



Etude de l'influence du stroma BRCA1 muté sur les étapes précoces de transformation tumorale dans le modèle du cancer du sein

Lucie Portier

► To cite this version:

Lucie Portier. Etude de l'influence du stroma BRCA1 muté sur les étapes précoces de transformation tumorale dans le modèle du cancer du sein. Cancer. Université Paris Saclay (COMUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS501 . tel-02410781

HAL Id: tel-02410781

<https://theses.hal.science/tel-02410781>

Submitted on 14 Dec 2019

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.

Etude de l'influence du stroma BRCA1 muté sur les étapes précoces de transformation tumorale dans le modèle du cancer du sein

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
Préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°569 Innovation Thérapeutique -
Du Fondamental à l'Appliqué (ITFA)
Spécialité de doctorat: Immunologie

Thèse présentée et soutenue à Villejuif, le 13 décembre 2017, par

Lucie PORTIER

Composition du Jury :

He LU Directeur de Recherche, Université Paris Diderot (INSERM U1165)	Président
Ivan BIECHE Docteur, MCU-PH, Université Paris Descartes (Institut Curie)	Rapporteur
Catherine MONNOT Chargée de Recherche, CIRB, Collège de France (INSERM U1050)	Rapporteur
Brigitte BRESSAC DE PAILLERETS Docteur, Université Paris Sud / Paris Saclay (INSERM U1186)	Examineur
Bernard MAILLIERE Directeur de Recherche, Université Paris Saclay (CEA, Institut Joliot)	Examineur
Frank GRISCELLI Professeur, Université Paris Descartes (INSERM U935)	Directeur de thèse
Annelise BENNACEUR-GRISCELLI Professeur, Université Paris Sud / Paris Saclay (INSERM U935)	Co-directeur de thèse

Remerciements

Au terme de ce travail réalisé à l'unité INSERM U935, je tiens à remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué à ce projet, de près ou de loin.

Tout d'abord, merci...

A mon directeur de thèse, le **Pr Frank Griscelli** pour avoir dirigé ce travail. Je vous remercie pour votre suivi du projet au laboratoire, votre contribution quant à l'analyse de certains échantillons et votre aide rédactionnelle.

Au **Pr Annelise Bennaceur-Griscelli** pour m'avoir accueillie dans son unité et m'avoir proposé ce sujet. Je vous remercie pour votre apport scientifique et la codirection de ce travail.

Je remercie très sincèrement les membres de mon jury de thèse : Monsieur **Ivan Bièche** et Madame **Catherine Monnot** pour avoir accepté de juger ce travail, ainsi que Madame **Brigitte Bressac** et Monsieur **He Lu** pour l'avoir examiné. Merci à Monsieur **Bernard Maillère** d'avoir accepté de présider ce jury.

Merci aussi...

A tous les membres, actuels et passés de **l'unité U935**, pour leur présence, leur accompagnement et leur participation à cette thèse.

Tout d'abord, un très grand merci à :

Dr Olivier Féraud, pilier du labo, tant pour les connaissances scientifiques, que pour la gestion du fonctionnement général. Merci pour tous tes conseils, ton apprentissage et la résolution des nombreux problèmes techniques ! Je te souhaite également beaucoup de satisfaction dans ta nouvelle aventure professionnelle.

Dominique Divers, autre pilier qui veille sur les cellules souches et sans qui les commandes n'aboutiraient pas. Merci pour ta patience, ta gentillesse, tes réponses et ton aide quotidienne.

Je n'oublie pas les (trop) nombreux anciens, ayant aussi participé à ce projet, alors merci à : **Emilie Gobbo** : présente dès mon arrivée, tu m'as conseillée à mes débuts, toujours avec bonne humeur. Les entrevues amicales hors labo ont ensuite pris le relais.

Lara Dirian : un immense merci pour tout ! Ton passage dans l'unité a été très enrichissant à tout point de vue : scientifique, professionnel et personnel. Travailler et échanger avec toi furent un grand plaisir. Sans oublier ton précieux soutien et tes encouragements.

Tony Ernault : pour ta gentillesse et ta disponibilité à tout moment, ton (hyper)dynamisme, ton aide technique et ta bonne humeur, sans oublier ta sympathie.

Mathieu Guibert : pour ton aide en biologie moléculaire.

Alexandre Ceccaldi : pour l'actu foot et le dynamisme que tu apportais à l'équipe. Au fait, après ces 3 ans de thèse, je ne me suis toujours pas mise au café...tu n'y croyais pas !

Isabelle Caccia-Puotti : pour ton aide ponctuelle lors des moments de rush.

Toujours au sein de la plateforme, je tiens également à remercier **Albert Tasteyre** pour ton calme et nos petites discussions, ainsi que **Mathis Soubeyrand** pour ta disponibilité et ton aide précieuse lors des manip finales.

Puis, au sein des équipes thématiques, je remercie sincèrement :

Les **Dr Hervé Acloque**, **Jérôme Artus** et **Adlen Foudi**, pour leurs discussions scientifiques, leurs conseils et leurs critiques.

Patricia Hugues : pour ta bonne humeur, ton entrain et ta bienveillance, sans oublier les séances bavardages à ton bout de couloir.

Dr Christophe Desterke : pour ton travail à différentes phases du projet, qui nous a permis de choisir des directions pour continuer.

Les co-thésards :

Julien : mon premier coach de manip, à peine arrivée que tu m'embarquais pour une séance de Trizol. Merci pour tes conseils, tes moments grognons et les courses partagées.

Cécile : tu aurais dû finir après moi, mais tu en as décidé autrement, ce qui ne change rien à notre sympathique collaboration et pour avoir partagé de bons moments en dehors du labo.

Masae : thank you very much for all the time shared with me about animal experimentation: your theory teaching, practical working and your help for my mice. Thanks too for our evening discussions and about your Japanese culture. Good luck for the end of your PhD!

Diana : nous avons vécu les galères de fin de thèse en même temps. Je retiendrai ta gentillesse, ton calme, ta disponibilité et ton amitié.

Sarah : pour tes accents brésilien et italien qui coloraient nos discussions et ta sympathie.

Gladys : pour ton soutien, ton aide et tes conseils à différents moments de la thèse.

Seda : merci d'avoir relancé et partagé la technique du WB lors de ton passage en France.

Les postdocs :

Eva : thanks a lot for all that we shared : scientific discussions, technical troubleshootings, good memories, laughs, trips, running, avocado culture... Thanks for your help and support. It was a pleasure to work in the same office.

Lucas : thank you for your kindness and happiness every day! **Afag** : pour ta gentillesse, ta disponibilité et ton aide. **Jinwook** : for the discovery of the Korean culture.

Merci aussi à l'équipe du 3^e pour nos échanges, en particulier **Sandrine Dulong**, **Yunhua Chang-Marchand** et surtout **Jean-Christophe Machowiak** (pour ton aide, ta franchise et ton amitié).

J'adresse également mes remerciements à **Ibrahim Casal** et **Gaëlle Duvallet** pour leur aide technique au sein de l'animalerie.

Je remercie **Nicolas Gendron** et le **Pr D. Smadja** (Paris V) pour le partage de leur savoir-faire et leur collaboration à ce projet.

Un clin d'œil à tous les courageux qui ont rejoint, au gré des motivations et de la météo, les séances de course à pied : Julien d'abord, puis Hervé et Eva, suivis de Cécile, Tony, Sarah, Lara, Lucas, Gladys et Jinwook. Ces sorties dans la verdure du parc des Hautes-Bruyères étaient bien sympa !

Merci également ...

Aux différentes équipes de recherche et pharmacie, rencontrées tout au long de mon parcours, qui ont partagé leurs savoirs et m'ont aidée à composer mon chemin :

- Pasteur Paris : **Micheline, Xavier et Madame Guy-Grand**. Vous avez été mes premiers contacts avec la recherche et cette initiation fut un plaisir.
- Pharmacie du Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil : **Audrey, Stéphanie, Caroline, Emmanuelle et Madame Thébault**. La découverte du milieu hospitalier à vos côtés fut particulièrement enrichissante.
- Pasteur Lille : **Corinne, Jeanne, Kassem, Denise, Véronique, Benoît, Catherine, Jérôme, Coline et Isabelle**. Cette aventure lilloise en votre compagnie fut une expérience très riche sur le plan professionnel, tout comme votre accueil et votre gentillesse.

Merci ensuite...

A mes amis pharma :

Audrey, Maud et Ségolène, mes 3 acolytes Fantastiques.

Claire et Céline, pour former notre Dritte Team, nœud d'une très belle amitié, malgré les va-et-vient de chacune !

Jessica pour avoir vécu une expérience de thèse en même temps que moi et pour nos retrouvailles lors des JED.

A **mes autres amis**, qui ont une place très importante dans ma vie et avec qui j'ai toujours partagé de beaux moments.

Merci enfin...

A **ma Maman**, pour tout et depuis toujours. Après les études de pharma, tu as encore supporté ces 3 ans de thèse et écouté toutes mes histoires, sûrement pas très claires pour toi. Merci pour tout ce que tu m'as apporté : ton amour, ton éducation, ton goût du travail, ton soutien quotidien, tant sur le plan moral, que financier et matériel, ton écoute, ta patience, tes conseils et tout le temps que tu m'as consacré.

A **mon Papa**, pour ton amour et ton soutien. Merci aussi pour les 2 séjours au calme, dans la verdure de la Dordogne, à la découverte du coin et de l'activité du fournil, tout en goûtant tout plein de bonnes choses à la sortie du four.

A **ma famille**, pour m'avoir toujours porté une grande affection, s'être intéressée à mes études et m'avoir encouragée dans mes entreprises.

Liste des figures et tableaux

Figures

Figure 1 : Coupe sagittale d'un sein et sa structure anatomique.

Figure 2 : Structure d'un lobe mammaire.

Figure 3 : Schéma représentant les différentes étapes du développement de la glande mammaire.

Figure 4 : Micrographies d'une glande mammaire murine à différents stades de maturité.

Figure 5 : Evolution de l'incidence et de la mortalité (taux standardisé monde) par cancer du sein entre 1980 et 2012.

Figure 6 : Caractéristiques de la cellule cancéreuse.

Figure 7 : Coupe sagittale d'une glande mammaire présentant les différents stades de prolifération cellulaire au cours de l'évolution d'un cancer canalaire.

Figure 8 : Corrélation entre les sous-types intrinsèques et moléculaires des tumeurs du sein.

Figure 9 : Illustration des variations de populations de cellules souches cancéreuses et de leurs descendances différenciées pour les sous-types basal, HER2 et luminal A de cancers du sein.

Figure 10 : Représentation des domaines protéiques de BRCA1.

Figure 11 : Rôles de BRCA1 et BRCA2 dans la réparation de l'ADN.

Figure 12 : Conséquences d'une inhibition de PARP dans des cellules mutées pour BRCA1/2.

Figure 13 : Modèle de carcinogenèse mammaire lié à BRCA1.

Figure 14 : Rôle de BRCA1 dans la destinée des cellules mammaires normales et mutées.

Figure 15 : Le microenvironnement tumoral.

Figure 16 : Représentation des domaines protéiques de la périostine.

Figure 17 : Le rôle de la périostine dans le cancer.

Figure 18 : La transition épithéliomésenchymateuse.

Figure 19 : Voies de signalisation embryonnaires conduisant à l'induction de la TEM.

Figure 20 : Signaux du microenvironnement tumoral et TEM.

Figure 21 : Angiogenèse.

Figure 22 : Caractéristiques d'une masse tumorale hypoxique.

Figure 23 : Les différents vecteurs utilisés pour la reprogrammation de cellules différenciées en iPSCs.

Figure 24 : Schéma de la reprogrammation de cellules sanguines de patients en iPSCs par transduction virale.

Figure 25 : Mécanismes moléculaires et vagues transcriptionnelles au cours de la reprogrammation chez l'Homme.

Figure 26 : Dérivation, différenciation et application des cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) spécifiques de patient.

Figure 27 : Capacités de différenciation des cellules souches mésenchymateuses.

Figure 28 : Effets immunomodulateurs des MSCs.

Figure 29 : Modèle d'étude et analyse des marqueurs de surface de la TEM et de la stemness sur des cellules épithéliales mammaires.

Figure 30 : Signature moléculaire des cellules épithéliales mammaires après co-culture avec les MSCs.

Figure 31 : Le milieu conditionné favorise la migration des cellules épithéliales mammaires avec et sans inhibiteur de la voie Sonic Hedgehog.

Figure 32 : Modèle de culture 3D et génération d'organoïdes.

Tableaux

Tableau 1 : Présentation des différents stades de cancers du sein en fonction du score TNM et description des atteintes présentes.

Tableau 2 : Caractéristiques des sous-types moléculaires des cancers du sein.

Tableau 3 : Gènes impliqués dans l'angiogenèse et induits par HIF1- α .

Liste des annexes

Annexe 1 : Classification TNM du cancer du sein, 7^e édition 2010, et stade UICC.

Annexe 2 : Classification TNM du cancer du sein illustrée.

Annexe 3 : Description des marqueurs cellulaires testés.

Annexe 4 : Publication complémentaire : Generation of an induced pluripotent cell (iPSC) line from a patient with a triple negative breast cancer with hereditary exon 17 deletion of BRCA1 gene.

