguyen, L., W. M. Martens, J., Van Hoeck, A., & Cuppen, E. (2020). Pan-cancer landscape of homologous recombination deficiency. *Nature Communications*, *11*(1), 5584. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19406-4>
- Nguyen, Q. H., Pervolarakis, N., Blake, K., Ma, D., Davis, R. T., James, N., Phung, A. T., Willey, E., Kumar, R., Jabart, E., Driver, I., Rock, J., Goga, A., Khan, S. A., Lawson, D. A., Werb, Z., & Kessenbrock, K. (2018). Profiling human breast epithelial cells using single cell RNA sequencing identifies cell diversity. *Nature Communications*, *9*(1), 2028. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04334-1>
- Nielsen, T. O., Hsu, F. D., Jensen, K., Cheang, M., Karaca, G., Hu, Z., Hernandez-Boussard, T., Livasy, C., Cowan, D., Dressler, L., Akslen, L. A., Ragaz, J., Gown, A. M., Gilks, C. B., van de Rijn, M., & Perou, C. M. (2004). Immunohistochemical and Clinical Characterization of the Basal-Like Subtype of Invasive Breast Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, *10*(16), 5367-5374. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0220>
- Nik-Zainal, S., Davies, H., Staaf, J., Ramakrishna, M., Glodzik, D., Zou, X., Martincorena, I., Alexandrov, L. B., Martin, S., Wedge, D. C., Van Loo, P., Ju, Y. S., Smid, M., Brinkman, A. B., Morganello, S., Aure, M. R., Lingjærde, O. C., Langerød, A., Ringnér, M., ... Stratton, M. R. (2016). Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature*, *534*(7605), 47-54. <https://doi.org/10.1038/nature17676>
- Nohe, A., Hassel, S., Ehrlich, M., Neubauer, F., Sebald, W., Henis, Y. I., & Knaus, P. (2002). The Mode of Bone Morphogenetic Protein (BMP) Receptor Oligomerization Determines Different BMP-2 Signaling Pathways. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(7), 5330-5338. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102750200>
- Oakes, S. R., Naylor, M. J., Asselin-Labat, M.-L., Blazek, K. D., Gardiner-Garden, M., Hilton, H. N., Kazlauskas, M., Pritchard, M. A., Chodosh, L. A., Pfeffer, P. L., Lindeman, G. J., Visvader, J. E., & Ormandy, C. J. (2008). The Ets transcription factor Elf5 specifies mammary alveolar cell fate. *Genes & Development*, *22*(5), 581-586. <https://doi.org/10.1101/gad.1614608>
- on behalf of the German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer (GC-HBOC), Engel, C., Rhiem, K., Hahnen, E., Loibl, S., Weber, K. E., Seiler, S., Zachariae, S., Hauke, J., Wappenschmidt, B., Waha, A., Blümcke, B., Kiechle, M., Meindl, A., Niederacher, D., Bartram, C. R., Speiser, D., Schlegelberger, B., Arnold, N., ... Schmutzler, R. K. (2018). Prevalence of pathogenic BRCA1/2 germline mutations among 802 women with unilateral triple-negative breast cancer without family cancer history. *BMC Cancer*, *18*(1), 265. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4029-y>
- Onichtchouk, D., Chen, Y.-G., Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Massague, J., & Niehrs, C. (1999). *Silencing of TGF- β signalling by the pseudoreceptor BAMBI*. 401.
- Ormandy, C. J., Camus, A., Barra, J., Damotte, D., Lucas, B., Buteau, H., Edery, M., Brousse, N., Babinet, C., Binart, N., & Kelly, P. A. (1997). Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes & Development*, *11*(2), 167-178. <https://doi.org/10.1101/gad.11.2.167>
- O'Shaughnessy, J., Schwartzberg, L., Danso, M. A., Miller, K. D., Rugo, H. S., Neubauer, M., Robert, N., Hellerstedt, B., Saleh, M., Richards, P., Specht, J. M., Yardley, D. A., Carlson, R. W., Finn, R. S., Charpentier, E., Garcia-Ribas, I., & Winer, E. P. (2014). Phase III Study of Iniparib Plus Gemcitabine and Carboplatin Versus Gemcitabine and Carboplatin in Patients With Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, *32*(34), 3840-3847. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.55.2984>
- Osipo, C., Patel, P., Rizzo, P., Clementz, A., Hao, L., Golde, T., & Miele, L. (s. d.). *ErbB-2 inhibition activates Notch-1 and sensitizes breast cancer cells to a c-secretase inhibitor*.
- Osta, W. A., Chen, Y., Mikhitarian, K., Mitas, M., Salem, M., Hannun, Y. A., Cole, D. J., & Gillanders, W. E. (2004). EpCAM Is Overexpressed in Breast Cancer and Is a Potential Target for Breast Cancer Gene Therapy. *Cancer Research*, *64*(16), 5818-5824. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0754>
- Owens, P., Pickup, M. W., Novitskiy, S. V., Giltneane, J. M., Gorska, A. E., Hopkins, C. R., Hong, C. C., & Moses, H. L. (2015). Inhibition of BMP signaling suppresses metastasis in mammary cancer. *Oncogene*, *34*(19), 2437-2449. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.189>
- Pal, D., Pertot, A., Shirole, N. H., Yao, Z., Anaparthi, N., Garvin, T., Cox, H., Chang, K., Rollins, F., Kendall, J., Edwards, L., Singh, V. A., Stone, G. C., Schatz, M. C., Hicks, J., Hannon, G. J., & Sordella, R. (2017). TGF- β reduces DNA ds-break repair mechanisms to heighten genetic diversity and adaptability of CD44+/CD24- cancer cells. *eLife*, *6*, e21615. <https://doi.org/10.7554/eLife.21615>
- Pannunzio, N. R., Li, S., Watanabe, G., & Lieber, M. R. (2014). Non-homologous end joining often uses microhomology: Implications for alternative end joining. *DNA Repair*, *17*, 74-80. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.02.006>

- Papi, L., Putignano, A. L., Congregati, C., Piaceri, I., Zanna, I., Sera, F., Morrone, D., Genuardi, M., & Palli, D. (2010). A PALB2 germline mutation associated with hereditary breast cancer in Italy. *Familial Cancer*, *9*(2), 181-185. <https://doi.org/10.1007/s10689-009-9295-z>
- Park, E. Y., Chang, E., Lee, E. J., Lee, H.-W., Kang, H.-G., Chun, K.-H., Woo, Y. M., Kong, H. K., Ko, J. Y., Suzuki, H., Song, E., & Park, J. H. (2014). Targeting of miR34a–NOTCH1 Axis Reduced Breast Cancer Stemness and Chemoresistance. *Cancer Research*, *74*(24), 7573-7582. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1140>
- Park, K.-S., Dubon, M. J., & Gumbiner, B. M. (2015). N-cadherin mediates the migration of MCF-10A cells undergoing bone morphogenetic protein 4-mediated epithelial mesenchymal transition. *Tumor Biology*, *36*(5), 3549-3556. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2991-9>
- Park, S. Y., Kwon, H. J., Choi, Y., Lee, H. E., Kim, S.-W., Kim, J. H., Kim, I. A., Jung, N., Cho, N.-Y., & Kang, G. H. (2012). Distinct patterns of promoter CpG island methylation of breast cancer subtypes are associated with stem cell phenotypes. *Modern Pathology*, *25*(2), 185-196. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.160>
- Park, S. Y., Lee, H. E., Li, H., Shipitsin, M., Gelman, R., & Polyak, K. (2010). Heterogeneity for Stem Cell–Related Markers According to Tumor Subtype and Histologic Stage in Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, *16*(3), 876-887. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1532>
- Parsa, S., Ramasamy, S. K., De Langhe, S., Gupte, V. V., Haigh, J. J., Medina, D., & Bellusci, S. (2008). Terminal end bud maintenance in mammary gland is dependent upon FGFR2b signaling. *Developmental Biology*, *317*(1), 121-131. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.02.014>
- Pastrello, C., Polesel, J., Della Puppa, L., Viel, A., & Maestro, R. (2010). Association between hsa-mir-146a genotype and tumor age-of-onset in BRCA1/BRCA2-negative familial breast and ovarian cancer patients. *Carcinogenesis*, *31*(12), 2124-2126. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq184>
- Paul, A. (2014). The breast cancer susceptibility genes (BRCA) in breast and ovarian cancers. *Frontiers in Bioscience*, *19*(4), 605. <https://doi.org/10.2741/4230>
- Peng, G., Chun-Jen Lin, C., Mo, W., Dai, H., Park, Y.-Y., Kim, S. M., Peng, Y., Mo, Q., Siwko, S., Hu, R., Lee, J.-S., Hennessy, B., Hanash, S., Mills, G. B., & Lin, S.-Y. (2014). Genome-wide transcriptome profiling of homologous recombination DNA repair. *Nature Communications*, *5*(1), 3361. <https://doi.org/10.1038/ncomms4361>
- Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslén, L. A., Fluge, Ø., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A.-L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, *406*(6797), 747-752. <https://doi.org/10.1038/35021093>
- Peshkin, B. N., Alabek, M. L., & Isaacs, C. (2011). BRCA1/2 mutations and triple negative breast cancers. *Breast Disease*, *32*(1-2), 25-33. <https://doi.org/10.3233/BD-2010-0306>
- Peterson, R. S., Andhare, R. A., Rousche, K. T., Knudson, W., Wang, W., Grossfield, J. B., Thomas, R. O., Hollingsworth, R. E., & Knudson, C. B. (2004). CD44 modulates Smad1 activation in the BMP-7 signaling pathway. *The Journal of Cell Biology*, *166*(7), 1081-1091. <https://doi.org/10.1083/jcb.200402138>
- Pickup, M. W., Hover, L. D., Guo, Y., Gorska, A. E., Chytil, A., Novitskiy, S. V., Moses, H. L., & Owens, P. (2015). Deletion of the BMP receptor BMPR1a impairs mammary tumor formation and metastasis. *Oncotarget*, *6*(26), 22890-22904. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4413>
- Pohl, S.-G., Brook, N., Agostino, M., Arfuso, F., Kumar, A. P., & Dharmarajan, A. (2017). Wnt signaling in triple-negative breast cancer. *Oncogenesis*, *6*(4), e310-e310. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2017.14>
- Polak, P., Kim, J., Braunstein, L. Z., Karlic, R., Haradhavala, N. J., Tiao, G., Rosebrock, D., Livitz, D., Kübler, K., Mouw, K. W., Kamburov, A., Maruvka, Y. E., Leshchiner, I., Lander, E. S., Golub, T. R., Zick, A., Orthwein, A., Lawrence, M. S., Batra, R. N., ... Getz, G. (2017). A mutational signature reveals alterations underlying deficient homologous recombination repair in breast cancer. *Nature Genetics*, *49*(10), 1476-1486. <https://doi.org/10.1038/ng.3934>
- Polyak, K., & Kalluri, R. (2010). The Role of the Microenvironment in Mammary Gland Development and Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(11), a003244-a003244. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003244>
- Pond, A. C., Bin, X., Batts, T., Roarty, K., Hilsenbeck, S., & Rosen, J. M. (2013). Fibroblast Growth Factor Receptor Signaling Is Essential for Normal Mammary Gland Development and Stem Cell Function. *Stem Cells*, *31*(1), 178-189. <https://doi.org/10.1002/stem.1266>
- Ponti, D., Costa, A., Zaffaroni, N., Pratesi, G., Petrangolini, G., Coradini, D., Pilotti, S., Pierotti, M. A., & Daidone, M. G. (2005). Isolation and *In vitro* Propagation of Tumorigenic Breast Cancer Cells with

- Stem/Progenitor Cell Properties. *Cancer Research*, 65(13), 5506-5511. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0626>
- Popova, T., Manié, E., Rieunier, G., Caux-Moncoutier, V., Tirapo, C., Dubois, T., Delattre, O., Sigal-Zafrani, B., Bollet, M., Longy, M., Houdayer, C., Sastre-Garau, X., Vincent-Salomon, A., Stoppa-Lyonnet, D., & Stern, M.-H. (2012). Ploidy and Large-Scale Genomic Instability Consistently Identify Basal-like Breast Carcinomas with *BRCA1/2* Inactivation. *Cancer Research*, 72(21), 5454-5462. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1470>
- Prater, M. D., Petit, V., Alasdair Russell, I., Giraddi, R. R., Shehata, M., Menon, S., Schulte, R., Kalajzic, I., Rath, N., Olson, M. F., Metzger, D., Faraldo, M. M., Deugnier, M.-A., Glukhova, M. A., & Stingl, J. (2014). Mammary stem cells have myoepithelial cell properties. *Nature Cell Biology*, 16(10), 942-950. <https://doi.org/10.1038/ncb3025>
- Preca, B., Bajdak, K., Mock, K., Sundararajan, V., Pfannstiel, J., Maurer, J., Wellner, U., Hopt, U. T., Brummer, T., Brabletz, S., Brabletz, T., & Stemmler, M. P. (2015). A self-enforcing CD 44s/ ZEB 1 feedback loop maintains EMT and stemness properties in cancer cells. *International Journal of Cancer*, 137(11), 2566-2577. <https://doi.org/10.1002/ijc.29642>
- Proia, T. A., Keller, P. J., Gupta, P. B., Klebba, I., Jones, A. D., Sedic, M., Gilmore, H., Tung, N., Naber, S. P., Schnitt, S., Lander, E. S., & Kuperwasser, C. (2011). Genetic Predisposition Directs Breast Cancer Phenotype by Dictating Progenitor Cell Fate. *Cell Stem Cell*, 8(2), 149-163. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.12.007>
- Qin, B. Y., Lam, S. S., Correia, J. J., & Lin, K. (s. d.). *Smad3* allosteric links TGF- β receptor kinase activation to transcriptional control.
- Qiu, S., & Huang, J. (2021). MRN complex is an essential effector of DNA damage repair. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 22(1), 31-37. <https://doi.org/10.1631/jzus.B2000289>
- Quann, K., Jing, Y., & Rigoutsos, I. (2015). Post-transcriptional regulation of BRCA1 through its coding sequence by the miR-15/107 group of miRNAs. *Frontiers in Genetics*, 6. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00242>
- Raje, M. M., & Ashma, R. (2019). Epigenetic regulation of BMP2 gene in osteoporosis : A DNA methylation study. *Molecular Biology Reports*, 46(2), 1667-1674. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04615-y>
- Rakha, E. A., El-Sheikh, S. E., Kandil, M. A., El-Sayed, M. E., Green, A. R., & Ellis, I. O. (2008). Expression of BRCA1 protein in breast cancer and its prognostic significance. *Human Pathology*, 39(6), 857-865. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2007.10.011>
- Rakha, E. A., Reis-Filho, J. S., & Ellis, I. O. (2008). Basal-Like Breast Cancer : A Critical Review. *Journal of Clinical Oncology*, 26(15), 2568-2581. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.13.1748>
- Rakha, E., Putti, T., Abd El-Rehim, D., Paish, C., Green, A., Powe, D., Lee, A., Robertson, J., & Ellis, I. (2006). Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation. *The Journal of Pathology*, 208(4), 495-506. <https://doi.org/10.1002/path.1916>
- Ramirez, F., & Rifkin, D. B. (2009). Extracellular microfibrils : Contextual platforms for TGF β and BMP signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(5), 616-622. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.05.005>
- Ray-Coquard, I., Pautier, P., Pignata, S., Pérol, D., González-Martín, A., Berger, R., Fujiwara, K., Vergote, I., Colombo, N., Mäenpää, J., Selle, F., Sehouli, J., Lorusso, D., Guerra Alía, E. M., Reinthaller, A., Nagao, S., Lefeuvre-Plesse, C., Canzler, U., Scambia, G., ... Harter, P. (2019). Olaparib plus Bevacizumab as First-Line Maintenance in Ovarian Cancer. *New England Journal of Medicine*, 381(25), 2416-2428. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1911361>
- Reddi, A. H. (s. d.). *Interplay between bone morphogenetic proteins and cognate binding proteins in bone and cartilage development : Noggin, chordin and DAN*. 3(1).
- Rennstam, K., Ringberg, A., Cunliffe, H. E., Olsson, H., Landberg, G., & Hedenfalk, I. (2010). Genomic alterations in histopathologically normal breast tissue from *BRCA1* mutation carriers may be caused by *BRCA1* haploinsufficiency. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 49(1), 78-90. <https://doi.org/10.1002/gcc.20723>
- Resetskova, E., Reis-Filho, J. S., Jain, R. K., Mehta, R., Thorat, M. A., Nakshatri, H., & Badve, S. (2010). Prognostic impact of ALDH1 in breast cancer : A story of stem cells and tumor microenvironment. *Breast Cancer Research and Treatment*, 123(1), 97-108. <https://doi.org/10.1007/s10549-009-0619-3>
- Reversi, A., Cassoni, P., & Chini, B. (2005). Oxytocin Receptor Signaling in Myoepithelial and Cancer Cells. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 10(3), 221. <https://doi.org/10.1007/s10911-005-9583-7>
- Reya, T., & Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, 434(7035), 843-850. <https://doi.org/10.1038/nature03319>

- Ricardo, S., Vieira, A. F., Gerhard, R., Leitão, D., Pinto, R., Cameselle-Teijeiro, J. F., Milanezi, F., Schmitt, F., & Paredes, J. (2011). Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1 : Expression distribution within intrinsic molecular subtype. *Journal of Clinical Pathology*, *64*(11), 937-946. <https://doi.org/10.1136/jcp.2011.090456>
- Richardson, C., Stark, J. M., Ommundsen, M., & Jasin, M. (2004). Rad51 overexpression promotes alternative double-strand break repair pathways and genome instability. *Oncogene*, *23*(2), 546-553. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207098>
- Richert, M. M., Schwertfeger, K. L., Ryder, J. W., & Anderson, S. M. (s. d.). *An Atlas of Mouse Mammary Gland Development*.
- Rios, A. C., Fu, N. Y., Cursons, J., Lindeman, G. J., & Visvader, J. E. (2016). The complexities and caveats of lineage tracing in the mammary gland. *Breast Cancer Research*, *18*(1), 116. <https://doi.org/10.1186/s13058-016-0774-5>
- Rios, A. C., Fu, N. Y., Lindeman, G. J., & Visvader, J. E. (2014). In situ identification of bipotent stem cells in the mammary gland. *Nature*, *506*(7488), 322-327. <https://doi.org/10.1038/nature12948>
- Rizzo, P., Miao, H., D'Souza, G., Osipo, C., Yun, J., Zhao, H., Mascarenhas, J., Wyatt, D., Antico, G., Hao, L., Yao, K., Rajan, P., Hicks, C., Siziopikou, K., Selvaggi, S., Bashir, A., Bhandari, D., Marchese, A., Lendahl, U., ... Miele, L. (2008). Cross-talk between Notch and the Estrogen Receptor in Breast Cancer Suggests Novel Therapeutic Approaches. *Cancer Research*, *68*(13), 5226-5235. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5744>
- Robinson, G. W. (2007). Cooperation of signalling pathways in embryonic mammary gland development. *Nature Reviews Genetics*, *8*(12), 963-972. <https://doi.org/10.1038/nrg2227>
- Robson, M., Im, S.-A., Senkus, E., Xu, B., Domchek, S. M., Masuda, N., Delaloge, S., Li, W., Tung, N., Armstrong, A., Wu, W., Goessl, C., Runswick, S., & Conte, P. (2017). Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline *BRCA* Mutation. *New England Journal of Medicine*, *377*(6), 523-533. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706450>
- Rodler, E., Sharma, P., Barlow, W. E., Gralow, J. R., Puhalla, S. L., Anders, C. K., Goldstein, L., Tripathy, D., Brown-Glaberman, U. A., Huynh, T.-T., Szyarto, C. S., Godwin, A. K., Pathak, H. B., Swisher, E. M., Radke, M. R., Timms, K. M., Lew, D. L., Miao, J., Pusztai, L., ... Hortobagyi, G. N. (2023). Cisplatin with veliparib or placebo in metastatic triple-negative breast cancer and *BRCA* mutation-associated breast cancer (S1416) : A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*, *24*(2), 162-174. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(22\)00739-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(22)00739-2)
- Rodriguez, C., Hughes-Davies, L., Vallès, H., Orsetti, B., Cuny, M., Ursule, L., Kouzarides, T., & Theillet, C. (2004). Amplification of the *BRCA2* Pathway Gene *EMSY* in Sporadic Breast Cancer Is Related to Negative Outcome. *Clinical Cancer Research*, *10*(17), 5785-5791. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0410>
- Rodríguez-Pinilla, S. M., Sarrió, D., Honrado, E., Hardisson, D., Calero, F., Benitez, J., & Palacios, J. (2006). Prognostic Significance of Basal-Like Phenotype and Fascin Expression in Node-Negative Invasive Breast Carcinomas. *Clinical Cancer Research*, *12*(5), 1533-1539. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2281>
- Roldán, G., Delgado, L., & Musé, I. M. (2006). Tumoral expression of *BRCA1*, Estrogen receptor alpha and ID4 protein in patients with sporadic breast cancer. *Cancer Biology & Therapy*, *5*(5), 505-510. <https://doi.org/10.4161/cbt.5.5.2597>
- Rosenzweig, B. L., Imamura, T., Okadome, T., Cox, G. N., Yamashita, H., Ten Dijke, P., Heldin, C. H., & Miyazono, K. (1995). Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *92*(17), 7632-7636. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.17.7632>
- Rouzier, R., Perou, C. M., Symmans, W. F., Ibrahim, N., Cristofanilli, M., Anderson, K., Hess, K. R., Stec, J., Ayers, M., Wagner, P., Morandi, P., Fan, C., Rabiul, I., Ross, J. S., Hortobagyi, G. N., & Pusztai, L. (2005). Breast Cancer Molecular Subtypes Respond Differently to Preoperative Chemotherapy. *Clinical Cancer Research*, *11*(16), 5678-5685. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2421>
- Ruan, W., & Kleinberg, D. L. (1999). *Insulin-Like Growth Factor I Is Essential for Terminal End Bud Formation and Ductal Morphogenesis during Mammary Development*. *140*(11).
- Ruan, W., Monaco, M. E., & Kleinberg, D. L. (2005). Progesterone Stimulates Mammary Gland Ductal Morphogenesis by Synergizing with and Enhancing Insulin-Like Growth Factor-I Action. *Endocrinology*, *146*(3), 1170-1178. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1360>
- Rugo, H. S., Olopade, O. I., DeMichele, A., Yau, C., van 't Veer, L. J., Buxton, M. B., Hogarth, M., Hylton, N. M., Paoloni, M., Perlmutter, J., Symmans, W. F., Yee, D., Chien, A. J., Wallace, A. M., Kaplan, H. G.,

- Boughey, J. C., Haddad, T. C., Albain, K. S., Liu, M. C., ... Esserman, L. J. (2016). Adaptive Randomization of Veliparib–Carboplatin Treatment in Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 375(1), 23-34. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1513749>
- Rumman, M., Dhawan, J., & Kassem, M. (2015). Concise Review : Quiescence in Adult Stem Cells: Biological Significance and Relevance to Tissue Regeneration. *Stem Cells*, 33(10), 2903-2912. <https://doi.org/10.1002/stem.2056>
- Runswick, S. K., O’Hare, M. J., Jones, L., Streuli, C. H., & Garrod, D. R. (2001). Desmosomal adhesion regulates epithelial morphogenesis and cell positioning. *Nature Cell Biology*, 3(9), 823-830. <https://doi.org/10.1038/ncb0901-823>
- Russo, J., & Russo, I. H. (2004). Development of the human breast. *Maturitas*, 49(1), 2-15. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2004.04.011>
- Ruzinova, M. B., & Benezra, R. (2003). Id proteins in development, cell cycle and cancer. *Trends in Cell Biology*, 13(8), 410-418. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(03\)00147-8](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(03)00147-8)
- Saal, L. H., Gruvberger-Saal, S. K., Persson, C., Lövgren, K., Jumppanen, M., Staaf, J., Jönsson, G., Pires, M. M., Maurer, M., Holm, K., Koujak, S., Subramaniam, S., Vallon-Christersson, J., Olsson, H., Su, T., Memeo, L., Ludwig, T., Ethier, S. P., Krogh, M., ... Borg, Å. (2008). Recurrent gross mutations of the PTEN tumor suppressor gene in breast cancers with deficient DSB repair. *Nature Genetics*, 40(1), 102-107. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.39>
- Sabatier, R., Adélaïde, J., Finetti, P., Ferrari, A., Huiart, L., Sobol, H., Chaffanet, M., Birnbaum, D., & Bertucci, F. (2010). BARD1 homozygous deletion, a possible alternative to BRCA1 mutation in basal breast cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 49(12), 1143-1151. <https://doi.org/10.1002/gcc.20822>
- Samad, T. A., Rebbapragada, A., Bell, E., Zhang, Y., Sidis, Y., Jeong, S.-J., Campagna, J. A., Perusini, S., Fabrizio, D. A., Schneyer, A. L., Lin, H. Y., Brivanlou, A. H., Attisano, L., & Woolf, C. J. (2005). DRAGON, a Bone Morphogenetic Protein Co-receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 280(14), 14122-14129. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410034200>
- Sansone, P., Storci, G., Giovannini, C., Pandolfi, S., Pianetti, S., Taffurelli, M., Santini, D., Ceccarelli, C., Chieco, P., & Bonafé, M. (2007). p66Shc/Notch-3 Interplay Controls Self-Renewal and Hypoxia Survival in Human Stem/Progenitor Cells of the Mammary Gland Expanded In Vitro as Mammospheres. *Stem Cells*, 25(3), 807-815. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0442>
- Sanvitale, C. E., Kerr, G., Chaikuad, A., Ramel, M.-C., Mohedas, A. H., Reichert, S., Wang, Y., Triffitt, J. T., Cuny, G. D., Yu, P. B., Hill, C. S., & Bullock, A. N. (2013). A New Class of Small Molecule Inhibitor of BMP Signaling. *PLoS ONE*, 8(4), e62721. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062721>
- Schmid, P., Cortes, J., Dent, R., Pusztai, L., McArthur, H., Kümmel, S., Bergh, J., Denkert, C., Park, Y. H., Hui, R., Harbeck, N., Takahashi, M., Untch, M., Fasching, P. A., Cardoso, F., Andersen, J., Patt, D., Danso, M., Ferreira, M., ... O’Shaughnessy, J. (2022). Event-free Survival with Pembrolizumab in Early Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 386(6), 556-567. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2112651>
- Schwartz, A. M., Henson, D. E., Chen, D., & Rajamarthandan, S. (2014). Histologic Grade Remains a Prognostic Factor for Breast Cancer Regardless of the Number of Positive Lymph Nodes and Tumor Size : A Study of 161 708 Cases of Breast Cancer From the SEER Program. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 138(8), 1048-1052. <https://doi.org/10.5858/arpa.2013-0435-OA>
- Scully, R., Panday, A., Elango, R., & Willis, N. A. (2019). DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(11), 698-714. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0152-0>
- Sedic, M., Skibinski, A., Brown, N., Gallardo, M., Mulligan, P., Martinez, P., Keller, P. J., Glover, E., Richardson, A. L., Cowan, J., Toland, A. E., Ravichandran, K., Riethman, H., Naber, S. P., Näär, A. M., Blasco, M. A., Hinds, P. W., & Kuperwasser, C. (2015). Haploinsufficiency for BRCA1 leads to cell-type-specific genomic instability and premature senescence. *Nature Communications*, 6(1), 7505. <https://doi.org/10.1038/ncomms8505>
- Seluanov, A., Mao, Z., & Gorbunova, V. (2010). Analysis of DNA Double-strand Break (DSB) Repair in Mammalian Cells. *Journal of Visualized Experiments*, 43, 2002. <https://doi.org/10.3791/2002>
- Sengle, G., Charbonneau, N. L., Ono, R. N., Sasaki, T., Alvarez, J., Keene, D. R., Bächinger, H. P., & Sakai, L. Y. (2008). Targeting of Bone Morphogenetic Protein Growth Factor Complexes to Fibrillin. *Journal of Biological Chemistry*, 283(20), 13874-13888. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707820200>
- Severson, T. M., Wolf, D. M., Yau, C., Peeters, J., Wehkam, D., Schouten, P. C., Chin, S.-F., Majewski, I. J., Michaut, M., Bosma, A., Pereira, B., Bismeyer, T., Wessels, L., Caldas, C., Bernards, R., Simon, I. M., Glas, A. M., Linn, S., & van ’t Veer, L. (2017). The BRCA1ness signature is associated significantly with