Liste des abréviations

A

ADCC: antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
 ADSC: adipose derived stem cell
 ADN: acide désoxyribonucléique
 Akt : AKR T cell lymphoma protein kinase
 ALDH : aldéhyde deshydrogénase
 Angpt : angiopoïétine
 ARN : acide ribonucléique
 ATM : ataxia-telangiectasia mutated

B

BARD1: BRCA1 associated RING domain protein 1
 b-FGF: basic fibroblast growth factor
 BRCA : breast cancer susceptibility gene
 BRCT: BRCA1 C terminus
 BRIP1: BRCA1-interacting protein C-terminal helicase 1

C

CAF : cancer associated fibroblast
 CDK : cyclin-dependant kinase
 CFU: colony forming unit
 CISH: chromogenic in situ hybridization
 CHK : checkpoint kinase
 CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
 CSC : cellule souche cancéreuse
 CSH: cellule souche hématopoïétique

E

EB: embryoid body
 EGF: epidermal growth factor
 EGFR: epidermal growth factor receptor
 ES: embryonic stem cell

F

FACS: fluorescent-activated cell sorting
 FAP: fibroblast activated protein
 FIH: factor inhibiting HIF
 FISH: fluorescent in situ hybridization

G

GAG: glycosaminoglycan
 GVHD: graft versus host disease
 GWAS : Genome Wide Association Study

H

HER2: human epidermal growth factor receptor 2
 HGF: hepatocyte growth factor
 HIF: hypoxia inducible factor

I

IARC: International agency for research on cancer
 IFN : interféron
 IL : interleukine
 INCa : Institut national du cancer
 iPSC: induced pluripotent stem cell

K

KO : knock out

L

LOH: loss of heterozygosity

LOX: lysyl oxydase

M

MEC: matrice extracellulaire

MEF: mouse embryonic fibroblast

MET: mesenchymal epithelial transition

miRNA: micro ARN

MMP: matrix metalloprotease

MSC: mesenchymal stem / stromal cell

N

NHEJ: non homologous end joining

NK: natural killer

NLS: nuclear localization sequence

O

OSKM: Oct4 / Sox 2 / Klf4 / c-Myc

OSNL: Oct4 / Sox2 / Nanog / Lin28

P

PALB2: partner and localizer of BRCA2

PARP: poly-ADP-ribose polymerase

PCR : polymerase chain reaction

qPCR : quantitative polymerase chain reaction

PDGF: platelet derived growth factor

PDGFR: platelet derived growth factor receptor

POSTN: périostine

R

RANK : receptor activator of nuclear factor- κ B

RE: récepteurs des œstrogènes

RING: really interesting new gene

ROS : reactive oxygen species

RP : récepteurs de la progestérone

SVF : sérum de veau fœtal

S

SCD: serine cluster domain

SMA: smooth muscle actin

SSEA: stage specific embryonic antigen

T

TAM: tumor associated macrophages

TEM: transition

épithéliomésenchymateuse

TERT: telomerase reverse transcriptase

TGF β : transforming growth factor β

TNF: tumor necrosis factor

TNM: Tumor Node Metastasis

TRA: tumor rejection antigen

V

VEGF: vascular endothelial growth factor

VEGFR: vascular endothelial growth factor receptor

Sommaire

Remerciements.....	4
Liste des figures et tableaux	7
Figures	7
Tableaux.....	8
Liste des annexes.....	9
Liste des abréviations	10
Sommaire	12
Avant-propos	16
Partie I Le cancer du sein	19
A. Rappels physiologiques et épidémiologie	20
1. Structure anatomique du sein	20
2. Développement de la glande mammaire.....	21
B. Cancer du sein.....	23
1. Données épidémiologiques.....	23
2. Notions générales.....	24
a. Acquisitions des caractéristiques cancéreuses.....	24
b. Particularités du cancer du sein	26
c. Facteurs de risque	27
d. Aspects cliniques, diagnostiques et thérapeutiques	28
2. Cancer du sein et hérédité	29
a. Les mutations observées	29
b. <i>BRCA1</i> versus <i>BRCA2</i>	30
3. Classifications des cancers du sein	30
a. Classification TNM	30
b. Grade histopronostique	31
c. Classification moléculaire	33
4. Hétérogénéité intratumorale.....	36

C.	BRCA1 : un gène suppresseur de tumeur associé aux cancers du sein	38
1.	Présentation et fonctions	38
a.	Généralités.....	38
b.	Structure protéique.....	38
c.	Rôle dans la réparation de l'ADN	40
2.	BRCA1 et tissu-spécificité.....	41
3.	Etude des cancers du sein associés à BRCA1	44
4.	Implications dans la pathologie cancéreuse	47
a.	Haploinsuffisance et perte d'hétérozygotie	47
b.	Conséquences fonctionnelles.....	49
Partie II Le microenvironnement tumoral		52
A.	Définition.....	53
B.	Composition du microenvironnement tumoral.....	53
1.	La composante cellulaire	54
a.	Les fibroblastes	54
b.	Les cellules souches / stromales mésenchymateuses.....	57
c.	Les cellules immunitaires	58
d.	Les cellules endothéliales	59
e.	Les cellules adipeuses	60
2.	La matrice extracellulaire (MEC)	60
a.	Composition	60
b.	Les molécules solubles	61
3.	Le cas de la périostine	62
B.	Rôle du stroma dans l'initiation et la progression tumorale.....	66
C.	Microenvironnement et transition épithéliomésenchymateuse (TEM).....	68
1.	Définition.....	68
2.	Rôles et conséquences dans la tumorigenèse	70
a.	Généralités.....	70
b.	Le TGFβ.....	72
c.	Relation entre TEM et BRCA1.....	73
3.	Implication du microenvironnement dans le processus de transition épithéliomésenchymateuse.....	74

D.	Microenvironnement et angiogenèse	77
1.	Définitions.....	77
a.	Angiogenèse physiologique.....	77
b.	Angiogenèse tumorale	78
c.	Le switch angiogénique.....	78
2.	Hypoxie	80
a.	HIF1	80
b.	Relation entre HIF1 et BRCA1	82
3.	Implication du microenvironnement dans le processus d'angiogenèse	83
Partie III Cellules souches et modélisation de pathologie		85
A.	Généralités sur les cellules souches.....	86
1.	Définitions.....	86
2.	Les cellules souches embryonnaires : ES.....	87
B.	Les cellules souches pluripotentes induites humaines : iPSCs.....	87
1.	Obtention des premières iPSCs.....	87
2.	Caractéristiques des iPSCs	88
3.	La reprogrammation	89
a.	Bref historique de la reprogrammation	89
b.	Les techniques de reprogrammation	89
c.	Les mécanismes de la reprogrammation.....	91
4.	Applications des iPSCs.....	93
a.	Recherche : modélisation pathologique et criblage	93
b.	Clinique : thérapie cellulaire et médecine régénératrice	95
C.	Les cellules souches / stromales mésenchymateuses : MSCs.....	96
1.	Historique	96
2.	Localisation.....	96
3.	Caractérisation	97
a.	Critères d'identification	97
b.	Plasticité.....	99
4.	Obtention de MSCs à partir de cellules souches pluripotentes.....	99
5.	Rôles	100

a. Activité paracrine.....	100
b. Niche hématopoïétique	101
c. Immunomodulation.....	101
d. Stimulation angiogénique	102
e. Réparation tissulaire et applications thérapeutiques.....	103
Objectifs	104
Résultats	106
A. Article 1 : “ <i>Mesenchymal stem cells-derived induced pluripotent stem cells with heterozygous deletion of BRCA1 drives breast cancer tumor growth and metastasis via upregulation of periostin and angiogenesis</i> ”.....	106
B. Résultats complémentaires 1 : les MSCs BRCA1-muté favorisent l’induction de la transition épithéliomésenchymateuse des cellules épithéliales mammaires.....	142
C. Résultats complémentaires 2 : mise en place d’un modèle de culture cellulaire 3D et génération d’organoïdes	149
Discussion - Perspectives	151
Annexes.....	163
Annexe 1 : Classification TNM du cancer du sein, 7 ^e édition 2010, et stade UICC.....	163
Annexe 2 : Classification TNM du cancer du sein illustrée	166
Annexe 3 : Description des marqueurs cellulaires testés	167
Annexe 4 : Publication complémentaire	171
Bibliographie.....	176

Avant-propos

Avec environ 54 000 nouveaux cas et 12 000 décès associés chaque année en France, le cancer du sein est le premier en termes d'incidence et de mortalité chez la femme. Une prédisposition familiale est à l'origine de certaines formes de ce cancer, augmentant ainsi le risque de voir se développer la maladie. Ces cancers héréditaires sont associés à des anomalies génétiques germinales, portant sur les gènes de susceptibilité *BRCA1* et *BRCA2* (*BR*east *C*ancer *1* et *2*). On considère qu'environ 20% d'entre eux sont associés à des mutations monoalléliques du gène *BRCA1*. L'implication de *BRCA1* dans la carcinogenèse est complexe et sera revue plus en détail au cours de ce travail. Ce gène, dit « suppresseur de tumeur », code pour une protéine multifactorielle impliquée, entre autre, dans le maintien de l'intégrité du génome en réparant les dommages de l'ADN, la différenciation cellulaire, l'autorenouvellement des cellules souches basales mammaires et dans le phénomène de transition épithéliomésenchymateuse (TEM).

L'exploration du rôle de *BRCA1* dans le développement du tissu mammaire normal et sa transformation maligne reste aujourd'hui incomplète. On peut alors se demander quelles sont les bases biologiques au statut de prédisposition au cancer lié aux mutations germinales de ce gène. L'évaluation des conséquences de la mutation sur des mécanismes cellulaires et moléculaires qui surviennent au cours de la transformation tumorale est un enjeu majeur, notamment sur le plan de la prévention. En effet, en accédant à une meilleure connaissance des cellules hétérozygotes pour le gène *BRCA1* (*BRCA1*^{+/-}), on pourrait donner une signification biologique à ce statut, permettant de prédire de façon plus précise le risque de cancer, d'identifier d'éventuels biomarqueurs et de tester des thérapies visant à corriger le trait phénotypique associé au statut mutationnel de *BRCA1*.

Bien que la survenue d'événements génétiques ou épigénétiques conduisant à la perte des deux allèles du gène *BRCA1* soient nécessaires pour que le cancer se développe, l'apparition d'aberrations phénotypiques dans les cellules pré-tumorales avec une mutation germinale de *BRCA1* devrait se produire de façon précoce, constituant le premier événement de la transformation. En effet, l'hétérozygotie de *BRCA1* devrait induire des altérations moléculaires significatives avec des

perturbations importantes au niveau du génome dans des cellules épithéliales apparemment normales, telles que des modifications des profils d'expression génique et de l'état d'activation des cascades de signalisation intracellulaires.

A ce jour, les conséquences moléculaires et fonctionnelles de cellules stromales avec une hétérozygotie du gène *BRCA1* restent mal étudiées. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'influence que pouvait exercer un microenvironnement hétérozygote pour *BRCA1* sur des cellules mammaires normales et cancéreuses. Pour cela, des cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) obtenues par la technique de reprogrammation issues de cellules de sang de patientes porteuses ou non d'une mutation *BRCA1* ont été différenciées en cellules souches / stromales mésenchymateuses (MSCs *BRCA1*^{+/-}). Ces MSCs ont été caractérisées et ont servi à modéliser un stroma, muté ou non pour *BRCA1*, dans plusieurs approches expérimentales *in vitro* et *in vivo*. Nous avons identifié une signature moléculaire unique aux niveaux ARN et protéique et étudié plus précisément le rôle des MSCs *BRCA1*^{+/-} dans deux phénomènes importants pour l'initiation tumorale, à savoir l'angiogenèse et la TEM.

Ces deux phénomènes sont connus pour participer aux étapes précoces de la tumorigenèse et au développement de métastases, faisant intervenir divers processus moléculaires et cellulaires. En effet, grâce à l'acquisition de propriétés de migration et à la dégradation de la matrice extracellulaire, les cellules tumorales s'échappent de la tumeur primaire et envahissent des sites secondaires. Cette progression tumorale est rendue possible par les interactions entre les cellules cancéreuses et le microenvironnement dans lequel elles se trouvent. Il est admis depuis plusieurs années que les éléments cellulaires du microenvironnement (fibroblastes, cellules souches / stromales mésenchymateuses, cellules immunitaires, cellules endothéliales) participent à la cascade d'événements permettant dans un premier temps une transformation tumorale et dans un second temps la dissémination métastatique. Notre étude apporte des éléments nouveaux sur le rôle du stroma, dans le contexte du cancer du sein héréditaire et sur de possibles développements thérapeutiques ciblant le stroma avec une mutation du gène *BRCA1*.

Ce manuscrit se compose de cinq grandes parties. Les trois premières sont consacrées à l'étude bibliographique. La première partie abordera la physiologie de la glande mammaire, le cancer du sein, ses caractéristiques et nous nous intéresserons au gène suppresseur de tumeur *BRCA1* impliqué dans les cancers du sein héréditaires. Puis nous étudierons dans une deuxième partie le microenvironnement tumoral et ses différents composants, les processus de transition épithéliomésenchymateuse et d'angiogenèse ainsi que leurs contributions dans la cancérogenèse. Enfin dans une troisième partie, nous parlerons de la technologie des cellules souches pluripotentes induites et détaillerons les caractéristiques des cellules souches / stromales mésenchymateuses. A la suite de cette étude bibliographique, nous exploiterons les résultats obtenus et terminerons par une discussion générale.

Partie I

Le cancer du sein

A. Rappels physiologiques et épidémiologie

1. Structure anatomique du sein

D'un point de vue anatomique, le sein se compose d'une glande mammaire entourée par du tissu conjonctif et du tissu adipeux, qui confèrent au sein sa morphologie (**Figure 1**). Un réseau vasculaire sanguin et lymphatique est également présent.

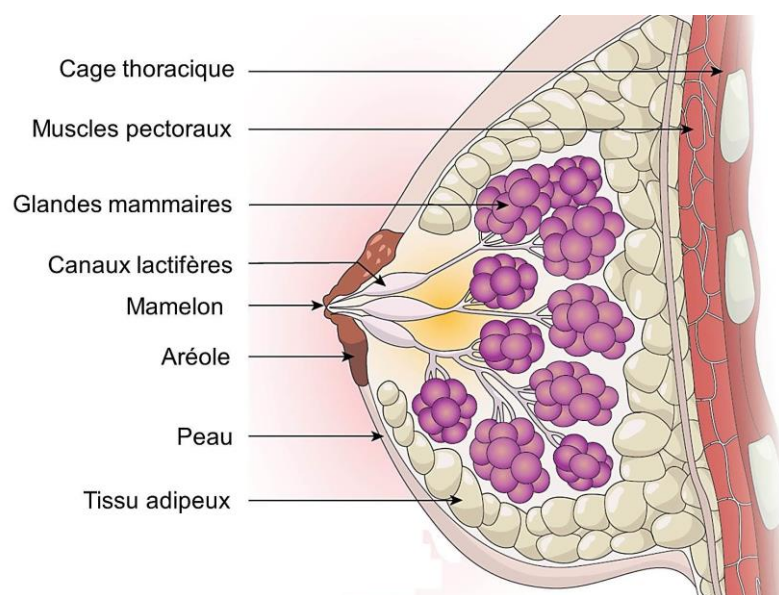


Figure 1 : Coupe sagittale d'un sein et sa structure anatomique.

La glande mammaire comprend quinze à vingt lobes, eux-mêmes constitués de lobules capables de sécréter du lait en période d'allaitement (**Figure 2**). En effet, la fonction biologique de cet organe est de produire du lait afin de nourrir un nouveau-né. Ce lait est fabriqué par les cellules des alvéoles composant les lobules et est ensuite transporté par les canaux lactifères (ou galactophores) jusqu'au mamelon, situé au centre d'une zone pigmentée, l'aréole.

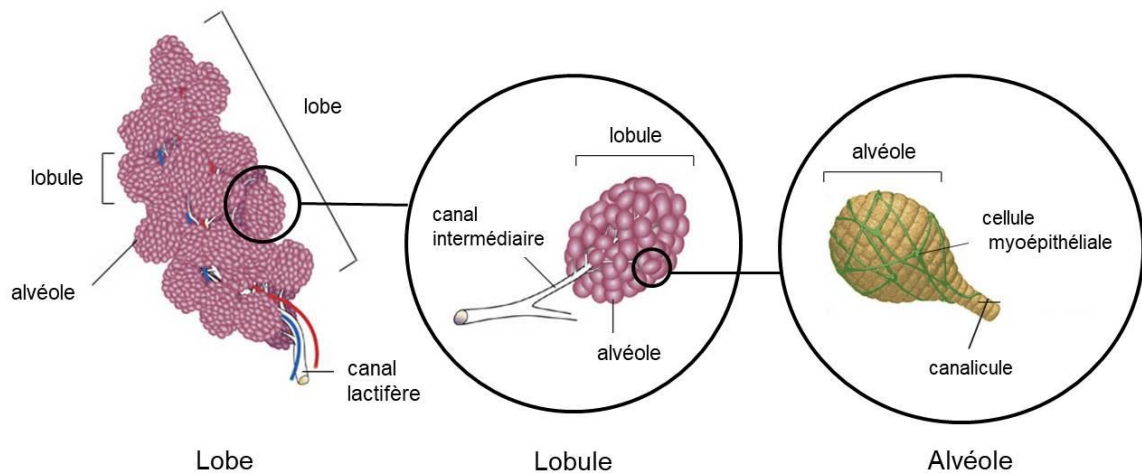


Figure 2 : Structure d'un lobe mammaire. (Adapté de S. Verbeke, 2010 [1]).

2. Développement de la glande mammaire

La glande mammaire est une glande exocrine qui présente plusieurs aspects au cours de la vie, selon le statut hormonal de l'individu. Son développement, comme son fonctionnement sont donc sous contrôle de plusieurs hormones.

Au stade embryonnaire, un motif de base de la glande mammaire, commun aux deux sexes, se développe au cours de la 4^e semaine à partir de l'ectoderme. Un bourgeon mammaire primaire se forme de chaque côté du thorax et va émettre plusieurs bourgeons mammaires secondaires. Ceux-ci vont se ramifier et se différencier en cellules sécrétrices et myoépithéliales. À la naissance, la structure de la glande mammaire est inachevée et reste au repos jusqu'à la puberté. Cette glande ne deviendra fonctionnelle chez la femme qu'au moment de la lactation.

C'est à la puberté que les modifications morphologiques sont les plus visibles chez la femme. Sous l'influence des sécrétions hormonales (œstrogènes et progestérone) provenant des ovaires, on observe une croissance et une multiplication des canaux galactophores. Durant chaque cycle menstruel, les seins subissent des fluctuations selon les variations des concentrations plasmatiques d'œstrogènes et de progestérone. Ces variations restent minimes, car la suite du développement mammaire reprendra et s'achèvera lors de la première grossesse avec l'élaboration des structures permettant la lactation.

La **Figure 3** présentée ci-dessous montre les principales étapes du développement de la glande mammaire et les hormones impliquées dans les transitions entre les différentes étapes.

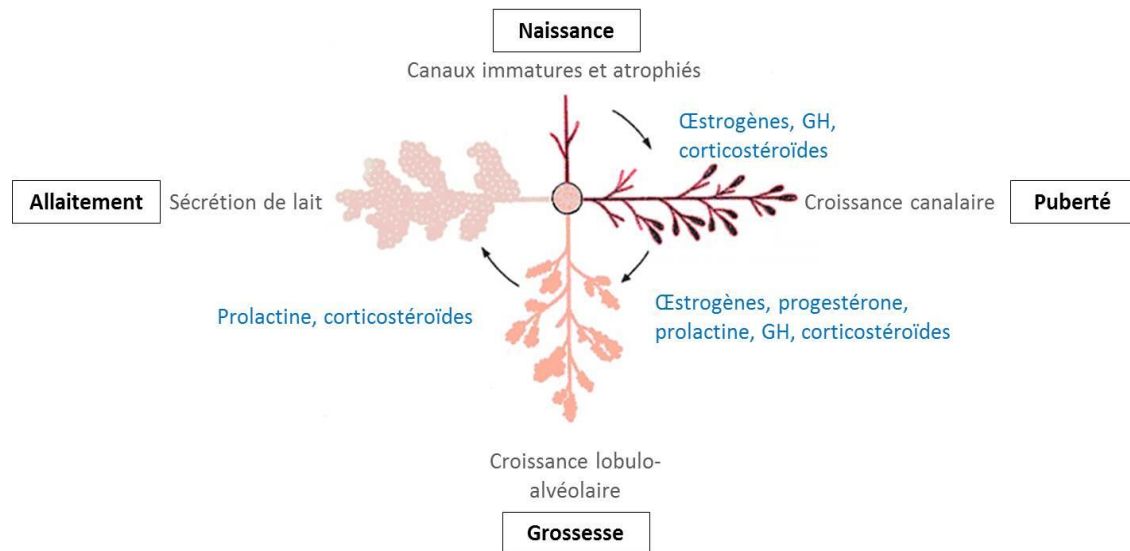


Figure 3 : Schéma représentant les différentes étapes du développement de la glande mammaire. (Adapté de CR Austin & RV Short, 1982, *Cambridge University Press* [2]).

Durant la grossesse, le sein se prépare à la lactation. Les œstrogènes, la progestérone, la prolactine et les corticoïdes induisent une forte activité proliférative des cellules épithéliales lobulaires et une accumulation du matériel sécrétoire dans ces mêmes cellules. Le volume des glandes mammaires subit alors une augmentation transitoire mais la lactation reste inhibée par la progestérone jusqu'à l'accouchement. Ce dernier provoque un nouveau changement du statut hormonal : la prolactine va stimuler la synthèse et la sécrétion du lait, tandis que l'ocytocine stimule la contraction des cellules myoépithéliales permettant l'éjection du lait dans les canaux galactophores. Au moment du sevrage ou en l'absence d'allaitement, la glande mammaire involue : l'activité sécrétoire cesse, la glande retourne à un état peu différencié et reste au repos (ne subissant plus que de légères modifications liées au cycle) jusqu'à la grossesse suivante. Enfin, lors de la ménopause, les lobules s'atrophient par manque de soutien hormonal et sont progressivement remplacés par du tissu adipeux.

La **Figure 4** présentée ci-dessous résume chez la souris les quatre principaux stades que nous venons de décrire. On peut voir le développement canalaire et lobulaire au cours de la gestation, puis le gonflement des lobules dû à la présence de lait en période d'allaitement et enfin l'involution, qui marque l'arrêt de l'activité sécrétoire.

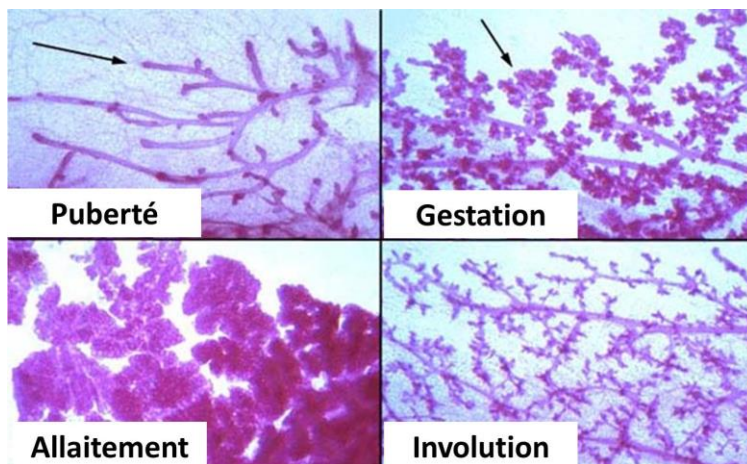


Figure 4 : Micrographies d'une glande mammaire murine à différents stades de maturité.
(Adapté de C. Brisken, 2002, *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* [3]).

B. Cancer du sein

1. Données épidémiologiques

Aujourd'hui, le cancer constitue l'une des problématiques majeures de santé publique. La survenue des cancers est en augmentation régulière, d'une part à cause de l'accroissement et du vieillissement de la population, et d'autre part en raison d'une augmentation de la prévalence de facteurs de risques connus (tabagisme, surpoids, manque d'activité physique) [3]. En revanche, les taux d'incidence et de mortalité varient selon le type de cancer, le sexe et la région étudiée.

D'un point de vue mondial, le cancer du sein est de loin le plus fréquent chez les femmes avec 1,7 millions de cas et plus de 500 000 décès estimés pour 2012 [4]. Il s'agit du premier cancer en termes d'incidence dans le monde et il se place en 5^{ème} position des causes de décès par cancer. En France, avec environ 54 000 nouveaux cas et 12 000 décès par an, le cancer du sein se situe au 2^{ème} rang des cancers et au 3^{ème} rang de la mortalité par cancer. Chez la femme, Il s'agit du cancer le plus

fréquent et de la première cause de mortalité par cancer. L'incidence de ce cancer a beaucoup augmenté entre 1980 et 2000 et est en diminution depuis 2005. La mortalité est restée relativement stable jusqu'en 1995, puis a diminué significativement jusqu'en 2012 (**Figure 5**) [5,6]. Les données actuelles estiment qu'une femme sur neuf sera touchée par cette maladie au cours de sa vie.

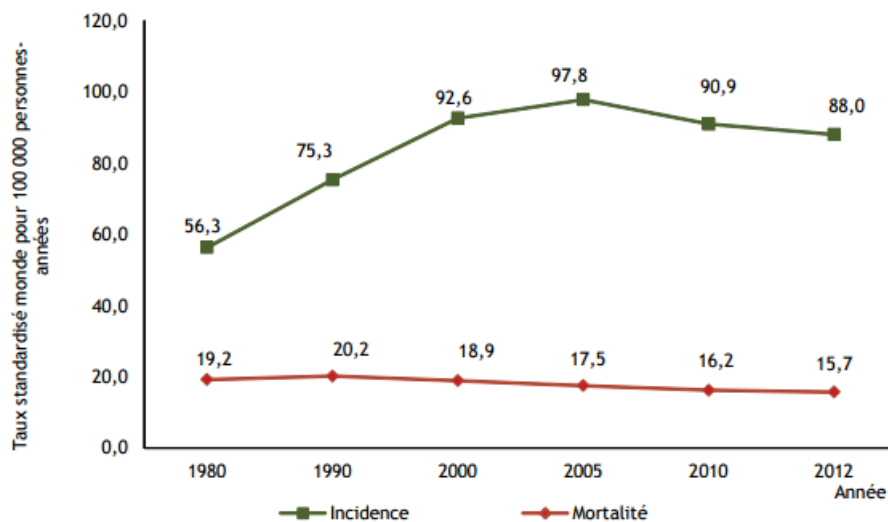


Figure 5 : Evolution de l'incidence et de la mortalité (taux standardisé monde) par cancer du sein entre 1980 et 2012. (D'après F. Binder-Foucard, 2013, INVS [5]).

L'âge moyen au diagnostic est de 63 ans (2012) et le taux de survie à 5 ans après diagnostic est de 87 %, celui à 10 ans est de 76 %. La France se situe parmi les pays avec les taux de survie les plus élevés d'Europe.

2. Notions générales

a. Acquisitions des caractéristiques cancéreuses

Le cancer se définit comme une maladie provoquée par la transformation et la prolifération excessive de cellules, liées à un échappement aux mécanismes de régulation qui assurent l'homéostasie de l'organisme. Les cellules cancéreuses forment une masse appelée tumeur qui se développe en envahissant puis détruisant les zones qui les entourent. Elles sont également capables de se détacher de la

tumeur, de migrer à travers les vaisseaux sanguins et lymphatiques et de s'implanter à distance, formant une ou plusieurs tumeurs secondaires (métastases).

Ce phénomène complexe se réalise en plusieurs étapes et passe par l'acquisition de nombreuses modifications génétiques et épigénétiques. L'organisme assure un contrôle strict et permanent de ses fonctions et de ses composants. Les cellules reçoivent donc de nombreux signaux, contrôlant notamment leur croissance, leur prolifération et leur métabolisme. Les modifications génétiques acquises progressivement vont aboutir à la transformation de cellules normales en cellules cancéreuses plus ou moins invasives. Les cellules cancéreuses deviennent partiellement indépendantes des différents signaux de régulation et vont présenter de nouvelles caractéristiques, qui leur conféreront un avantage sélectif (**Figure 6**). Ces changements sont regroupés en dix grandes « signatures » (*hallmarks*) : autosuffisance en facteurs de croissance et capacité de prolifération illimitée, combinées à une résistance aux signaux antiprolifératifs et à la mort cellulaire, la capacité à envahir les tissus, à induire une angiogenèse, à échapper au système immunitaire et à modifier le métabolisme ; tout ceci en présentant une inflammation pro-tumorigénique et une instabilité génomique favorisant les mutations [7].

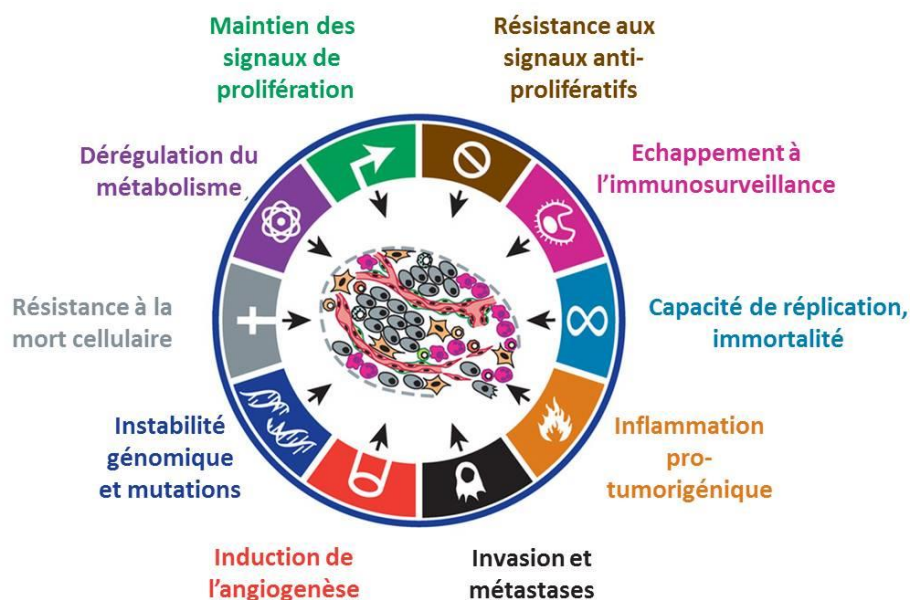


Figure 6 : Caractéristiques de la cellule cancéreuse. (Adapté de D. Hanahan et RA Weinberg, 2011, *Cell* [7]).

b. Particularités du cancer du sein

L'oncogenèse mammaire est initiée lorsqu'une cellule normale subit une (ou plusieurs) mutation(s) qui la transforme(nt) et qui contribue(nt) aux différentes étapes de la progression tumorale. Un stade préliminaire à la cancérisation est défini par l'hyperplasie. Elle correspond à une prolifération excessive des cellules épithéliales, faisant apparaître un tissu ayant un nombre anormalement élevé de cellules de morphologie normale. On parle d'hyperplasie atypique lorsque ce sont les cellules malignes qui prolifèrent avec une perte de certaines caractéristiques propres à la cellule saine dont elles proviennent. Ainsi, des modifications morphologiques apparaissent, l'intensification de leur prolifération et l'acquisition d'un caractère plus indifférencié témoignent d'une perte partielle ou totale de leur fonction dans l'organisme.

Les cancers du sein se développent à partir des canaux (cancers canaux) ou des lobules (cancers lobulaires) de la glande mammaire. On les distingue en deux grandes catégories:

- les cancers « *in situ* », lorsque les cellules cancéreuses restent confinées dans la lumière des canaux et lobules. La membrane basale est intacte et les tissus avoisinants sains. Ils représentent 25 % des cas et 80 % sont d'origine canalaire ;
- les cancers « infiltrants » ou « invasifs », lorsque les cellules cancéreuses traversent la membrane basale et se retrouvent dans le tissu avoisinant. Ils représentent 75 % des cas et sont généralement canaux (75 %). Les cellules malignes peuvent alors se propager dans l'organisme via les vaisseaux sanguins et lymphatiques et former des métastases. Les principaux organes touchés par les métastases issues de ce cancer sont le foie, les os et les poumons.

La **Figure 7** illustre différents stades d'un cancer canalaire à partir d'un état normal jusqu'au stade métastatique et montre l'importance de la membrane basale au cours de cette évolution.