- response to PARP inhibitor treatment versus control in the I-SPY 2 randomized neoadjuvant setting. *Breast Cancer Research*, 19(1), 99. <https://doi.org/10.1186/s13058-017-0861-2>
- Shackleton, M., Vaillant, F., Simpson, K. J., Stingl, J., Smyth, G. K., Asselin-Labat, M.-L., Wu, L., Lindeman, G. J., & Visvader, J. E. (2006). Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature*, 439(7072), 84-88. <https://doi.org/10.1038/nature04372>
- Shao, Z., Li, K., Yao, L., Chen, L., Cao, Z.-G., Yu, S.-J., Kuang, X.-Y., & Hu, X. (2014). ID2 predicts poor prognosis in breast cancer, especially in triple-negative breast cancer, and inhibits E-cadherin expression. *OncoTargets and Therapy*, 1083. <https://doi.org/10.2147/OTT.S64759>
- Sharma, P., Barlow, W. E., Godwin, A. K., Pathak, H., Isakova, K., Williams, D., Timms, K. M., Hartman, A. R., Wenstrup, R. J., Linden, H. M., Tripathy, D., Hortobagyi, G. N., & Hayes, D. F. (2018). Impact of homologous recombination deficiency biomarkers on outcomes in patients with triple-negative breast cancer treated with adjuvant doxorubicin and cyclophosphamide (SWOG S9313). *Annals of Oncology*, 29(3), 654-660. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx821>
- Sharma, P., Kimler, B. F., O'Dea, A., Nye, L., Wang, Y. Y., Yoder, R., Staley, J. M., Prochaska, L., Wagner, J., Amin, A. L., Larson, K., Balanoff, C., Elia, M., Crane, G., Madhusudhana, S., Hoffmann, M., Sheehan, M., Rodriguez, R., Finke, K., ... Khan, Q. (2021). Randomized Phase II Trial of Anthracycline-free and Anthracycline-containing Neoadjuvant Carboplatin Chemotherapy Regimens in Stage I-III Triple-negative Breast Cancer (NeoSTOP). *Clinical Cancer Research*, 27(4), 975-982. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-3646>
- Sharma, R., Gogoi, G., Saikia, S., Sharma, A., Kalita, D. J., Sarma, A., Limaye, A. M., Gaur, M. K., Bhattacharyya, J., & Jaganathan, B. G. (2022). BMP4 enhances anoikis resistance and chemoresistance of breast cancer cells through canonical BMP signaling. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 16(2), 191-205. <https://doi.org/10.1007/s12079-021-00649-9>
- Sharma, T., Kapoor, A., & Mandal, C. C. (2022). Duality of bone morphogenetic proteins in cancer: A comprehensive analysis. *Journal of Cellular Physiology*, 237(8), 3127-3163. <https://doi.org/10.1002/jcp.30785>
- Shehata, M., Teschendorff, A., Sharp, G., Novcic, N., Russell, I. A., Avril, S., Prater, M., Eirew, P., Caldas, C., Watson, C. J., & Stingl, J. (2012). Phenotypic and functional characterisation of the luminal cell hierarchy of the mammary gland. *Breast Cancer Research*, 14(5), R134. <https://doi.org/10.1186/bcr3334>
- Shen, J., Ambrosone, C. B., DiCioccio, R. A., Odunsi, K., Lele, S. B., & Zhao, H. (2008). A functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis. *Carcinogenesis*, 29(10), 1963-1966. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn172>
- Shen, J., Ambrosone, C. B., & Zhao, H. (2009). Novel genetic variants in microRNA genes and familial breast cancer. *International Journal of Cancer*, 124(5), 1178-1182. <https://doi.org/10.1002/ijc.24008>
- Shi, W., Chang, C., Nie, S., Xie, S., Wan, M., & Cao, X. (2007). Endofin acts as a Smad anchor for receptor activation in BMP signaling. *Journal of Cell Science*, 120(7), 1216-1224. <https://doi.org/10.1242/jcs.03400>
- Shi, Y., Hata, A., Lo, R. S., Massagué, J., & Pavletich, N. P. (1997). A structural basis for mutational inactivation of the tumour suppressor Smad4. *Nature*, 388(6637), 87-93. <https://doi.org/10.1038/40431>
- Shibue, T., & Weinberg, R. A. (2017). EMT, CSCs, and drug resistance: The mechanistic link and clinical implications. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14(10), 611-629. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.44>
- Shimelis, H., LaDuca, H., Hu, C., Hart, S. N., Na, J., Thomas, A., Akinhanmi, M., Moore, R. M., Brauch, H., Cox, A., Eccles, D. M., Ewart-Toland, A., Fasching, P. A., Fostira, F., Garber, J., Godwin, A. K., Konstantopoulou, I., Nevanlinna, H., Sharma, P., ... Couch, F. J. (2018). Triple-Negative Breast Cancer Risk Genes Identified by Multigene Hereditary Cancer Panel Testing. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 110(8), 855-862. <https://doi.org/10.1093/jnci/djy106>
- Shin, D.-H., Park, J.-H., Lee, J.-Y., Won, H.-Y., Jang, K.-S., Min, K.-W., Jang, S.-H., Woo, J.-K., Oh, S. H., & Kong, G. (2015). Overexpression of Id1 in transgenic mice promotes mammary basal stem cell activity and breast tumorigenesis. *Oncotarget*, 6(19), 17276-17290. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3640>
- Shipitsin, M., Campbell, L. L., Argani, P., Weremowicz, S., Bloushtain-Qimron, N., Yao, J., Nikolskaya, T., Serebryskaya, T., Beroukhim, R., Hu, M., Halushka, M. K., Sukumar, S., Parker, L. M., Anderson, K. S., Harris, L. N., Garber, J. E., Richardson, A. L., Schnitt, S. J., Nikolsky, Y., ... Polyak, K. (2007). Molecular Definition of Breast Tumor Heterogeneity. *Cancer Cell*, 11(3), 259-273. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.01.013>

- Sieber, C., Kopf, J., Hiepen, C., & Knaus, P. (2009). Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 20(5-6), 343-355. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.10.007>
- Sikov, W. M., Berry, D. A., Perou, C. M., Singh, B., Cirrincione, C. T., Tolaney, S. M., Kuzma, C. S., Pluard, T. J., Somlo, G., Port, E. R., Golshan, M., Bellon, J. R., Collyar, D., Hahn, O. M., Carey, L. A., Hudis, C. A., & Winer, E. P. (2015). Impact of the Addition of Carboplatin and/or Bevacizumab to Neoadjuvant Once-per-Week Paclitaxel Followed by Dose-Dense Doxorubicin and Cyclophosphamide on Pathologic Complete Response Rates in Stage II to III Triple-Negative Breast Cancer : CALGB 40603 (Alliance). *Journal of Clinical Oncology*, 33(1), 13-21. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.57.0572>
- Silver, D. P., Richardson, A. L., Eklund, A. C., Wang, Z. C., Szallasi, Z., Li, Q., Juul, N., Leong, C.-O., Calogrias, D., Buraimoh, A., Fatima, A., Gelman, R. S., Ryan, P. D., Tung, N. M., De Nicolo, A., Ganesan, S., Miron, A., Colin, C., Sgroi, D. C., ... Garber, J. E. (2010). Efficacy of Neoadjuvant Cisplatin in Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28(7), 1145-1153. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.22.4725>
- Sioftanos, G., Ismail, A., Föhse, L., Shanley, S., Worku, M., & Short, S. C. (2010). *BRCA1* and *BRCA2* heterozygosity in embryonic stem cells reduces radiation-induced Rad51 focus formation but is not associated with radiosensitivity. *International Journal of Radiation Biology*, 86(12), 1095-1105. <https://doi.org/10.3109/09553002.2010.501836>
- Sleeman, K. E., Kendrick, H., Ashworth, A., Isacke, C. M., & Smalley, M. J. (2005). CD24 staining of mouse mammary gland cells defines luminal epithelial, myoepithelial/basal and non-epithelial cells. *Breast Cancer Research*, 8(1), R7. <https://doi.org/10.1186/bcr1371>
- Sluiter, M., Mew, S., & van Rensburg, E. J. (2009). PALB2 sequence variants in young South African breast cancer patients. *Familial Cancer*, 8(4), 347-353. <https://doi.org/10.1007/s10689-009-9241-0>
- Smid, M., Wang, Y., Zhang, Y., Sieuwerts, A. M., Yu, J., Klijn, J. G. M., Foekens, J. A., & Martens, J. W. M. (2008). Subtypes of Breast Cancer Show Preferential Site of Relapse. *Cancer Research*, 68(9), 3108-3114. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5644>
- Smith, G. H., & Medina, D. (1988). A morphologically distinct candidate for an epithelial stem cell in mouse mammary gland. *Journal of Cell Science*, 90(1), 173-183. <https://doi.org/10.1242/jcs.90.1.173>
- Sokol, E. S., Jin, D. X., Fine, A., Trabucco, S. E., Maund, S., Frampton, G., Molinero, L., & Antonarakis, E. S. (2022). PARP Inhibitor Insensitivity to *BRCA1/2* Monoallelic Mutations in Microsatellite Instability-High Cancers. *JCO Precision Oncology*, 6, e2100531. <https://doi.org/10.1200/PO.21.00531>
- Sokol, E. S., Pavlick, D., Khiabani, H., Frampton, G. M., Ross, J. S., Gregg, J. P., Lara, P. N., Oesterreich, S., Agarwal, N., Necchi, A., Miller, V. A., Alexander, B., Ali, S. M., Ganesan, S., & Chung, J. H. (2020). Pan-Cancer Analysis of *BRCA1* and *BRCA2* Genomic Alterations and Their Association With Genomic Instability as Measured by Genome-Wide Loss of Heterozygosity. *JCO Precision Oncology*, 4, 442-465. <https://doi.org/10.1200/PO.19.00345>
- Song, L., Dai, T., Xie, Y., Wang, C., Lin, C., Wu, Z., Ying, Z., Wu, J., Li, M., & Li, J. (2012). Up-regulation of miR-1245 by c-myc targets *BRCA2* and impairs DNA repair. *Journal of Molecular Cell Biology*, 4(2), 108-117. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjr046>
- Sørli, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J. C., Brown, P. O., Botstein, D., Lønning, P. E., & Børresen-Dale, A.-L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(19), 10869-10874. <https://doi.org/10.1073/pnas.191367098>
- Sørli, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J. S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., Demeter, J., Perou, C. M., Lønning, P. E., Brown, P. O., Børresen-Dale, A.-L., & Botstein, D. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(14), 8418-8423. <https://doi.org/10.1073/pnas.0932692100>
- Sountoulidis, A., Stavropoulos, A., Giaglis, S., Apostolou, E., Monteiro, R., Chua De Sousa Lopes, S. M., Chen, H., Stripp, B. R., Mummery, C., Andreakos, E., & Sideras, P. (2012). Activation of the Canonical Bone Morphogenetic Protein (BMP) Pathway during Lung Morphogenesis and Adult Lung Tissue Repair. *PLoS ONE*, 7(8), e41460. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041460>
- Sousa, B., Paredes, J., Milanezi, F., Lopes, N., Martins, D., Dufloth, R., Vieira, D., Albergaria, A., Veronese, L., Carneiro, V., Carvalho, S., Costa, J. L., Zeferino, L., & Schmitt, F. (2010). P-cadherin, vimentin and CK14 for identification of basal-like phenotype in breast carcinomas : An immunohistochemical study. *Histology and Histopathology*, 25(8), 963-974. <https://doi.org/10.14670/HH-25.963>
- Southey, M. C., Goldgar, D. E., Winqvist, R., Pylkäs, K., Couch, F., Tischkowitz, M., Foulkes, W. D., Dennis, J., Michailidou, K., van Rensburg, E. J., Heikkinen, T., Nevanlinna, H., Hopper, J. L., Dörk, T., Claes, K. B.,

- Reis-Filho, J., Teo, Z. L., Radice, P., Catucci, I., ... Milne, R. L. (2016). *PALB2*, *CHEK2* and *ATM* rare variants and cancer risk: Data from COGS. *Journal of Medical Genetics*, *53*(12), 800-811. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2016-103839>
- Spike, B. T., Engle, D. D., Lin, J. C., Cheung, S. K., La, J., & Wahl, G. M. (2012). A Mammary Stem Cell Population Identified and Characterized in Late Embryogenesis Reveals Similarities to Human Breast Cancer. *Cell Stem Cell*, *10*(2), 183-197. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.12.018>
- Staaf, J., Glodzik, D., Bosch, A., Vallon-Christersson, J., Reuterswärd, C., Häkkinen, J., Degasperis, A., Amarante, T. D., Saal, L. H., Hegardt, C., Stobart, H., Ehinger, A., Larsson, C., Rydén, L., Loman, N., Malmberg, M., Kvist, A., Ehrencrona, H., Davies, H. R., ... Nik-Zainal, S. (2019). Whole-genome sequencing of triple-negative breast cancers in a population-based clinical study. *Nature Medicine*, *25*(10), 1526-1533. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0582-4>
- Sternlicht, M. D. (2005). Key stages in mammary gland development: The cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast Cancer Research*, *8*(1), 201. <https://doi.org/10.1186/bcr1368>
- Stingl, J., Eaves, C. J., Zandieh, I., & Emsman, J. T. (2001). Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue. *Breast Cancer Research and Treatment*, *67*(2), 93-109. <https://doi.org/10.1023/A:1010615124301>
- Stingl, J., Eirew, P., Ricketson, I., Shackleton, M., Vaillant, F., Choi, D., Li, H. I., & Eaves, C. J. (2006). Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature*, *439*(7079), 993-997. <https://doi.org/10.1038/nature04496>
- Sulaiman, A., McGarry, S., Li, L., Jia, D., Ooi, S., Addison, C., Dimitroulakos, J., Arnaout, A., Nessim, C., Yao, Z., Ji, G., Song, H., Gadde, S., Li, X., & Wang, L. (2018). Dual inhibition of Wnt and Yes-associated protein signaling retards the growth of triple-negative breast cancer in both mesenchymal and epithelial states. *Molecular Oncology*, *12*(4), 423-440. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12167>
- Sumbal, J., Belisova, D., & Koledova, Z. (2021). Fibroblasts: The grey eminence of mammary gland development. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *114*, 134-142. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.10.012>
- Sun, Q., Wang, Y., Officer, A., Pecknold, B., Lee, G., Harismendy, O., & Desgrosellier, J. S. (2022). Stem-like breast cancer cells in the activated state resist genetic stress via TGFBI-ZEB1. *Npj Breast Cancer*, *8*(1), 5. <https://doi.org/10.1038/s41523-021-00375-w>
- Sweeney, C., Bernard, P. S., Factor, R. E., Kwan, M. L., Habel, L. A., Quesenberry, C. P., Shakespear, K., Weltzien, E. K., Stijleman, I. J., Davis, C. A., Ebbert, M. T. W., Castillo, A., Kushi, L. H., & Caan, B. J. (2014). Intrinsic Subtypes from PAM50 Gene Expression Assay in a Population-Based Breast Cancer Cohort: Differences by Age, Race, and Tumor Characteristics. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, *23*(5), 714-724. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-13-1023>
- Sztupinszki, Z., Diossy, M., Krzystanek, M., Reiniger, L., Csabai, I., Favero, F., Birkbak, N. J., Eklund, A. C., Syed, A., & Szallasi, Z. (2018). Migrating the SNP array-based homologous recombination deficiency measures to next generation sequencing data of breast cancer. *Npj Breast Cancer*, *4*(1), 16. <https://doi.org/10.1038/s41523-018-0066-6>
- Taddei, I., Deugnier, M.-A., Faraldo, M. M., Petit, V., Bouvard, D., Medina, D., Fässler, R., Thiery, J. P., & Glukhova, M. A. (2008). B1 Integrin deletion from the basal compartment of the mammary epithelium affects stem cells. *Nature Cell Biology*, *10*(6), 716-722. <https://doi.org/10.1038/ncb1734>
- Takaoka, M., & Miki, Y. (2018). BRCA1 gene: Function and deficiency. *International Journal of Clinical Oncology*, *23*(1), 36-44. <https://doi.org/10.1007/s10147-017-1182-2>
- Tan, X., Peng, J., Fu, Y., An, S., Rezaei, K., Tabbara, S., Teal, C. B., Man, Y., Brem, R. F., & Fu, S. W. (2014). miR-638 mediated regulation of BRCA1 affects DNA repair and sensitivity to UV and cisplatin in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research*, *16*(5), 435. <https://doi.org/10.1186/s13058-014-0435-5>
- Tanos, T., Rojo, L. J., Echeverria, P., & Brisken, C. (2012). ER and PR signaling nodes during mammary gland development. *Breast Cancer Research*, *14*(4), 210. <https://doi.org/10.1186/bcr3166>
- Tay, C. C. K., Glasier, A. F., & McNeilly, A. S. (1996). Twenty-four hour patterns of prolactin secretion during lactation and the relationship to suckling and the resumption of fertility in breast-feeding women. *Human Reproduction*, *11*(5), 950-955. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a019330>
- Teichgraber, D. C., Guirguis, M. S., & Whitman, G. J. (2021). Breast Cancer Staging: Updates in the *AJCC Cancer Staging Manual*, 8th Edition, and Current Challenges for Radiologists, From the *AJR Special Series on Cancer Staging*. *American Journal of Roentgenology*, *217*(2), 278-290. <https://doi.org/10.2214/AJR.20.25223>

- Telli, M. L., Jensen, K. C., Vinayak, S., Kurian, A. W., Lipson, J. A., Flaherty, P. J., Timms, K., Abkevich, V., Schackmann, E. A., Wapnir, I. L., Carlson, R. W., Chang, P.-J., Sparano, J. A., Head, B., Goldstein, L. J., Haley, B., Dakhil, S. R., Reid, J. E., Hartman, A.-R., ... Ford, J. M. (2015). Phase II Study of Gemcitabine, Carboplatin, and Iniparib As Neoadjuvant Therapy for Triple-Negative and *BRCA1* / 2 Mutation-Associated Breast Cancer With Assessment of a Tumor-Based Measure of Genomic Instability : PrECOG 0105. *Journal of Clinical Oncology*, *33*(17), 1895-1901. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.57.0085>
- Teo, W. S., Holliday, H., Karthikeyan, N., Cazet, A. S., Roden, D. L., Harvey, K., Konrad, C. V., Murali, R., Varghese, B. A., Thankamony, A. P., Chan, C.-L., McFarland, A., Junankar, S., Ye, S., Yang, J., Nikolic, I., Shah, J. S., Baker, L. A., Millar, E. K. A., ... Nair, R. (2020). Id Proteins Promote a Cancer Stem Cell Phenotype in Mouse Models of Triple Negative Breast Cancer via Negative Regulation of Robo1. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*, 552. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00552>
- Ter Brugge, P., Moser, S. C., Bièche, I., Kristel, P., Ibadioune, S., Eeckhoutte, A., De Bruijn, R., Van Der Burg, E., Lutz, C., Annunziato, S., De Ruyter, J., Masliah Planchon, J., Vacher, S., Courtois, L., El-Botty, R., Dahmani, A., Montaudon, E., Morisset, L., Sourd, L., ... Marangoni, E. (2023). Homologous recombination deficiency derived from whole-genome sequencing predicts platinum response in triple-negative breast cancers. *Nature Communications*, *14*(1), 1958. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37537-2>
- Thankamony, A. P., Murali, R., Karthikeyan, N., Varghese, B. A., Teo, W. S., McFarland, A., Roden, D. L., Holliday, H., Konrad, C. V., Cazet, A., Dodson, E., Yang, J., Baker, L. A., George, J. T., Levine, H., Jolly, M. K., Swarbrick, A., & Nair, R. (2020). Targeting the Id1-Kif11 Axis in Triple-Negative Breast Cancer Using Combination Therapy. *Biomolecules*, *10*(9), 1295. <https://doi.org/10.3390/biom10091295>
- The Breast Cancer Susceptibility Collaboration (UK), Rahman, N., Seal, S., Thompson, D., Kelly, P., Renwick, A., Elliott, A., Reid, S., Spanova, K., Barfoot, R., Chagtai, T., Jayatilake, H., McGuffog, L., Hanks, S., Evans, D. G., Eccles, D., Easton, D. F., & Stratton, M. R. (2007). *PALB2*, which encodes a *BRCA2*-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nature Genetics*, *39*(2), 165-167. <https://doi.org/10.1038/ng1959>
- The Cancer Genome Atlas Network. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, *490*(7418), 61-70. <https://doi.org/10.1038/nature11412>
- Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C., & Karamanos, N. K. (2016). Extracellular matrix structure. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *97*, 4-27. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001>
- Thike, A. A., Cheok, P. Y., Jara-Lazaro, A. R., Tan, B., Tan, P., & Tan, P. H. (2010). Triple-negative breast cancer : Clinicopathological characteristics and relationship with basal-like breast cancer. *Modern Pathology*, *23*(1), 123-133. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2009.145>
- Thike, A. A., Tan, P. H., Ikeda, M., & Iqbal, J. (2016). Increased ID4 expression, accompanied by mutant p53 accumulation and loss of *BRCA1/2* proteins in triple-negative breast cancer, adversely affects survival. *Histopathology*, *68*(5), 702-712. <https://doi.org/10.1111/his.12801>
- Thompson, E. R., Rowley, S. M., Li, N., McInerney, S., Devereux, L., Wong-Brown, M. W., Trainer, A. H., Mitchell, G., Scott, R. J., James, P. A., & Campbell, I. G. (2016). Panel Testing for Familial Breast Cancer : Calibrating the Tension Between Research and Clinical Care. *Journal of Clinical Oncology*, *34*(13), 1455-1459. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.63.7454>
- Tian, T., Shan, L., Yang, W., Zhou, X., & Shui, R. (2019). Evaluation of the BRCAness phenotype and its correlations with clinicopathological features in triple-negative breast cancers. *Human Pathology*, *84*, 231-238. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.10.004>
- Timms, K. M., Abkevich, V., Hughes, E., Neff, C., Reid, J., Morris, B., Kalva, S., Potter, J., Tran, T. V., Chen, J., Iliev, D., Sangale, Z., Tikishvili, E., Perry, M., Zharkikh, A., Gutin, A., & Lanchbury, J. S. (2014). Association of *BRCA1/2* defects with genomic scores predictive of DNA damage repair deficiency among breast cancer subtypes. *Breast Cancer Research*, *16*(6), 475. <https://doi.org/10.1186/s13058-014-0475-x>
- Tirkkonen, M., Johannsson, O., Agnarsson, B. A., Olsson, H., Ingvarsson, S., Karhu, R., Tanner, M., Isola, J., Barkardottir, R. B., Borg, A., & Kallioniemi, O. P. (1997). Distinct somatic genetic changes associated with tumor progression in carriers of *BRCA1* and *BRCA2* germ-line mutations. *Cancer Research*, *57*(7), 1222-1227.
- Tischkowitz, M., & Xia, B. (2010). *PALB2/FANCN* : Recombining Cancer and Fanconi Anemia. *Cancer Research*, *70*(19), 7353-7359. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1012>
- Tischkowitz, M., Xia, B., Sabbaghian, N., Reis-Filho, J. S., Hamel, N., Li, G., van Beers, E. H., Li, L., Khalil, T., Quenneville, L. A., Omeroglu, A., Poll, A., Lepage, P., Wong, N., Nederlof, P. M., Ashworth, A., Tonin, P. N., Narod, S. A., Livingston, D. M., & Foulkes, W. D. (2007). Analysis of *PALB2* / *FANCN* -associated

- breast cancer families. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(16), 6788-6793. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701724104>
- To, K., Fotovati, A., Reipas, K. M., Law, J. H., Hu, K., Wang, J., Astanehe, A., Davies, A. H., Lee, L., Stratford, A. L., Raouf, A., Johnson, P., Berquin, I. M., Royer, H.-D., Eaves, C. J., & Dunn, S. E. (2010). Y-Box Binding Protein-1 Induces the Expression of *CD44* and *CD49f* Leading to Enhanced Self-Renewal, Mammosphere Growth, and Drug Resistance. *Cancer Research*, 70(7), 2840-2851. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3155>
- Tobon, H., & Salazar, H. (1974). Ultrastructure of the Human Mammary Gland. I. Development of the Fetal Gland Throughout Gestation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 39(3), 443-456. <https://doi.org/10.1210/jcem-39-3-443>
- Toft, D. J., & Cryns, V. L. (2011). Minireview : Basal-like breast cancer: from molecular profiles to targeted therapies. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 25(2), 199-211. <https://doi.org/10.1210/me.2010-0164>
- Tsuruta, D., Kobayashi, H., Imanishi, H., Sugawara, K., Ishii, M., & Jones, J. (2008). Laminin-332-Integrin Interaction : A Target For Cancer Therapy? *Current Medicinal Chemistry*, 15(20), 1968-1975. <https://doi.org/10.2174/092986708785132834>
- Tung, N., Arun, B., Hacker, M. R., Hofstatter, E., Toppmeyer, D. L., Isakoff, S. J., Borges, V., Legare, R. D., Isaacs, C., Wolff, A. C., Marcom, P. K., Mayer, E. L., Lange, P. B., Goss, A. J., Jenkins, C., Krop, I. E., Winer, E. P., Schnitt, S. J., & Garber, J. E. (2020). TBCRC 031 : Randomized Phase II Study of Neoadjuvant Cisplatin Versus Doxorubicin-Cyclophosphamide in Germline *BRCA* Carriers With HER2-Negative Breast Cancer (the INFORM trial). *Journal of Clinical Oncology*, 38(14), 1539-1548. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.03292>
- Tung, N. M., Robson, M. E., Venz, S., Santa-Maria, C. A., Nanda, R., Marcom, P. K., Shah, P. D., Ballinger, T. J., Yang, E. S., Vinayak, S., Melisko, M., Brufsky, A., DeMeo, M., Jenkins, C., Domchek, S., D'Andrea, A., Lin, N. U., Hughes, M. E., Carey, L. A., ... Garber, J. E. (2020). TBCRC 048 : Phase II Study of Olaparib for Metastatic Breast Cancer and Mutations in Homologous Recombination-Related Genes. *Journal of Clinical Oncology*, 38(36), 4274-4282. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.02151>
- Turner, N. C., & Reis-Filho, J. S. (2006). Basal-like breast cancer and the *BRCA1* phenotype. *Oncogene*, 25(43), 5846-5853. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209876>
- Turner, N. C., Reis-Filho, J. S., Russell, A. M., Springall, R. J., Ryder, K., Steele, D., Savage, K., Gillett, C. E., Schmitt, F. C., Ashworth, A., & Tutt, A. N. (2007). *BRCA1* dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. *Oncogene*, 26(14), 2126-2132. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210014>
- Turner, N., Tutt, A., & Ashworth, A. (2004). Hallmarks of « BRCAness » in sporadic cancers. *Nature Reviews Cancer*, 4(10), 814-819. <https://doi.org/10.1038/nrc1457>
- Tutt, A. (2001). Mutation in *Brca2* stimulates error-prone homology-directed repair of DNA double-strand breaks occurring between repeated sequences. *The EMBO Journal*, 20(17), 4704-4716. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.17.4704>
- Tutt, A. N. J., Garber, J. E., Kaufman, B., Viale, G., Fumagalli, D., Rastogi, P., Gelber, R. D., de Azambuja, E., Fielding, A., Balmaña, J., Domchek, S. M., Gelmon, K. A., Hollingsworth, S. J., Korde, L. A., Linderholm, B., Bandos, H., Senkus, E., Suga, J. M., Shao, Z., ... Geyer, C. E. (2021). Adjuvant Olaparib for Patients with *BRCA1*—Or *BRCA2* -Mutated Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 384(25), 2394-2405. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2105215>
- Tutt, A., Tovey, H., Cheang, M. C. U., Kernaghan, S., Kilburn, L., Gazinska, P., Owen, J., Abraham, J., Barrett, S., Barrett-Lee, P., Brown, R., Chan, S., Dowsett, M., Flanagan, J. M., Fox, L., Grigoriadis, A., Gutin, A., Harper-Wynne, C., Hatton, M. Q., ... Bliss, J. M. (2018). Carboplatin in *BRCA1/2*-mutated and triple-negative breast cancer BRCAness subgroups : The TNT Trial. *Nature Medicine*, 24(5), 628-637. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0009-7>
- Vaclová, T., Gómez-López, G., Setién, F., Bueno, J. M. G., Macías, J. A., Barroso, A., Urioste, M., Esteller, M., Benítez, J., & Osorio, A. (2015). DNA repair capacity is impaired in healthy *BRCA1* heterozygous mutation carriers. *Breast Cancer Research and Treatment*, 152(2), 271-282. <https://doi.org/10.1007/s10549-015-3459-3>
- Van Keymeulen, A., Rocha, A. S., Ousset, M., Beck, B., Bouvencourt, G., Rock, J., Sharma, N., Dekoninck, S., & Blanpain, C. (2011). Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance. *Nature*, 479(7372), 189-193. <https://doi.org/10.1038/nature10573>
- van Amerongen, R., Bowman, A. N., & Nusse, R. (2012). Developmental Stage and Time Dictate the Fate of Wnt/ β -Catenin-Responsive Stem Cells in the Mammary Gland. *Cell Stem Cell*, 11(3), 387-400. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.023>

- van Beers, E. H., van Welsem, T., Wessels, L. F. A., Li, Y., Oldenburg, R. A., Devilee, P., Cornelisse, C. J., Verhoef, S., Hogervorst, F. B. L., van't Veer, L. J., & Nederlof, P. M. (2005). Comparative genomic hybridization profiles in human BRCA1 and BRCA2 breast tumors highlight differential sets of genomic aberrations. *Cancer Research*, *65*(3), 822-827.
- Veeck, J., Wild, P. J., Fuchs, T., Schüffler, P. J., Hartmann, A., Knüchel, R., & Dahl, E. (2009). Prognostic relevance of Wnt-inhibitory factor-1 (WIF1) and Dickkopf-3 (DKK3) promoter methylation in human breast cancer. *BMC Cancer*, *9*(1), 217. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-217>
- Veltmaat, J. M., Van Veelen, W., Thiery, J. P., & Bellusci, S. (2004). Identification of the mammary line in mouse by *Wnt10b* expression. *Developmental Dynamics*, *229*(2), 349-356. <https://doi.org/10.1002/dvdy.10441>
- Vieira, A. F., Ricardo, S., Ablett, M. P., Dionísio, M. R., Mendes, N., Albergaria, A., Farnie, G., Gerhard, R., Cameselle-Teijeiro, J. F., Seruca, R., Schmitt, F., Clarke, R. B., & Paredes, J. (2012). P-Cadherin Is Coexpressed with CD44 and CD49f and Mediates Stem Cell Properties in Basal-like Breast Cancer. *STEM CELLS*, *30*(5), 854-864. <https://doi.org/10.1002/stem.1075>
- Villadsen, R., Fridriksdottir, A. J., Rønnow-Jessen, L., Gudjonsson, T., Rank, F., LaBarge, M. A., Bissell, M. J., & Petersen, O. W. (2007). Evidence for a stem cell hierarchy in the adult human breast. *The Journal of Cell Biology*, *177*(1), 87-101. <https://doi.org/10.1083/jcb.200611114>
- Walden, P. D., Ruan, W., Feldman, M., & Kleinberg, D. L. (1998). *Evidence That the Mammary Fat Pad Mediates the Action of Growth Hormone in Mammary Gland Development*. *139*(2).
- Walens, A., Van Alsten, S. C., Olsson, L. T., Smith, M. A., Lockhart, A., Gao, X., Hamilton, A. M., Kirk, E. L., Love, M. I., Gupta, G. P., Perou, C. M., Vaziri, C., Hoadley, K. A., & Troester, M. A. (2022). RNA-Based Classification of Homologous Recombination Deficiency in Racially Diverse Patients with Breast Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, *31*(12), 2136-2147. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-22-0590>
- Wang, D., Cai, C., Dong, X., Yu, Q. C., Zhang, X.-O., Yang, L., & Zeng, Y. A. (2015). Identification of multipotent mammary stem cells by protein C receptor expression. *Nature*, *517*(7532), 81-84. <https://doi.org/10.1038/nature13851>
- Wang, D., Lu, P., Zhang, H., Luo, M., Zhang, X., Wei, X., Gao, J., Zhao, Z., & Liu, C. (2014). Oct-4 and Nanog promote the epithelial-mesenchymal transition of breast cancer stem cells and are associated with poor prognosis in breast cancer patients. *Oncotarget*, *5*(21), 10803-10815. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2506>
- Wang, H., Bierie, B., Li, A. G., Pathania, S., Toomire, K., Dimitrov, S. D., Liu, B., Gelman, R., Giobbie-Hurder, A., Feunteun, J., Polyak, K., & Livingston, D. M. (2016). BRCA1/FANCD2/BRG1-Driven DNA Repair Stabilizes the Differentiation State of Human Mammary Epithelial Cells. *Molecular Cell*, *63*(2), 277-292. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.038>
- Wang, X., Lu, H., Li, T., Yu, L., Liu, G., Peng, X., & Zhao, J. (s. d.). *Krüppel-like factor 8 promotes tumorigenic mammary stem cell induction by targeting miR-146a*.
- Wang, Z., Li, Y., Kong, D., Ahmad, A., Banerjee, S., & Sarkar, F. H. (2010). Cross-talk between miRNA and Notch signaling pathways in tumor development and progression. *Cancer Letters*, *292*(2), 141-148. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.11.012>
- Watanabe, Y., Maeda, I., Oikawa, R., Wu, W., Tsuchiya, K., Miyoshi, Y., Itoh, F., Tsugawa, K., & Ohta, T. (2013). Aberrant DNA methylation status of DNA repair genes in breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Genes to Cells*, *18*(12), 1120-1130. <https://doi.org/10.1111/gtc.12100>
- Watkins, J. A., Irshad, S., Grigoriadis, A., & Tutt, A. N. (2014). Genomic scars as biomarkers of homologous recombination deficiency and drug response in breast and ovarian cancers. *Breast Cancer Research*, *16*(3), 211. <https://doi.org/10.1186/bcr3670>
- Watson, C. J. (2006). Key stages in mammary gland development - Involution : Apoptosis and tissue remodelling that convert the mammary gland from milk factory to a quiescent organ. *Breast Cancer Research*, *8*(2), 203. <https://doi.org/10.1186/bcr1401>
- Wei, M., Xu, J., Dignam, J., Nanda, R., Sveen, L., Fackenthal, J., Grushko, T. A., & Olopade, O. I. (2008). Estrogen receptor α , BRCA1, and FANCF promoter methylation occur in distinct subsets of sporadic breast cancers. *Breast Cancer Research and Treatment*, *111*(1), 113-120. <https://doi.org/10.1007/s10549-007-9766-6>
- Weigelt, B., Kreike, B., & Reis-Filho, J. S. (2009). Metaplastic breast carcinomas are basal-like breast cancers : A genomic profiling analysis. *Breast Cancer Research and Treatment*, *117*(2), 273-280. <https://doi.org/10.1007/s10549-008-0197-9>