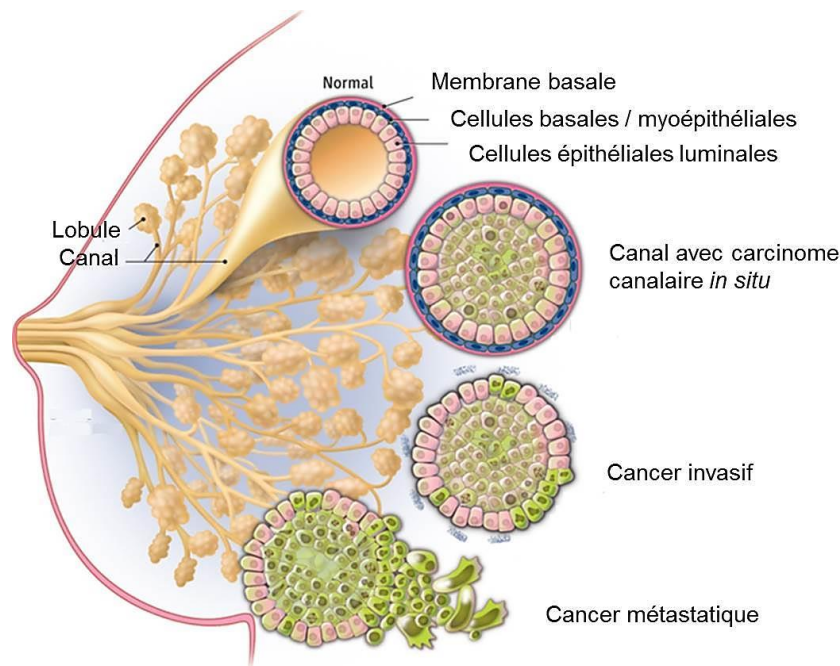


Figure 7 : Coupe sagittale d'une glande mammaire présentant les différents stades de prolifération cellulaire au cours de l'évolution d'un cancer canalaire. (Adapté de E. Marshall, 2014, *Science* [8]).

c. Facteurs de risque

Plusieurs facteurs de risque spécifiques à ce cancer sont connus : l'âge (l'incidence augmente après 30 ans), les antécédents familiaux en rapport avec les gènes *BRCA1* ou *BRCA2*, les facteurs hormonaux (ménarche précoce, avant 12 ans ; ménopause tardive, après 50 ans ; femme nulligeste ou ayant eu des grossesses tardives après 35 ans, absence d'allaitement), les antécédents d'hyperplasie atypique mammaire, l'exposition à des radiations ionisantes chez l'enfant ou l'adolescent, l'obésité et les facteurs alimentaires. La présence d'une mutation sur l'un des deux gènes de prédisposition fait passer le risque d'apparition d'un cancer de 50 à 80 % contre 10 % dans la population générale. Le rôle des contraceptifs oraux et des traitements hormonaux substitutifs de la ménopause reste débattu.

Soulignons que les cancers du sein existent aussi chez l'homme, même s'ils restent exceptionnels (moins de 1 % des cas de cancers du sein). En effet, les hommes possèdent également des seins mais leurs glandes mammaires ne sont pas développées. La plupart des hommes atteints présentent un carcinome canalaire

infiltrant avec une surexpression des récepteurs hormonaux. Les symptômes, l'évolution de la maladie et la prise en charge sont sensiblement identiques à ceux chez les femmes. Certains facteurs de risque sont connus comme l'âge (généralement après 60 ans), les antécédents familiaux de cancer du sein, l'exposition aux rayonnements et un taux élevé en œstrogènes, pouvant être dû au syndrome de Klinefelter ou à une atteinte hépatique. De la même manière que chez la femme, on note l'existence d'une prédisposition génétique, puisqu'environ 15 % des cancers du sein chez l'homme sont liés à une mutation héréditaire des gènes *BRCA1* et 2 (12% pour *BRCA2* et 1% pour *BRCA1*) [9,10].

d. Aspects cliniques, diagnostiques et thérapeutiques

Les cancers du sein entraînent peu de signes cliniques durant les premiers stades de leur développement. A un niveau plus avancé, ils peuvent être responsables de grosseurs ou d'induration au niveau du sein ou de l'aisselle, de déformation, d'ulcération ou de rétractation de la peau ou encore d'écoulement anormal au niveau du mamelon. C'est la raison pour laquelle un suivi gynécologique régulier avec palpation est recommandé à toutes les femmes afin de surveiller le risque de maladies bénignes ou malignes. Dans le cadre du premier Plan Cancer (2003/2007), les pouvoirs publics ont généralisé le dépistage organisé du cancer du sein sur l'ensemble du territoire. Ainsi, toutes les femmes âgées de 50 à 74 ans sont invitées à se faire dépister (examen des seins et mammographie avec double lecture) tous les 2 ans. Ce dépistage permet de détecter des anomalies précoces de petite taille et d'assurer une prise en charge rapide.

La prise en charge d'un cancer du sein dépend de sa nature, de sa localisation et de son stade d'avancement. Selon les cas, les traitements peuvent avoir différents objectifs : supprimer la tumeur ou les métastases, réduire le risque de récurrence, ralentir le développement tumoral ou métastatique, ou encore améliorer le confort et la qualité de vie en traitant les symptômes engendrés par la maladie. Deux grands types de traitements coexistent : les traitements locorégionaux (chirurgie et radiothérapie) et les traitements systémiques (chimiothérapie, hormonothérapie et thérapies ciblées). La chirurgie constitue le traitement de référence de la plupart des cancers du sein et est complétée par une exploration ganglionnaire axillaire, afin de

déterminer l'étendue du cancer. La radiothérapie est généralement appliquée après la chirurgie afin de détruire d'éventuelles cellules tumorales résiduelles et diminuer le risque de récurrence locale. Les traitements systémiques sont établis en tenant compte des caractéristiques du cancer. La chimiothérapie associe souvent plusieurs molécules (inhibiteurs de topoisomérase II, antimétabolites, alkylants, antimitotiques) selon un protocole bien défini. La forte expression des récepteurs hormonaux va conduire à une hormonothérapie (anti-estrogènes, anti-aromatases), tandis que celle d'HER2 (*Human Epidermal growth factor receptor 2*) oriente sur une thérapie ciblée (trastuzumab, lapatinib).

2. Cancer du sein et hérédité

a. Les mutations observées

Une origine héréditaire est suspectée lorsqu'un même type de tumeur est retrouvé chez plusieurs membres proches d'une famille (fratrie, ascendance et descendance directe), souvent à un âge précoce. Les cancers du sein héréditaires représentent 5 à 10 % de l'ensemble des cancers du sein, tandis que les 90 à 95 % autres sont dits sporadiques [11]. Parmi ces cancers héréditaires, les mutations des gènes *BRCA1* et *BRCA2* représentent 20% des cas et sont responsables de nombreuses altérations cellulaires et génétiques de par leur implication dans la réparation de l'ADN notamment [12–14]. Leur transmission se fait selon un mode autosomique dominant.

Les gènes *BRCA1* et *BRCA2* ont été décrits respectivement en 1994 et 1995. Ils sont localisés sur deux chromosomes différents et ne partagent qu'une faible homologie structurale. Ils participent tous les deux à la réparation de l'ADN suite à une cassure double brin et leur délétion totale chez la souris entraîne une létalité embryonnaire [15]. Les femmes porteuses d'une mutation de *BRCA1* ou *BRCA2* ont 50 à 80% de risques de développer un cancer du sein au cours de leur vie. Ce risque est également augmenté pour les cancers de l'ovaire : 10-40 % pour *BRCA1* et 10-20% pour *BRCA2* [16]. En plus d'avoir un risque plus élevé de développer un cancer du sein, l'âge médian de survenue est plus précoce pour les patientes porteuses d'une mutation puisqu'il est de 40 ans pour *BRCA1* et de 43 ans pour *BRCA2*.

D'autres gènes de susceptibilité responsables de formes familiales de cancers du sein ont été décrits. L'ensemble de leurs mutations n'explique qu'1% des cas et l'on distingue plusieurs classes selon le risque conféré (le risque cumulé au cours de la vie est appelé « pénétrance ») et la fréquence des mutations identifiées [17]. Il s'agit des gènes *TP53*, *PTEN*, *CDH1* et *STK11* ayant la plus forte pénétrance et de *CHEK2*, *BRIP1*, *ATM* et *PALB2* ayant une pénétrance modérée [16,17]. Ces gènes sont impliqués dans la réparation de l'ADN ou la mort cellulaire. Les mutations somatiques de *TP53* sont plus fréquentes dans les cancers du sein avec une mutation de l'un des *BRCA* et le spectre des mutations observées est différent de celui des formes sporadiques [18].

b. *BRCA1* versus *BRCA2*

Les caractéristiques des cancers du sein diffèrent selon qu'ils sont liés à *BRCA1* ou *BRCA2*. Les cancers associés à *BRCA1* sont majoritairement de type basal, c'est-à-dire indifférenciés et donc plus agressifs. Ils sont généralement de haut-grade et triples négatifs (RE⁻, RP⁻ et HER2⁻), c'est-à-dire qu'ils expriment ni les récepteurs hormonaux (RE : récepteurs des œstrogènes, RP : récepteur de la progestérone), ni HER2 [19,20]. En revanche, les tumeurs associées à *BRCA2* sont moins spécifiques et comptent une majorité de cancers exprimant les RE [16]. Les cancers de l'ovaire apparaissent plus précocement et avec une fréquence plus élevée en cas de mutation de *BRCA1*. Chez l'homme, le risque cumulé d'avoir un cancer du sein est d'environ 1% pour les porteurs d'une mutation de *BRCA1* et d'environ 7% pour ceux ayant une mutation de *BRCA2* [21]. La mutation de *BRCA2* est également associée à un risque augmenté de cancers du pancréas, de la prostate et de mélanomes [22,23].

3. Classifications des cancers du sein

a. Classification TNM

Afin d'évaluer l'avancée d'un cancer, le corps médical utilise la classification TNM, outil standardisé et régulièrement mis à jour par l'*American Joint Committee on Cancer* (AJCC). Cette classification prend en compte trois éléments désignés par les

lettres suivantes : T (*tumor*) correspond à la taille de la tumeur, N (*node*) indique s'il y a une atteinte ganglionnaire et M (*metastasis*) précise la présence ou non de métastase(s). Chacune de ces lettres est accompagnée d'un chiffre rendant compte de l'extension de cet élément. L'association de ces trois éléments permet de définir des stades (du stade 0 au stade IV), caractérisant de manière plus précise la maladie et permettant d'apporter une indication pronostique. Le **tableau 1** résume les différents stades décrits par l'UICC (Union Internationale Contre le Cancer) pour le cancer du sein [24].

Le système TNM distingue le stade pré-thérapeutique, noté cTNM, obtenu par un examen clinique et le stade anatomopathologique, noté pTNM, obtenu après une analyse post-chirurgicale. Une réévaluation du stade est donc possible après la chirurgie si les caractéristiques observées diffèrent de celles de l'examen clinique. Les **annexes 1** et **2** présentent la description de la dernière classification TNM (2010) et son illustration schématique.

b. Grade histopronostique

L'analyse post-chirurgicale permet également de définir un grade après l'examen d'un échantillon de la tumeur. Originellement appelée classification de Scarff, Bloom et Richardson (SBR), elle a été adaptée par CW Elston et IO Elis. Trois paramètres histologiques sont ainsi évalués : l'architecture cellulaire (apparence des cellules cancéreuses), la forme du noyau et l'activité mitotique (nombre de cellules en division). Une note allant de 1 à 3 est attribuée à chaque paramètre et la somme des trois notes correspond au grade. Le grade I (bas grade) correspond aux tumeurs les moins agressives avec des cellules cancéreuses bien différenciées et semblables aux cellules normales (scores 3,4 et 5), le grade II (grade intermédiaire) correspond aux tumeurs intermédiaires (scores 6 et 7) et le grade III (haut grade) aux tumeurs les plus agressives avec des cellules peu différenciées ou indifférenciées (scores 8 et 9). C'est dans ce dernier grade que se situent la majorité des tumeurs BRCA1-muté.

Comme pour la classification TNM, la définition du grade est importante pour le choix d'un traitement adjuvant à la chirurgie et établir un pronostic.

Stade UICC	TNM			Description
Stade 0	Tis	N0	M0	Cancer <i>in situ</i> – confiné aux canaux, aux lobules ou au mamelon Pas d'envahissement ganglionnaire Absence de métastase
Stade I	T1	N0	M0	Tumeur ≤ 2 cm de diamètre Pas d'envahissement ganglionnaire Absence de métastase
Stade IIA	T0	N1	M0	Absence de tumeur dans le sein Atteinte de 1 à 3 ganglions axillaires Absence de métastase
	T1	N1	M0	Tumeur ≤ 2 cm de diamètre Atteinte de 1 à 3 ganglions axillaires ou mammaires internes ou les deux Absence de métastase
	T2	N0	M0	2 cm < tumeur ≤ 5 cm Pas d'envahissement ganglionnaire Absence de métastase
Stade IIB	T2	N1	M0	2 cm < tumeur ≤ 5 cm Atteinte de 1 à 3 ganglions axillaires ou mammaires internes ou les deux Absence de métastase.
	T3	N0	M0	Tumeur > 5 cm Pas d'envahissement ganglionnaire Absence de métastase
Stade IIIA	T0	N2	M0	Absence de tumeur dans le sein Atteinte de 4 à 9 ganglions axillaires ou mammaires internes Absence de métastase
	T1	N2	M0	Tumeur ≤ 2 cm Atteinte de 4 à 9 ganglions axillaires ou mammaires internes Absence de métastase
	T2	N2	M0	2 cm < tumeur ≤ 5 cm Atteinte de 4 à 9 ganglions axillaires ou mammaires internes ou les deux Absence de métastase
	T3	N1, N2	M0	Tumeur > 5 cm Atteinte de 4 à 9 ganglions axillaires ou mammaires internes ou les deux Absence de métastase
Stade IIIB	T4	N0, N1, N2	M0	La tumeur s'est propagée à la paroi thoracique ou à la peau L'un des énoncés suivants s'applique : - pas d'envahissement ganglionnaire - atteinte de 1 à 9 ganglions axillaires - atteinte possible des ganglions mammaires internes Absence de métastase
Stade IIIC	Tout T	N3	M0	Toute taille de tumeur L'un des énoncés suivants s'applique : - atteinte d'au moins 10 ganglions axillaires - atteinte d'au moins 1 ganglion infraclaviculaire ou sus-claviculaire - atteinte d'au moins 3 ganglions axillaires ou ganglions mammaires internes Absence de métastase
	T4d			Caractère inflammatoire
Stade IV	Tout T	Tout N	M1	N'importe quelle taille de tumeur N'importe quel degré d'atteinte ganglionnaire Présence de métastase (os, foie, poumon, cerveau, ganglions lymphatiques éloignés)

Tableau 1 : Présentation des différents stades de cancers du sein en fonction du score TNM et description des atteintes présentes.

c. Classification moléculaire

Le terme « cancer du sein » regroupe en réalité plusieurs maladies hétérogènes avec des caractéristiques biologiques, cliniques et moléculaires différentes. Cette hétérogénéité pose plusieurs problèmes, non seulement dans la prise en charge du cancer du sein (variations dans la réponse aux traitements et dans le devenir des patients), mais aussi dans l'étude de la biologie de la pathologie. Les données cliniques sont systématiquement complétées par des analyses histologiques, recherchant l'expression des récepteurs hormonaux (œstrogènes et progestérone), ainsi que celle d'HER2. Ces éléments permettent de sélectionner un traitement adapté au type de cancer et de prédire un pronostic [25,26].