- Weiskirchen, R. (2009). BMP-7 as antagonist of organ fibrosis. *Frontiers in Bioscience*, 14(1), 4992. <https://doi.org/10.2741/3583>
- Wen, Y. H., Ho, A., Patil, S., Akram, M., Catalano, J., Eaton, A., Norton, L., Benezra, R., & Brogi, E. (2012). Id4 protein is highly expressed in triple-negative breast carcinomas: Possible implications for BRCA1 downregulation. *Breast Cancer Research and Treatment*, 135(1), 93-102. <https://doi.org/10.1007/s10549-012-2070-0>
- Wessels, L. F. A., van Welsem, T., Hart, A. A. M., van't Veer, L. J., Reinders, M. J. T., & Nederlof, P. M. (2002). Molecular classification of breast carcinomas by comparative genomic hybridization: A specific somatic genetic profile for BRCA1 tumors. *Cancer Research*, 62(23), 7110-7117.
- Westphalen, C. B., Fine, A. D., André, F., Ganesan, S., Heinemann, V., Rouleau, E., Turnbull, C., Garcia Palacios, L., Lopez, J.-A., Sokol, E. S., & Mateo, J. (2022). Pan-cancer Analysis of Homologous Recombination Repair-associated Gene Alterations and Genome-wide Loss-of-Heterozygosity Score. *Clinical Cancer Research*, 28(7), 1412-1421. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-2096>
- Wilhelmsen, K., Litjens, S. H. M., & Sonnenberg, A. (2006). Multiple Functions of the Integrin $\alpha 6 \beta 4$ in Epidermal Homeostasis and Tumorigenesis. *MOL. CELL. BIOL.*, 26.
- Willers, H., Taghian, A. G., Luo, C.-M., Treszezamsky, A., Sgroi, D. C., & Powell, S. N. (2009). Utility of DNA Repair Protein Foci for the Detection of Putative BRCA1 Pathway Defects in Breast Cancer Biopsies. *Molecular Cancer Research*, 7(8), 1304-1309. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-09-0149>
- Willert, K., Brown, J. D., Danenberg, E., Duncan, A. W., Weissman, I. L., Reya, T., Yates, J. R., & Nusse, R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*, 423(6938), 448-452. <https://doi.org/10.1038/nature01611>
- Williams, J. M., & Daniel, C. W. (1983). Mammary ductal elongation: Differentiation of myoepithelium and basal lamina during branching morphogenesis. *Developmental Biology*, 97(2), 274-290. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(83\)90086-6](https://doi.org/10.1016/0012-1606(83)90086-6)
- Wiseman, B. S., Sternlicht, M. D., Lund, L. R., Alexander, C. M., Mott, J., Bissell, M. J., Soloway, P., Itohara, S., & Werb, Z. (2003). Site-specific inductive and inhibitory activities of MMP-2 and MMP-3 orchestrate mammary gland branching morphogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 162(6), 1123-1133. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302090>
- Worrillow, L. J., & Allan, J. M. (2006). Dereglulation of homologous recombination DNA repair in alkylating agent-treated stem cell clones: A possible role in the aetiology of chemotherapy-induced leukaemia. *Oncogene*, 25(12), 1709-1720. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209208>
- Wozney, J. M., Rosen, V., & Celeste, A. J. (s. d.). *Novel Regulators of Bone Formation: 242*.
- Wu, J., Mu, Q., Thiviyanathan, V., Annapragada, A., & Vigneswaran, N. (2014). Cancer stem cells are enriched in Fanconi anemia head and neck squamous cell carcinomas. *International Journal of Oncology*, 45(6), 2365-2372. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2677>
- Wuidart, A., Ousset, M., Rulands, S., Simons, B. D., Van Keymeulen, A., & Blanpain, C. (2016). Quantitative lineage tracing strategies to resolve multipotency in tissue-specific stem cells. *Genes & Development*, 30(11), 1261-1277. <https://doi.org/10.1101/gad.280057.116>
- Xia, F., Taghian, D. G., DeFrank, J. S., Zeng, Z.-C., Willers, H., Iliakis, G., & Powell, S. N. (2001). Deficiency of human BRCA2 leads to impaired homologous recombination but maintains normal nonhomologous end joining. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(15), 8644-8649. <https://doi.org/10.1073/pnas.151253498>
- Xiao, Y.-T., Xiang, L.-X., & Shao, J.-Z. (2007). Bone morphogenetic protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 362(3), 550-553. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.08.045>
- Yamaguchi, K. (1999). XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway. *The EMBO Journal*, 18(1), 179-187. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.1.179>
- Yamashita, N., Tokunaga, E., Kitao, H., Hitchins, M., Inoue, Y., Tanaka, K., Hisamatsu, Y., Taketani, K., Akiyoshi, S., Okada, S., Oda, Y., Saeki, H., Oki, E., & Maehara, Y. (2015). Epigenetic Inactivation of BRCA1 Through Promoter Hypermethylation and Its Clinical Importance in Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*, 15(6), 498-504. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2015.06.009>
- Yan, G., Dai, M., Zhang, C., Poulet, S., Moamer, A., Wang, N., Boudreault, J., Ali, S., & Lebrun, J.-J. (2021). TGF β /cyclin D1/Smad-mediated inhibition of BMP4 promotes breast cancer stem cell self-renewal activity. *Oncogenesis*, 10(3), 21. <https://doi.org/10.1038/s41389-021-00310-5>
- Yao, E., & Ventura, A. (2011). A New Role for miR-182 in DNA Repair. *Molecular Cell*, 41(2), 135-137. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.01.005>

- Yardley, D. A., Coleman, R., Conte, P., Cortes, J., Brufsky, A., Shtivelband, M., Young, R., Bengala, C., Ali, H., Eakel, J., Schneeweiss, A., de la Cruz-Merino, L., Wilks, S., O'Shaughnessy, J., Glück, S., Li, H., Miller, J., Barton, D., & Harbeck, N. (2018). nab-Paclitaxel plus carboplatin or gemcitabine versus gemcitabine plus carboplatin as first-line treatment of patients with triple-negative metastatic breast cancer: Results from the tnAcity trial. *Annals of Oncology*, 29(8), 1763-1770. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy201>
- Yasmeen, A., Liu, W., Dekhil, H., Kassab, A., Aloyz, R., Foulkes, W. D., & Al Moustafa, A.-E. (2008). BRCA1 mutations contribute to cell motility and invasion by affecting its main regulators. *Cell Cycle*, 7(23), 3781-3783. <https://doi.org/10.4161/cc.7.23.6993>
- Ye. (2009). Bone morphogenetic proteins in development and progression of breast cancer and therapeutic potential (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 24(05). https://doi.org/10.3892/ijmm_00000269
- Yehiely, F., Moyano, J. V., Evans, J. R., Nielsen, T. O., & Cryns, V. L. (2006). Deconstructing the molecular portrait of basal-like breast cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 12(11), 537-544. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.09.004>
- Yin, Q., Wang, X., Fewell, C., Cameron, J., Zhu, H., Baddoo, M., Lin, Z., & Flemington, E. K. (2010). MicroRNA miR-155 Inhibits Bone Morphogenetic Protein (BMP) Signaling and BMP-Mediated Epstein-Barr Virus Reactivation. *Journal of Virology*, 84(13), 6318-6327. <https://doi.org/10.1128/JVI.00635-10>
- Yin, X., Xiang, T., Li, L., Su, X., Shu, X., Luo, X., Huang, J., Yuan, Y., Peng, W., Oberst, M., Kelly, K., Ren, G., & Tao, Q. (2013). DACT1, an antagonist to Wnt/ β -catenin signaling, suppresses tumor cell growth and is frequently silenced in breast cancer. *Breast Cancer Research*, 15(2), R23. <https://doi.org/10.1186/bcr3399>
- Yu, C.-J., Ou, J.-H., Wang, M.-L., Jialielihan, N., & Liu, Y.-H. (2015). Elevated survivin mediated multidrug resistance and reduced apoptosis in breast cancer stem cells. *Journal of B.U.ON.: Official Journal of the Balkan Union of Oncology*, 20(5), 1287-1294.
- Yu, P. B., Beppu, H., Kawai, N., Li, E., & Bloch, K. D. (2005). Bone Morphogenetic Protein (BMP) Type II Receptor Deletion Reveals BMP Ligand-specific Gain of Signaling in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(26), 24443-24450. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502825200>
- Yu, Z., Pestell, T. G., Lisanti, M. P., & Pestell, R. G. (2012). Cancer stem cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(12), 2144-2151. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.08.022>
- Yuan, Y., Lee, J. S., Yost, S. E., Li, S. M., Frankel, P. H., Ruel, C., Schmolze, D., Robinson, K., Tang, A., Martinez, N., Stewart, D., Waisman, J., Kruper, L., Jones, V., Menicucci, A., Uygun, S., Yoder, E., van der Baan, B., Yim, J. H., ... Mortimer, J. (2021). Phase II Trial of Neoadjuvant Carboplatin and Nab-Paclitaxel in Patients with Triple-Negative Breast Cancer. *The Oncologist*, 26(3), e382-e393. <https://doi.org/10.1002/onco.13574>
- Zabkiewicz, C., Resaul, J., Hargest, R., Jiang, W. G., & Ye, L. (2017). Bone morphogenetic proteins, breast cancer, and bone metastases: Striking the right balance. *Endocrine-Related Cancer*, 24(10), R349-R366. <https://doi.org/10.1530/ERC-17-0139>
- Zhang, J., Lin, Y., Sun, X. J., Wang, B. Y., Wang, Z. H., Luo, J. F., Wang, L. P., Zhang, S., Cao, J., Tao, Z. H., Wu, J., Shao, Z. M., Yang, W. T., & Hu, X. C. (2018). Biomarker assessment of the CBCSG006 trial: A randomized phase III trial of cisplatin plus gemcitabine compared with paclitaxel plus gemcitabine as first-line therapy for patients with metastatic triple-negative breast cancer. *Annals of Oncology*, 29(8), 1741-1747. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy209>
- Zhang, L., Adileh, M., Martin, M. L., Klingler, S., White, J., Ma, X., Howe, L. R., Brown, A. M. C., & Kolesnick, R. (2017). Establishing estrogen-responsive mouse mammary organoids from single Lgr5+ cells. *Cellular Signalling*, 29, 41-51. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2016.08.001>
- Zhang, X., Martinez, D., Koledova, Z., Qiao, G., Streuli, C. H., & Lu, P. (2014). FGF ligands of the postnatal mammary stroma regulate distinct aspects of epithelial morphogenesis. *Development*, 141(17), 3352-3362. <https://doi.org/10.1242/dev.106732>

Annexes

Homologous recombination pathway alterations in basal-like breast cancers

Simon AHO, Boris GUYOT, Véronique MAGUER-SATTA

Abstract: Breast cancer is a heterogeneous disease with different molecular subtypes correlated with prognosis. The basal-like subtype accounts for about 20% of cases and is associated with the poorest prognosis, especially in terms of age at diagnosis and survival. In addition to these clinical features, this subtype is characterized by several histo-molecular patterns, including a specific profile of copy number alterations or a frequent low BRCA1 expression beyond familial forms with germline BRCA1 variants. As BRCA1 is highly involved in DNA double-strand break repair by homologous recombination, this suggests an underlying deficit in this pathway in basal-like breast cancers (BLBC). This homologous recombination deficiency (HRD) could explain part of the basal-like carcinogenesis. Nevertheless, beyond its mechanistic interest, the HRD phenotype is of relevance because it is associated in other cancer sites with promising response rates to certain DNA double-strand break inducing agents such as platinum salts or PARP inhibitors. In this review, we therefore discuss the transcriptomic definition of BLBC, while reporting the histo-molecular features suggesting that HRD is a hallmark of these tumors. Secondly, we review the different HRD detection techniques currently available and their application in BLBC. Finally, we list the established and suspected HRD causes in these tumours and the therapeutic consequences in clinical practice.

Introduction

Breast cancer is the most diagnosed cancer and the leading cause of cancer death in women worldwide¹. Nevertheless, it is an extremely heterogeneous disease with several molecular entities of variable prognosis²⁻⁴. Indeed, gene expression analysis initiated about twenty years ago by Perou and Sorlie identified at least 5 different breast cancer subtypes. Among them, the basal-like subtype represents approximately 20% of cases and is associated with the most pejorative prognosis, due to its intrinsic biological characteristics on the one hand, and the lack of effective treatments currently available on the other. Recently, the advent of increasingly sophisticated omic molecular biology techniques shed light on the molecular diversity of this basal-like subtype which in fact seems to group tumors somewhat different in terms of mutational profile, epigenome, transcriptome, proteome, kinome, tumor microenvironment, cell of origin and therefore prognosis^{5,6}. However, despite these biological differences, it seems interesting to report 3 points. (i) Basal-like breast cancers (BLBC) are frequently genetically unstable. (ii) Almost all breast cancers with bi-allelic inactivation of BRCA1 predisposition gene fit into the basal-like subtype as defined by Perou and Sorlie. (iii) These BRCA^{-/-} tumors not only resemble sporadic BLBC in terms of gene expression, but also display a similar histological phenotype, clinical presentation and chromosomal aberrations. Thus, given the crucial role of BRCA1 in maintaining genome integrity via homologous recombination (HR) DNA double-strand break repair, this suggests that at least some BLBC may present alterations of the HR pathway explaining their characteristics, in particular their genomic instability. This point is important because it has been demonstrated in recent years that homologous recombination deficiency (HRD) can be exploited by DNA double-strand breaks inducing agents such as platinum salts or PARP inhibitors (PARPi)^{7,8}. Indeed, in tumor cells with HRD, DNA double-strand breaks cannot be repaired reliably, which leads to their death by synthetic lethality. This approach has already shown interesting results in various cancers, particularly in some prostate⁹, pancreatic¹⁰ and ovarian cancers¹¹⁻¹³, underlining the interest of detecting HRD from a theranostic point of view. This is particularly true for breast cancer. Indeed, currently, only breast cancers with germline BRCA1 or BRCA2 mutations are eligible for PARPi treatment (Olaparib or Talazoparib depending on the clinical situation¹⁴⁻¹⁶). However, BLBC histological and molecular profile suggests an HRD phenotype beyond BRCA1/2 germline mutations which could make them good candidates for an extension of the PARPi use, provided that potential responders are identified in advance.

First, in this review, we will discuss the BLBC definition as well as its histological characteristics and chromosomal complexity. Secondly, we will examine the arguments suggesting HR alteration in these tumors. Finally, we will review the identified causes of HRD in BLBC which remain to date a real therapeutic challenge.

Basal-like breast cancers: what are we talking about?

Transcriptomic classifications

In the 2000s, a succession of transcriptomic analysis identified 5 distinct breast cancer subtypes called intrinsic subtypes: luminal A, luminal B, normal-like, HER2 enriched and basal-like²⁻⁴, the latter being associated with the worst prognosis in terms of age at diagnosis, overall survival and disease-free survival¹⁷⁻²⁰.

From a transcriptional point of view, BLBCs are so named because they robustly express a cluster of genes also expressed by cells located in the outer (basal) layer of the mammary gland: myoepithelial cells as well as stem cells and basal progenitors^{2-4,21}. Some of these genes products, in particular cytokeratin 5 (CK5) and cytokeratin 17 (CK17), but also laminin, integrin- β 4 or even BPAG1 are normally involved in the anchoring of basal cells to the basal membrane²². Nevertheless, beyond this structural role, some are also involved in various tumorigenic signaling pathways, in particular ERK, PI3K-AKT or NF κ B²³. Other basal-like gene products are involved in epithelial-mesenchymal transition (EMT) (TGF β 2, MMP14, TM4SF1), proliferation (cyclin E1, BUB1, EZH2) or even stemness (cKIT, TGF β 2)²⁴. In contrast, among the least expressed genes are genes coding for estrogen receptor (ER α), progesterone receptor (PR) and Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 (HER2), BLBC being predominantly triple-negative (no ER α and PR expression, no HER2 amplification/overexpression). Interestingly, more recent transcriptomic analysis focusing exclusively on triple negative breast cancers (TNBC) have established that these cancers can also be discriminated into different molecular subtypes.

Thus in 2011, Lehmann et al. identified 6 different subtypes by cluster analysis: Basal-like 1 (BL1), Basal-like 2 (BL2), Immunomodulatory (IM), Mesenchymal (M), Mesenchymal stem-like (MSL) and Luminal androgen receptor (LAR)²⁵. In this study, the authors showed that deregulated signaling pathways and biological functions were different among subtypes, opening the door to subtype-specific targeted therapies. For example, the BL1 and BL2 subtypes were enriched in cell cycle and DNA damage response genes, the IM subtype in immune response genes and the M and MSL subtypes in EMT and stemness genes (TGF- β , mTOR, Rac1/Rho, Wnt/ β -catenin, FGFR, PDGFR, VEGF pathways). Finally, the LAR subtype was enriched in androgen receptor signaling genes. Interestingly, Masuda et al. evaluated in their localized TNBC cohort the contribution of each of these subtypes in basal-like and non-basal-like cancers defined according to the intrinsic PAM50 classification. As shown in Figure 1, the basal-like group was mainly made up of the IM (23%), BL1 (21%) and M (20%) subtypes while the non-basal-like group was mainly made up of the LAR one (59%)²⁶.

Furthermore, in 2015, Burstein et al. identified 4 molecular subtypes with variable prognosis: Luminal androgen receptor (LAR), Mesenchymal (MES), Basal-like immune-suppressed (BLIS) and Basal-like immune-activated (BLIA)²⁷. Interestingly, LAR and MES Burstein subtypes closely overlap with LAR and MSL Lehmann subtypes. In contrast, BLIS and BLIA Burstein subtypes include a mix of the other 4 subtypes defined by Lehmann (BL1, BL2, IM and M).

In 2016, Lehmann et al. simplified their 2011 classification by taking into account the contribution of transcripts from normal immune and stromal cells in the tumor microenvironment. The authors therefore ultimately distinguished 4 subtypes: BL1, BL2, M and LAR²⁸.

In 2019, a multi-omics study by Jiang et al. also divided a large 465 TNBC chinese cohort into 4 subtypes: Basal-like immune-suppressed (BLIS), Immunomodulatory (IM), Luminal androgen receptor (LAR) and Mesenchymal-like (MES)⁵. Thus, BLIS, IM and LAR Jiang subtypes faithfully match the BL1, IM and LAR Lehmann subtypes. In contrast, MES Jiang subtype contains a mix of BL2, M, and MSL Lehmann subtypes. Moreover, almost all the BLIS and IM Jiang tumors as well as the majority of the MES ones in fact fit into the basal-like subtype initially described in the Perou and Sorlie intrinsic classification²⁻⁴. Conversely, a small proportion of LAR Jiang tumors belong to the intrinsic basal-like group.

Finally, in 2021, Lehmann et al. carried out new multi-omics analysis using public data from the TCGA, METABRIC, CPTAC and MET500 cohorts⁶. They confirmed by this study the existence of the 4 subtypes previously described by their group (BL1, BL2, M and LAR). In this work, analysis of

scRNAseq, copy number alterations (CNA), genetic and epigenetic profiling plead for a possible common origin to BL1 and M tumors for which there would therefore exist a biological continuum. M tumors in this hypothesis would correspond to a dedifferentiated form of BL1 tumors. Moreover, these 2 subtypes corresponded exclusively to basal-like tumors according to the intrinsic classification, unlike the BL2 subtype which corresponded half to basal-like tumors and half to HER2-enriched tumors. The LAR subtype in this work corresponded exclusively to HER2-enriched tumors. Thus, these different studies show all the molecular diversity of the basal-like subtype initially described by Perou and Sorlie.

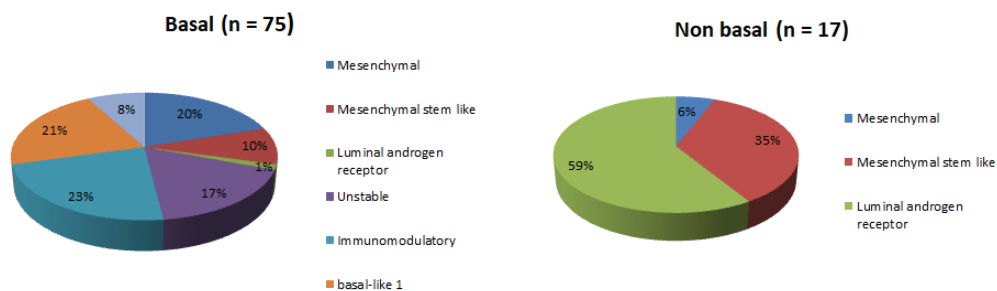


Figure 1 (from Masuda et al.): contribution of the different Lehmann TNBC molecular subtypes in PAM50-defined basal-like and non-basal-like breast cancers

Histological features

As transcriptomic analysis are not easily feasible in current practice, several teams sought to develop panels of immuno-histochemical markers to reliably identify BLBC. Historically, the triple-negative phenotype was used for this purpose, but, as we have seen previously, not all TNBC are basal-like and moreover a minority of BLBC are not triple-negative either^{3,17,29}. So, additional markers, comprising in particular basal cytokeratins (CK5/6, CK14, CK17) and EGFR, were used for better discrimination of cases. For example, Nielsen et al. established that a panel of 4 markers (negativity of Er α and HER2 associated with positivity of CK5/6 and/or EGFR) makes it possible to discriminate BLBC (defined according to the intrinsic classification) with a 76% sensitivity and a 100% specificity³⁰. Subsequently, Cheang et al. optimized this panel by adding progesterone receptor negativity³¹. This panel of 5 markers allows a better discrimination of BLBC in terms of survival. Additionally, Livasy et al. studied the IHC profile of previously selected BLBC based on their gene expression profile³². The most frequently encountered immunophenotype was Er α and PR negativity associated with CK5/6, CK8/18, EGFR and vimentin positivity. This positivity of the luminal markers CK8/18, associated with the frequent negativity of the myoepithelial markers SMA, p63 and CD10 is interesting. It makes the hypothesis of a differentiated myoepithelial origin for BLBC unlikely, but rather suggests the involvement of a bipotent progenitor, as mentioned by several other studies^{6,33-35}.

Moreover, other groups have integrated additional markers into their diagnostic panel, thus increasing their specificity at the cost of sensitivity. These markers can be structural (fascin, laminin 5, β 4 integrin, P-cadherin) or associated with the transduction of tumorigenic signals (c-KIT, VEGF, c-MYC, p53). They are comprehensively described in the review by Choo and Nielsen³⁶ and Botti et

al.³⁷). This illustrates the lack of consensus on the best IHC surrogate of the basal-like phenotype established by gene expression analysis.

Moreover, beyond these markers used as a surrogate, other histological characteristics are shared by the majority of BLBC. Although these characteristics do not constitute diagnostic criteria, they have orientation value. Among them, we can find low differentiation, high nuclear grade, high mitotic index, central necrosis, pushing margins, stromal lymphocyte infiltration or even enrichment in C44+/CD24- cancer stem cells^{32,38-40}.

From a histological point of view, the most represented subtype is non-specific infiltrating ductal carcinoma³⁸. However, all subtypes can present a basal-like profile. Interesting is the overrepresentation of medullary (10%)⁴¹ and metaplastic (10%)⁴² carcinomas in the basal-like group.

Genetic instability

Beyond the IHC characterization of BLBC, several teams sought to assess their chromosomal complexity using Comparative Genomic Hybridization (CGH)-array. For example Chin et al. simultaneously analyzed gene expression and CNA profiles in an early stage breast cancer cohort and correlated these CNA to intrinsic molecular subtypes and to survival⁴³. This work indicates that CNA indeed vary depending on the molecular subtype and that BLBC are enriched in low-level CNA (gains involving chromosomes 3q, 8q and 10p and losses involving chromosomes 3p, 4p, 4q, 5q, 12q, 13q, 14q and 15q). The authors also showed that high-level CNA (amplifications) are rare in these tumors, regardless of the locus considered.

Similarly Bergamaschi et al. analyzed by CGH-array CNA of 89 locally advanced breast cancers previously classified according to the 5 intrinsic subtypes⁴⁴. Interestingly, chromosome gains and losses were statistically more frequent in BLBC with notably gains on chromosomes 1q12-q41, 6p12-p25, 7q22-q36, 10p12-p15, 17q25 and 21q22 and losses on chromosomes 3q12, 4p15-p32, 4q31-q35, 5q11-q3 and 14q22-q23. The authors also confirmed a low amplifications rate in this subtype.

Furthermore, Adelaide et al. analyzed CNA of 45 basal tumors and 48 luminal tumors, again defined according to their gene expression profile⁴⁵. In this study, the most prevalent alterations (>20%) in BLBC were gains in regions 1q, 3q24-27, 8p11-12, 8q21-ter, 10p, 12p13-ter and 17q25-ter and losses in regions 4q13-14, 4q34-35, 5q, 8p21-ter and 14q21. Rare amplifications were found in this subtype affecting in particular the 8p11, 8q11-ter, 10p13-ter, 15q26, 18q11 and 19q11-12 regions.

Finally, in 2009, Natrajan et al. analyzed CNA of 69 grade 3 infiltrating ductal carcinomas of non-specific type (IDC-NST), 14 of which being defined as basal-like by IHC according to the Nielsen classification³⁰. They showed that the most frequent alterations (>50%) for this subtype were gains in regions 1q, 6p, 8q and 10p and losses in regions 1p, 4p, 5q, 8p, 10q, 15q and Xp. Amplifications were also found on 1q21, 3q25, 8q24, 12p13 and 19q12⁴⁶.

Interestingly, this profile of low-level chromosomal abnormalities (gain and loss CNA) shared by BLBC in these different studies is suggestive of an underlying HRD.

Similarities to BRCA1 deficient tumors

BRCA1 is a 24-exon gene located on chromosome 17q21. It acts as a tumor suppressor gene thanks to its various biological functions including cell cycle regulation, cytoskeleton organization, apoptosis

regulation, X chromosome inactivation or transcription regulation of certain genes such as TP53 or STAT1^{47,48}. More recently, its role in the differentiation of mammary luminal progenitors has also been reported^{33–35,49–53}. Nevertheless, the best-known and most-described function of BRCA1 remains its role in maintaining genome integrity through its involvement in DNA double-strand breaks repair by HR⁵⁴. In fact, inactivating germline BRCA1 mutation confers an increased predisposition to certain cancers, in particular ovarian and breast cancer. These breast cancers developed in BRCA1 pathogenic variant carriers are very homogeneous from a clinical, histopathological and molecular point of view (table 1). Indeed, from a morphological and histological point of view, these tumors are frequently highly proliferative, with pushing margins, central necrosis and frequently peripheral lymphocyte infiltration. Focally, areas of atypical medullary phenotype have been described. Immunohistochemically, BRCA1 mutated tumors are largely triple-negative and frequently express basal cytokeratins (CK5/6, CK14) as well as EGFR. A nuclear expression of p53 is also often found. These characteristics similar to BLBC have been extensively studied and reported in particular by Turner et al.⁵⁵ and Domagala et al.⁵⁶. Interestingly, in addition to these immunohistochemical similarities, Sorlie et al. also showed a high concordance between basal-like and BRCA1-mutated breast cancers in terms of gene expression profile⁴.

Furthermore, several studies also examined, by CGH-array, BRCA1-mutated tumors' characteristics in terms of chromosomal aberrations. For example, initially, Tirkkonen et al. compared CNA in 21 BRCA1 mutated breast carcinomas to those in 55 sporadic cases used as controls⁵⁷. In BRCA1 mutated cancers, losses on chromosomes 5q (86%), 4q (81%), 4p (64%), 2q (40%) and 12q (40%) were significantly more frequent than in the control group. Wessels et al. also reported similar results including more frequent deletions of 4p, 5q and 12q in BRCA1 mutated samples⁵⁸. Interestingly, this chromosomal aberrations profile is different from that found in a context of BRCA2 mutation⁵⁹. On the other hand, Jonsson et al.⁶⁰ compared CNA of 14 BRCA1 mutated tumors with those of 26 sporadic cases. In this study, the authors reported a greater frequency of CNA in BRCA-mutated tumors. The most frequent gains in these tumors (>75%) were found in chromosomes 1q42.12-q42.13, 3q26.32-q26.33, 3q27.1-q27.33, 7q36.1-q36.3, 8q24.23-q24.3, 10p15.3 and 10p15.1-p14. The most frequent losses (>75%) involved chromosomes 4p15.32-p14, 4q31.3, 4q32.1-q34, 5q11.2-q23.3, 8pter-p12, 13q13.3-q21.32, 15q12 -13.1, 15q15.3-q21.1 and 17p13.2-p12. Similar results were reported in a study by Joosse et al.⁶¹. As reported by Melchor et al.⁶² and Holstege et al.⁶³, these chromosomal abnormalities found in BRCA1 mutated tumors are very similar to those found in sporadic BLBC. These similarities concern in particular gains on chromosomes 1p, 2p, 3q, 6p, 6q, 7q, 8q, 10p, 12p, 13q and 19q and losses on chromosomes 3p, 4p, 5q, 10q, 12q, 14q and 15q⁶³. This genomic instability profile common to basal-like and BRCA1 mutated tumors points to an underlying HRD, a process in which the BRCA1 protein is highly involved. This suggests that a part of sporadic BLBC could present BRCA1 inactivation through BRCA1 somatic mutations or epigenetic or post-transcriptional repression of this gene. This hypothesis is supported by frequently reduced BRCA1 transcriptional and protein expression in sporadic BLBC. Thus, Turner et al.⁶⁴ compared BRCA1 transcriptional expression in 37 BLBC (identified in IHC by a positive CK5/6 staining) and 37 CK5/6 negative tumors matched on age and grade. BRCA1 mRNA expression was 2-fold lower in BLBC. Additionally, Joosse et al.⁶⁵ analyzed by RT-qPCR the mRNA BRCA1 expression level in 41 sporadic BLBC and 83 sporadic luminal tumors, used as control. They showed a reduction in BRCA1 expression in 51% of BLBC. At the protein level, Rakha et al.⁶⁶ reported an association between altered BRCA1 IHC nuclear expression and basal-like phenotype defined according to several IHC classifications. For example, 76% of tumors identified as basal-like according to the Nielsen classification³⁰ showed an

alteration in BRCA1 nuclear expression. However, as shown by these different studies, not all BLBC show alterations in BRCA1 transcriptional or protein expression. This suggests that in these tumors, other genes involved in HR could be altered at the transcriptional or post-transcriptional level, also leading to a BRCA-like phenotype called “BRCA-ness”^{67–69}. In this article, we will first review the different techniques that allowed to suspect HR alteration in BLBC and secondly, we will examine the identified causes of these alterations.

	BRCA1m tumors	Sporadic basal-like tumors
Clinical criteria		
Onset at a young age	+	+
Bad prognosis	+	+
Histological criteria		
High grade	+	+
High proliferation index	+	+
Pushing margins	+	+
Central necrosis	+	+
Areas of medullary or metaplastic phenotype	+	+
Peripheral lymphocyte infiltration	+	+
Triple negative phenotype	+	+
EGFR overexpression	+	+
Basal cytokeratins expression	+	+
P53 nuclear expression	+	+
Chromosomal profile		
Gains/losses	Frequent	Frequent
Gains	1p, 1q, 2p, 3q, 6p, 6q, 7q, 8q, 10p, 13q, 19q	1q, 3q, 6p, 7q, 8p, 8q, 10p, 12p, 17q, 21q
Losses	2q, 3p, 4p, 4q, 5q, 8p, 10q, 12q, 13q, 14q, 15q, 17p	1p, 3p, 3q, 4p, 4q, 5q, 8p, 10q, 12q, 13q, 14q, 15q, XP

Table 1: similarities between BRCA1 mutated and sporadic basal-like tumors

Evidence of HRD in basal-like breast cancers

How to measure HRD?

HR is a highly reliable DNA double-strand break repair process. In case of deficiency in this system, other DNA repair mechanisms can take place, but with a high error rate leading to genomic instability favoring carcinogenesis through the activation of oncogenes and inactivation of tumor suppressor genes⁵⁴. However, HRD also constitutes a weak point in tumors from which certain molecules inducing DNA double-strand breaks take advantage, in particular PARPi^{7,8}. It is therefore important to know how to detect HRD in tumors, from a theranostic point of view. To this end, several techniques have been developed in recent years (see also figure 3)

Chromosomal aberrations

The first technique is based on the recognition of chromosomal aberrations which are the consequence of HRD. Initially, several solutions based on HRD-associated CNA detection by CGH-array⁶¹ or Multiplex Ligation-dependant Probe Amplification (MLPA)⁷⁰ were developed. However, these techniques were difficult to reproduce due to the lack of standardization of data analysis tools. Finally, the subsequent development of Single Nucleotide Polymorphism (SNP)-array allowed

significant advances in the robust detection of HRD. Thus this technique allows the identification of 3 types of chromosomal aberrations correlated with HRD:

- LST (Large-scale State Transition) are DNA re-arrangements (translocations, inversions, deletions) involving chromosomal regions of more than 10 Mb. A LST-based HRD signature was developed by Popova et al. from 65 tumors defined as basal-like by IHC (triple negative tumors positive for CK5/6/14/17 and/or EGFR) including 23 with BRCA1 pathogenic variant. This signature has been then validated on 55 primary samples and 17 basal-like cell lines leading to the discrimination of BRCA1/2-defective BLBC with a 100% sensitivity and 97% specificity⁷¹. In a last step, it has been validated on new mammary carcinomas of different histological subtypes⁷² and also on cohorts of ovarian cancers⁷³.

- HRD-Loss Of Heterozygosity (LOH) correspond to deletions involving chromosomal regions of more than 15 Mb without involving the entire chromosome. An HRD signature based on these intermediate-sized LOH areas has been established by Abkevich et al. based on primary samples of BRCA1/2 mutated and non-mutated ovarian carcinomas. It has been then validated on a cohort of ovarian carcinomas and BRCA1/2 defective ovarian and mammary cell lines⁷⁴.

-TAI (Telomeric Allelic Imbalance) relate to copy number gains or losses in telomeric region. A signature based on these TAI has been developed by Birkbak et al. The authors have shown an inverse correlation between the quantity of TAI and the BRCA1 transcriptional expression level in some TNBC and serous ovarian carcinomas⁷⁵.

It should be noted that there are commercial solutions combining these 3 signatures in a more robust manner in a score which points, above a threshold value, towards an HRD phenotype⁷⁶. This is the case with the HRD score from Myriad Genetics, which has demonstrated its ability to predict HRD+ epithelial ovarian cancers' sensitivity to PARPi Olaparib as a first-line maintenance treatment¹¹. Interestingly, it has been demonstrated that chromosomal aberrations such as LST, LOH and TAI can be detected by next-generation sequencing (NGS) techniques with results similar to SNP-array techniques⁷⁷.

More recently, to limit the time and cost inherent to this type of analysis and to make HRD detection more accessible in clinical practice, several teams^{78,79} developed an alternative tool called shallowHRD based on Whole Genome Sequencing (WGS) with low coverage (shallow WGS, ~1X coverage) allowing the detection of Large-scale Genomic alterations (LGA) specific to HRD with excellent sensitivity and specificity (87.5 and 90.5% respectively for the Popova team⁷⁹).

Application to basal-like breast cancers

Regarding BLBC, few studies have explored the HRD prevalence specifically in this subpopulation. Imanishi et al. analyzed the HR status in a neoadjuvant setting using the Myriad technique (positive HRD status if HRD score ≥ 42) in 141 breast cancers, including 35 TNBC. According to the Lehmann classification²⁵, these cancers were subdivided into 7 BL1, 7 M, 8 IM, 7 MSL and 6 LAR cancers. Interestingly, the BL1 and M subtypes (which consistently fit into the intrinsic basal-like cluster) both showed HRD rates of nearly 75% (compared to about 60% for MSL subtype, 50% for IM subtype and 0% for LAR subtype)⁸⁰.

Similarly, in the study by Jiang et al.⁵, Myriad HRD scores were highest in the BLIS subgroup and lowest in the LAR group. Moreover, HRD score was also well correlated with the intrinsic basal-like status.

In a recent study by Ter Brugge et al, 54.5% (30/55) of early TNBC patient-derived xenografts (PDX) were classified as HRD+ by shallow WGS and this technique showed 95% concordance rates in predicting HRD compared to the Myriad test. Similarly, these 2 techniques demonstrated similar sensitivity and specificity in predicting response to platinum salts in this study (81% sensitivity and 65% specificity for shallow WGS, 76% sensitivity and 61% specificity for Myriad assay)⁸¹.

Finally, several clinical trials exploring TNBC sensitivity to platinum salts and PARPi studied their HR status using different techniques based on the measurement of chromosomal aberrations. Considering that approximately 80% of TNBC are basal-like^{30,82,83}, this gives an approximation of HR alterations in this molecular subtype. As indicated in table 2, the HRD+ status has been found in 41.5 to 76.9% of TNBC depending on the studies and the HRD evaluation techniques used.

Trial/reference	Study population	HRD Assessment Type	% HRD in triple-negative population	Further information
Timms 2014 ⁷⁶	All types of breast cancer	HRD score (Myriad)	44.2%	
Isakoff 2015 ⁸⁴ TBCRC 009	TNBC	HRD LOH HRD LST	43.8% 50%	
Telli 2015 ⁸⁵ PrECOG	TNBC and/or pathogenic BRCA1/2 mutation, neoadjuvant situation	HRD LOH (positive if ≥ 10) and/or deleterious BRCA1/2 mutation. HRD LOH test on pre-treatment biopsies.	76.9%	78% of TNBC were identified as basal-like according to the intrinsic classification. According to Lehmann classification: 16% BL1, 4% BL2, 27% IM, 8% LAR, 27% M, 6% MSL, 12% unstable
Handled 2016 ⁷²	TNBC	HRD LST	52%	
All 2018 ⁸⁶ DTT	Unselected advanced TNBC	HRD score (Myriad) (positive if ≥ 42) and/or tumor pathogen BRCA1/2 mutation	41.5%	
Law 2018 ⁸⁷ GEPARSIXTO	Stage II-III TNBC, neoadjuvant situation	HRD score (Myriad) (positive if ≥ 42) and/or tumor pathogen BRCA1/2 mutation	70.5%	60.3% HRD+ without BRCA1/2 mutation
Sharma 2018 ⁸⁸ SWOGS9313	TNBC, adjuvant situation	HRD score (Myriad) (positive if ≥ 42) and/or tumor pathogen BRCA1/2 mutation	67%	
Mayer 2020 ⁸⁹ TBCRC030	Stage II-III TNBC, neoadjuvant situation.	HRD score (Myriad) (positive if ≥ 33)	71.1%	

Table 2: Evaluation of HRD status in TNBC cohorts

Mutational signatures

Another approach for measuring HRD is to detect a specific mutational signature by DNA sequencing. Indeed, in addition to the above-mentioned chromosomal aberrations, the HRD tumors' genome is characterized by the presence of small deletions (>50 nucleotides) surrounded by regions of micro-homology⁹⁰⁻⁹² which can be detected by high coverage WGS and identified as "genomic scars". For example signatures 3 and 8 of the Catalogue Of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC) are enriched in genomic scars relating to HRD⁹³⁻⁹⁵. Thus, WGS makes it possible to combine in a given sample the detection of mutational signatures and chromosomal rearrangements associated with HRD, allowing its diagnosis with great robustness, at a cost and time that are not yet compatible with its application in current practice. The HRDetect signature is for example based on this approach⁹⁶. This model has

been developed on a cohort of 560 breast cancers including 22 cases with a germline BRCA1/2 mutation that it has been first able to detect with a sensitivity of 98.7%. It has been then validated on independent cohorts of breast, ovarian and pancreatic cancer, allowing the detection of HRD beyond BRCA1/2 mutations. A similar signature called Classifier Of Homologous Recombination Deficiency (CHORD) has also been developed based on the initial analysis of 3824 solid tumors (pan-cancer) with or without bi-allelic BRCA1/2 inactivation⁹⁷.

Finally, a simplified approach based on the detection of signature 3 from the sequencing of a gene panel (instead of WGS like HRDetect or CHORD) has recently been developed. This is the Signature Multivariate analysis (SigMA) which showed interesting detection capabilities in the study by Gulhan⁹⁸.

Application to basal-like breast cancers

A few studies assessed HRD status in BLBC using tools based on the detection of specific mutational signatures.

Nik-Zainal et al. found an enrichment in signature 3 in BLBC⁹⁴. This data was confirmed by Polak et al. who demonstrated an enrichment in signature 3 in young Afro-descendant women with BLBC, in connection with BRCA1 and RAD51C epigenetic repression by promoter hypermethylation of these 2 HR genes⁹⁵.

On the other hand, Chopra et al. analyzed 20 TNBC with the HRDetect signature. Of these 20 tumors, 15 (75%) were classified as basal-like according to the intrinsic classification. Interestingly, 80% (12/15) of these BLBC had a positive HRDetect score (>0.7). Conversely, only 1 non-BLBC was HRD+ according to this signature and this case corresponded to a BRCA1-mutated tumor expressing Erα⁹⁹.

Furthermore, Staaf et al.¹⁰⁰ sequenced 254 TNBC and classified 237 of them according to the HRDetect signature. Interestingly, 59% of cases were HRDetect high (>0.7), with a genetic or epigenetic cause found in 67% of cases (BRCA1/2 germline or somatic mutation, BRCA1 or RAD51C promoter hypermethylation, PALB2 biallelic loss). HRD high status was correlated, after adjuvant chemotherapy, with better invasive disease free survival (Hazard Ratio (HR) : 0.42, 95% confidence interval (CI) : 0.2-0.87) and distant relapse free survival (HR : 0.31, CI : 0.13-0.76). The HRDetect high cohort was, as expected, clearly enriched in intrinsic BLBC even if a non-negligible number of BLBC were classified as HRDetect low. Thus, 92.1 and 54.1% of BLBC were found in HRDetect high and low cohorts respectively. Considering this time the Lehmann classification, they found in the HRDetect high cohort an enrichment in Basal-like 1 and Mesenchymal subtypes. Similar data was reported in the multi-omics study by Lehmann et al¹⁰¹.

Transcriptomic signatures

Recently, Walens et al.¹⁰² have developed an HRD signature based on the expression level of 51 genes involved in DNA repair. By comparing to the Myriad HRD score (used as Gold Standard), they showed that this transcriptomic signature could detect HRD with a 84% sensitivity and 73% specificity.

Similarly, Konstantinopoulos et al. have also developed a 60 genes expression-based HRD transcriptomic signature analyzing BRCA1/2 mutated (34 cases) or not mutated (27 cases) epithelial ovarian cancers¹⁰³.

Additionally, Larsen et al. have established a “BRCA1-like” transcriptomic signature based on the differential expression of 110 genes in 33 BRCA1 mutated and 128 sporadic tumors¹⁰⁴.

On the other hand, Peng et al. have established in vitro an HRD transcriptomic signature from the MCF10A mammary cell line in which they repressed by RNA-interference certain key HR genes, in particular BRCA1 and RAD51. They have then validated this signature on other HR genes deficient cell lines and demonstrated its ability to predict in vitro the response to PARPi Olaparib and Rucaparib and in vivo overall survival in several pan-cancer cohorts of patients¹⁰⁵.

Similarly, Daemen et al. have developed an in vitro transcriptomic HRD signature from the response of 22 mammary cell lines to a range of increasing doses of Olaparib¹⁰⁶.

Application to basal-like breast cancers

In the study by Walens et al.¹⁰², the HRD high cohort was enriched in BLBC and associated with a poor prognosis in terms of relapses.

Furthermore, Severson et al.¹⁰⁷ have developed another HRD signature based on the expression level of 77 genes pre-selected for their differential expression in TNBC classified as HRD+ compared to TNBC classified as HRD- (based on of their CNA). This transcriptomic signature has been then tested on 116 HER2- mammary tumors from the I-SPY2 trial having received Taxol (control group) associated or not with PARPi Veliparib and Carboplatin (experimental group) in a neoadjuvant setting, allowing detection of an HRD + phenotype in 47% of cases (78% of TNBC and 14% of Er α -expressing tumors). This HRD+ phenotype was correlated with a better response to Veliparib + Carboplatin.

Functional test: RAD51 nuclear recruitment

The different signatures presented above have the advantage of accurately predicting HRD status, whether the causal HRD abnormalities are known or not. Nevertheless, these tools are based on the detection of genetic anomalies established during the early phases of carcinogenesis and considered to be “genomic scars”¹⁰⁸. They can therefore erroneously classify tumors initially HRD+ but which would have subsequently restored their HR status by activating compensatory mechanisms, the selection pressure exerted by certain therapeutic agents (in particular PARPi) being able to favor this transition from a deficient to proficient HR status. As genomic signatures do not provide information on the HR status in real time in tumors, several teams sought to circumvent this difficulty by developing functional tests based on the IHC detection of RAD51 nuclear recruitment (visible as foci), after genotoxic event. Indeed, RAD51 is a protein highly involved in HR and its use as a surrogate of proficient HR has been validated by several preliminary studies carried out on fresh breast tumor biopsies after chemotherapy^{109,110}. In these studies, the absence of RAD51 recruitment (HRD+ phenotype) was correlated with a better response to chemotherapy. Eikesdal et al. showed that the absence of RAD51 recruitment was also correlated with a better response to Olaparib¹¹¹.

Other studies evaluated the RAD51 recruitment on tissues biopsied before treatment^{112–116}. In this case DNA breaks were generated after ex vivo irradiation of these tissues. Interestingly, Mutter et al. compared this functional technique to HRD detection by Whole Exome Sequencing. They thus considered 9 RAD51- (functional HR deficient) and 15 RAD51+ (functional HR proficient) breast carcinoma biopsies. LST, TAI, LOH scores as well as the number of indels were significantly higher in the RAD51- group (Wilcoxon rank-sum test $p=0.002$, $p=0.009$, $p=0.048$ and $p=0.044$, respectively)¹¹³.

Moreover, in a similar study conducted by Meijer, 60% (6/10) of RAD51- breast tumors analyzed were enriched in signature 3. In this work, the non-BRCA HRD+ tumors' rate identified by the absence of recruitment of RAD51 (33%) was similar to the rate found via HRDetect¹¹⁶.

Finally, other teams attempted to carry out these RAD51 stainings on tumor tissues not exposed to any exogenous genotoxic event such as chemotherapy or radiotherapy^{117,118}. In this case, the analysis of RAD51 recruitment is carried out on the basis of the existence in these tumors of spontaneous endogenous DNA breaks. Catroviello-Bermejo et al.¹¹⁷ demonstrated the feasibility of this technique. In their study, the functional RAD51 recruitment test predicted PARPi response with a 100% sensitivity and specificity, even more robustly than Myriad HRD test.

Application to basal-like breast cancers

Few studies, investigated the RAD51 nuclear recruitment specifically in BLBC. On the other hand, several studies demonstrated the correlation between absence of RAD51 nuclear recruitment and triple negative phenotype.

Thus in the study by Greaser et al.¹⁰⁴, TNBC were more frequently RAD51 deficient, and this was statistically significant. Naipal et al.¹¹⁵ reported the same result. Similarly, Chopra et al.⁹⁹ showed that 77% of the TNBC analyzed in their study were RAD51 deficient.

Moreover, in the study by Willers et al.¹¹², 75% of RAD51-deficient (3/4) breast tumors were triple-negative. This enrichment in TNBC in the RAD51-deficient subgroup was also described by Meijer et al.¹¹⁶.

Finally, the work of Hill et al.¹¹⁹ specifically studied the RAD51 recruitment in BLBC cell lines, compared to non-BLBC cell lines and non-tumor samples. Interestingly, only a third of the basal-like cell lines were RAD51 deficient, the others displaying levels of RAD51 nuclear recruitment similar to controls. These data are supported by the study of Ter Brugge et al. in which RAD51 recruitment after platinum salt treatment was studied in 32 early basal-like PDX. In this work 46.9% (15/32) of cases were RAD51 deficient and 53.1% (17/32) were RAD51 proficient. Among the RAD51-deficient PDX, 93.3% (14/15) exhibited HRD in shallow WGS and 6.7% (1/15) were considered HRP. Of the RAD51 proficient PDX, 35.3% (6/17) were HRD and 64.7% (11/17) were HRP⁸¹. This suggests that only part of the BLBC present a functional HRD or that HRD does not necessarily manifest itself by a loss of RAD51 recruitment in a subgroup of BLBC. Further studies seem necessary to elucidate these points.

HRD causes in basal-like breast cancer

Beyond BRCA1 and BRCA2 which constitute important predisposition genes, many other genes are involved in HR⁵⁴. Some of them may be the target of different inactivation mechanisms: epigenetic repression (for example by promoter hypermethylation), inactivating mutation, post transcriptional silencing¹²⁰. Generally, in HRD tumors, the 2 alleles are found inactivated, although several studies showed that mono-allelic BRCA1 inactivation (haplo-insufficiency) is already associated with a certain level of genetic instability that could favor the subsequent appearance of an HRD phenotype¹²¹⁻¹²⁴. In this chapter we will therefore detail the different HR genes inactivation mechanisms involved in the acquisition of an HRD phenotype in BLBC.

Genetic alterations

BRCA1 and BRCA2

In the early 2000s, several studies analyzed the prevalence of BRCA1 and 2 mutations in cohorts of TNBC made up of subjects selected on their family history or their age. In these cohorts, as reported by Hartman et al.¹²⁵, the prevalence of BRCA1 mutations was 6.5 to 34.4% depending on the series. The prevalence of BRCA2 mutations was 0 to 9.2%. Other similar studies have been reviewed by Peshkin et al. with mutation rates ranging from 9 to 100% (mean 35%) for BRCA1 and 2 to 12% (mean 8%) for BRCA2¹²⁶.

Subsequently, additional studies investigated the prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in unselected TNBC. In the study by Hartman et al., 6.5% (13/199) of patients had a germline BRCA1 mutation and 4% (8/199) of patients had a germline BRCA2 mutation¹²⁵.

In the study by Gonzalez-Angulo et al.¹²⁷, the BRCA1 mutation rate was 19.5% (15/77 including 1 somatic mutation) and the BRCA2 mutation rate was 3.9% (3/77, no somatic mutation), confirming the data from Janatova et al.¹²⁸ that somatic BRCA1/2 mutations are rare in sporadic breast cancer. Interestingly, these BRCA1/2 mutations were associated with better disease-free survival (HR : 0.19, 95% CI : 0.045–0.79, P=0.016)¹²⁷.

Couch et al. analyzed the rate of germline mutations in predisposition genes in 1824 cases of unselected TNBC. They found a germline mutation rate of 8.5% (155/1824) for BRCA1 and 2.7% (49/1824) for BRCA2¹²⁹.

In the study by Brianese et al., 11.5% (15/131) of TNBC in the cohort had a germline BRCA1 mutation, 0.8% (1/131) a somatic BRCA1 mutation and 1.5% (2/131) a germline BRCA2 mutation. In this study, BRCA1 inactivation was also associated with a better prognosis in terms of overall survival and progression-free survival¹³⁰.

In the study by Engel et al. having analyzed 802 unilateral TNBC in women without any family history of breast cancer, the BRCA1 germline mutation rate was 14.7% (118/802) and the BRCA2 germline mutation rate was 1.1 % (9/802)¹³¹.

In the Chinese cohort exploited by Ma et al.¹³² and including 325 unselected TNBC, BRCA1 and BRCA2 genes had a germline mutation in 7.4 (24/325) and 2.2 (7/325)% of cases, respectively.

Additionally, the work of Shimelis et al.¹³³ made it possible to compare the germline mutation rates for the BRCA1 and BRCA2 genes in 8753 TNBC according to the geographical origin of patients. Thus, in this study, the BRCA1 germline mutation rate was 5.6% in the Caucasian population and 5.9% in the African-American population. The BRCA2 germline mutation rate was 2.2 and 3.1% in these populations respectively.

It should also be noted that in the study by Manié et al., 52% (69/132) of TNBC cases presented an HRD LST+ signature. Of these 69 cases, 30% (21/69) had a BRCA1 mutation/deletion and 12% (8/69) had a BRCA2 inactivation⁷².

Finally, the sequencing work of TCGA network evaluated BRCA1/2 mutation rate specifically in the basal-like subtype. Of 81 BLBC, about 20% had a BRCA1/2 mutation: 12% with germline mutation and 8% with somatic mutation¹³⁴.

Other homologous recombination genes

PALB2

Several studies have identified PALB2 as a breast cancer susceptibility gene^{135,136}. Indeed, most of these studies have shown enrichment in various PALB2 mutations in cohorts of familial forms of breast cancer¹³⁷⁻¹⁴⁹. Additionally, Polak et al. showed that such PALB2 mutations were associated with signature 3 (HRD mutational signature)⁹⁵. Thus, for example, in the Heikkinen study, PALB2 1592delT mutation was found in 19 patients in the family cohort (2.0%, odds ratio : 11.03, 95% CI : 2.65 – 97.78, $p < 0.0001$) versus 8 patients in the sporadic cohort (0.6%, odds ratio : 3.40, 95% CI 0.68 – 32.95, $p = 0.1207$) and 2 patients in the control cohort (0.2%). These PALB2-deficient cancers mainly corresponded to cancers with a basal-like phenotype in IHC.

Moreover, in the study by Couch et al. 1.1% (21/1824) of TNBC in the cohort had a germline PALB2 mutation¹²⁹.

In the study by Zhang et al., 55.9% (132/236) of metastatic TNBC presented a germline mutation of a HR gene, among which were included 5 cases of pathogenic variants of PALB2 (2.1%)¹⁵⁰.

In the Chinese study by Ma et al., only 0.6% of TNBC (2/325) had a germline PALB2 mutation¹³².

Finally, in the study by Shimelis et al.¹³³ 1.7% of the Caucasian TNBC cohort and 0.8% of the African American cohort demonstrated a germline PALB2 mutation, highlighting ethnic differences in the spectrum of variants involved in the biology of these tumors .

BARD1

In 2020, Bodily et al.¹²⁰ analyzed TCGA breast cohort composed of 1101 cases of breast cancer with different subtypes. In this cohort, they found 8 alterations of the BARD1 gene (0.7% of cases): 1 germline mutation, 2 somatic mutations, 5 homozygous deletions. These BARD1-deficient tumors presented a mutational signature similar to BRCA1-deficient tumors, suggesting the involvement of BARD1 alterations in the carcinogenesis of some HRD tumors.

This observation supports the data of Polak et al. who reported the case of a BARD1^{-/-} tumor associated with signature 3⁹⁵.

Sabatier et al. also reported the case of a young 36-year-old woman with breast carcinoma with a homozygous deletion of BARD1 (1 hereditary loss and 1 somatic loss). This tumor was characterized as HRD in CGH-array and basal-like in gene expression profile¹⁵¹.

Nevertheless, BARD1 alterations seem to be relatively rare among TNBC. Indeed, Couch et al. found a BARD1 germline mutation rate of 0.5% (9/1824) in their series¹²⁹.

For their part, Shimelis et al. demonstrated a BARD1 germline mutation rate of 0.7% in their Caucasian cohort and 1.2% in their African-American cohort¹³³.

In the Chinese population, the team of Zhang et al.¹⁵⁰ showed a BARD1 pathogenic variant rate of 3.8% (9/236) while the team of Ma et al.¹³² found none in her cohort (0/325).

RAD51D

Germline RAD51D mutations in TNBC are rare in non-Asian populations (estimated at 0.4% in the study by Couch et al.¹²⁹ and 0.3% in the study by Shimelis et al.¹³³). Nevertheless, they seem to be more frequent in Asian populations: 0.8% (2/236) in the study by Zhang et al. and 2.8% (9/325) in the

study by Ma et al¹³². In this same study, an association was found between germline RAD51D mutation and HRD status determined by next generation sequencing.

PTEN

Although bi-allelic loss of PTEN has been described as associated with HRD¹⁵², it is unclear whether this loss contributes to HRD or is only a consequence of it¹⁵³.

In Couch et al. TNBC cohort, germline PTEN mutation rate was 0.05% (1/1824)¹²⁹.

The same figure was reported in the Shimelis et al. clinical cohort (0.05% i.e. 4 cases/8719, all ethnic groups combined)¹³³.

Other genes

Since HR pathway is complex and regulated by many other genes, the question of the involvement of some of these genes in the acquisition of an HRD phenotype deserves to be raised. McCabe et al.¹¹⁴ therefore evaluated in vitro the sensitivity to different PARPi in cells deficient in proteins involved in HR. In this study, cells deficient in RAD51, RAD54, SEM1, RPA1, NBN, ATR, ATM, CHEK1, CHEK2, FANCD2, FANCA or FANCL exhibited increased sensitivity to PARPi. Other genes such as BAP1, CDK12, BRIP1, BLM, WRN, MRE11A, RAD51B, RAD51C have also been described as associated with an HRD phenotype when altered⁶⁹. Currently there are therefore panels of genes related to HR that can be sequenced in clinical practice as a replacement or in addition to the above-mentioned HRD evaluation techniques. For example, De Bono et al. evaluated in the PROFOUND trial the Olaparib efficacy (vs. Enzalutamide or Abiraterone) in men with metastatic castration-resistant prostate cancer, progressive after one line of second-generation hormone therapy and carrying at least one alteration in one of the genes preselected for their direct or indirect role in HR. The gene panel therefore included BRCA1, BRCA2 and ATM (cohort A) and BRIP1, BARD1, CDK12, CHEK1, CHEK2, FANCL, PALB2, PPP2R2A, RAD51B, RAD51C, RAD51D and RAD54L (cohort B). A benefit for Olaparib in terms of radiological progression-free survival and overall survival was therefore found in cohort A and in the overall population (cohort A + B)⁹.

Nevertheless, the rate of alterations of these additional genes specifically in TNBC/BLBC seems low. Thus in the 1824 TNBC cohort of Couch et al., the germline ATM, CHEK2, BRIP1, MRE11A and RAD51C mutation rates were respectively 0.11, 0, 0.44, 0.11 and 0.33%¹²⁹. In the cohort of Shimelis et al., they were 0.26, 0.33, 0.42, 0.09 and 0.48 respectively¹³³. However, in these studies, there were no analysis of somatic mutations or CNA. Figure 1 therefore represents the genetic mutations, germline or somatic as well as the CNA of the HR genes mentioned above, specifically in the basal-like subgroup of the TCGA mammary cohort and compared to the other molecular subtypes^{134,154}.