Plus récemment, le développement des techniques d'analyses génomiques à haut débit comme les puces à ADN a permis d'affiner la classification des cancers infiltrants sur le plan moléculaire et de dégager de nouveaux facteurs pronostiques et prédictifs.

Les travaux de CM Perou et T. Sorlie proposent un « portrait moléculaire » des cancers du sein et identifient 5 sous-types intrinsèques, sur la base de l'expression transcriptionnelle d'environ 500 gènes : luminal A, luminal B, HER2, *basal-like* et *normal-like* [27,28]. Ils ont ensuite été corrélés aux marqueurs déjà utilisés et associés à un facteur pronostic (**Tableau 2 et Figure 8**).

Sous-type	Statut IHC	Grade	Pronostic	Prévalence
Luminal A	[RE+ RP+] HER2- KI67-	1 2	Bon	23,7 %
Luminal B	[RE+ RP+] HER2- KI67+	2 3	Intermédiaire	38,8 %
	[RE+ RP+] HER2+ KI67+		Mauvais	14 %
Surexpression HER2	[RE- RP-] HER2+	2 3	Mauvais	11,2 %
Basal	[RE- RP-] HER2- marqueur basal +	3	Mauvais	12,3 %
<i>Normal-like</i>	[RE+ RP+] HER2- KI67-	1 2 3	Intermédiaire	7,8 %

Tableau 2 : Caractéristiques des sous-types moléculaires des cancers du sein. (Adapté de X. Dai, 2015, *American Journal of Cancer Research* [25]).

Les cancers de type luminal se développent à partir des cellules épithéliales des canaux ou des lobules (cellules luminales). Ce sont les formes les plus fréquentes de cancer du sein et se divisent en deux sous-groupes : luminal A et B. Les deux sous-groupes expriment les récepteurs aux œstrogènes (fortement pour le

A et plus faiblement pour le B) et/ou à la progestérone. Le sous-type B présente une prolifération (KI67+) plus importante que le A et est de moins bon pronostic. Il peut aussi présenter une surexpression d'*HER2*. Les cancers *HER2* présentent une surexpression du gène *HER2*, entraînant une prolifération cellulaire accrue. Ils sont négatifs pour les récepteurs hormonaux, généralement de mauvais pronostic, mais bénéficient de thérapies ciblées. Le sous-type basal a un profil d'expression mimant celui qui existe dans les cellules basales mammaires normales. Il est caractérisé par l'absence d'expression des récepteurs hormonaux et d'*HER2*, c'est pourquoi on parle de cancer triple négatif. En revanche, ces cancers expriment fortement certains marqueurs basaux (cytokératines 5, 6, 14, 17, EGFR) et sont souvent associés aux mutations de *TP53* et *BRCA1*. Ce sont les cancers ayant le plus mauvais pronostic.

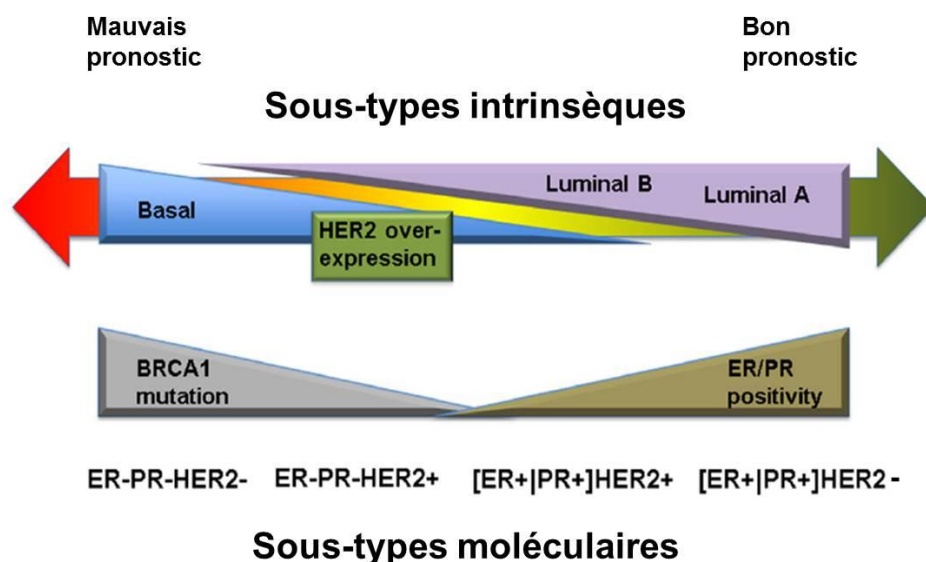


Figure 8 : Corrélation entre les sous-types intrinsèques et moléculaires des tumeurs du sein. (Adapté de X. Dai, 2015, *American Journal of Cancer Research* [25]).

Par l'utilisation de ces techniques d'analyses génomiques les auteurs ont proposé une correspondance entre la diversité phénotypique des cancers du sein observée en clinique et celle des profils d'expression génique. Les portraits moléculaires ainsi obtenus ont non seulement révélé des similitudes et des différences entre les tumeurs, mais ont aussi été corrélés à une interprétation biologique [27]. Le projet TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) a été mis en place dans le but d'accélérer la compréhension des bases moléculaires du cancer grâce à l'application des technologies d'analyse du génome, y compris le séquençage à grande échelle. L'analyse de plus de 800 tumeurs mammaires à l'aide de six

techniques différentes (variation du nombre de copies d'ADN, méthylation de l'ADN, séquençage de l'exome, réseau d'ARN messenger, séquençage des micro-ARNs et puces protéiques en phase reverse) a permis de préciser les profils mutationnels des sous-types décrits précédemment. Il en est notamment ressorti que seulement trois gènes (*TP53*, *PIK3CA*, *GATA3*) présentent des mutations somatiques dont l'incidence est supérieure à 10% dans tous les cancers du sein [29]. Les deux sous-types luminaux sont les plus hétérogènes en termes d'expression génique, de spectre mutationnel et de devenir chez le patient. Le sous-type luminal A présente les gènes les plus significativement mutés, le plus fréquent étant *PIK3CA* (45%), suivi de *MAP3K1*, *GATA3*, *TP53* et *CDH1*. Les gènes *TP53* et *PIK3CA* sont les plus fréquemment mutés (29% chacun) pour les tumeurs lumineuses B. La mutation de *TP53* apparaît dans 80% des cas de cancers de type basal. Celle de *PIK3CA* représente moins de 10% et l'on observe des mutations fréquentes de *TP53* (72%) et *PIK3CA* (39%) dans le sous-type HER2 [29].

Comme nous venons de le voir, les cancers du sein présentent une diversité génétique très forte, due à des variations génétiques héréditaires et à des aberrations génomiques acquises. La définition des cinq sous-types précédents a été complétée avec l'analyse des données génomiques et transcriptomiques de plus de 2000 tumeurs via le projet METABRIC (*Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium*) qui a permis d'affiner encore plus cette classification. Ce sont ainsi 10 nouveaux sous-groupes, basés sur des caractéristiques génétiques communes, qui sont ressortis de cette étude [30,31]. Certaines tumeurs sporadiques partagent des similitudes avec des cancers héréditaires liés à *BRCA1/2*. Ce phénotype spécifique est appelé « BRCAness » [32,33]. Il est associé à la survenue précoce d'un cancer, généralement de haut grade et décrit une situation pour laquelle il existe un défaut de réparation de l'ADN en l'absence d'une mutation germinale de *BRCA1* ou *BRCA2* [34]. La majorité des cancers du sein triple négatifs présentent ce profil de « BRCAness » et une meilleure identification de celui-ci pourrait permettre la sélection de thérapies appropriées [33,34].

Cette classification moléculaire souligne bien l'hétérogénéité des cancers du sein. La poursuite des descriptions et l'amélioration de la classification permettront

de définir de nouveaux sous-groupes plus restreints et d'envisager des approches thérapeutiques liées aux caractéristiques de ces sous-groupes.

4. Hétérogénéité intratumorale

Au cours de l'évolution tumorale, une hétérogénéité cellulaire se met en place à travers la combinaison d'altérations génétiques et d'événements épigénétiques. Cette hétérogénéité récapitule les processus de développement normaux, incluant l'auto-renouvellement des cellules souches et leur différenciation. La plupart des tumeurs montrent ainsi une organisation hiérarchique similaire, au sommet de laquelle on retrouve des cellules souches qui stimulent la croissance tumorale, induisent des métastases et contribuent à la résistance aux traitements. Cette hétérogénéité illustre l'existence de nombreux sous-clones au sein des tumeurs [35].

Les sous-types moléculaires précédemment décrits proviennent de cellules situées à différents niveaux de la hiérarchie mammaire. Par exemple, le profil d'expression du sous-type basal révèle des similarités avec les cellules progénitrices luminales. Ces données concordent avec ce que l'on retrouve en clinique, à savoir un enrichissement en progéniteurs luminaux dans les tumeurs de patientes mutées pour *BRCA1*, généralement caractérisées par un sous-type basal [36]. Les sous-types moléculaires sont également caractérisés par des profils d'expression distincts des micro-ARN dont certains régulent les états des cellules souches cancéreuses [37].

Les altérations moléculaires (mutation de *PIK3CA* dans les cancers luminaux, de *TP53* +/- *PTEN* dans les cancers triple négatifs ou encore l'amplification d'*HER2* dans le sous-type HER2) retrouvées dans les différents sous-types de cancers du sein sont liées à une augmentation de la proportion de cellules souches cancéreuses. Ces effets ont été observés dans des modèles pré-cliniques et chez les patients [35]. La plasticité de ces cellules souches cancéreuses mammaires permet leur transition entre un état épithélial plus prolifératif et un état mésenchymateux plus quiescent et invasif. Les cellules souches cancéreuses présentes au sein d'une tumeur peuvent donc générer leurs descendances cellulaires respectives, à savoir des cellules tumorales épithéliales et

mésenchymateuses. Les proportions de ces deux états sont corrélées avec la caractérisation des sous-types moléculaires des cancers du sein [35]. Par exemple, le sous-type luminal A ne contient que des cellules tumorales épithéliales et majoritairement différenciées, ce qui explique son bon pronostic. Au contraire, le sous-type basal contient majoritairement des cellules tumorales épithéliales mais également une sous-composante de cellules tumorales mésenchymateuses et de cellules exprimant des marqueurs souches (MCSCs, Bi-CSCs et ECSCs), ce qui explique son pronostic plus défavorable (**Figure 9**).

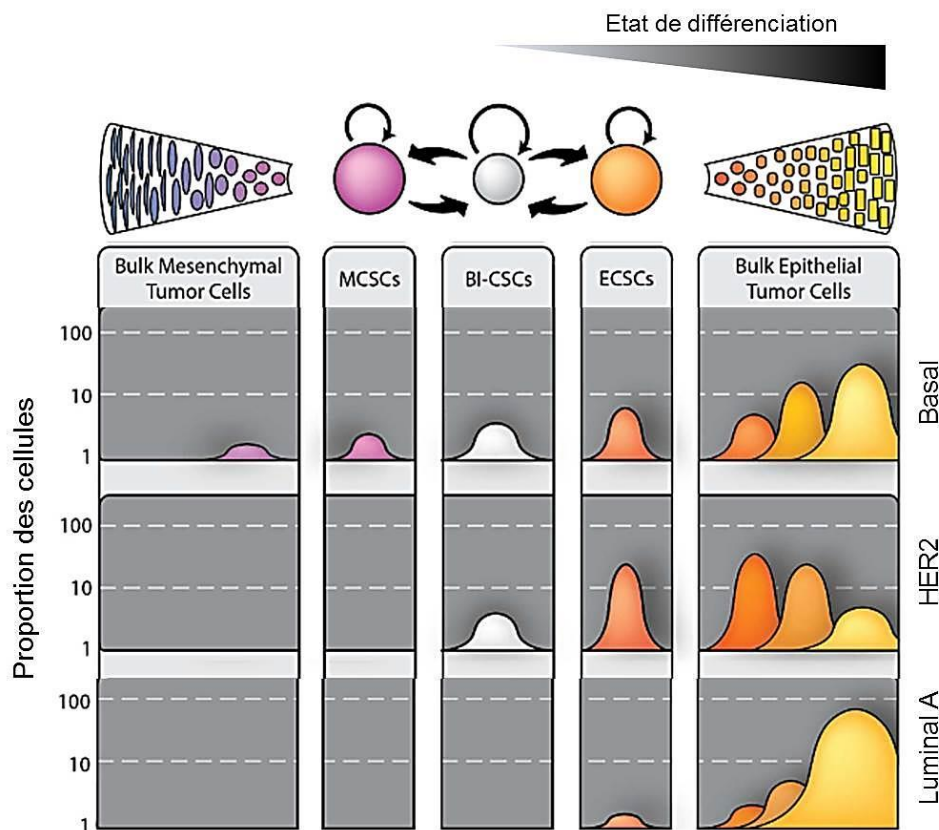


Figure 9 : Illustration des variations de populations de cellules souches cancéreuses et de leurs descendances différenciées pour les sous-types basal, HER2 et luminal A de cancers du sein. (Adapté de MD Brooks, 2015, *Cell Stem Cell* [35]).

Bi-CSCs : cellules souches cancéreuses bipotentes, MCSCs : cellules souches cancéreuses mésenchymateuses, ECSCs : cellules souches cancéreuses épithéliales.

La description de cette hétérogénéité cellulaire tumorale et de la plasticité des cellules souches cancéreuses présentes au sein des tumeurs représente un enjeu majeur dans la compréhension du développement tumoral, son évolution et la mise en place de stratégies thérapeutiques.

C. BRCA1 : un gène suppresseur de tumeur associé aux cancers du sein

1. Présentation et fonctions

a. Généralités

Le gène *BRCA1* a été identifié et cloné en 1994 par Y. Miki [14]. Il se situe sur le chromosome 17, dans la région 21 de la grande sous-unité (17q21). Sa séquence se compose de 24 exons (22 codants et 2 non-codants), donnant naissance à une protéine de 220 kb composée de 1863 acides aminés [14,15]. *BRCA1* intervient dans de nombreux processus cellulaires, tels que la prolifération, la régulation de la transcription, l'inactivation du chromosome X, la réparation de l'ADN en réponse aux dommages, la progression du cycle cellulaire et l'apoptose [38–40]. Sa présence est également indispensable lors du développement. En effet, des souris mutantes homozygotes présentent une létalité embryonnaire précoce (E7.5) due à une trop grande instabilité génomique et à l'activation de la voie p53/p21 conduisant à l'apoptose [41,42].

La protéine *BRCA1* est présente de façon ubiquitaire dans l'ensemble de l'organisme et possède une activité d'ubiquitine-ligase. Ce processus d'ubiquitinylation permet de cibler les protéines destinées à la dégradation par le protéasome. Elle peut être altérée (par des mutations ou délétions constitutives), réduite voire absente dans certaines tumeurs du sein et de l'ovaire [14]. Son niveau d'expression est modulé au cours du cycle cellulaire : on observe de faibles niveaux en phase G1, un début d'augmentation en fin de G1 et en début de S, et des niveaux importants entre la fin de la phase S et la phase G2, correspondant aux points de contrôle du cycle [15].

b. Structure protéique

La protéine se compose de quatre domaines principaux. L'extrémité N-terminale contient un domaine RING (*Really Interesting New Gene*), qui s'associe avec la protéine *BARD1* (*BRCA1 associated RING domain protein 1*) et une séquence de localisation nucléaire NLS (*Nuclear localization sequence*). La région

centrale comporte un site de phosphorylation par CHK2 (*Checkpoint kinase 2*). Enfin l'extrémité C-terminale contient trois zones distinctes : un domaine coiled-coil qui s'associe avec PALB2 (*Partner and localizer of BRCA2*), le partenaire et localisateur de BRCA2, un domaine SCD (*Serine cluster domain*) présentant une dizaine de sites de phosphorylation par ATM (*Ataxia-telangiectasia mutated*) et un domaine BRCT (*BRCA1 C Terminus domain*) se fixant aux protéines comme Abraxas, CtIP (*CtBP interacting protein*), BRIP1 (*BRCA1-interacting protein C-terminal helicase 1*) (**Figure 10**).

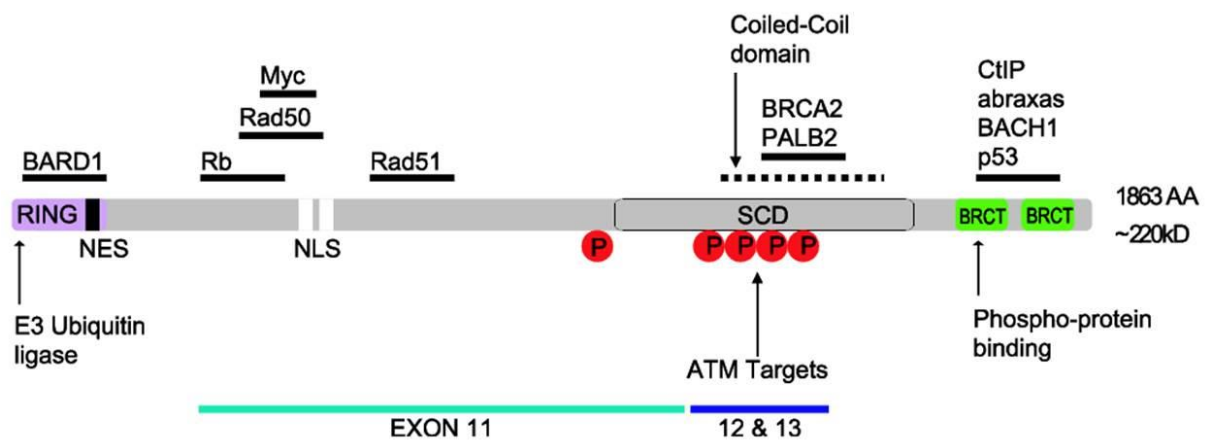


Figure 10 : Représentation des domaines protéiques de BRCA1. (D'après SL. Clark, 2012, *Computational and Structural Biotechnology Journal* [43]).

L'interaction entre BRCA1 et BARD1 se fait grâce à leurs motifs RING respectifs pour former un hétérodimère. Le complexe BRCA1–BARD1 est impliqué dans l'activation des points de contrôles du cycle cellulaire (G1/S, phase S et G2/M). Ce domaine RING est également essentiel à l'activité d'ubiquitine-ligase de la protéine.

Le domaine BRCT facilite les liaisons entre BRCA1 et d'autres protéines phosphorylées. Le complexe formé avec Abraxas permet le recrutement de BRCA1 aux sites de dommages de l'ADN. Celui formé avec BRIP1 contient une topoisomérase et est associé à la réparation de l'ADN pendant la réplication. Enfin celui formé avec CtIP permet l'activation d'ATR et de la recombinaison homologue.

Trois régions sont principalement touchées par des mutations retrouvées en clinique : le domaine RING, la partie entre les exons 11 et 13 et le domaine BRCT

[43]. Les éléments présentés ci-dessus démontrent que quelle que soit la localisation d'une mutation, celle-ci affectera le fonctionnement de la protéine. Une mutation dans le domaine RING empêchera l'interaction avec BARD1, la formation de l'hétérodimère et limitera l'activité ubiquitine-ligase. Si la NLS est touchée, la protéine restera dans le cytoplasme et ne pourra pas agir sur l'ADN dans le noyau de la cellule. De la même façon, si un ou plusieurs sites de phosphorylation sont mutés, la localisation de BRCA1 sur les lésions peut être affectée. Enfin une mutation sur le domaine BRCT peut empêcher la reconnaissance d'une protéine phosphorylée et la mise en place du complexe de réparation [44].

c. Rôle dans la réparation de l'ADN

La protéine BRCA1 est localisée au niveau nucléaire et a un grand nombre de fonctions dans la réparation de l'ADN grâce à ses domaines de liaison avec celui-ci, mais également grâce à ses nombreuses interactions avec d'autres protéines. En effet, en temps normal, BRCA1 va jouer un rôle de régulateur de la transcription sous forme de complexe protéique. En cas de dommage subi par l'ADN (cassure double brin ou liaison inter-brin), BRCA1 est rapidement phosphorylé par la protéine ATM et forme un complexe avec plusieurs partenaires dont BARD1, Rad51 et BRCA2. Ce complexe se fixe sur le site de la lésion afin de permettre la reprise du cycle si la réparation est possible ou bien conduire à l'apoptose de la cellule considérée trop endommagée. En revanche, une mutation de *BRCA1* conduit à une incapacité de réparation par le complexe protéique. Si le dommage touche un gène impliqué dans ce point de contrôle cellulaire, celui-ci ne peut être activé et la cellule poursuit sa prolifération. La conséquence étant alors de voir s'accumuler d'autres mutations, conduisant à une transformation maligne de la cellule (**Figure 11**) [45].

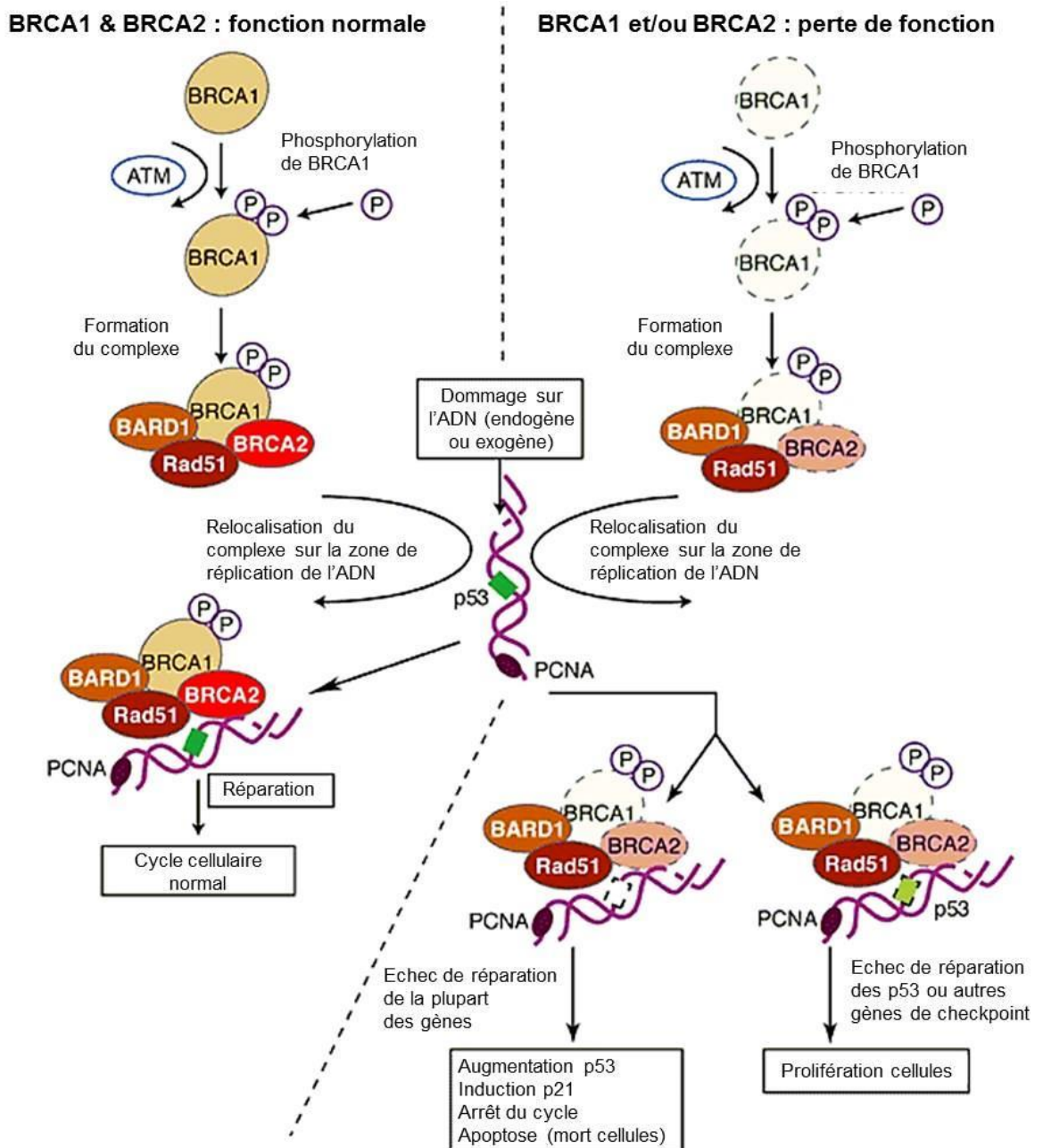


Figure 11 : Rôles de BRCA1 et BRCA2 dans la réparation de l'ADN. (Adapté de MA. Arnold [46] et reproduit de PL. Welch [45], 2000, *Trends in Genetics*).

2. BRCA1 et tissu-spécificité

Les individus porteurs d'une mutation inactivatrice de *BRCA1* ou *BRCA2* sont prédisposés à plusieurs types de cancers mais plus particulièrement aux cancers du sein et de l'ovaire. Plusieurs hypothèses ont été élaborées pour expliquer cette spécificité tissulaire.

Premièrement, le concept de redondance a été avancé comme une explication à ce phénomène. Il a été proposé que la plupart des tissus possèdent des voies alternatives exécutant la même fonction de suppresseur de tumeur que *BRCA1*. Par conséquent, la perte de *BRCA1* dans des tissus possédant de tels mécanismes aurait moins d'effet que dans le sein ou l'ovaire, qui n'ont pas ces mécanismes.

Une autre explication possible implique l'activité proliférative importante dans ces deux tissus. En absence de *BRCA1*, la prolifération cellulaire peut conduire à un taux de mutation plus élevé, augmentant ainsi le risque de mutations liées au cancer. Cependant, d'autres tissus, comme le côlon, ont des taux de prolifération élevés, mais ne présentent pas d'incidence élevée de formation tumorale chez les individus touchés par la mutation.

BRCA1 a aussi été impliqué dans la régulation de la transcription et il est possible qu'il régule certains gènes exprimés seulement dans le sein et les ovaires. L'expression altérée de ces transcrits pourrait alors conduire à une transformation néoplasique [47]. Autrement, des cofacteurs de *BRCA1*, spécifiques du sein et de l'ovaire pourraient causer une transformation en absence de *BRCA1*. Une autre équipe a proposé que *BRCA1* joue un rôle inhibiteur sur la voie de signalisation du récepteur des œstrogènes [48]. Il a d'ailleurs été montré que la majorité des tumeurs *BRCA1*^{-/-} n'expriment pas ce RE, mais il est difficile de savoir si ces tumeurs proviennent de cellules n'ayant jamais exprimé ce RE, ou bien s'il s'agit d'une perte d'expression au cours de la tumorigenèse.

L'hypothèse décrite par A. Monteiro [49] classe les effets de *BRCA1* en deux classes d'événements. L'événement proximal, incluant des mécanismes tissu-spécifiques par lesquels un gène est inactivé (de façon génétique ou épigénétique), serait une différence dans les taux de perte d'hétérozygotie (LOH) dérivée de la recombinaison mitotique au locus de *BRCA1*. Les événements « distaux » seraient ceux qui régulent le sort d'une cellule devenue *BRCA1*^{-/-} : deviendra-t-elle une cellule néoplasique ou entrera-t-elle en apoptose ? D'une part, ce phénomène de LOH est beaucoup plus fréquent dans les tissus mammaire et ovarien, contrairement à d'autres tissus et pourrait expliquer cette pénétrance plus élevée. D'autre part, la prolifération cellulaire est très élevée dans la glande mammaire, majorant ainsi le

risque de mutations. Plusieurs facteurs sont déterminants dans le phénomène de LOH, tels que le taux de recombinaison mitotique, l'environnement en chromatine (variation de l'expression de *BRCA1* à certaines étapes du développement de la glande mammaire) et la dépendance à la tumeur et au chromosome en question. Cependant à ce jour, les mécanismes de LOH restent incertains [50,51].

D'un point de vue épigénétique, la méthylation de l'ADN sur les résidus cytosines des îlots CpG est un mécanisme permettant le contrôle de l'expression génique. La région 5' du promoteur de *BRCA1* comporte de nombreux îlots CpG. Il a été montré que la méthylation de cette région est corrélée avec une expression diminuée du gène dans les cellules somatiques [52]. Cette observation a été retrouvée dans une autre étude, qui a analysé les méthylations aberrantes du promoteur de *BRCA1* dans des cancers du sein [53]. Ceci suggère que ce silence épigénétique pourrait être l'un des mécanismes de l'inactivation de la transcription de *BRCA1* dans les cancers du sein. Une méta-analyse publiée en 2013 est venue préciser ces éléments en montrant que la méthylation du gène *BRCA1* était associée à une faible survie chez des patients atteints de cancer du sein [54].

Enfin, comme *BRCA1* est un gène essentiel, sa perte conduit les cellules à la mort ou à une diminution nette de leur prolifération dans les tissus autres que le sein et l'ovaire. Ceci réduit donc la probabilité d'accumuler des mutations additionnelles conduisant à la tumorigenèse. Il se pourrait donc que, dans le sein et l'ovaire seulement, les cellules *BRCA1*⁻ soient capables de survivre suffisamment longtemps pour laisser apparaître des mutations secondaires, qui admettent la prolifération cellulaire. Ainsi, la raison pour laquelle la perte de *BRCA1* entraîne la formation de tumeurs tissu-spécifiques n'est pas la présence de moyens de réparation d'ADN ou de survie cellulaire redondants dans la plupart des tissus mais la capacité des tissus mammaire et ovarien à survivre de manière prolongée en l'absence de *BRCA1*. Cette capacité pourrait être due à des facteurs génétiques particuliers propres à ces tissus, ou bien à l'environnement physiologique (effet protecteur des hormones) [28]. Le travail de C. Gorrini a montré par exemple que les œstrogènes protégeaient des cellules déficientes pour *BRCA1* de la mort induite par des ROS (espèces réactives

de l'oxygène) via la voie PI3K/AKT. Les cellules sont donc capables de survivre et d'accumuler par la suite des mutations [55].

En conclusion, la relation entre le développement tumoral tissu-spécifique et *BRCA1* ne semble pas encore claire à ce jour, malgré les nombreuses hypothèses élaborées.