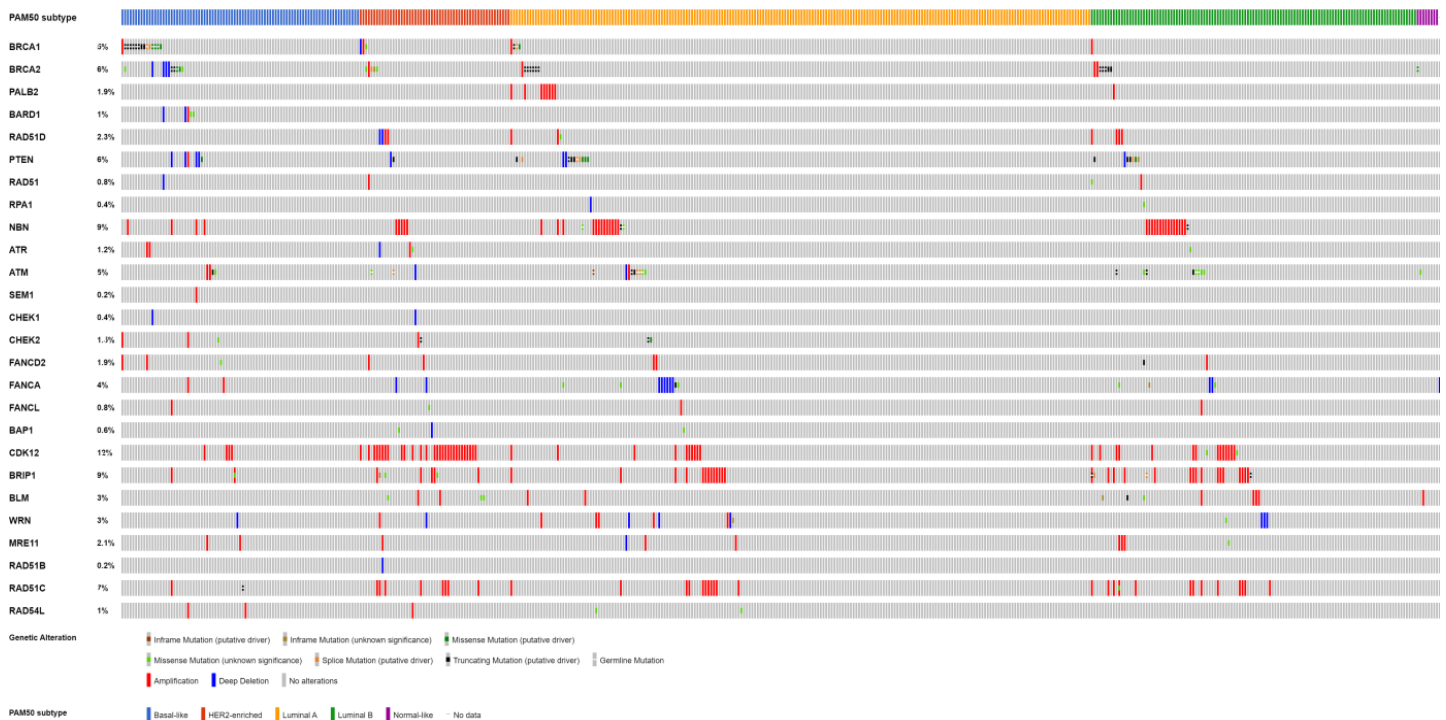


Figure 2: Alterations in homologous recombination genes TCGA mammary cohort

Transcriptional dysregulations

Even if the number of genes potentially involved in the acquisition of an HRD phenotype is substantial, mutations and CNA relating to these genes do not on their own explain all the cases of HRD in BLBC/TNBC. It has therefore been proposed that transcriptional deregulation of some of these genes could constitute alternative phenomena explaining HRD in these cancers.

BRCA1 promoter hypermethylation

Many works, listed by Watanabe et al.¹⁵⁵, thus identified BRCA1 promoter hypermethylation in certain subgroups of sporadic breast cancers. Among these works, we can cite the study by Esteller et al. which found BRCA1 promoter hypermethylation in 13% (11/84) of the unselected breast tumors studied. In a second series, 20% (9/45) of breast carcinomas with BRCA1 loss of heterozygosity showed inactivation of the second allele by BRCA1 promoter hypermethylation¹⁵⁶. In the Chinese cohort of Chen et al., 26% (139/536) of sporadic breast cancers showed BRCA1 promoter hypermethylation and this event was associated with a lower progression-free survival¹⁵⁷. Furthermore, Lips et al. found BRCA1 promoter hypermethylation in 25% (41/163) of the HER2-breast cancer cases studied¹⁵⁸.

BRCA1 promoter hypermethylation has also been studied more specifically in TNBC.

Indeed, as early as 1999, Catteau et al. investigated BRCA1 promoter methylation in 96 invasive breast cancers. This event was found in 11% of cases and was strongly associated with the triple negative phenotype¹⁵⁹. In the study by Watanabe et al., 23% (7/30) of the analyzed TNBC showed BRCA1 promoter hypermethylation compared to only 3% (1/29) in the control group of luminal

tumors ($p=0.03$)¹⁵⁵. Additionally, Yamashita et al. analyzed the methylation status in 69 localized TNBC. In this study, 16% (11/69) of the cases were positive. There were no positive cases in the control cohort consisting of 161 non-TNBC. Furthermore, BRCA1 promoter hypermethylation was significantly associated with lymphovascular invasion, nuclear grade and low transcriptional and protein BRCA1 expression¹⁶⁰. In a SWOG9313 trial translational analysis, Sharma et al. found BRCA1 promoter hypermethylation in 32% (111/348) of localized TNBC in the cohort⁸⁸. Similarly, Brianese et al. found rates of 20.6% (27/131)¹³⁰. Tian et al. found a similar figure of 25.2% (38/151)¹⁶¹. As a reminder, in the study by Manié et al., 52% (69/132) of the TNBC in the cohort were HRD+ (LST+), including 35% (24/69) with BRCA1 promoter hypermethylation⁷².

Studies have also looked specifically at BLBC.

In the study by Matros et al. in 2005, the rate of BRCA1 promoter hypermethylation, although 21% (16/75) in their sporadic breast cancer cohort, was low among BLBC¹⁶². These data were confirmed by the study by Turner et al. in 2007. Indeed, this study analyzed 37 sporadic breast cancers expressing basal cytokeratin 5/6 as well as age- and grade-matched controls. BRCA1 promoter hypermethylation in this study was 14% in the basal cohort and 11% in the control cohort (difference not significant, $p=0.72$)⁶⁴. In the study by Joosse concerning 41 BLBC, the results were a bit different. Indeed, BRCA1 promoter hypermethylation was found in 34% (14/41) of cases and was significantly associated with low BRCA1 transcriptional expression⁶⁵. Finally, in the Indian study by Bal et al., 24% (11/45) of the sporadic breast cancer cases studied showed BRCA1 promoter hypermethylation. These 11 cases presented a reduced expression or even an absence of BRCA1 protein expression and a basal phenotype¹⁶³.

It should be noted that in the PETREMAC phase II trial conducted on patients presenting with stage II/III localized TNBC, BRCA1 promoter hypermethylation was significantly associated with a better response to Olaparib¹¹¹. In contrast, in a recent study by Ter Brugge et al. on 55 PDX models of early TNBC, established at the Institut Curie, BRCA1 promoter methylation was not associated with a better response to platinum salts. However, in this study, only a BRCA1 methylation level of 90-100% was associated with complete BRCA1 transcriptional repression while lower methylation levels (40-60%) were associated with residual BRCA1 expression and resistance to platinum salts⁸¹.

Id4 overexpression

The Id family proteins (Id1–Id4) are proteins possessing a helix-double-helix dimerization domain thanks to which they can form heterodimers with transcriptional factors also structured in a basic helix-loop-helix. As the Id proteins do not have a DNA-binding domain, the heterodimers that they form with the transcription factors antagonize the latter by preventing them from interacting with the DNA. They are therefore considered as dominant negative transcriptional regulators¹⁶⁴. In the Id family, Id4 has notably been identified as a negative regulator of BRCA1 expression¹⁶⁵, notably in certain sporadic Er α negative breast cancers¹⁶⁶. Moreover, in the study by Branham et al., Id4 demethylation was positively correlated with its transcriptional and protein expression and strongly associated with a BRCAness phenotype measured by MLPA in 63 breast tumors¹⁶⁷. Interestingly, Id4 overexpression is strongly associated with the basal-like phenotype.

Thus, in the study by Turner et al., Id4 expression level (evaluated by qPCR) in the 37 sporadic BLBC studied was 9.1 times higher than in the non-basal-like controls matched on age and grade ($p < 0.0001$)⁶⁴. Additionally, Wen et al. compared the Id4 protein expression level in IHC in 101 TNBC compared with 113 non-TNBC. In this study, 75% (76/101) of the TNBC cases showed

immunoreactivity for Id4, including 40% (40/101) with positive staining in more than 50% of the tumor cells. Conversely, only 5% (6/113) of control cases were positive for Id4 ($p < 0.0001$). Id4 expression was significantly associated with nuclear grade, mitotic index and basal cytokeratin CK14 expression (not significant for CK5/6 and EGFR)¹⁶⁸. Similarly, Thike et al. evaluated Id4 status in IHC in 699 TNBC cases organized in TMA. In this study, Id4 expression was found in 95% (663/699) of the cases among which 45.6% (317/699) of intense expression and 65% (454/699) of expression in more than 50% of tumor cells. Id4 expression was significantly associated with stage, grade, mitotic index and basal-like phenotype defined in IHC by CK14, EGFR and 34 β E12 expression¹⁶⁹. Additionally, Junankar et al. analyzed Id4 protein expression level in IHC in a cohort of 80 BLBC. In this study, 37.5% (30/80) of the cases had a high level of Id4 expression (Id4 high). Id4 high status was significantly associated with an unfavorable prognosis in terms of overall survival at 3 years (hazard ratio for death : 4.24, $p < 0.0008$), independently of grade or proliferation estimated by Ki67. The same unfavorable prognostic impact was found for Id4 transcriptional expression in 2 other BLBC independent cohorts of 60 and 285 cases respectively. In these cohorts, Id4 was highly expressed in approximately 50% of cases. It should be noted that in this same work, Id4 repression in BLBC cell models was associated in vitro with less proliferation and in vivo with less tumor growth, which could explain the difference in prognosis between Id4 high and Id4 low cohorts¹⁷⁰. It should also be noted that in TCGA, ID4 high BLBC transcriptome was enriched in numerous genes involved in mammary stem cells' biology. This relationship between Id4 and stemness could also partly explain the negative prognostic impact of Id4¹⁷⁰. Nevertheless, the Id4 biological functions specifically in BLBC remain obscure. Therefore, Baker et al. analyzed by Chip-seq the Id4-chromatine interactome in different BLBC and high-grade ovarian serous carcinomas cell lines. They also identified by Rapid immunoprecipitation and mass spectrometry of endogenous proteins (RIME) all of Id4 protein interactions in these models. Interestingly, they showed that in addition to its canonical role as a dominant negative transcriptional regulator, Id4, in BLBC, could interact with certain areas of euchromatin, even in the absence of any known DNA binding domain. These interaction zones correspond to sites of active transcription and DNA damage. At this level, Id4 does not seem to influence transcription but rather interact with many proteins involved in DNA damage response. The exact consequences of these interactions on genome integrity maintenance and genomic stability remain to be determined, but these discoveries could make the link between Id4 overexpression and BRCAness in certain BLBC¹⁷¹.

Other mechanisms

Several other mechanisms of transcriptional and epigenetic deregulation of HR actors have been described in mammary carcinomas and recently reviewed by Mekonnen et al¹⁷². These mechanisms notably include RAD51C and FANCF hypermethylation. Thus, in the study by Polak et al. RAD51C promoter hypermethylation was well correlated with a significant drop in RAD51C mRNA expression and strongly associated with signature 3. Interestingly, among patients with this epigenetic abnormality, there was an enrichment in young Afro-descendants with basal-like cancer⁹⁵. Nevertheless, the contribution of RAD51C promoter hypermethylation in the acquisition of an HRD phenotype in TNBC/BLBC seems weak. In fact, in the study by Manié et al., only 4% (3/69) of cases in HRD+ TNBC (LST+) presented this alteration⁷².

Similarly, although Turner et al. originally proposed FANCF promoter hypermethylation as an HRD mechanism⁶⁷, the frequency of this alteration is less than 1% in the Wei et al multi-subtype breast cancer cohort¹⁷³.

Furthermore, EMSY is a gene located on chromosome 11q13 whose protein interacts with exon 3 of BRCA2 gene leading to its transcriptional repression¹⁷⁴. EMSY overexpression in vitro leads to the accumulation of chromosomal aberrations similar to those observed in the context of BRCA2 inactivating mutation, making amplification/overexpression of EMSY a potential cause of HRD¹⁷⁵. EMSY amplification has been described in a number of sporadic breast cancers and is correlated with poor prognosis¹⁷⁴⁻¹⁸¹. Nevertheless, this alteration is rare in BLBC and is rather associated with the luminal B phenotype^{175,179}.

Homeobox (HOX) family genes are morphogens encoding transcription factors regulating the expression of many genes involved in cell growth and differentiation. They are frequently dysregulated in many cancers¹⁸². Gilbert et al. thus identified HOXA9 as a positive regulator of BRCA1 expression and showed that its mRNA level was significantly lower in their cohort of 47 TNBC, compared to non-tumor controls¹⁸³. Nevertheless, the consequences of HOXA9 loss on HRD phenotype acquisition remain to be determined. Moreover, in TCGA mammary cohort, HOXA9 does not appear to be inactivated or repressed in BLBC¹³⁴.

Finally, HMGA1b is a protein able to bind to DNA in AT-rich region and interact with various transcription factors in order to modulate their activity. Baldassarre et al. demonstrated that this protein could interact directly with BRCA1 promoter leading to its transcriptional repression¹⁸⁴. However, HMGA1b overexpression remains relatively rare in BLBC (only 1 amplification case in TCGA mammary cohort¹³⁴) and the consequences in terms of HRD also remain to be determined.

Post-transcriptional dysregulations

In addition to the previously detailed HRD mechanisms, some teams sought to explore the impact of certain miRNAs on the post-transcriptional regulation of certain HR actors, in particular BRCA1. Thus Garcia et al. demonstrated the ability of miR-146a and miR-146b-5p to repress BRCA1. As expected, in this study, the highest expression levels of these miRNAs were found in BLBC cell lines and in TNBC tissues¹⁸⁵. By studying TCGA data, M'hamed et al. confirmed that miR-146a is significantly overexpressed in TNBC compared to non-TNBC. However, they failed to demonstrate the ability of this miRNA to repress BRCA1 in the MDA-MB-231 mesenchymal-like TNBC cell line, unlike miR-10b and miR-26a¹⁸⁶. Additionally, Shen et al. and Pastrello et al. showed that certain miR-26a polymorphisms were associated with an earlier breast cancer diagnosis in certain risk groups, highlighting the hypothetical impact of this miRNA in the tumorigenesis of certain breast cancers^{187,188}.

Furthermore, Moskwa et al. demonstrated a statistically significant inverse correlation between expression level of another miRNA, miR-182, and BRCA1 in a panel of TNBC cell lines. Conversely, they also showed that in these models, miR-182 repression led to BRCA1 overexpression, suggesting a role for this miRNA in the post-transcriptional regulation of BRCA1^{189,190}.

Shen et al. and De Summa et al. showed that another miRNA, miR-17, was able to interact with BRCA1 3'UTR mRNA and inactivate it^{191,192}. This miRNA was found overexpressed in the MDA-MB-231 cell line¹⁹².

Additionally, Tan et al. also identified BRCA1 transcript as a direct target of miR-638 in TNBC cell lines. In their study, overexpression of this miRNA induced hypersensitivity to Cisplatin. Nevertheless, it was found rather under-expressed in the triple-negative primary tissues of their cohort¹⁹³.

Additionally, Quan et al. showed that several miRNAs of the miR15/107 family are able to interact directly with the coding sequence of BRCA1 mRNA, inducing its inactivation. Nevertheless, the consequences in terms of protein expression were heterogeneous in the pancreatic and colorectal cancer cell lines used¹⁹⁴. Moreover, these miRNAs seem rather under-expressed in the context of mammary carcinomas¹⁹⁵.

Finally, Song et al. demonstrated in the MDA-MB-231 cell line that miR-1245 is capable of suppressing BRCA2 transcript activity via interaction with its 3' UTR region, resulting in the appearance of HRD, genomic instability and increased sensitivity to irradiation¹⁹⁶. Nevertheless, the abundance of miRNAs specifically in BLBC and its impact on HR status in vivo remains to be determined.

Conclusion and perspectives

BLBC is an aggressive breast cancer subtype defined in the 2000s on the basis of its gene expression profile in the so-called intrinsic classification. Surrogates based on protein expression in IHC were subsequently established, so that it represents 17 to 37% of cases of breast cancer when considering the intrinsic classification⁴ and approximately 16% of cases when considers IHC classifications^{197,198}. The clinical, biological and molecular similarities of BRCA1 mutated cancers with sporadic BLBC initially led to suspect the involvement of HRD mechanisms in the biology of these tumours, beyond the BRCA1 mutation. In addition to the mechanistic interest, there is therefore a theranostic interest in detecting HRD in this type of cancer, this anomaly having been clinically associated with the response to various therapeutic agents (in particular platinum salts and PARPi) in several tumor locations. In this review, although the definitions of BLBC and HRD vary between studies, we show that up to 80% of BLBC display HRD⁹⁹. The main mechanisms (most often mutually exclusive¹³⁴) explaining this HRD seem to be:

- germline (about 12%) or somatic (about 8%) mutations of the BRCA1/2 genes, with a large majority of BRCA1 mutations⁷²
- BRCA1 promoter hypermethylation (from 14⁶⁴ to 34⁶⁵%)
- RAD51C promoter hypermethylation (about 4%)⁷²

Overexpression of Id4 (from 37.5 to 50%) was also frequently found¹⁷⁰ (figure 3).


The other mechanisms include inactivating mutations of other HR genes or transcriptional or post-transcriptional repression mechanisms of these elements.

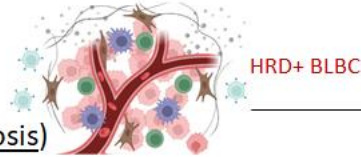
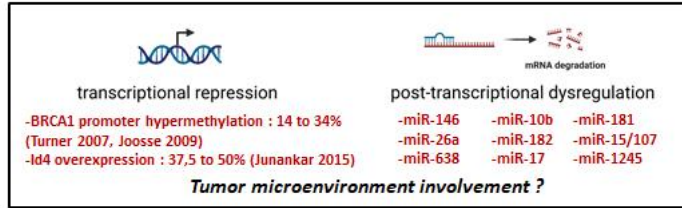
These latter mechanisms argue for a non mutational origin for some BLBC. The causes of these non-mutational alterations of certain HR genes are largely unexplored. For example, the factors regulating BRCA1 promoter hypermethylation, Id4 overexpression or certain miRNAs expression in BLBC are not well known, nor are the conditions favouring their occurrence. In this respect, several studies showed that certain cytokines in the tumour microenvironment, such as TGF β , were associated in vitro with transcriptional repression of several HR genes, notably via the miR-181 family involvement^{199,200}. This transcriptional deregulation in the HR pathway would therefore, according to these works, lead to the appearance of a BRCAness phenotype characterised by significant genetic instability and increased sensitivity to certain genotoxic agents such as PARPi. This suggests that in basal-like carcinogenesis, certain stresses in the tumor microenvironment could lead to the

acquisition of an HRD phenotype, by substituting for or cooperating with the more classically described mutations in HR genes. It therefore seems fundamental to better identify these mechanisms, the understanding of which could play an important role in the development of innovative treatments.

Finally, given the HRD frequency in BLBC, they should theoretically be relatively sensitive to platinum salts and PARPi, as is particularly the case in epithelial ovarian cancers¹¹⁻¹³. In most studies, the analysis of response to these agents and the impact of their use on survival focused on cohorts of TNBC, as they represent approximately 80% of BLBC and molecular subtype classification is rarely performed in current practice. Table 4 therefore lists the main trials in these situations. Thus, in the neo-adjuvant phase, the addition of Carboplatin to standard chemotherapy based on anthracyclines and taxanes in the treatment of unselected TNBC seems to improve the pathological complete response (pCR) rate with an inconsistent impact in terms of disease-free survival and no significance in terms of overall survival in phase III trials^{87,201,202}. Replacing anthracyclines with a platinum salt also appears to give similar pCR levels in this situation^{88,203}. In practice, the response to platinum salts in the early phase seems to be correlated with HRD status, but this is inconsistent according to studies^{85,87,89,204}. Similarly, the benefit of using PARPi in the early phase is well established in the case of germline BRCA1/2 mutation^{14,205} and suggested by phase II studies in other HRD situations^{85,111}. In the metastatic phase, Carboplatin monotherapy gives similar response rates to Taxotere as a first line chemotherapy, as demonstrated in the study by Tutt et al⁸⁶. Nevertheless, in this study, Carboplatin was associated with a better objective response rate in the subgroup with a germline BRCA1/2 mutation but not in the HRD cohort (Myriad test). These data reinforce those of Byrski et al. who had shown an excellent 80% objective response rate to Cisplatin in metastatic breast carcinoma with a BRCA1/2 mutation (70% of triple-negative cancers)²⁰⁶. In case of use of a doublet of chemotherapy in metastatic TNBC, a protocol based on platinum salts seems to be associated with a better progression-free survival, with no benefit in overall survival^{150,207}. In this situation, the Carboplatin + Nab-Paclitaxel association seems superior to Carboplatin + Gemcitabine²⁰⁷. Moreover, the benefit of adding a PARPi to platinum-based chemotherapy is inconsistent according to the studies considered²⁰⁸⁻²¹⁰, even if a benefit specifically in the BRCA-like population (sBRCAm, HRDscore (Myriad) > 42, BRCA1 promoter hypermethylation, germline mutation in HR genes other than BRCA1/2) cannot be excluded²⁰⁸. Finally, if PARPi in monotherapy have shown their interest in terms of progression free survival in breast cancers with germline BRCA1/2 mutation^{15,16}, their overall ineffectiveness in sporadic TNBC has been demonstrated²¹¹. Interesting also are the response rates in case of germline PALB2 or somatic BRCA1/2 mutations²¹². However, the efficacy of platinum salts and PARPi in TNBC/BLBC seems lower than in epithelial ovarian cancers¹¹⁻¹³ suggesting the existence of resistance mechanisms to PARPi in these cancers (efflux pump expression, reversion mutation, loss of 53BP1, HRD compensation mechanisms, enrichment in cancer stem cells, etc.). The demonstration of such mechanisms, beyond the diagnosis of HRD itself, therefore seems necessary to make further progress in the treatment of BLBC, which remains to date the most aggressive breast cancer molecular subtype.

HRD causes


 mutation
 -gBRCA1 : 10%
 -sBRCA1 : 6%
 -gBRCA2 : 2,5%
 -sBRCA2 : 2,5 %
 -other HR gene : 11,2%
 (TCGA)



HRD consequences (diagnosis)

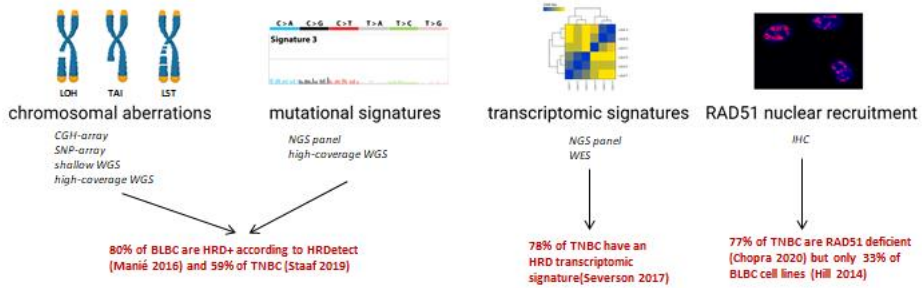


Figure 3: HRD main known causes and consequences in basal-like breast cancers

Trial/reference	Population	Stadium	Analysis sub-groups according to HR status	Treatments tested	Judgment criteria	Results
PETREMAC/Eikesdal ¹¹¹ Phase II single arm	Unselected TNBC (Neo-adjuvant) 32 patients	II/III		Olaparib 300mg x2/d for a maximum of 10 weeks	-main: objective response rate (ORR)	-ORR = 56.3% (18/32) -88.9% (16/18) of responders vs 28.6% (4/14) of non-responders had HR gene mutations or BRCA1 hypermethylation (p = 0.0008)
PrECOG 0105/Telli ⁸⁵ Stage II	Unselected TNBC (Neo-adjuvant) 80 patients	I to IIIA	A: HRD-LOH high (n = 50) B: no HRD-LOH low (n = 15)	Gemcitabine (1000 mg/m ² D1 D8) + Carboplatin (AUC 2 D1 D8) + Iniparib (5.6 mg/kg D1 D4 D8 D11) every 21 days x 6 cycles	-main: pathological complete response (pCR) and residual cancer burden (RCB) 0/1	- overall pCR = 36% A: RCB 0/1: 66% B: RCB 0/1: 20%
SOLTI NeoPARP/Llombart-Cussac 2015 ²¹³ Stage II	Unselected TNBC (Neo-adjuvant) 141 patients	II/IIIA		Paclitaxel 80 mg/m ² weekly (P) vs Paclitaxel 80 mg/m ² weekly + Iniparib 11.2 mg/kg weekly (P1) vs Paclitaxel 80 mg/m ² weekly + Iniparib 5.6 mg/kg twice weekly D1 D4 (P2)	-main: pCR	-pCR P: 21% -pCR P1: 22% -pCR P2: 19%
GeparOLA/Fasching ²¹⁴ Phase II	HRD (Myriad) or BRCA1/2m breast cancers 107 patients	I to III		Paclitaxel 80 mg/m ² weekly + Olaparib 100 mg x2/day (PO) vs Paclitaxel 80 mg/m ² + Carboplatin AUC twice weekly (PC) 12 weeks After the 12 weeks, 3 to 4 cycles of Epirubicin + Cyclophosphamide	-main: pCR	-pCR PO 55.1%, 90% CI 44.5% to 65.3% vs pCR PC 48.6%, 90% CI 34.3% to 63.2%
Fountain ²¹⁵ Phase II single arm	Unselected TNBC (Neo-adjuvant) 63 patients	II/III		Paclitaxel 80 mg/m ² weekly + Carboplatin AUC 2 weekly for 12 weeks then Epirubicin/Cyclophosphamide dose dense 4 cycles	-main: pCR	-pCR: 54%
Sharma ⁸⁸ Phase II single arm	Unselected TNBC (Neo-adjuvant) 190 patients	I/III	A: BRCAm B: BRCA wild type	Carboplatin AUC 6 + Taxotere 75mg/m ² /3 weeks 6 cycles	-main: pCR -secondary: RCB0/1	-pCR: 55% pCR A 59% pCRB 56% (p=0.83) -RCB0/1: 68%
I-SPY-2/Rugo ²¹⁶ Phase II	TNBC (Neo-adjuvant) 72 patients	II/III		Paclitaxel 80 mg/m ² weekly + Veliparib 50 mg x2/day + Carboplatin AUC6/3 weeks, 12 weeks (PVC) Vs Paclitaxel alone (P) After 12 weeks 4 cycles of Doxorubicin/Cyclophosphamide in both arms	-main: pCR	-pCR PVC 51% (95% Bayesian probability interval, 36 to 66%) vs pCR P 26% (95% PI, 9 to 43%)
Litton ²⁰⁵ Phase II	HER2- breast cancers with gBRCA1/2m (75% triple-negative) (Neo-adjuvant) 20 patients	I to III		Talazoparib 1 mg/day 6 months	-main: RCB0/1	-RCB0: 53% -RCB0/1: 63%
Olympia/Tutt ¹⁴ Phase III	HER2- breast cancers with gBRCA1/2m (> 80% triple-negative) and at high clinicopathologic risk of recurrence (Adjuvant) 1836 patients	I to III		Olaparib 300 mg x2/d vs placebo, 52 weeks	-main: invasive disease-free survival (iDFS) -secondary: overall survival (OS)	-iDFS at 4 years Olaparib 82.7% vs placebo 75.4% (HR: 0.63, 95% CI 0.50 – 0.78) - OS at 4 years Olaparib 89.8% vs placebo 86.4% (HR: 0.68, 95% CI 0.47 – 0.97)
Silver ²¹⁷ Phase II single arm	Unselected TNBC (Neo-adjuvant) 28 patients	II/III		Cisplatin 75 mg/m ² /3 weeks 4 cycles	-main: pCR -secondary: ORR -identification of predictive biomarkers of response	-pCR: 22% (6/28) including the 2 gBRCA1m -ORR: 64% (18/28) All cases were classified as basal-like according to the intrinsic classification. Factors associated with a good response to Cisplatin: young age (p = 0.001), low BRCA1 mRNA expression (p = 0.03), BRCA1 promoter methylation (p = 0.04), p53 inactivating mutation (p=0.01), E2F3 activation signature (p=0.03).
Yuan ²¹⁸ Phase II single arm	Unselected TNBC (Neo-adjuvant) 67 patients	II/III		Carboplatin AUC6/4 weeks 4 cycles + Nab-Paclitaxel 100 mg/m ² weekly 16 weeks	-main: pCR/RCB	-pCR (RCB0): 48% (32/67) -RCB1: 15% (10/67) -RCB2: 28% (19/67) -RCB3: 7% (5/67) -progression : 2% (1/67)
NeoSTOP/Sharma ²⁰³ Stage II	Unselected TNBC (Neo-adjuvant) 100 patients	I to III		Carboplatin AUC 6/3 weeks 4 cycles + Paclitaxel 80 mg/m ² weekly 12 weeks then Doxorubicin + Cyclophosphamide/2 weeks 4 cycles (CPDC) Vs Carboplatin AUC6/3 weeks + Taxotere (CT) 75mg/m ² /3 weeks 6 cycles	-main: pCR/RCB -secondary: Relapse Free Survival (RFS) and Overall survival (OS)	-pCR CPDC 54% (95% CI:40%-69%) vs CT 54% (95% CI: 40%-68%). -RCB 0+1: 67% in both arms. No difference in RFS and OS.
TBCRC031/Tung ²¹⁹ Phase II	Localized breast cancers with gBRCAm (70% triple-negative cancers) (Neo-adjuvant)	I to III		Cisplatin 75 mg/m ² /3 weeks 4 cycles vs Doxorubicin 60mg/m ² + Cyclophosphamide 600mg/m ² /2 to 3	-main: pCR -secondary: probability RCB0/1	-pCR Cisplatin 18% Vs pCR AC26% (RR: 0.70, 95% CI 0.39 – 1.2) -probability RCB0/1 Cisplatin 33% vs AC 46% (RR 0.73, 95% CI

	118 patients			weeks 4 cycles (AC)		0.50 – 1.1)
Byrsky ²²⁰ Phase II	Localized breast cancers with BRCA1m (76.6% triple-negative) (Neo-adjuvant) 107 patients	I to III		Cisplatin 75 mg/m ² /3 weeks 4 cycles	-main: pCR	-PCR: 61% (65/107)
WSG-ADAPT-TN/GIuz ²²¹ Phase II	Unselected TNBC (Neo-adjuvant) 336 patients	I to III		Nab-Paclitaxel 125 mg/m ² + Gemcitabine 1g/m ² D1 D8/3 weeks (NG) vs Nab-Paclitaxel 125mg/m ² + Carboplatin AUC2 D1 D8/3 weeks AUC2 (NC) 12 weeks	-main: pCR	-pCRNG 28.7%, 95% CI: 0.22 to 0.36 vs NC 45.9%, 95% CI: 0.38 to 0.54; P = 0.002
Brightness/Loibl ¹⁰¹ Phase III	Unselected TNBC (Neo-adjuvant) 634 patients	II/III		Paclitaxel (80 mg/m ² weekly for 12 weeks) + Carboplatin (AUC 6/3 weeks 4 cycles) + Veliparib (50 mg x2/day) (PCV) vs Paclitaxel (80 mg/m ² weekly 12 weeks) + Carboplatin (AUC 6/3 weeks 4 cycles) + placebo (PC) vs Paclitaxel (80 mg/m ² weekly for 12 weeks) alone (P) Followed by 4 cycles of Doxorubicin/Cyclophosphamide in the 3 arms	-main: pCR -secondary: RFS and OS	-pCR PCV vs P: 53% (168/316) vs 31% (49/158), p<0.0001 -pCR PCV vs PC: 53% (168/316) vs 58% (92/160), p = 0.36 -RFS: HR PCV vs P=0.63, 95% CI: 0.43-0.92, P=0.02 HR PCV vs PC = 1.12, 95% CI: 0.72-1.72, P = 0.62 -OS: no significant difference between the groups
KEYNOTE 522/Schmid Phase III	Unselected TNBC (Neo-adjuvant) 1174 patients	II/III		Carboplatin + Paclitaxel + PEMBRO /placebo 12 weeks followed by AC +PEMBRO/placebo 12 weeks.	-main: pCR, RFS -secondary: OS (non mature)	pCCR : 64,8% in the experimental arm vs 51,2 in the control arm (Delta = 13.6%, [95% CI, 5.4 to 21.8]; P<0.001) -15 months RFS: 92,6% vs 88,2% (hazard ratio, 0.63; 95% CI, 0.43 to 0.93)
Kaklamani ²⁰⁴ Phase II single arm	Unselected TNBC (Neo-adjuvant) 30 patients	I/III	A: HRD (Myriad) and/or BRCAm B: no HRD	Carboplatin AUC 6/3 weeks + Eribulin 1.4 mg/m ² D1-D8 4 cycles of 21 days	-main: pCR	-PCR: 43% (13/30) -PCR group A: 75% (9/12) -PCR group B: 14.2% (2/14)
TBCRC30/Mayer ⁸⁹ Phase II	Unselected TNBC (Neo-adjuvant) 48 patients	I to III	A: HRD (Myriad) or tBRCAm B: HRP	Cisplatin 75 mg/m ² /3 weeks (n=56) vs Paclitaxel 80mg/m ² weekly 12 weeks	-main: RCB0/1 vs RCB2/3	-RCB0/1 Cisplatin = 26.4% vs RCB0/1 Paclitaxel = 26.3% (ns) A: BCR0/1: 23% vs. 12%; OR 2.22 (95% CI: 0.39–23.68); ns B: BCR0/1: 29% vs. 31%; OR 0.90 (95% CI: 0.19–4.95); ns
CALGB40603/Sikov ²⁰² Phase III	Unselected TNBC (Neo-adjuvant) 443 patients	II/III		Paclitaxel 80 mg/m ² weekly 12 weeks vs Paclitaxel 80 mg/m ² weekly 12 weeks + Bevacizumab 10 mg/kg/2 weeks 9 cycles vs Paclitaxel 80 mg/m ² weekly 12 weeks + Carboplatin AUC6/3 weeks 4 cycles vs Paclitaxel 80 mg/m ² weekly 12 weeks + Carboplatin AUC6/3 weeks 4 cycles + Bevacizumab 10 mg/kg/2 weeks 9 cycles followed by Doxorubicin/Cyclophosphamide 4 cycles after the first 12 weeks of treatment in each arm	-main: pCR -secondary: RFS and OS	-pCR Carboplatin groups 54% vs other groups 41%; P.0029 -no significant differences in RFS and OS
GEPARSIXTO/Loibl ⁸⁷ Phase III	Unselected TNBC (Neo-adjuvant) 595 patients	II/III	2 subgroups A: HRD (Myriad) and/or tBRCAm B: HRP	Paclitaxel 80 mg/m ² weekly + Non-pegylated liposomal doxorubicin 20 mg/m ² weekly + Bevacizumab 15 mg/kg/3 weeks (n = 157) 18 weeks (PDB) vs same treatment + Carboplatin AUC 2 weekly 18 weeks (PDBC)	-main: pCR -secondary: RFS and OS	-pCR PDB: 36.9% (84/158) vs PCR PDBC: 53.2% (58/157), p=0.005. A: pCR 33.9% vs. 63.5%; GOLD 3.4 (95% CI: 1.7–6.9) B: pCR 20.0% vs. 29.6%; GOLD 1.7 (95% CI: 0.5–5.7) - improvement in RFS in the PDBC group (hazard ratio 0.56 (95% CI 0.34–0.93); P = 0.022). A: HR 0.49 (95% CI: 0.23–1.04); P = 0.059 B: HR 0.44 (95% CI: 0.17–1.17); P = 0.086) -no significant difference in OS
TBCRC048 /Tung ²¹² Stage II	Metastatic breast cancers with alterations of genes involved in homologous recombination (19% of triple-negative breast cancers) Pre-treatment with a maximum of 2 lines of chemotherapy in the metastatic phase, no previous treatment with PARPi or progression on platinum salts. 27 patients in each cohort	IV	- Cohort 1: ATM , ATR, BAP1, BARD1, BLM, BRIP1, CHEK1, CHEK2, CDK12, FANCA, FANCC, FANCD2, FANCF , MRE11A , NBN, PALB2, RAD50, RAD51C, RAD51D, Or WRN germline mutation -Cohort 2: somatic mutation in one of the same genes or BRCA1/2	Olaparib 300mg x 2/day	-main: ORR	-Cohort 1: ORR 33% (9/27); the 9 cases with gPALB2m ORR in the gPALB2m population: 82% (9/11) -Cohort 2: ORR 31% (8/26) ORR non BRCA1/2mutated population: 0% (0/10)
Gelmon ²¹¹ Phase II single arm	Metastatic TNBC or with BRCA1/2m (81% triple-negative) 26 patients	IV		Olaparib 400 mg x2/day	-main: ORR	-ORR : 0%

Kummar ²²² Stage II	TNBC not selected (2 nd metastatic line or more) 21 patients	IV		Cyclophosphamide 50 mg x1/day (n=18) Vs Cyclophosphamide 50 mg x1/day + Veliparib 60 mg/day	-main: ORR -secondary: progression-free survival (PFS)	-TRO Cyclophosphamide = 5.6% (1/18) vs TRO Cyclophosphamide + Veliparib = 9.5% (2/21), ns -PFS Cyclophosphamide = 1.9 months vs PFS Cyclophosphamide + Veliparib = 2.1 months, ns.
Byrsky ²⁰⁶ Phase II	Metastatic breast cancers with BRCA1m (70% triple-negative) Possibility of having received up to 4 lines of prior chemotherapy in the metastatic phase. 20 patients	IV		Cisplatin 75mg/m ² /3 weeks 6 cycles	-Main: ORR	-ORR : 80% (complete response 45% (9/20) and partial response 35% (7/20))
SWOG1416/Rodler ²⁰⁸ Stage II	Unselected metastatic TNBC. Possibility of having received 1 prior line of systemic treatment in the metastatic phase 335 patients	IV	3 subgroups: A: g BRCAm B: BRCA-like: sBRCAm, HRDscore (Myriad) > 42, BRCA1 promoter hypermethylation, germline mutation in HR genes other than BRCA1/2 C: non-BRCA-like	Cisplatin 75 mg/m ² /3 weeks (C) vs Cisplatin 75 mg/m ² /3 weeks + Veliparib 300 mgx2/day D1-D14 (VC)	-main: PFS	-PFS A: CV = 6.2 months (95% CI 2.3–9.2) vs C = 6.4 months (HR 0.79 [95% CI 0.38–1.67]; p=0.54) -PFS B: CV = 5.9 months (95% CI 2.3–9.2) vs C = 4.2 months (HR 0.57 [95% CI 0.37–0.88]; p=0.010) -PFS C: CV = 4.0 months (95% CI 2.3–9.2) vs C = 3.0 months (HR 0.89 [95% CI 0.60–1.33]; p=0.57)
Olympia AD/Robson ¹⁵ Phase III	HER2- gBRCA1/2m metastatic breast cancers (>49% triple negatives) (No more than 2 metastatic lines previously received) 302 patients	IV		Olaparib 300mg x2/day vs investigator's choice (Capecitabine, Eribulin, Vinorelbine) (CEV)	-main: PFS -secondary: ORR, OS	-PFS Olaparib 7.0 months vs CEV 4.2 months (HR 0.58, 95% CI 0.43 - 0.80; P<0.001) -ORR Olaparib 59.9% vs CEV 28.8% - OS Olaparib 19.3 months vs CEV 17.1 months (HR 0.90, 95% CI 0.66–1.23; P = 0.513)
EMBRACA/Litton ¹⁶ Phase III	gBRCA1/2m metastatic breast cancer (>40% triple negative) No more than 2 metastatic lines previously received) 431 patients	IV		Talazoparib 1 mg/day vs Investigator's Choice (Capecitabine, Eribulin, Vinorelbine, Gemcitabine) (CEVG)	-main: PFS -secondary OS	-PFS Talazoparib 8.6 months vs CEVG 5.6 months (HR 0.54; 95% CI, 0.41 to 0.71; P<0.001) - OS Talazoparib 19.3 months vs CEVG 19.5 months (HR 0.848; 95% CI, 0.67 to 1.07; P = 0.17)
BROCADE3/Dieras ²⁰⁹ Phase III	HER2- metastatic breast cancers (>47% triple negatives) (No more than 2 metastatic lines previously received) 513 patients	IV		Carboplatin (AUC 6) D1 + Paclitaxel (80 mg/m ² D1 D8 D15/ 3 weeks) + Veliparib (120 mg x2/day D-2 to 5) (CPV) Vs Carboplatin (AUC 6) D1 + Paclitaxel (80 mg/m ² D1 D8 D15/ 3 weeks) + placebo (CP)	-main: PFS -secondary: OS	-PFS CPV 14.5 months vs CP 12.6 months, HR = 0.71, 95% CI = 0.57 – 0.88, p = 0.0016 -OS CPV 33.5 months vs CP 28.2 months, HR = 0.95, 95% CI = 0.73 – 1.23, p = 0.67
TBCRC009/Isakoff ⁸⁴ Phase II single arm	Unselected TNBC (1st or 2 nd metastatic line) 43 patients in each subgroup	IV		Cisplatin (75 mg/m ²) or Carboplatin (AUC 6)/ 3 weeks	-main: ORR	- Overall ORR = 25.6% Cisplatin ORR = 32.6% Carboplatin ORR = 18.7% -HRD LOH/LST score was higher among BRCA1wt responders than among BRCA1wt non-responders (12.7 vs. 5.1; p = 0.032)
Yardley 2018 ²⁰⁷ Stage II	Unselected TNBC (1st metastatic line) 191 patients	IV		Nab-Paclitaxel 125 mg/m ² + Carboplatin AUC2 D1 D8/3 weeks (NC) vs Nab-Paclitaxel 125 mg/m ² + Gemcitabine 1g/m ² D1 D8/3 weeks (NG) vs Carboplatin AUC2 D1 D8 + Gemcitabine 1g/m ² D1 D8/3 weeks (CG)	-main: PFS -secondary: OS, ORR	-PFS: *NC 8.3 months vs PG 5.5 months, HR 0.59; 95% CI, 0.38–0.92; P = 0.02 *NC 8.3 months vs CG 6.0 months, HR 0.58; 95% CI, 0.37–0.90; P = 0.02 -OS : *NC 16.8 months vs PG12.1 months, HR 0.73; 95% CI, 0.47–1.13; P = 0.16 *NC 16.8 months vs CG 12.6 months; HR 0.80; 95% CI, 0.52–1.22; p = 0.29 -ORR: *NC: 73% *NG: 39% *CG: 44%
O'Shaugnessy ²¹⁰ Phase III	Unselected metastatic TNBC 519 patients	IV		Carboplatin AUC2 + Gemcitabine 1g/m ² D1 D8 (GC) vs same treatment + Iniparib 5.6 mg/kg D1 D4 D8 D11 (CGI)	-main: PFS and OS	No difference in OS (CG 11.1 vs CGI 11.8 months, HR 0.88; 95% CI, 0.69 to 1.12; P = 0.28) or PFS (CG 4.1 months vs CGI 5.1 months, HR 0.79; 95% CI, 0.65 to 0.98; P=0.27)
TBCSG006/Zhang ¹⁵⁰ Phase III	Unselected TNBC (1st metastatic line) 236 patients	IV	A: HRD group = ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK1, CHEK2, FANCA, FANCC, FANCD2, FANCF, FANCG, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, PALB2, PMS2, PTEN, RAD50, RAD51C, RAD51D, STK11 and TP53 germline mutation	Cisplatin 75 mg/m ² D1 + Gemcitabine 1250 mg/m ² D1-D8 (CG) vs Paclitaxel 175 mg/m ² D1 + Gemcitabine 1250 mg/m ² D-D8 (PG) every 3 weeks for a maximum of 8 cycles	-main: PFS -secondary: OS, ORR	*Overall population: -PFS: CG 7.73 months, 95% CI 6.46–9.00 vs PG 6.07 months, 95% CI 5.32–6.8; P = 0.005. -OS: no significant difference *Analysis in subgroups: -group A: better ORR and PFS in the CG arm than in the PG arm (71.9% vs 38.7%, P = 0.008; 10.37 vs 4.30 months, P = 0.011). -group B: better ORR and PFS in the CG arm than in the PG arm

			B: gBRCA1/2 m group C: HRD group without gBRCA1/2m D: HRP group			(83.3% vs. 37.5%, P=0.086; 8.90 vs 3.20 months, P = 0.0459). -group C: better ORR and PFS in the CG arm than in the PG arm (70.4% vs. 37.0%, P=0.014; 10.37 vs 3.53 months, P = 0.022). -group D: no difference in ORR and PFS.
TNT/Tutt ⁸⁶ Phase III	Unselected TNBC (1st metastatic line) 188 patients in each group	IV	A: gBRCAm (n=43) B: HRD Myriad (n=81) C: HRD Myriad or gBRCAm (n = 86)	Carboplatin AUC6/3 weeks vs Taxotere 100mg/m2/3 weeks 6 rounds	-main: ORR -secondary: PFS and OS	- Overall ORR: Carboplatin 31.4% (59/188) vs Taxotere 34.0% (64/188); P = 0.66 - cohort A ORR : Carboplatin 68% vs Taxotere 33%; P = 0.01 - cohort B ORR : Carboplatin 38.2% (13/34) vs Taxotere 40.4% (19/47); ns -cohort C ORR: Carboplatin 44.7% (17/38) vs Taxotere 39.6% (19/48); ns -PFS : Carboplatin 3.1 months (95% CI, 2.4–4.2), vs Taxotere 4.4 months (95% CI, 4.1–5.1), ns -OS: Carboplatin 12.8 months (95% CI, 10.6–15.3) vs Taxotere 12.0 months (95% CI, 10.2–13.0); ns

Table 3: Main studies reporting the sensitivity of triple-negative breast cancers to platinum salts and PARP inhibitors

References

1. Arnold, M. *et al.* Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. *The Breast* **66**, 15–23 (2022).
2. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–752 (2000).
3. Sørlie, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 10869–10874 (2001).
4. Sørlie, T. *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 8418–8423 (2003).
5. Jiang, Y.-Z. *et al.* Genomic and Transcriptomic Landscape of Triple-Negative Breast Cancers: Subtypes and Treatment Strategies. *Cancer Cell* **35**, 428–440.e5 (2019).
6. Lehmann, B. D. *et al.* Multi-omics analysis identifies therapeutic vulnerabilities in triple-negative breast cancer subtypes. *Nat. Commun.* **12**, 6276 (2021).
7. Farmer, H. *et al.* Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* **434**, 917–921 (2005).
8. Bryant, H. E. *et al.* Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. **434**, (2005).
9. de Bono, J. *et al.* Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* **382**, 2091–2102 (2020).
10. Golan, T. *et al.* Maintenance Olaparib for Germline *BRCA* -Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *N. Engl. J. Med.* **381**, 317–327 (2019).
11. Ray-Coquard, I. *et al.* Olaparib plus Bevacizumab as First-Line Maintenance in Ovarian Cancer. *N. Engl. J. Med.* **381**, 2416–2428 (2019).
12. Coleman, R. L. *et al.* Veliparib with First-Line Chemotherapy and as Maintenance Therapy in Ovarian Cancer. *N. Engl. J. Med.* **381**, 2403–2415 (2019).
13. González-Martín, A. *et al.* Niraparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *N. Engl. J. Med.* **381**, 2391–2402 (2019).
14. Tutt, A. N. J. *et al.* Adjuvant Olaparib for Patients with *BRCA1* - or *BRCA2* -Mutated Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **384**, 2394–2405 (2021).
15. Robson, M. *et al.* Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline *BRCA* Mutation. *N. Engl. J. Med.* **377**, 523–533 (2017).
16. Litton, J. K. *et al.* Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline *BRCA* Mutation. *N. Engl. J. Med.* **379**, 753–763 (2018).
17. Fan, C. & Weigelt, B. Concordance among Gene-Expression–Based Predictors for Breast Cancer. *N Engl J Med* (2006).
18. Banerjee, S. Basal-like breast carcinomas: clinical outcome and response to chemotherapy. *J. Clin. Pathol.* **59**, 729–735 (2006).
19. Carey, L. A. *et al.* The Triple Negative Paradox: Primary Tumor Chemosensitivity of Breast Cancer Subtypes. *Clin. Cancer Res.* **13**, 2329–2334 (2007).
20. Parker, J. S. *et al.* Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. *J. Clin. Oncol.* **27**, 1160–1167 (2009).
21. Nguyen, Q. H. *et al.* Profiling human breast epithelial cells using single cell RNA sequencing identifies cell diversity. *Nat. Commun.* **9**, 2028 (2018).
22. Tsuruta, D. *et al.* Laminin-332-Integrin Interaction: A Target For Cancer Therapy? *Curr. Med. Chem.* **15**, 1968–1975 (2008).
23. Wilhelmson, K., Litjens, S. H. M. & Sonnenberg, A. Multiple Functions of the Integrin $\alpha_6\beta_4$ in Epidermal Homeostasis and Tumorigenesis. *MOL CELL BIOL* **26**, (2006).
24. Stingl, J. *et al.* Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature* **439**, 993–997 (2006).

25. Lehmann, B. D. *et al.* Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J. Clin. Invest.* **121**, 2750–2767 (2011).
26. Masuda, H. *et al.* Differential Response to Neoadjuvant Chemotherapy Among 7 Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes. *Clin. Cancer Res.* **19**, 5533–5540 (2013).
27. Burstein, M. D. *et al.* Comprehensive Genomic Analysis Identifies Novel Subtypes and Targets of Triple-Negative Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* **21**, 1688–1698 (2015).
28. Lehmann, B. D. *et al.* Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PLOS ONE* **11**, e0157368 (2016).
29. Rouzier, R. *et al.* Breast Cancer Molecular Subtypes Respond Differently to Preoperative Chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* **11**, 5678–5685 (2005).
30. Nielsen, T. O. *et al.* Immunohistochemical and Clinical Characterization of the Basal-Like Subtype of Invasive Breast Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **10**, 5367–5374 (2004).
31. Cheang, M. C. U. *et al.* Basal-Like Breast Cancer Defined by Five Biomarkers Has Superior Prognostic Value than Triple-Negative Phenotype. *Clin. Cancer Res.* **14**, 1368–1376 (2008).
32. Livasy, C. A. *et al.* Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod. Pathol.* **19**, 264–271 (2006).
33. Liu, S. *et al.* BRCA1 regulates human mammary stem/progenitor cell fate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 1680–1685 (2008).
34. Lim *et al.* Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat. Med.* **15**, 907–913 (2009).
35. Molyneux, G. *et al.* BRCA1 Basal-like Breast Cancers Originate from Luminal Epithelial Progenitors and Not from Basal Stem Cells. *Cell Stem Cell* **7**, 403–417 (2010).
36. Choo, J. R. & Nielsen, T. O. Biomarkers for Basal-like Breast Cancer. *Cancers* **2**, 1040–1065 (2010).
37. Botti, G. *et al.* Morphological and pathological features of basal-like breast cancer. *Transl. Cancer Res.* **8**, S503–S509 (2019).
38. Fulford, L. G. *et al.* Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast: patterns of metastasis and long-term survival. *Breast Cancer Res.* **9**, R4 (2007).
39. Rodríguez-Pinilla, S. M. *et al.* Prognostic Significance of Basal-Like Phenotype and Fascin Expression in Node-Negative Invasive Breast Carcinomas. *Clin. Cancer Res.* **12**, 1533–1539 (2006).
40. Honeth, G. *et al.* The CD44+/CD24-phenotype is enriched in basal-like breast tumors. *Breast Cancer Res.* **10**, R53 (2008).
41. Marginean, F., Rakha, E. A., Ho, B. C., Ellis, I. O. & Lee, A. H. Histological features of medullary carcinoma and prognosis in triple-negative basal-like carcinomas of the breast. *Mod. Pathol.* **23**, 1357–1363 (2010).
42. Weigelt, B., Kreike, B. & Reis-Filho, J. S. Metaplastic breast carcinomas are basal-like breast cancers: a genomic profiling analysis. *Breast Cancer Res. Treat.* **117**, 273–280 (2009).
43. Chin, K. *et al.* Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiology. *Cancer Cell* **10**, 529–541 (2006).
44. Bergamaschi, A. *et al.* Distinct patterns of DNA copy number alteration are associated with different clinicopathological features and gene-expression subtypes of breast cancer. *Genes. Chromosomes Cancer* **45**, 1033–1040 (2006).
45. Adélaïde, J. *et al.* Integrated Profiling of Basal and Luminal Breast Cancers. *Cancer Res.* **67**, 11565–11575 (2007).
46. Natrajan, R. *et al.* Tiling Path Genomic Profiling of Grade 3 Invasive Ductal Breast Cancers. *Clin. Cancer Res.* **15**, 2711–2722 (2009).
47. Paul, A. The breast cancer susceptibility genes (BRCA) in breast and ovarian cancers. *Front. Biosci.* **19**, 605 (2014).
48. Takaoka, M. & Miki, Y. BRCA1 gene: function and deficiency. *Int. J. Clin. Oncol.* **23**, 36–44 (2018).

49. Furuta, S. *et al.* Depletion of BRCA1 impairs differentiation but enhances proliferation of mammary epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 9176–9181 (2005).
50. He, Z. *et al.* Pathogenic BRCA1 variants disrupt PLK1-regulation of mitotic spindle orientation. *Nat. Commun.* **13**, 2200 (2022).
51. Proia, T. A. *et al.* Genetic Predisposition Directs Breast Cancer Phenotype by Dictating Progenitor Cell Fate. *Cell Stem Cell* **8**, 149–163 (2011).
52. Martinez-Ruiz, H. *et al.* A TGFb–miR-182–BRCA1 axis controls the mammary differentiation hierarchy. *Sci. Signal.* (2016).
53. Wang, H. *et al.* BRCA1/FANCD2/BRG1-Driven DNA Repair Stabilizes the Differentiation State of Human Mammary Epithelial Cells. *Mol. Cell* **63**, 277–292 (2016).
54. Scully, R., Panday, A., Elango, R. & Willis, N. A. DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 698–714 (2019).
55. Turner, N. C. & Reis-Filho, J. S. Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. *Oncogene* **25**, 5846–5853 (2006).
56. Domagala, P., Huzarski, T., Lubinski, J., Gugala, K. & Domagala, W. Immunophenotypic predictive profiling of BRCA1-associated breast cancer. *Virchows Arch.* **458**, 55–64 (2011).
57. Tirkkonen, M. *et al.* Distinct somatic genetic changes associated with tumor progression in carriers of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutations. *Cancer Res.* **57**, 1222–1227 (1997).
58. Wessels, L. F. A. *et al.* Molecular classification of breast carcinomas by comparative genomic hybridization: a specific somatic genetic profile for BRCA1 tumors. *Cancer Res.* **62**, 7110–7117 (2002).
59. van Beers, E. H. *et al.* Comparative genomic hybridization profiles in human BRCA1 and BRCA2 breast tumors highlight differential sets of genomic aberrations. *Cancer Res.* **65**, 822–827 (2005).
60. Jönsson, G. *et al.* Distinct Genomic Profiles in Hereditary Breast Tumors Identified by Array-Based Comparative Genomic Hybridization. *Cancer Res.* **65**, 7612–7621 (2005).
61. Jooisse, S. A. *et al.* Prediction of BRCA1-association in hereditary non-BRCA1/2 breast carcinomas with array-CGH. *Breast Cancer Res. Treat.* **116**, 479–489 (2009).
62. Melchor, L. *et al.* Distinct genomic aberration patterns are found in familial breast cancer associated with different immunohistochemical subtypes. *Oncogene* **27**, 3165–3175 (2008).
63. Holstege, H. *et al.* BRCA1-mutated and basal-like breast cancers have similar aCGH profiles and a high incidence of protein truncating TP53 mutations. *BMC Cancer* **10**, 654 (2010).
64. Turner, N. C. *et al.* BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. *Oncogene* **26**, 2126–2132 (2007).
65. Jooisse, S. A. *et al.* Genomic signature of BRCA1 deficiency in sporadic basal-like breast tumors. *Genes. Chromosomes Cancer* **50**, 71–81 (2011).
66. Rakha, E. A. *et al.* Expression of BRCA1 protein in breast cancer and its prognostic significance. *Hum. Pathol.* **39**, 857–865 (2008).
67. Turner, N., Tutt, A. & Ashworth, A. Hallmarks of ‘BRCAness’ in sporadic cancers. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 814–819 (2004).
68. De Summa, S. *et al.* BRCAness: a deeper insight into basal-like breast tumors. *Ann. Oncol.* **24**, viii13–viii21 (2013).
69. Lord, C. J. & Ashworth, A. BRCAness revisited. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 110–120 (2016).
70. Lips, E. H. *et al.* Quantitative copy number analysis by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) of BRCA1-associated breast cancer regions identifies BRCAness. *Breast Cancer Res.* **13**, R107 (2011).
71. Popova, T. *et al.* Ploidy and Large-Scale Genomic Instability Consistently Identify Basal-like Breast Carcinomas with BRCA1/2 Inactivation. *Cancer Res.* **72**, 5454–5462 (2012).
72. Manié, E. *et al.* Genomic hallmarks of homologous recombination deficiency in invasive breast carcinomas: Genomic hallmarks of homologous recombination defect. *Int. J. Cancer* **138**, 891–900 (2016).

73. Goundiam, O. *et al.* Histo-genomic stratification reveals the frequent amplification/overexpression of CCNE1 and BRD4 genes in non-BRCAness high grade ovarian carcinoma. *Int. J. Cancer* **137**, 1890–1900 (2015).
74. Abkevich, V. *et al.* Patterns of genomic loss of heterozygosity predict homologous recombination repair defects in epithelial ovarian cancer. *Br. J. Cancer* **107**, 1776–1782 (2012).
75. Birkbak, N. J. *et al.* Telomeric Allelic Imbalance Indicates Defective DNA Repair and Sensitivity to DNA-Damaging Agents. *Cancer Discov.* **2**, 366–375 (2012).
76. Timms, K. M. *et al.* Association of BRCA1/2 defects with genomic scores predictive of DNA damage repair deficiency among breast cancer subtypes. *Breast Cancer Res.* **16**, 475 (2014).
77. Sztupinski, Z. *et al.* Migrating the SNP array-based homologous recombination deficiency measures to next generation sequencing data of breast cancer. *Npj Breast Cancer* **4**, 16 (2018).
78. Macintyre, G. *et al.* Copy number signatures and mutational processes in ovarian carcinoma. *Nat. Genet.* **50**, 1262–1270 (2018).
79. Eeckhoutte, A. *et al.* ShallowHRD: detection of homologous recombination deficiency from shallow whole genome sequencing. *Bioinformatics* **36**, 3888–3889 (2020).
80. Imanishi, S. *et al.* Clinicopathological analysis of homologous recombination-deficient breast cancers with special reference to response to neoadjuvant paclitaxel followed by FEC. *Breast Cancer Res. Treat.* **174**, 627–637 (2019).
81. Ter Brugge, P. *et al.* Homologous recombination deficiency derived from whole-genome sequencing predicts platinum response in triple-negative breast cancers. *Nat. Commun.* **14**, 1958 (2023).
82. Rakha, E. A., Reis-Filho, J. S. & Ellis, I. O. Basal-Like Breast Cancer: A Critical Review. *J. Clin. Oncol.* **26**, 2568–2581 (2008).
83. Bertucci, F. *et al.* How basal are triple-negative breast cancers? *Int. J. Cancer* **123**, 236–240 (2008).
84. Isakoff, S. J. *et al.* TBCRC009: A Multicenter Phase II Clinical Trial of Platinum Monotherapy With Biomarker Assessment in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* **33**, 1902–1909 (2015).
85. Telli, M. L. *et al.* Phase II Study of Gemcitabine, Carboplatin, and Iniparib As Neoadjuvant Therapy for Triple-Negative and BRCA1 / 2 Mutation–Associated Breast Cancer With Assessment of a Tumor-Based Measure of Genomic Instability: PrECOG 0105. *J. Clin. Oncol.* **33**, 1895–1901 (2015).
86. Tutt, A. *et al.* Carboplatin in BRCA1/2-mutated and triple-negative breast cancer BRCAness subgroups: the TNT Trial. *Nat. Med.* **24**, 628–637 (2018).
87. Loibl, S. *et al.* Survival analysis of carboplatin added to an anthracycline/taxane-based neoadjuvant chemotherapy and HRD score as predictor of response—final results from GeparSixto. *Ann. Oncol.* **29**, 2341–2347 (2018).
88. Sharma, P. *et al.* Impact of homologous recombination deficiency biomarkers on outcomes in patients with triple-negative breast cancer treated with adjuvant doxorubicin and cyclophosphamide (SWOG S9313). *Ann. Oncol.* **29**, 654–660 (2018).
89. Mayer, E. L. *et al.* TBCRC 030: a phase II study of preoperative cisplatin versus paclitaxel in triple-negative breast cancer: evaluating the homologous recombination deficiency (HRD) biomarker. *Ann. Oncol.* **31**, 1518–1525 (2020).
90. Tutt, A. Mutation in Brca2 stimulates error-prone homology-directed repair of DNA double-strand breaks occurring between repeated sequences. *EMBO J.* **20**, 4704–4716 (2001).
91. Xia, F. *et al.* Deficiency of human BRCA2 leads to impaired homologous recombination but maintains normal nonhomologous end joining. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 8644–8649 (2001).
92. Moynahan, M. E., Pierce, A. J. & Jasin, M. BRCA2 Is Required for Homology-Directed Repair of Chromosomal Breaks. *Mol. Cell* **7**, 263–272 (2001).

93. Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative *et al.* Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* **500**, 415–421 (2013).
94. Nik-Zainal, S. *et al.* Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature* **534**, 47–54 (2016).
95. Polak, P. *et al.* A mutational signature reveals alterations underlying deficient homologous recombination repair in breast cancer. *Nat. Genet.* **49**, 1476–1486 (2017).
96. Davies, H. *et al.* HRDetect is a predictor of BRCA1 and BRCA2 deficiency based on mutational signatures. *Nat. Med.* **23**, 517–525 (2017).
97. Nguyen, L., W. M. Martens, J., Van Hoeck, A. & Cuppen, E. Pan-cancer landscape of homologous recombination deficiency. *Nat. Commun.* **11**, 5584 (2020).
98. Gulhan, D. C., Lee, J. J.-K., Melloni, G. E. M., Cortés-Ciriano, I. & Park, P. J. Detecting the mutational signature of homologous recombination deficiency in clinical samples. *Nat. Genet.* **51**, 912–919 (2019).
99. Chopra, N. *et al.* Homologous recombination DNA repair deficiency and PARP inhibition activity in primary triple negative breast cancer. *Nat. Commun.* **11**, 2662 (2020).
100. Staaf, J. *et al.* Whole-genome sequencing of triple-negative breast cancers in a population-based clinical study. *Nat. Med.* **25**, 1526–1533 (2019).
101. Lehmann, B. D. *et al.* Multi-omics analysis identifies therapeutic vulnerabilities in triple-negative breast cancer subtypes. *Nat. Commun.* **12**, 6276 (2021).
102. Walens, A. *et al.* RNA-Based Classification of Homologous Recombination Deficiency in Racially Diverse Patients with Breast Cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **31**, 2136–2147 (2022).
103. Konstantinopoulos, P. A. *et al.* Gene Expression Profile of BRCA1/BRCA2 Mutation Carriers That Correlates With Responsiveness to Chemotherapy and With Outcome in Patients With Epithelial Ovarian Cancer. *J. Clin. Oncol.* **28**, 3555–3561 (2010).
104. Larsen, M. J. *et al.* Classifications within Molecular Subtypes Enables Identification of BRCA1/BRCA2 Mutation Carriers by RNA Tumor Profiling. *PLoS ONE* **8**, e64268 (2013).
105. Peng, G. *et al.* Genome-wide transcriptome profiling of homologous recombination DNA repair. *Nat. Commun.* **5**, 3361 (2014).
106. Daemen, A. *et al.* Cross-platform pathway-based analysis identifies markers of response to the PARP inhibitor olaparib. *Breast Cancer Res. Treat.* **135**, 505–517 (2012).
107. Severson, T. M. *et al.* The BRCA1/BRCA2 mutation signature is associated significantly with response to PARP inhibitor treatment versus control in the I-SPY 2 randomized neoadjuvant setting. *Breast Cancer Res.* **19**, 99 (2017).
108. Watkins, J. A., Irshad, S., Grigoriadis, A. & Tutt, A. N. Genomic scars as biomarkers of homologous recombination deficiency and drug response in breast and ovarian cancers. *Breast Cancer Res.* **16**, 211 (2014).
109. Asakawa, H. *et al.* Prediction of breast cancer sensitivity to neoadjuvant chemotherapy based on status of DNA damage repair proteins. *Breast Cancer Res.* **12**, R17 (2010).
110. Graeser, M. *et al.* A Marker of Homologous Recombination Predicts Pathologic Complete Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Primary Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* **16**, 6159–6168 (2010).
111. Eikesdal, H. P. *et al.* Olaparib monotherapy as primary treatment in unselected triple negative breast cancer. *Ann. Oncol.* **32**, 240–249 (2021).
112. Willers, H. *et al.* Utility of DNA Repair Protein Foci for the Detection of Putative BRCA1 Pathway Defects in Breast Cancer Biopsies. *Mol. Cancer Res.* **7**, 1304–1309 (2009).
113. Mutter, R. W. *et al.* Bi-allelic alterations in DNA repair genes underpin homologous recombination DNA repair defects in breast cancer: Homologous recombination defective breast cancers. *J. Pathol.* **242**, 165–177 (2017).
114. McCabe, N. *et al.* Deficiency in the Repair of DNA Damage by Homologous Recombination and Sensitivity to Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibition. *Cancer Res.* **66**, 8109–8115 (2006).

115. Naipal, K. A. T. *et al.* Functional *Ex Vivo* Assay to Select Homologous Recombination–Deficient Breast Tumors for PARP Inhibitor Treatment. *Clin. Cancer Res.* **20**, 4816–4826 (2014).
116. Meijer, T. G. *et al.* Functional *Ex Vivo* Assay Reveals Homologous Recombination Deficiency in Breast Cancer Beyond BRCA Gene Defects. *Clin. Cancer Res.* **24**, 6277–6287 (2018).
117. Castroviejo-Bermejo, M. *et al.* A RAD 51 assay feasible in routine tumor samples calls PARP inhibitor response beyond BRCA mutation. *EMBO Mol. Med.* **10**, (2018).
118. Cruz, C. *et al.* RAD51 foci as a functional biomarker of homologous recombination repair and PARP inhibitor resistance in germline BRCA-mutated breast cancer. *Ann. Oncol.* **29**, 1203–1210 (2018).
119. Hill, S. J., Clark, A. P., Silver, D. P. & Livingston, D. M. BRCA1 Pathway Function in Basal-Like Breast Cancer Cells. *Mol. Cell. Biol.* **34**, 3828–3842 (2014).
120. Bodily, W. R. *et al.* Effects of germline and somatic events in candidate BRCA-like genes on breast-tumor signatures. *PLOS ONE* **15**, e0239197 (2020).
121. Cousineau, I. & Belmaaza, A. BRCA1 Haploinsufficiency, but not Heterozygosity for a BRCA1-truncating Mutation, Deregulates Homologous Recombination. *Cell Cycle* **6**, 962–971 (2007).
122. Rennstam, K. *et al.* Genomic alterations in histopathologically normal breast tissue from *BRCA1* mutation carriers may be caused by BRCA1 haploinsufficiency. *Genes. Chromosomes Cancer* **49**, 78–90 (2010).
123. Konishi, H. *et al.* Mutation of a single allele of the cancer susceptibility gene *BRCA1* leads to genomic instability in human breast epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 17773–17778 (2011).
124. Sedic, M. *et al.* Haploinsufficiency for BRCA1 leads to cell-type-specific genomic instability and premature senescence. *Nat. Commun.* **6**, 7505 (2015).
125. Hartman, A.-R. *et al.* Prevalence of BRCA mutations in an unselected population of triple-negative breast cancer. *Cancer* **118**, 2787–2795 (2012).
126. Peshkin, B. N., Alabek, M. L. & Isaacs, C. BRCA1/2 mutations and triple negative breast cancers. *Breast Dis.* **32**, 25–33 (2011).
127. Gonzalez-Angulo, A. M. *et al.* Incidence and Outcome of *BRCA* Mutations in Unselected Patients with Triple Receptor-Negative Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* **17**, 1082–1089 (2011).
128. Janatova, M., Zikan, M., Dunder, P., Matous, B. & Pohlreich, P. Novel somatic mutations in the BRCA1 gene in sporadic breast tumors. *Hum. Mutat.* **25**, 319–319 (2005).
129. Couch, F. J. *et al.* Inherited Mutations in 17 Breast Cancer Susceptibility Genes Among a Large Triple-Negative Breast Cancer Cohort Unselected for Family History of Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* **33**, 304–311 (2015).
130. Brianese, R. C. *et al.* BRCA1 deficiency is a recurrent event in early-onset triple-negative breast cancer: a comprehensive analysis of germline mutations and somatic promoter methylation. *Breast Cancer Res. Treat.* **167**, 803–814 (2018).
131. on behalf of the German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer (GC-HBOC) *et al.* Prevalence of pathogenic BRCA1/2 germline mutations among 802 women with unilateral triple-negative breast cancer without family cancer history. *BMC Cancer* **18**, 265 (2018).
132. Ma, D. *et al.* Molecular Features and Functional Implications of Germline Variants in Triple-Negative Breast Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **113**, 884–892 (2021).
133. Shimelis, H. *et al.* Triple-Negative Breast Cancer Risk Genes Identified by Multigene Hereditary Cancer Panel Testing. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **110**, 855–862 (2018).
134. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **490**, 61–70 (2012).
135. Tischkowitz, M. & Xia, B. PALB2/FANCN: Recombining Cancer and Fanconi Anemia. *Cancer Res.* **70**, 7353–7359 (2010).
136. Easton, D. F. *et al.* Gene-Panel Sequencing and the Prediction of Breast-Cancer Risk. *N. Engl. J. Med.* **372**, 2243–2257 (2015).

137. The Breast Cancer Susceptibility Collaboration (UK) *et al.* PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nat. Genet.* **39**, 165–167 (2007).
138. Tischkowitz, M. *et al.* Analysis of PALB2 / FANCN -associated breast cancer families. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 6788–6793 (2007).
139. Foulkes, W. D. *et al.* Identification of a novel truncating PALB2 mutation and analysis of its contribution to early-onset breast cancer in French-Canadian women. *Breast Cancer Res.* **9**, R83 (2007).
140. Erkkö, H. *et al.* A recurrent mutation in PALB2 in Finnish cancer families. *Nature* **446**, 316–319 (2007).
141. Cao, A.-Y. *et al.* The prevalence of PALB2 germline mutations in BRCA1/BRCA2 negative Chinese women with early onset breast cancer or affected relatives. *Breast Cancer Res. Treat.* **114**, 457–462 (2009).
142. Papi, L. *et al.* A PALB2 germline mutation associated with hereditary breast cancer in Italy. *Fam. Cancer* **9**, 181–185 (2010).
143. Sluiter, M., Mew, S. & van Rensburg, E. J. PALB2 sequence variants in young South African breast cancer patients. *Fam. Cancer* **8**, 347–353 (2009).
144. García, M. J. *et al.* Analysis of FANCB and FANCN/PALB2 Fanconi Anemia genes in BRCA1/2-negative Spanish breast cancer families. *Breast Cancer Res. Treat.* **113**, 545–551 (2009).
145. Heikkinen, T. *et al.* The Breast Cancer Susceptibility Mutation PALB2 1592delT Is Associated with an Aggressive Tumor Phenotype. *Clin. Cancer Res.* **15**, 3214–3222 (2009).
146. Dansonka-Mieszkowska, A. *et al.* A novel germline PALB2 deletion in Polish breast and ovarian cancer patients. *BMC Med. Genet.* **11**, 20 (2010).
147. Antoniou, A. C. *et al.* Breast-Cancer Risk in Families with Mutations in PALB2. *N. Engl. J. Med.* **371**, 497–506 (2014).
148. Thompson, E. R. *et al.* Panel Testing for Familial Breast Cancer: Calibrating the Tension Between Research and Clinical Care. *J. Clin. Oncol.* **34**, 1455–1459 (2016).
149. Southey, M. C. *et al.* PALB2 , CHEK2 and ATM rare variants and cancer risk: data from COGS. *J. Med. Genet.* **53**, 800–811 (2016).
150. Zhang, J. *et al.* Biomarker assessment of the CBCSG006 trial: a randomized phase III trial of cisplatin plus gemcitabine compared with paclitaxel plus gemcitabine as first-line therapy for patients with metastatic triple-negative breast cancer. *Ann. Oncol.* **29**, 1741–1747 (2018).
151. Sabatier, R. *et al.* BARD1 homozygous deletion, a possible alternative to BRCA1 mutation in basal breast cancer. *Genes. Chromosomes Cancer* **49**, 1143–1151 (2010).
152. Mendes-Pereira, A. M. *et al.* Synthetic lethal targeting of PTEN mutant cells with PARP inhibitors. *EMBO Mol. Med.* **1**, 315–322 (2009).
153. Saal, L. H. *et al.* Recurrent gross mutations of the PTEN tumor suppressor gene in breast cancers with deficient DSB repair. *Nat. Genet.* **40**, 102–107 (2008).
154. Cerami, E. *et al.* The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data. *Cancer Discov.* **2**, 401–404 (2012).
155. Watanabe, Y. *et al.* Aberrant DNA methylation status of DNA repair genes in breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Genes Cells* **18**, 1120–1130 (2013).
156. Esteller, M. Promoter Hypermethylation and BRCA1 Inactivation in Sporadic Breast and Ovarian Tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 564–569 (2000).
157. Chen, Y. *et al.* BRCA1 promoter methylation associated with poor survival in Chinese patients with sporadic breast cancer. *Cancer Sci.* **100**, 1663–1667 (2009).
158. Lips, E. H. *et al.* Indicators of homologous recombination deficiency in breast cancer and association with response to neoadjuvant chemotherapy. *Ann. Oncol.* **22**, 870–876 (2011).
159. Catteau, A., Harris, W. H., Xu, C.-F. & Solomon, E. Methylation of the BRCA1 promoter region in sporadic breast and ovarian cancer: correlation with disease characteristics. *Oncogene* **18**, 1957–1965 (1999).

160. Yamashita, N. *et al.* Epigenetic Inactivation of BRCA1 Through Promoter Hypermethylation and Its Clinical Importance in Triple-Negative Breast Cancer. *Clin. Breast Cancer* **15**, 498–504 (2015).
161. Tian, T., Shan, L., Yang, W., Zhou, X. & Shui, R. Evaluation of the BRCAness phenotype and its correlations with clinicopathological features in triple-negative breast cancers. *Hum. Pathol.* **84**, 231–238 (2019).
162. Matros, E. *et al.* BRCA1 promoter methylation in sporadic breast tumors: relationship to gene expression profiles. *Breast Cancer Res. Treat.* **91**, 179–186 (2005).
163. Bal, A. *et al.* BRCA1-methylated sporadic breast cancers are BRCA-like in showing a basal phenotype and absence of ER expression. *Virchows Arch.* **461**, 305–312 (2012).
164. Ruzinova, M. B. & Benezra, R. Id proteins in development, cell cycle and cancer. *Trends Cell Biol.* **13**, 410–418 (2003).
165. Beger, C. *et al.* Identification of *Id4* as a regulator of *BRCA1* expression by using a ribozyme-library-based inverse genomics approach. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 130–135 (2001).
166. Roldán, G., Delgado, L. & Musé, I. M. Tumoral expression of BRCA1, Estrogen receptor alpha and ID4 protein in patients with sporadic breast cancer. *Cancer Biol. Ther.* **5**, 505–510 (2006).
167. Branham, M. T. *et al.* Epigenetic regulation of ID4 in the determination of the BRCAness phenotype in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **155**, 13–23 (2016).
168. Wen, Y. H. *et al.* Id4 protein is highly expressed in triple-negative breast carcinomas: possible implications for BRCA1 downregulation. *Breast Cancer Res. Treat.* **135**, 93–102 (2012).
169. Thike, A. A., Tan, P. H., Ikeda, M. & Iqbal, J. Increased ID4 expression, accompanied by mutant p53 accumulation and loss of BRCA1/2 proteins in triple-negative breast cancer, adversely affects survival. *Histopathology* **68**, 702–712 (2016).
170. Junankar, S. *et al.* ID4 controls mammary stem cells and marks breast cancers with a stem cell-like phenotype. *Nat. Commun.* **6**, 6548 (2015).
171. Baker, L. A. *et al.* Proteogenomic analysis of Inhibitor of Differentiation 4 (ID4) in basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res.* **22**, 63 (2020).
172. Mekonnen, N., Yang, H. & Shin, Y. K. Homologous Recombination Deficiency in Ovarian, Breast, Colorectal, Pancreatic, Non-Small Cell Lung and Prostate Cancers, and the Mechanisms of Resistance to PARP Inhibitors. *Front. Oncol.* **12**, 880643 (2022).
173. Wei, M. *et al.* Estrogen receptor α , BRCA1, and FANCF promoter methylation occur in distinct subsets of sporadic breast cancers. *Breast Cancer Res. Treat.* **111**, 113–120 (2008).
174. Hughes-Davies, L. *et al.* EMSY Links the BRCA2 Pathway to Sporadic Breast and Ovarian Cancer. *Cell* **115**, 523–535 (2003).
175. Bane, A. L., Mulligan, A. M., Pinnaduwege, D., O'Malley, F. P. & Andrulis, I. L. EMSY and CCND1 amplification in familial breast cancer: from the Ontario site of the Breast Cancer Family Registry. *Breast Cancer Res. Treat.* **127**, 831–839 (2011).
176. Rodriguez, C. *et al.* Amplification of the BRCA2 Pathway Gene *EMSY* in Sporadic Breast Cancer Is Related to Negative Outcome. *Clin. Cancer Res.* **10**, 5785–5791 (2004).
177. Lips, E. H. *et al.* Indicators of homologous recombination deficiency in breast cancer and association with response to neoadjuvant chemotherapy. *Ann. Oncol.* **22**, 870–876 (2011).
178. Cousineau, I. & Belmaaza, A. EMSY overexpression disrupts the BRCA2/RAD51 pathway in the DNA-damage response: implications for chromosomal instability/recombination syndromes as checkpoint diseases. *Mol. Genet. Genomics* **285**, 325–340 (2011).
179. Holm, K. *et al.* Characterisation of amplification patterns and target genes at chromosome 11q13 in CCND1-amplified sporadic and familial breast tumours. *Breast Cancer Res. Treat.* **133**, 583–594 (2012).
180. Madjd, Z. *et al.* Expression of EMSY, a Novel BRCA2-link Protein, is Associated with Lymph Node Metastasis and Increased Tumor Size in Breast Carcinomas. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **15**, 1783–1789 (2014).
181. Navazio, A. S. *et al.* EMSY copy number variation in male breast cancers characterized for BRCA1 and BRCA2 mutations. *Breast Cancer Res. Treat.* **160**, 181–186 (2016).

182. Grier, D. *et al.* The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. *J. Pathol.* **205**, 154–171 (2005).
183. Gilbert, P. M. *et al.* HOXA9 regulates BRCA1 expression to modulate human breast tumor phenotype. *J. Clin. Invest.* **120**, 1535–1550 (2010).
184. Baldassarre, G. *et al.* Negative Regulation of BRCA1 Gene Expression by HMGA1 Proteins Accounts for the Reduced BRCA1 Protein Levels in Sporadic Breast Carcinoma. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 2225–2238 (2003).
185. Garcia, A. I. *et al.* Down-regulation of BRCA1 expression by miR-146a and miR-146b-5p in triple negative sporadic breast cancers. *EMBO Mol. Med.* **3**, 279–290 (2011).
186. Fkih M’hamed, I. *et al.* Identification of miR-10b, miR-26a, miR-146a and miR-153 as potential triple-negative breast cancer biomarkers. *Cell. Oncol.* **38**, 433–442 (2015).
187. Shen, J. *et al.* A functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis. *Carcinogenesis* **29**, 1963–1966 (2008).
188. Pastrello, C., Polesel, J., Della Puppa, L., Viel, A. & Maestro, R. Association between hsa-mir-146a genotype and tumor age-of-onset in BRCA1/BRCA2-negative familial breast and ovarian cancer patients. *Carcinogenesis* **31**, 2124–2126 (2010).
189. Moskwa, P. *et al.* miR-182-Mediated Downregulation of BRCA1 Impacts DNA Repair and Sensitivity to PARP Inhibitors. *Mol. Cell* **41**, 210–220 (2011).
190. Yao, E. & Ventura, A. A New Role for miR-182 in DNA Repair. *Mol. Cell* **41**, 135–137 (2011).
191. Shen, J., Ambrosone, C. B. & Zhao, H. Novel genetic variants in microRNA genes and familial breast cancer. *Int. J. Cancer* **124**, 1178–1182 (2009).
192. De Summa, S. *et al.* Expression of base excision repair key factors and miR17 in familial and sporadic breast cancer. *Cell Death Dis.* **5**, e1076–e1076 (2014).
193. Tan, X. *et al.* miR-638 mediated regulation of BRCA1 affects DNA repair and sensitivity to UV and cisplatin in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* **16**, 435 (2014).
194. Quann, K., Jing, Y. & Rigoutsos, I. Post-transcriptional regulation of BRCA1 through its coding sequence by the miR-15/107 group of miRNAs. *Front. Genet.* **6**, (2015).
195. Li, D. *et al.* Analysis of MiR-195 and MiR-497 Expression, Regulation and Role in Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* **17**, 1722–1730 (2011).
196. Song, L. *et al.* Up-regulation of miR-1245 by c-myc targets BRCA2 and impairs DNA repair. *J. Mol. Cell Biol.* **4**, 108–117 (2012).
197. Carey, L. A. *et al.* Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study.
198. Millikan, R. C. *et al.* Epidemiology of basal-like breast cancer. (2008).
199. Liu, L. *et al.* TGF β Induces “BRCAness” and Sensitivity to PARP Inhibition in Breast Cancer by Regulating DNA-Repair Genes. *Mol. Cancer Res.* **12**, 1597–1609 (2014).
200. Pal, D. *et al.* TGF- β reduces DNA ds-break repair mechanisms to heighten genetic diversity and adaptability of CD44+/CD24- cancer cells. *eLife* **6**, e21615 (2017).
201. Loibl, S. *et al.* Addition of the PARP inhibitor veliparib plus carboplatin or carboplatin alone to standard neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer (BrighTNess): a randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **19**, 497–509 (2018).
202. Sikov, W. M. *et al.* Impact of the Addition of Carboplatin and/or Bevacizumab to Neoadjuvant Once-per-Week Paclitaxel Followed by Dose-Dense Doxorubicin and Cyclophosphamide on Pathologic Complete Response Rates in Stage II to III Triple-Negative Breast Cancer: CALGB 40603 (Alliance). *J. Clin. Oncol.* **33**, 13–21 (2015).
203. Sharma, P. *et al.* Randomized Phase II Trial of Anthracycline-free and Anthracycline-containing Neoadjuvant Carboplatin Chemotherapy Regimens in Stage I–III Triple-negative Breast Cancer (NeoSTOP). *Clin. Cancer Res.* **27**, 975–982 (2021).
204. Kaklamani, V. G. *et al.* Phase II neoadjuvant clinical trial of carboplatin and eribulin in women with triple negative early-stage breast cancer (NCT01372579). *Breast Cancer Res. Treat.* **151**, 629–638 (2015).

205. Litton, J. K. *et al.* Neoadjuvant Talazoparib for Patients With Operable Breast Cancer With a Germline *BRCA* Pathogenic Variant. *J. Clin. Oncol.* **38**, 388–394 (2020).
206. Byrski, T. *et al.* Results of a phase II open-label, non-randomized trial of cisplatin chemotherapy in patients with *BRCA1*-positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res.* **14**, R110 (2012).
207. Yardley, D. A. *et al.* nab-Paclitaxel plus carboplatin or gemcitabine versus gemcitabine plus carboplatin as first-line treatment of patients with triple-negative metastatic breast cancer: results from the tnAcity trial. *Ann. Oncol.* **29**, 1763–1770 (2018).
208. Rodler, E. *et al.* Cisplatin with veliparib or placebo in metastatic triple-negative breast cancer and *BRCA* mutation-associated breast cancer (S1416): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* **24**, 162–174 (2023).
209. Diéras, V. *et al.* Veliparib with carboplatin and paclitaxel in *BRCA*-mutated advanced breast cancer (BROCADE3): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **21**, 1269–1282 (2020).
210. O’Shaughnessy, J. *et al.* Phase III Study of Iniparib Plus Gemcitabine and Carboplatin Versus Gemcitabine and Carboplatin in Patients With Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* **32**, 3840–3847 (2014).
211. Gelmon, K. A. *et al.* Olaparib in patients with recurrent high-grade serous or poorly differentiated ovarian carcinoma or triple-negative breast cancer: a phase 2, multicentre, open-label, non-randomised study. *Lancet Oncol.* **12**, 852–861 (2011).
212. Tung, N. M. *et al.* TBCRC 048: Phase II Study of Olaparib for Metastatic Breast Cancer and Mutations in Homologous Recombination-Related Genes. *J. Clin. Oncol.* **38**, 4274–4282 (2020).
213. Llombart-Cussac, A. *et al.* SOLTI NeoPARP: a phase II randomized study of two schedules of iniparib plus paclitaxel versus paclitaxel alone as neoadjuvant therapy in patients with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **154**, 351–357 (2015).
214. Fasching, P. A. *et al.* Neoadjuvant paclitaxel/olaparib in comparison to paclitaxel/carboplatinum in patients with *HER2*-negative breast cancer and homologous recombination deficiency (GeparOLA study). *Ann. Oncol.* **32**, 49–57 (2021).
215. Fontaine, C. *et al.* Weekly carboplatin plus neoadjuvant anthracycline-taxane-based regimen in early triple-negative breast cancer: a prospective phase II trial by the Breast Cancer Task Force of the Belgian Society of Medical Oncology (BSMO). *Breast Cancer Res. Treat.* **176**, 607–615 (2019).
216. Rugo, H. S. *et al.* Adaptive Randomization of Veliparib–Carboplatin Treatment in Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **375**, 23–34 (2016).
217. Silver, D. P. *et al.* Efficacy of Neoadjuvant Cisplatin in Triple-Negative Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* **28**, 1145–1153 (2010).
218. Yuan, Y. *et al.* Phase II Trial of Neoadjuvant Carboplatin and Nab-Paclitaxel in Patients with Triple-Negative Breast Cancer. *The Oncologist* **26**, e382–e393 (2021).
219. Tung, N. *et al.* TBCRC 031: Randomized Phase II Study of Neoadjuvant Cisplatin Versus Doxorubicin-Cyclophosphamide in Germline *BRCA* Carriers With *HER2*-Negative Breast Cancer (the INFORM trial). *J. Clin. Oncol.* **38**, 1539–1548 (2020).
220. Byrski, T. *et al.* Pathologic complete response to neoadjuvant cisplatin in *BRCA1*-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **147**, 401–405 (2014).
221. Gluz, O. *et al.* De-escalated Neoadjuvant Chemotherapy in Early Triple-Negative Breast Cancer (TNBC): Impact of Molecular Markers and Final Survival Analysis of the WSG-ADAPT-TN Trial. *Clin. Cancer Res.* **28**, 4995–5003 (2022).
222. Kummar, S. *et al.* Randomized phase II trial of cyclophosphamide and the oral poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor veliparib in patients with recurrent, advanced triple-negative breast cancer. *Invest. New Drugs* **34**, 355–363 (2016).

Breast implant-associated squamous cell carcinoma: clinical, pathological and molecular analysis of 2 cases

Simon AHO, Isabelle TREILLEUX, Adrien BUISSON, Daniel PISSALOUX, Olivier TREDAN, Paul FROBERT, Emmanuel DELAY

Abstract : Breast implant-associated squamous cell carcinoma is an extremely rare entity, but its incidence seems to have increased in recent years. The disease has a poor prognosis due to local aggressiveness, potential for metastatic spread and frequent chemoresistance. Moreover, little is known about its origins. In this article, we review 2 cases treated in our center, reporting their clinical features, the various treatments used and their efficacy, as well as anatomopathological and molecular data, with the aim of improving fundamental knowledge and identifying potential therapeutic targets.

Introduction

Recently, the American Society of Plastic Surgeons (ASPS)¹ and the US Food and Drug Administration (FDA)², published an alert regarding breast implant-associated squamous cell carcinomas (BIA-SCC). Indeed, the incidence of this extremely rare entity (20 cases reported worldwide since 1992, cumulative risk 1:164,884, 95% CI 0.2:100,000 to 5.6:100,000³) has risen significantly in recent years (9 of the 20 cases have been published between 2021 and the present day), justifying the publication of these alerts.

The pathophysiology of the different reported cases is unclear, but BIA-SCC seem to develop at the expense of certain cells in the periprosthetic capsule. The capsule is a well-described structure at the interface between the implant and the surrounding breast tissue. It corresponds to a physiological immunological response of the mammary gland in reaction to the introduction of a foreign body. The structure of this capsule varies according to the type of implant used. Nevertheless, a multi-layered architecture common to the different capsules can be described (**Figure 1**).

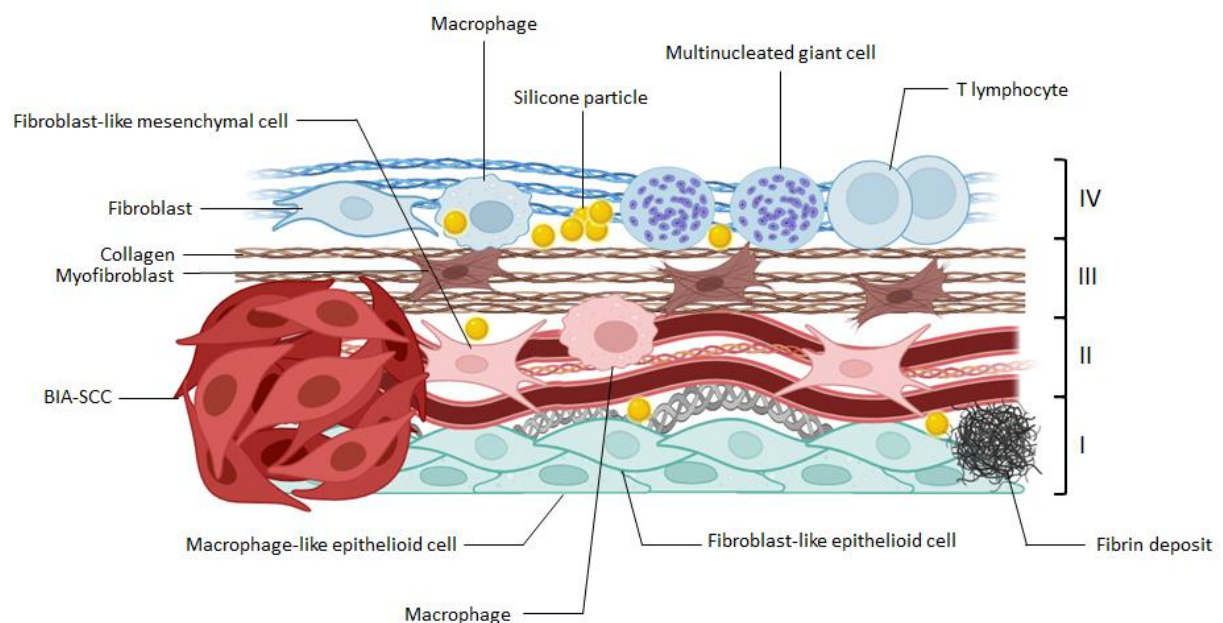


Figure 1 Schematic representation of the multi-layered architecture of the periprosthetic capsule

The inner layer is located directly in contact with the implant and interfaces with the overlying layers. It is made up of a cellular contingent and an extra-cellular fibrillar matrix network. The cellular contingent is composed of juxtaposed epithelioid cells. These cells can display 2 phenotypes under electron microscopy: a macrophage-like phenotype and a fibroblast-like phenotype⁴. The matrix contingent is organized in a network of reticulated collagen fibrils running roughly parallel to the implant's inner surface⁵. Silicone-like

amorphous material from the implant may also be found in this layer. Fibrin deposits can also be observed⁴. The overlying layer is made up of blood vessels, close to which are fibroblast-like mesenchymal cells and macrophages⁴. The third layer is essentially made up of collagen fibers, also organized parallel to the implant surface⁴. Embedded in this collagen network are myofibroblasts⁵. Finally, the last layer interfaces with the overlying mammary gland and is enriched with various cells such as fibroblasts, macrophages, multinucleated giant cells and lymphoid aggregates with a predominance of T lymphocytes⁶. Silicone particles can be found in all 4 layers of the implant, notably in the vicinity of multinucleated giant cells and within macrophages. In this context, tumorigenesis of BIA-SCC would involve 2 steps:

-1 step of squamous re-epithelialization of the periprosthetic capsule⁷

-1 step of progressive transformation of this neoepithelium to squamous cell carcinoma, in a context of chronic inflammation^{7,8}.