3. Etude des cancers du sein associés à *BRCA1*

Bien qu'il existe une hétérogénéité clinique, histologique et moléculaire parmi les tumeurs familiales mutées pour l'un des gènes *BRCA*, certaines caractéristiques communes existent. Nous avons vu que les cancers du sein associés à *BRCA1* sont principalement de haut grade (grade 3) et présentent une signature transcriptomique de type basal, définie par l'expression de gènes majoritairement exprimés par les cellules basales de la glande mammaire. Ce sont donc des tumeurs indifférenciées et plus agressives. D'un point de vue histologique, on retrouve des infiltrats lymphocytaires et des marges de croissance où se produit l'avancée tumorale. Ces tumeurs présentent une instabilité génomique élevée avec des délétions d'ADN fréquentes et l'on retrouve régulièrement des mutations du gène *TP53* et une amplification du proto-oncogène *MYC* [34]. Parmi ces cancers avec une mutation héréditaire de *BRCA1*, environ 80% sont des cancers triple négatifs (RE⁻, RP⁻ et HER2⁻) [33]. Ils ne peuvent donc bénéficier d'hormonothérapie ou de thérapies ciblant l'HER2.

En France, on estime que 2 femmes sur 1000 sont porteuses d'une mutation sur l'un des gènes *BRCA*. En plus d'accroître le risque de développer un cancer du sein, ces mutations augmentent également le risque de cancer des annexes et aggravent le risque de cancer contralatéral après un premier cancer du sein. Le risque de récurrence de cancer du sein est identique que l'on soit porteuse ou non d'une mutation *BRCA* durant les cinq premières années mais il est plus élevé après ce délai. Des consultations d'oncogénétique ont été mises en place afin d'évaluer le risque héréditaire, d'effectuer des recherches moléculaires sur les gènes de prédisposition au cancer, de proposer une attitude de surveillance adaptée au risque et d'assurer un suivi à long terme des patients et des familles [Info Cancer].

Un certain nombre de recommandations sont proposées aux femmes porteuses d'une altération des gènes *BRCA1* ou *BRCA2* et donc prédisposées aux cancers du sein et de l'ovaire. Un référentiel publié par l'INCa (Institut National du Cancer) et mis à jour en avril 2017 propose des stratégies pour le dépistage et les traitements de réduction du risque de cancer du sein et des annexes. Il conseille un examen clinique mammaire tous les 6 mois à partir de l'âge de 20 ans et une surveillance radiologique annuelle dès l'âge de 30 ans. Cette dernière se fait d'abord par IRM (examen le plus sensible), suivie d'une mammographie plus ou moins une échographie. En termes de prévention, seules les interventions chirurgicales peuvent diminuer le risque de cancer. La mastectomie bilatérale prophylactique (à partir de 30 ans) est la mesure la plus efficace, elle permet une réduction importante du risque de 95%. L'ablation des ovaires diminue aussi le risque de cancer du sein d'environ 50% lorsque celle-ci est réalisée avant 45-50 ans, chez une patiente non ménopausée et qui n'a développé aucune tumeur [INCa].

Comme pour tout cancer, le traitement repose sur les données cliniques et biologiques de la tumeur. Cependant, deux approches sont particulièrement intéressantes compte tenu des fonctions de *BRCA1* et *BRCA2* dans la réparation de l'ADN.

La première consiste à utiliser les dérivés du platine (cisplatine, oxaliplatine et carboplatine) qui sont des agents alkylants. Ils se fixent sur l'ADN, créent des ponts entre les brins et bloquent la réplication de l'ADN, ce qui aboutit à l'apoptose de la cellule. Il ne s'agit pas d'une thérapie ciblée à proprement parler, mais des études ont montré que des cellules et des tumeurs (xénogreffes) déficientes pour *BRCA1* présentaient une sensibilité particulière au cisplatine, par comparaison avec d'autres agents de chimiothérapie. Des cellules *BRCA2*-muté ont répondu de manière similaire à ces composés [15]. Ces observations ont été confirmées chez des patients porteurs d'une mutation de *BRCA1* ou *BRCA2*. Leur survie globale était meilleure que celle de patients sans mutation lorsqu'ils recevaient du carboplatine [34].

La seconde approche se base sur le concept de létalité synthétique, décrite à l'origine comme un phénomène dans lequel des mutations de deux gènes différents se combinent pour provoquer la mort cellulaire, alors qu'aucune mutation par elle-même n'est létale [15]. Cette approche consiste à bloquer PARP (*Poly-ADP-ribose*

polymerase), une enzyme impliquée dans la réparation de l'ADN suite à une cassure simple brin. L'effet de ces inhibiteurs repose sur l'accumulation de cassures simple brin due à l'inactivité de PARP qui sont par la suite converties en cassures double brin. Les cellules déficientes pour *BRCA1* ou *BRCA2* sont incapables de réparer ces cassures double brin par la voie de recombinaison homologue, ce qui aboutit à leur apoptose (**Figure 12**) [15,56].

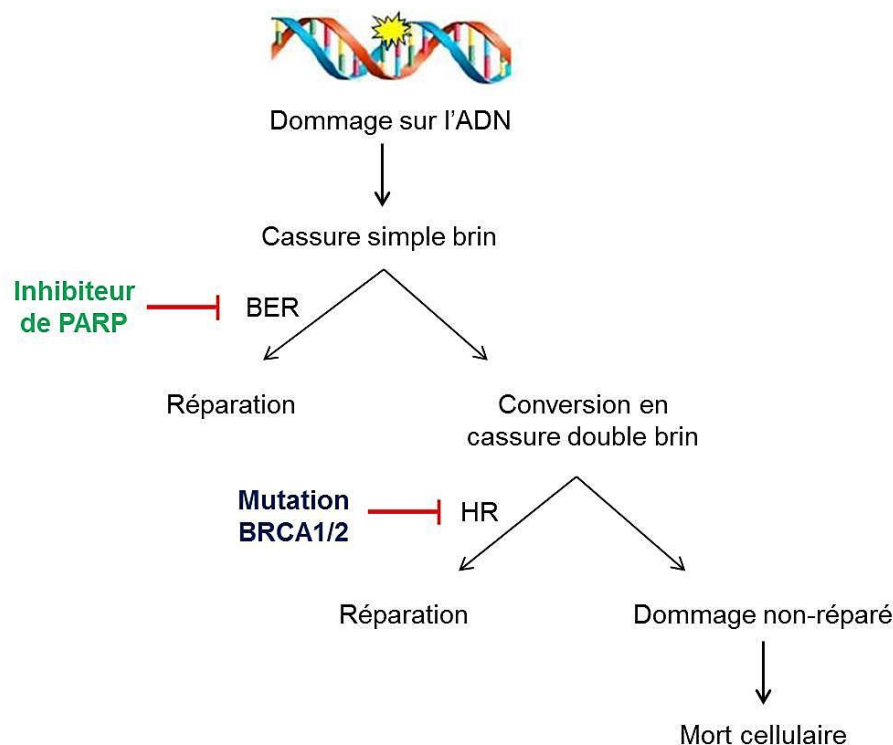


Figure 12 : Conséquences d'une inhibition de PARP dans des cellules mutées pour BRCA1/2. (Adapté de SB De Lorenzo, 2013, *Frontiers in Oncology* [56]).
BER : réparation par excision de base et HR : recombinaison homologue.

Des études ont montré que des cellules porteuses d'une mutation de *BRCA1/2* étaient plus sensibles à l'inhibition de PARP [57,58]. L'olaparib est le premier inhibiteur de PARP à avoir obtenu une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) européenne pour être prescrit à des patientes avec un cancer de l'ovaire de haut grade, sensibles au platine et porteuses d'une mutation *BRCA*. Son utilisation n'est pas encore accordée dans les cas de cancers du sein avec mutation de *BRCA1/2*, mais des études cliniques sont en cours et d'autres inhibiteurs de PARP sont en développement (véliparib, rucaparib) [15]. On peut notamment citer l'étude de phase III OLYMPIA qui consiste à évaluer l'efficacité et la tolérance d'un traitement adjuvant par olaparib comparé à un placebo chez des patients présentant un cancer du sein

primitif avec mutation germinale de *BRCA1/2* et HER2-négatif à haut risque ayant entièrement terminé leur traitement local et une chimiothérapie néoadjuvante ou adjuvante. On pourrait également envisager de combiner ces molécules avec de la radiothérapie afin d'augmenter l'efficacité du traitement. Les rayons accentueraient l'apparition de lésions sur l'ADN qui ne pourraient être réparées.

4. Implications dans la pathologie cancéreuse

a. Haploinsuffisance et perte d'hétérozygotie

La génétique des formes héréditaires de cancer liée à un gène de susceptibilité est basée sur le modèle « à deux coups » de Knudson [59]. Le premier coup est constitué par une mutation germinale qui inactive l'un des allèles. Le deuxième coup résulte souvent en une perte d'hétérozygotie (LOH) ou une délétion - événement stochastique - inactivant l'autre allèle et aboutissant à une perte de fonction. Cette inactivation peut alors être l'étape initiale de la progression maligne. Cette perte somatique de l'allèle sauvage est observée dans la majorité des tumeurs du sein et de l'ovaire de femmes porteuses d'un allèle germinale muté [38].

Un autre phénomène peut expliquer l'inactivation du deuxième allèle de *BRCA1* et constituer un élément déclenchant dans le processus tumoral: la méthylation de son promoteur [60,61]. La méthylation de l'ADN est un mécanisme de régulation épigénétique au niveau transcriptionnel. Elle entraîne une modification de l'architecture de la chromatine aboutissant à une compaction des nucléosomes, ce qui empêche l'accès des facteurs de transcription ou des protéines de liaison à l'ADN. Ainsi, une hyperméthylation du promoteur de *BRCA1* conduit à une inhibition de sa transcription et donc à une quantité protéique diminuée [52,53]. Ceci est valable pour tous les gènes suppresseurs de tumeur.

Cependant, la seule mutation de *BRCA1* ne suffit pas au développement d'un cancer. Au moins deux à trois événements sont requis pour transformer une cellule simplement mutée en une cellule cancéreuse (**Figure 13**). Il a par exemple été fréquemment observé dans les tumeurs *BRCA1*^{+/-} des mutations de la protéine *TP53* impliquée dans la maintenance de l'intégrité du génome [62,63]. Des mutations

d'autres gènes engagés dans le contrôle du cycle cellulaire, la prolifération ou le métabolisme cellulaire peuvent être l'un de ces événements.

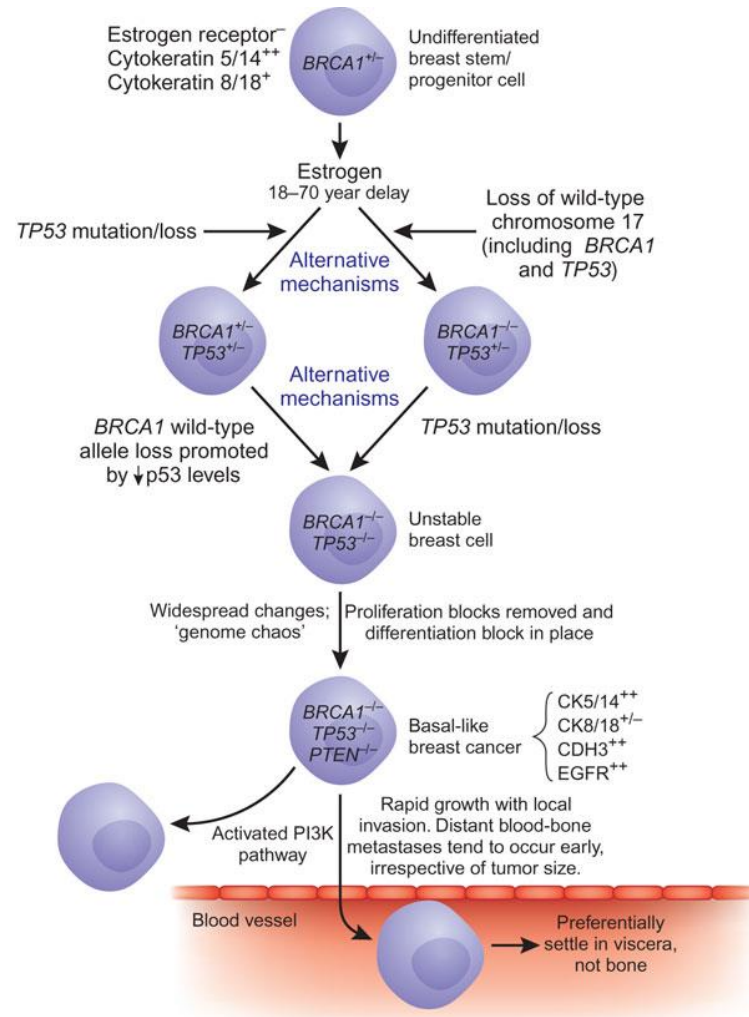


Figure 13 : Modèle de carcinogenèse mammaire lié à BRCA1. (D'après WD Foulkes, 2008, *Nature Genetics* [64]).

Il existe plusieurs évidences suggérant que *BRCA1* aurait aussi un rôle important dans la forme sporadique des cancers du sein et de l'ovaire [32]. Ainsi, 30 à 40% des cancers sporadiques montrent une réduction de l'expression de l'ARNm et de la protéine *BRCA1* [65,66]. De même, il pourrait y avoir une LOH pour *BRCA1* dans les cancers sporadiques [65,67–69] et il a été suggéré qu'un seul allèle fonctionnel serait insuffisant (phénomène d'haploinsuffisance) pour le maintien des fonctions de la protéine *BRCA1* [70,71]. La faible quantité protéique de *BRCA1* dans les cellules cancéreuses d'origine sporadique [72–76] pourrait s'expliquer par

l'hyperméthylation du promoteur de *BRCA1* (10 à 15% des cas la présentent) [52,77] et par l'altération des protéines régulant sa transcription [78–80]. Enfin des modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation et l'ubiquitinylation, pourraient être inhibées et laisser *BRCA1* inactif [81–83].

b. Conséquences fonctionnelles

La prédisposition au cancer du sein limité au statut génétique d'hétérozygotie *BRCA1*^{+/-} a un fondement biologique. En effet des résultats expérimentaux ont montré que le statut hétérozygote confère aux cellules des anomalies infrabiologiques et certains traits phénotypiques spécifiques permettant de discerner les cellules mutées hétérozygotes des cellules normales homozygotes *BRCA1*^{+/+}.

Il existe en particulier des différences phénotypiques entre les cellules épithéliales mammaires normales de femmes porteuses d'une mutation de *BRCA1* et celles de femmes saines [84,85]. *BRCA1* est requis pour la différenciation des cellules progénitrices RE-négatives en cellules luminales RE-positives. La présence d'un allèle muté de *BRCA1* a donc tendance à maintenir les cellules dans un état indifférencié. Cette haploinsuffisance entraîne également un autorenouvellement de cellules souches basales par un blocage de la différenciation, aboutissant à un contingent de cellules souches ALDH1 (*Aldehyde Dehydrogenase 1*) positives (marqueur de propriétés souches d'une cellule) plus élevé dans les tissus mammaires de mastectomie prophylactique des femmes *BRCA1*^{+/-} (**Figure 14**). La composition cellulaire du tissu épithélial mammaire normal de femmes porteuses d'une mutation du gène *BRCA1* se distingue ainsi par un excès de cellules progénitrices [64, 70]. De même, une corrélation des signatures moléculaires a été montrée entre des cellules progénitrices luminales, du tissu mammaire associé à une mutation de *BRCA1* et des tumeurs basales. Ceci suggère que la première manifestation cellulaire dans les cancers associés à *BRCA1* et les autres cancers de type basal se ferait au niveau de la cellule progénitrice luminale [87].