The phenomenon of re-epithelialization is poorly understood, but could be due to the proliferation of skin cells accidentally introduced during breast reconstruction⁷. More likely, it could be metaplasia favoured by chronic inflammation and involving certain fibroblasts or macrophages of the capsule or galactophore ducts sectioned during the initial surgery⁷.

For some authors, myoepithelial cells may also be involved in epithelial metaplasia^{9,10}. Clinically, symptoms always appear at least 1 decade after prosthesis implantation. They include severe unilateral breast swelling associated with pain. The prognosis is poor, with local and distant aggressiveness and a generally weak response to chemotherapy (platinum salts, taxanes, anthracyclines). The mortality rate is estimated at 43.8% at 6 months².

Histologically, there is a continuum of metaplasia - dysplasia - proliferative and invasive squamous cell carcinoma with varying degrees of keratinization. On immunohistochemistry (IHC), lesions are CK5/6+, p63+, triple-negative (in the same way that a team from Gustave-Roussy institute showed that classic breast squamous cell carcinomas exhibit a "pseudo-basal-like" phenotype on IHC, with also marked EGFR expression⁹).

However, these BIA-SCC have never been molecularly profiled, and no interesting therapeutic options are currently emerging. Given the growing interest in this rare but serious entity for which there is little scientific data available, we hereby report two additional cases managed in our center. We detail the clinical and histological presentation of the lesions as well as the response to different therapeutic interventions. Finally, we present a molecular analysis of these tumors studied through the prism of pan-genomic RNAseq.

CASE 1

The story begins with the placement of bilateral silicone gel breast implants at the age of 34 for aesthetic purposes. Seven years later, the patient underwent bilateral implant exchange due to implant rupture without extracapsular rupture (bilateral capsulectomy followed by placement of new silicone gel implants). Two years later, a peri-prosthetic capsule appeared on the right side, leading to capsulectomy while retaining the intact implant. Six years later, approximately 15 years after the initial intervention, the patient reported induration, inflammation, and an increase in volume of the right breast, without fever. Breast ultrasound revealed significant right-sided effusion with enhancement of the capsule. Ultrasound-guided fluid aspiration revealed macroscopically gelatinous fluid with suspicious squamous cells on cytology. PET scan showed hypermetabolism (SUVmax 9.5) in the deep side of the effusion over 6 cm (**Fig.1**), for which anaplastic large cell lymphoma could not be ruled out. Eventually, the patient underwent removal of the right prosthesis. Approximately 400 ml of aseptic collection was evacuated at the beginning of the procedure. Several lesions developed in the peri-prosthetic capsule were identified. The main lesion measured 5 to 6 cm in size and extended to the intercostal muscles. Satellite lesions were also present with infiltration of the external pectoral muscle. Subtotal capsulectomy was performed. The procedure was halted when frozen section ruled out anaplastic large cell lymphoma. No axillary procedure was performed. Cytology of the peri-prosthetic fluid revealed atypical keratinized squamous cells. Histological diagnosis confirmed infiltrating squamous cell carcinoma, focally keratinizing, well-differentiated, arising from squamous epithelialization of the prosthetic capsule. The case was discussed in a multidisciplinary tumor board, and surgical re-intervention was validated. Right mastectomy with resection of the thoracic wall at the level of the 3rd, 4th, 5th, and 6th ribs with plate osteosynthesis and coverage by ipsilateral latissimus dorsi musculocutaneous flap, along with axillary lymph node dissection, was performed. Histology confirmed well-differentiated keratinizing infiltrating squamous cell carcinoma, lining almost the entire epithelialized peri-prosthetic capsule, with a residual small non-tumoral squamous flap. Two cutaneous permeation nodules were found on the infero-external and supero-internal quadrants, along with infiltration of the pectoral muscle up to the contact of the rib cage at the level of the 4th rib. The nipple was intact, margins were clear, and axillary lymph node dissection was negative (4 non-involved nodes). Adjuvant radiotherapy was administered at a dose of 50 Gy in 25 fractions to the right thoracic wall, with an additional 16 Gy in 8 fractions to the scar, using conformal radiotherapy technique with 6 and 25 MV tangential beams. Unfortunately, four months after the end of radiotherapy, the patient developed a 50 x 26 x 38 mm fluid-containing formation in the right axillary cavity, biopsy of which revealed metastatic localization of the known squamous cell carcinoma. PET scan confirmed right axillary recurrence without distant lesions (**Fig.2**). Surgical re-intervention or re-irradiation was not feasible. After initial refusal of therapy, the patient agreed to receive Carboplatin and 5FU chemotherapy, and

three cycles were completed. Unfortunately, after these cycles, local progression complicated by *Pseudomonas aeruginosa* infection ensued, leading to the patient's death.

CASE 2

At the age of 34, the patient underwent bilateral saline breast implant surgery. 10 years later, a local infection resulted in the replacement of the left prosthesis. Subsequently, the patient developed several episodes of infection in the prosthetic lodge, with recurrent abscesses treated with antibiotherapy and surgical trimming at 14, 16 and 21 years from the initial procedure. Pathology samples showed chronic sclero-inflammatory changes associated with a retracted hyperkeratotic hyperplastic epidermis with no sign of dysplasia. A new periprosthetic abscess appeared 22 years after the initial procedure. The thoracic CT scan showed K4 osteitis with infracentimetric left axillary and subpectoral internal mammary nodes. Further trimming was performed, combined with capsulectomy. Pathology was consistent with a well-differentiated keratinizing squamous cell carcinoma developed on the periprosthetic side of the capsule and invading K4. After this initial surgery, a PET scan was performed to assess extension, revealing intensely hypermetabolic changes in the left breast and chest wall, associated with low-to-moderate satellite lymph nodes in the axilla and left internal mammary area (**Fig.3**). No suspect distant hyperfixation was seen. A new thoracic CT scan confirmed a necrotic mass in place of the left mammary gland, with extension to the pleura and lysis of the 4th left rib anterior segment. MRI of the chest wall confirmed a left breast mass with bone and pleural invasion, left internal breast adenomegaly, left posterobasal pleural thickening and intramuscular nodule of the left anterior wall. Given the locally advanced nature of the disease, initial chemotherapy with Paclitaxel and Cetuximab was initiated with an excellent partial response at 3 months (**Fig.4**). This led to a parietectomy involving the left breast and the anterior segment of K3 to K6, combined with a left axillary curage. The resection was macroscopically complete. Histological analysis revealed a 12 cm well-differentiated keratinizing squamous cell carcinoma. No perineural sheathing or neoplastic emboli were visualized. On the other hand, resorptive macrophagic granulomatous remodelling was described over approximately 60% of the tumour surface, which could be interpreted as post-therapeutic remodelling. There was no lymph node involvement. Adjuvant radiotherapy was planned but cancelled when a 36 mm parietal nodule was found in the operative site, biopsied in favour of a local relapse of squamous cell carcinoma. Chemotherapy with Paclitaxel and Cetuximab, which had initially been effective, was resumed for 1 month. At the end, the disease progressed locally and a new regimen of weekly Adriamycin chemotherapy was initiated. After 1 month of treatment, further local and abdominal progression was observed. A first sequence of left thoracic irradiation was performed (18 Gy in 3 fractions). Given the resurgence of pain, the patient underwent re-irradiation of a left subclavicular nodule (36 Gy in 6 fractions) and another abdominal nodule (18 Gy in 3 fractions), leading to partial response (**Fig.5**). Following radiotherapy, treatment

with Cemiplimab was introduced. After the 2nd cycle of treatment, the patient developed cerebral progression in the form of two right frontal lesions with perilesional edema and no signs of cerebral herniation (**Fig.6**). Stereotactic cerebral irradiation was performed (30 Gy in 5 fractions) and a new regimen of chemotherapy with Carboplatin AUC 1.5 mg/m² every 15 days was initiated, with further locoregional and cerebral progression observed at 6 weeks. A new regimen of weekly methotrexate 40 mg/m² was administered over 2.5 months. In parallel, a new local radiotherapy treatment was initiated: 8 Gy in 1 fraction on the left 11th rib, 6 Gy in one fraction on a right parasternal nodule, 30 Gy in five fractions on the left petrous bone. This progressive clinical presentation was eventually complicated by undocumented hypoxic multilobar pneumonitis, leading to patient's death.

Histological considerations

Interestingly, histological analysis of the periprosthetic capsule in Case 1 (partial capsulectomy and subsequent surgical revision) confirmed the phenomenon of capsule re-epithelialization, followed by progressive transformation of this neo-epithelium in an inflammatory context. In this case, the capsule was lined with a squamous epithelium that was histologically normal in some areas, hyperplastic and dysplastic in others, and tumoral in others, in the form of a moderately differentiated, focally keratinizing, in situ and infiltrating squamous cell carcinoma. The entire thickness of the capsule was affected by the carcinomatous process. There was no breast granulation on the capsulectomy cross-sectional planes of cases 1 and 2, so this was not a metaplastic squamous cell carcinoma of the breast. In both cases, the capsule wall was highly inflammatory, infiltrated with lymphocytes and macrophages, rich in vessels and myofibroblasts. In both cases, the tumour invaded the surrounding mammary gland, skin, pectoral muscle plane and surrounding bone tissue, indicating local aggressiveness. Nevertheless, there were no vascular emboli or perineurium infiltration. On IHC, tumour cells did not express p16 (case 1). Epstein Barr virus EBER RNA expression by in situ hybridization was also negative. Finally, there was no immunoreactivity for estrogen and progesterone receptors, nor for HER2 receptor (triple-negative phenotype).

Molecular considerations

Squamous cell carcinomas are common tumors arising in a variety of anatomical locations, including lung, ENT sphere, skin, esophagus and cervix. Although different from one another, these squamous cell carcinomas share certain molecular similarities. Common alterations include TP53, CDKN2A, NOTCH, HRAS, EGFR, PTEN and PIK3CA, converging on the CDKN2A/RB1, PI3K/AKT, NOTCH and EGFR/RAS/MAPK pathways¹⁰⁻²¹. We therefore conducted an in-depth molecular analysis of our BIA-SCC cases to identify alterations that

might be shared with other types of squamous cell carcinoma. RNA-seq performed on the case 1 surgical specimen showed a NOTCH 2 ambiguous pathogenicity mutation and a CDKN2A pathogenic mutation. EGFR was significantly overexpressed. The G2/M transition score was high, in favor of a proliferative lesion. TMB was low. There were no other therapeutically targetable alterations. This profile is compatible with data in the literature concerning cutaneous squamous cell carcinomas, in which a somatic loss-of-function mutation of NOTCH 2 is present in over 60% of cases, loss of CDKN2A in over 30%, and frequent overexpression of EGFR^{11,15}. These alterations can also be found in other squamous cell carcinomas, but to a lesser extent¹⁵. In skin tissue, NOTCH signaling has been described as a regulator of keratinocyte differentiation, while CDKN2A, as in many other tissues, is associated with cell cycle regulation¹⁵.

In case 2, no molecular alterations were found, but with the risk of false negatives due to the very poor quality of the sample.

Conclusion

These various cases have enabled us to shed light on the biological behaviour of BIA-SCCS. From a pathophysiological point of view, the anatomopathological data are compatible with the hypothesis of a metaplasia-dysplasia-invasive carcinoma continuum mediated by chronic inflammation. From a molecular point of view, these tumors appear to behave relatively similarly to cutaneous squamous cell carcinomas, with somatic loss-of-function mutation of NOTCH2 and CDKN2A, and EGFR overexpression. The high G2/M transition score confirms the aggressive and proliferative nature of this cancer type. The low TMB suggests a tumor with a relatively simple genomic structure, and does not encourage the use of immunotherapy, despite lymphoid infiltration on IHC. From a therapeutic point of view, this case review confirms the overall resistance of these tumors to the various therapeutic modalities offered (chemotherapy, immunotherapy, radiotherapy). Only Paclitaxel Cetuximab in case 2 induced an initial partial response, consistent with EGFR overexpression. It therefore seems useful to document these different BIA-SCC cases in registries dedicated to their molecular analysis, with the aim of proposing new treatments adapted to the tumor biology. On the basis of our analyses, treatment with CDK4/6 inhibitors could be justified, as could therapy targeting NOTCH2 or EGFR. Multimodal approaches could also be considered.

References

1. Wednesday, M. 8. FDA provides update on Breast Implant Associated-Squamous Cell Carcinoma (BIA-SCC). American Society of Plastic Surgeons <https://www.plasticsurgery.org/for-medical-professionals/publications/psn-extra/news/fda-provides-update-on-breast-implant-associated-squamous-cell-carcinoma>.
2. Health, C. for D. and R. UPDATE: Reports of Squamous Cell Carcinoma (SCC) in the Capsule Around Breast Implants - FDA Safety Communication. FDA (2023).
3. Santanelli di Pompeo, F. et al. Breast Implants and the Risk of Squamous Cell Carcinoma of the Breast: A Systematic Literature Review and Epidemiologic Study. *Aesthet. Surg. J.* sjae023 (2024) doi:10.1093/asj/sjae023.
4. Del Rosario, A. D. et al. True Synovial Metaplasia of Breast Implant Capsules: A Light and Electron Microscopic Study. *Ultrastruct. Pathol.* **19**, 83–93 (1995).
5. Rubino, C. et al. Ultrastructural Anatomy of Contracted Capsules Around Textured Implants in Augmented Breasts: *Ann. Plast. Surg.* **46**, 95–102 (2001).
6. Kamel, M. et al. The peri-implant breast capsule: An immunophenotypic study of capsules taken at explantation surgery. *J. Biomed. Mater. Res.* **58**, 88–96 (2001).
7. Kitchen, S. B., Bauer, W. C., Paletta, C. E. & Shehadi, S. I. Epithelialization of the lining of a breast implant capsule. Possible origin of squamous cell carcinoma associated with a breast implant capsule. *Cancer* **73**, 1449–1452 (1994).
8. Alikhan, M. B., Nassar, A. & Mansoor, I. Squamous Metaplasia on the Breast Implant Capsule. *Int. J. Surg. Pathol.* **18**, 570–574 (2010).
9. Grenier, J. et al. Differential Immunohistochemical and Biological Profile of Squamous Cell Carcinoma of the Breast. *ANTICANCER Res.* (2007).
10. Agrawal, N. et al. Exome Sequencing of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Reveals Inactivating Mutations in NOTCH1. *Science* **333**, 1154–1157 (2011).
11. Corchado-Cobos, R., García-Sancho, N., González-Sarmiento, R., Pérez-Losada, J. & Cañueto, J. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: From Biology to Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 2956 (2020).
12. Kadian, L. K., Arora, M., Prasad, C. P., Pramanik, R. & Chauhan, S. S. Signaling pathways and their potential therapeutic utility in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin. Transl. Oncol.* **24**, 1014–1032 (2022).
13. Niu, Z., Jin, R., Zhang, Y. & Li, H. Signaling pathways and targeted therapies in lung squamous cell carcinoma: mechanisms and clinical trials. *Signal Transduct. Target. Ther.* **7**, 353 (2022).
14. Rasi Bonab, F. et al. Molecular pathways in the development of HPV-induced cervical cancer. *EXCLI J.* 20Doc320 ISSN 1611-2156 (2021) doi:10.17179/EXCLI2021-3365.
15. Sánchez-Danés, A. & Blanpain, C. Deciphering the cells of origin of squamous cell carcinomas. *Nat. Rev. Cancer* **18**, 549–561 (2018).
16. Satpathy, S. et al. A proteogenomic portrait of lung squamous cell carcinoma. *Cell* **184**, 4348-4371.e40 (2021).
17. Shah, P. A. et al. NOTCH1 Signaling in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cells* **9**, 2677 (2020).
18. Song, Y. et al. Identification of genomic alterations in oesophageal squamous cell cancer. *Nature* **509**, 91–95 (2014).
19. Stransky, N. et al. The Mutational Landscape of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Science* **333**, 1157–1160 (2011).
20. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature* **489**, 519–525 (2012).
21. Xiao, S. et al. Roles of oncogenes in esophageal squamous cell carcinoma and their therapeutic potentials. *Clin. Transl. Oncol.* **25**, 578–591 (2022).

CASE 1

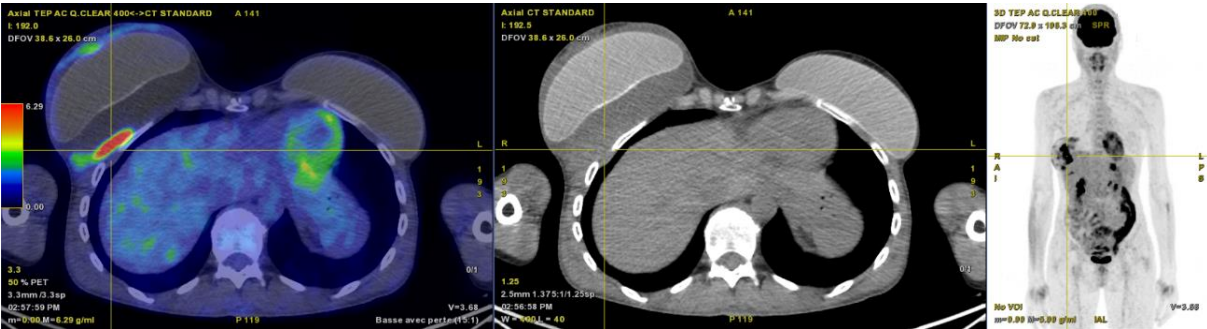


Fig.1 Preoperative PET scan showing a 6 cm hypermetabolic retroprosthetic collection

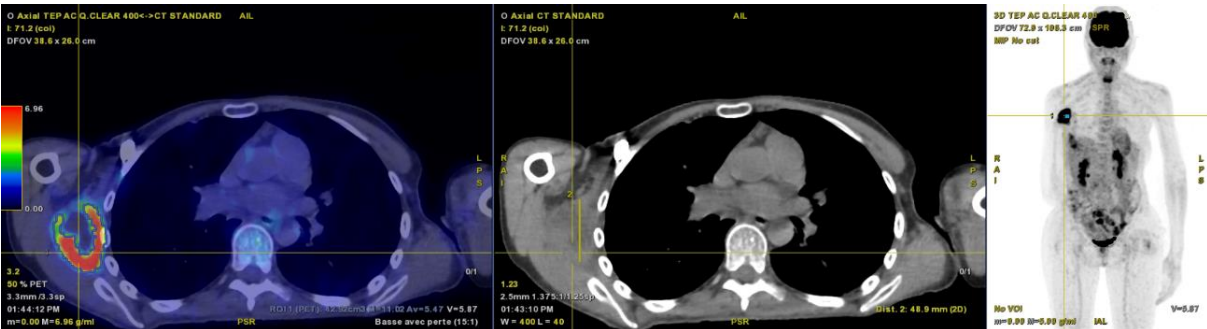


Fig.2 PET scan 4 months after completion of radiation therapy showing locoregional relapse in the right axilla

CASE 2

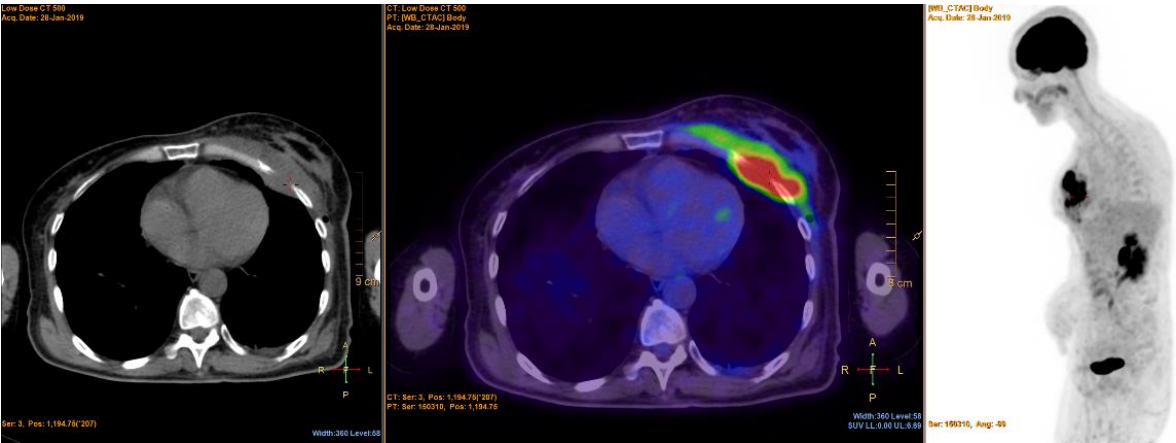


Fig.3 Post-capsulectomy PET scan showing left subpectoral, pleural, costal and axillary invasion

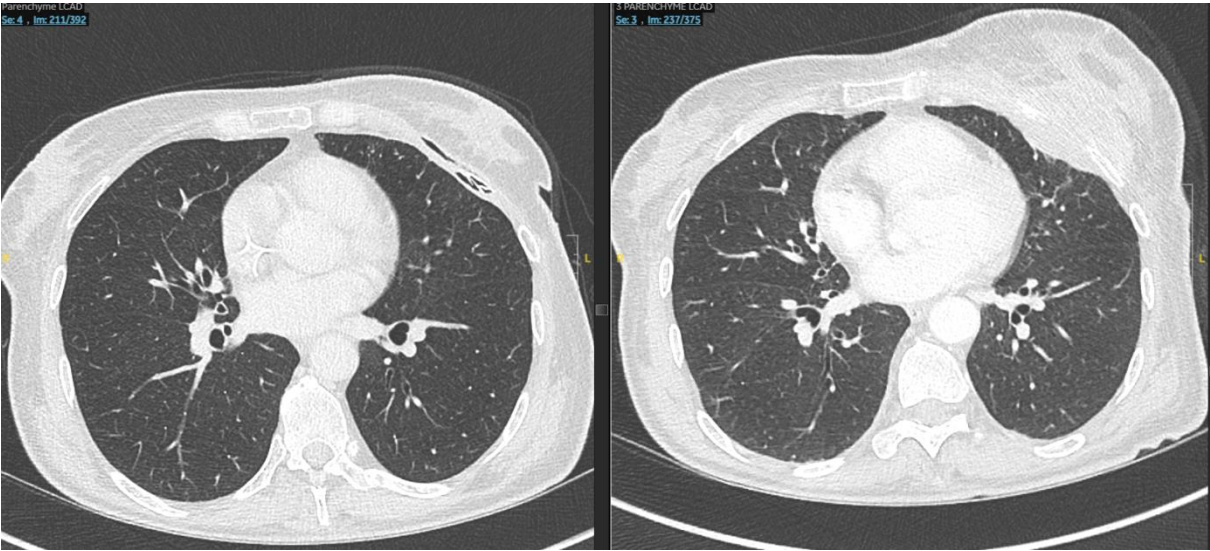


Fig.4 Reassessment chest CT scan after 3 months of PACLITAXEL and CETUXIMAB (left) showing a near-complete response compared with the baseline CT scan (right)



Fig.5 Clinical partial response after irradiation of multiple thoracoabdominal parietal metastases

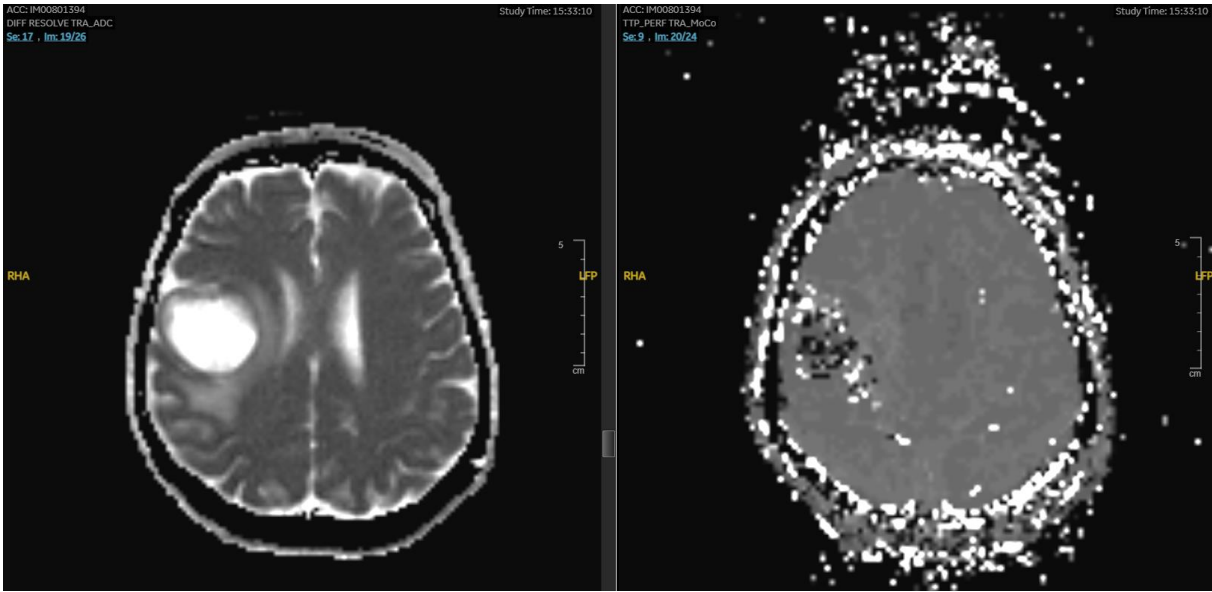


Fig6. Brain MRI showing right fronto-cerebral progression after 2 Cemiplimab cycles

RESUME

Introduction : Le cancer du sein est la première cause de décès par cancer chez la femme dans le monde. Il s'agit d'une maladie hétérogène dont il existe plusieurs sous-types moléculaires corrélés au pronostic. Parmi ces différentes entités, le sous-type basal-like présente le pronostic le plus défavorable. Il est caractérisé par une expression accrue de marqueurs de différenciation basale et une instabilité génétique importante, fréquemment due à des altérations de la recombinaison homologue. Il est également enrichi en cellules souches cancéreuses. Ces cellules semblent être impliquées dans les étapes précoces de la carcinogenèse mais également dans la résistance aux traitements cytotoxiques et la rechute. Plusieurs voies de signalisation influencent leur biologie, notamment la voie des « bone morphogenetic proteins » (BMP). Des dérégulations de cette voie ont été mises en évidence dans certaines tumeurs mammaire de sous-type luminal mais son implication dans l'émergence des tumeurs basal-like reste à explorer.

Matériels et méthodes : A l'aide d'échantillons primaires et en interrogeant des bases de données publiques, nous avons recherché des anomalies de la voie BMP dans des tumeurs basal-like et des tissus prédisposés mutés pour BRCA1. Nous avons également utilisé la lignée de cellules souches épithéliales mammaires humaines MCF10A afin de modéliser in vitro les processus d'initiation tumorale des cellules souches dans la glande mammaire.

Résultats : Nous montrons que l'expression du récepteur BMPR1A et du ligand BMP4 sont dérégulés dans les tumeurs basal-like et les tissus prédisposés. Ces dérégulations entraînent une répression transcriptionnelle de BRCA1 dans notre modèle de cellules souches. Les conséquences fonctionnelles incluent une différenciation préférentielle selon le phénotype basal, une augmentation de la stemness et des altérations de la voie de la recombinaison homologue.

Conclusion : Nous suggérons un rôle de l'axe BMP4-BMPR1A dans les étapes précoces de la carcinogenèse des tumeurs mammaires basal-like (i) en favorisant le maintien d'un contingent de cellules souches dans la glande mammaire, (ii) en orientant leur différenciation vers un phénotype basal, (iii) en favorisant l'instabilité génétique nécessaire à leur transformation en cellules souches cancéreuses.

ABSTRACT

Introduction: Breast cancer is the leading cause of cancer death in women worldwide. It is a heterogeneous disease with several molecular subtypes correlated with prognosis. Of these, the basal-like subtype has the poorest prognosis. It is characterized by increased expression of basal differentiation markers and significant genetic instability, frequently due to alterations in homologous recombination. It is also enriched in cancer stem cells. These cells appear to be involved in the early stages of carcinogenesis, but also in resistance to cytotoxic treatments and relapse. Several signaling pathways influence their biology, notably the bone morphogenetic protein (BMP) pathway. Dysregulation of this pathway has been identified in some luminal breast tumors, but its involvement in the emergence of basal-like tumors remains to be explored.

Materials and methods: Using primary samples and public databases, we investigated BMP pathway abnormalities in basal-like tumors and BRCA1-mutated predisposed tissues. We also used the MCF10A human mammary epithelial stem cell line to model in vitro stem cell tumor initiation in the mammary gland.

Results: We show that BMPR1A receptor and BMP4 ligand expression are dysregulated in basal-like tumors and predisposed tissues. These dysregulations lead to transcriptional repression of BRCA1 in our stem cell model. Functional consequences include preferential differentiation according to basal phenotype, increased stemness and alterations in the homologous recombination pathway.

Conclusion: We suggest a role for the BMP4-BMPR1A axis in the early stages of carcinogenesis of basal-like mammary tumors by (i) promoting the maintenance of a stem cell population in the mammary gland, (ii) directing their differentiation towards a basal phenotype, (iii) promoting the genetic instability necessary for their transformation into cancer stem cells.