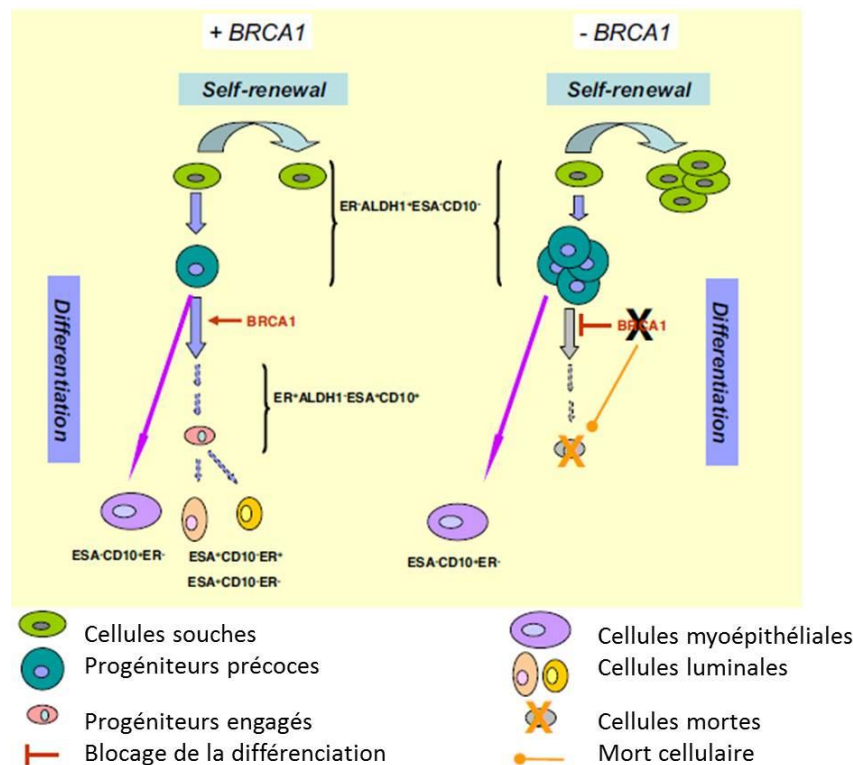


Figure 14 : Rôle de BRCA1 dans la destinée des cellules mammaires normales et mutées. (Adapté de S. Liu, 2008, *Proceedings of the National Academy of Sciences* [88]).
ER : récepteur aux œstrogènes.

Une autre conséquence touche la voie de survie PI3K/AKT qui est inhibée par *BRCA1*. Une perte de fonction de *BRCA1* augmente donc l'activité de cette voie et favorise la survie des cellules [15]. *BRCA1* joue aussi un rôle de protection contre le stress oxydatif et de hauts niveaux de celui-ci sont associés à des cancers plus agressifs [89].

Nous pouvons également citer les effets de la radiothérapie sur les cellules *BRCA1*^{+/-}. D'une part il a été montré que les cellules porteuses d'une mutation sur *BRCA1* ont une radiosensibilité accrue avec une capacité de prolifération diminuée après irradiation [90]. D'autre part l'analyse de tissus mammaires sains chez des patients *BRCA1*-muté a mis en évidence une réduction de la population luminaire (cellules progénitrices et matures) dans les zones irradiées dans le cadre du traitement en comparaison avec les zones non-irradiées. Dans le même temps il a été observé pour les cellules basales et les cellules progénitrices lumineuses irradiées une diminution de leur capacité à former des colonies. Ces résultats supportent l'idée que la radiothérapie est associée à une activité réduite des cellules progénitrices

dans les tissus mammaires de patients *BRCA1*-muté et suggèrent que la radiothérapie à faibles doses pourrait avoir un effet sur la cellule d'origine des tumeurs liées à *BRCA1* [91]. Enfin des études indiquent que la radiothérapie pour les patients atteints de cancer avec une mutation de *BRCA1* est associée à une incidence plus faible de développement ultérieur d'un cancer du sein ipsilatéral [92]. Ces données soulignent l'intérêt de l'utilisation de la radiothérapie dans des stratégies de prévention et de traitement chez les porteurs d'une mutation de *BRCA1*.

Dans les cellules épithéliales mammaires, *BRCA1* stabilise la protéine Slug (aussi appelée Snail 2), impliquée dans le phénomène de transition épithéliomésenchymateuse (TEM), qui sera revu ultérieurement [86]. Une mutation de *BRCA1* entraîne donc une activation de la TEM pouvant faciliter la migration des cellules et conduire à des métastases. En outre, Slug exerce un rétrocontrôle sur *BRCA1* en se fixant sur son promoteur afin de réprimer son expression. En effet, les membres de la famille Snail sont capables de recruter des modificateurs d'histones (déméthylases) pour exercer un contrôle épigénétique sur leurs cibles. Enfin, ZQ Wu a montré que des conditions hypoxiques, fréquemment présentes au sein des tumeurs, induisaient l'expression de Snail et Slug. L'hypoxie est ainsi capable de déclencher une régulation épigénétique sur le promoteur de *BRCA1* ou bien de le réduire au silence [93].

Partie II

Le microenvironnement tumoral

A. Définition

La progression tumorale a souvent été limitée à l'acquisition de modifications génétiques successives, conduisant notamment à une prolifération cellulaire accrue et une résistance à l'apoptose. Cependant, il est aujourd'hui admis qu'une tumeur ne peut croître seule et que les cellules tumorales ne sont pas simplement des îlots cellulaires isolés. En effet, le foyer tumoral peut être perçu comme un organe à part entière, composé de cellules cancéreuses qui évoluent dans un microenvironnement complexe.

Ce concept de microenvironnement tumoral a été introduit en 1889 par le chirurgien anglais Stephen Paget avec sa théorie du « *seed and soil* » (la graine et le sol). Après avoir analysé 735 cas de cancers du sein, il constate que la localisation des métastases n'est pas aléatoire mais qu'il existe une affinité spécifique pour certains organes (foie, ovaires, os). Il suggère donc que la dissémination des cellules cancéreuses dans l'organisme n'est pas un phénomène dû au hasard mais que les cellules tumorales (*seed*) s'implantent préférentiellement dans un organe ou un milieu (*soil*) fournissant un contexte avantageux [94].

Le microenvironnement ou stroma tumoral comprend une composante cellulaire, constituée de cellules tumorales et de cellules non malignes mais altérées (fibroblastes, cellules immunitaires, cellules endothéliales, adipocytes, cellules souches mésenchymateuses) englobées dans une matrice extracellulaire (MEC). Comme pour tout organe, un dialogue s'établit entre l'ensemble des cellules qui interagissent physiquement ou par la sécrétion de facteurs solubles.

B. Composition du microenvironnement tumoral

Le microenvironnement tumoral est un ensemble hétérogène et dynamique. Il est constitué de nombreux types cellulaires différents qui sont en interaction permanente les uns avec les autres (**Figure 15**). A travers la description de ces composants, nous allons voir comment la tumeur interagit et coopère avec ces éléments afin qu'ils deviennent un véritable support pour la croissance tumorale.

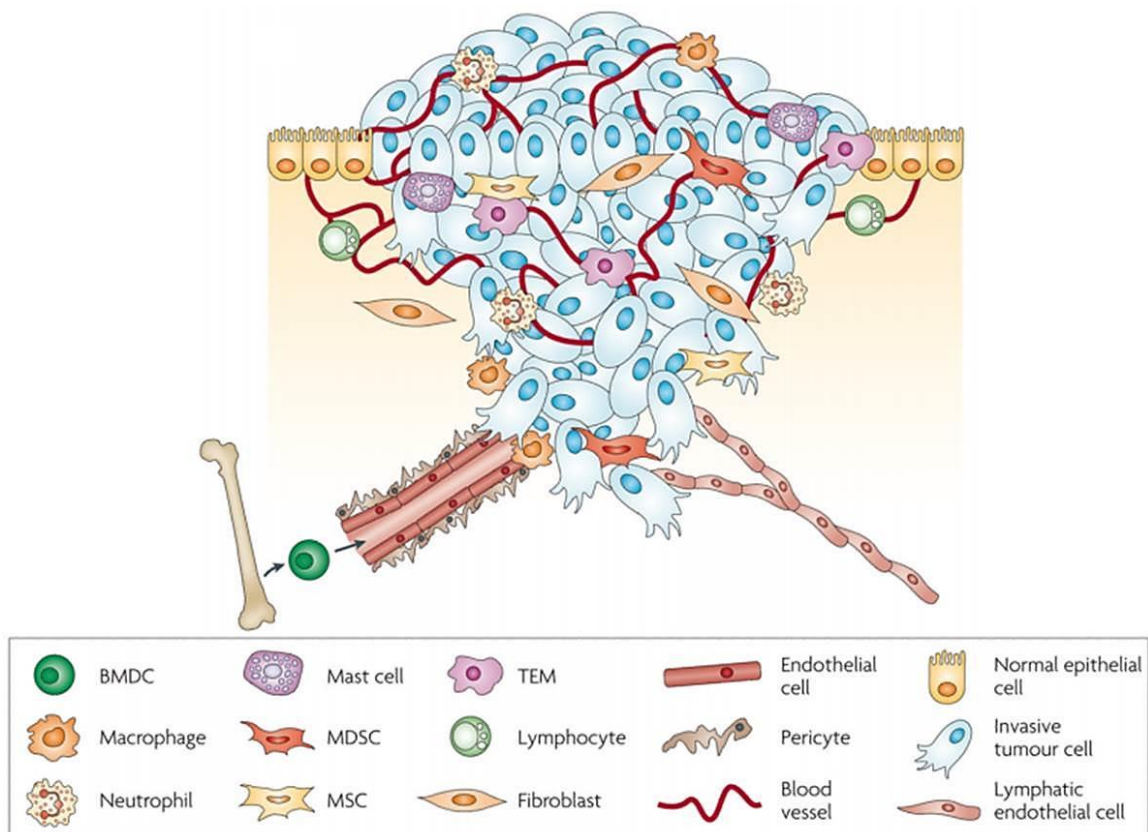


Figure 15 : Le microenvironnement tumoral. (Adapté de JA Joyce & JW Pollard, 2009, *Nature Reviews Cancer* [95]).

BMDC : cellule dérivée de la moelle osseuse, MDSC : cellule myéloïde suppressive, MSC : cellule souche mésenchymateuse, TEM : monocyte exprimant TIE2.

1. La composante cellulaire

La composante cellulaire du microenvironnement tumoral comprend les cellules tumorales et les cellules non tumorales situées autour de la tumeur. Ces dernières présentent généralement des différences morphologiques et fonctionnelles en comparaison avec leurs homologues présents dans un stroma normal. Nous nous intéresserons principalement aux cellules non malignes, les caractéristiques générales des cellules tumorales ayant été décrites en Partie I.

a. Les fibroblastes

Les fibroblastes ou CAFs (*Cancer Associated Fibroblasts*) constituent l'élément majoritaire du stroma tumoral [96]. En conditions normales, on les retrouve dans les tissus conjonctifs avec une activité réduite. Ils jouent cependant un rôle important

dans les processus de réparation tissulaire ou lors des réactions inflammatoires [96]. Ce sont des cellules fusiformes capables de produire un grand nombre de molécules. Ils secrètent notamment des composants de la matrice extracellulaire comme certains collagènes (type I, II et V) et de la fibronectine. Ils synthétisent également des cytokines, des facteurs de croissance et des enzymes, en particulier des métalloprotéases (MMPs), capables de dégrader la MEC, entraînant alors la libération d'autres petites molécules.

Une autre hypothèse, basée sur les similarités entre les CAFs et les MSCs, propose une origine un peu différente. Selon l'étude de V. Paunescu, les CAFs dérivent des MSCs et pourraient représenter un sous-ensemble de MSCs spécialisées [97]. En effet, il est montré que les CAFs et les MSCs possèdent une morphologie semblable et partagent des éléments immunophénotypiques similaires. Les CAFs expriment des marqueurs de surface généralement utilisés pour caractériser les MSCs, comme les CD44, CD73, CD90 et sont négatifs pour les CD34 et CD45. On observe également l'expression de protéines du cytosquelette et de la MEC, comme la vimentine et l' α -SMA (*alpha Smooth Muscle Actin*), ainsi que le potentiel de différenciation (adipocytes, chondrocytes, ostéoblastes). En revanche, la production de cytokines (IL-4, IL-10, TNF α , TGF- β 1) et de facteurs de croissance (VEGF) est plus importante pour les CAFs que pour les MSCs, tout comme le taux de prolifération.

Dans un contexte tumoral, les cellules cancéreuses vont activer les fibroblastes en CAFs via une stimulation paracrine avec des facteurs de croissance, comme le TGF β [98]. Ces fibroblastes associés au cancer sont plus nombreux dans le stroma tumoral et leur phénotype est modifié. On note l'expression de l' α -SMA, de la vimentine, de la desmine et de la FAP (*Fibroblast Activated Protein*). Par leurs sécrétions augmentées, les CAFs jouent un rôle important dans le développement tumoral et le processus métastatique.

On retrouve l'implication des CAFs à tous les stades du processus cancéreux. Tout d'abord, les CAFs sont activés et éduqués par les cellules cancéreuses aux stades précoces du développement tumoral. Ils contribuent ainsi à l'initiation du processus. Les CAFs produisent un grand nombre de molécules (facteurs de croissance, cytokines) qui vont participer à la prolifération cellulaire et à la croissance de la tumeur. L'angiogenèse est indispensable afin de maintenir une expansion

correcte de la tumeur. Les CAFs sont capables de recruter des cellules endothéliales afin d'initier ce processus et de libérer des facteurs angiogéniques de la MEC par sa dégradation via les protéases. Les phénomènes de migration, d'invasion et de métastase se produisent plus tardivement et les CAFs sont de nouveau impliqués. Ils sont capables d'induire le processus de TEM conduisant à l'acquisition par les cellules malignes d'un phénotype migratoire et invasif. Ils vont également participer à la mise en place d'une niche favorable et à la circulation des cellules cancéreuses dans les vaisseaux, ce qui augmente leur efficacité à former des métastases. Sur le plan de l'inflammation, les molécules secrétées par les CAFs ne contribuent pas seulement au recrutement de cellules inflammatoires, mais aussi à moduler leur différenciation et leur statut d'activation. Enfin, ils jouent un rôle dans les modifications métaboliques de la tumeur. En passant à une glycolyse aérobie, ils produisent des métabolites riches en énergie (lactate, pyruvate) pour nourrir les cellules cancéreuses [99].

En clinique, il a été montré que l'absence d'expression de la cavéoline-1 (CAV1) dans le stroma était corrélée à une taille de tumeur plus élevée, des stades TNM et histologique plus avancés, un taux de rechute augmenté, une résistance thérapeutique et une survie diminuée chez des patients atteints de cancer du sein [100]. De même, il a été démontré que le développement de cellules tumorales était favorisé par des fibroblastes activés issus de cancers du sein en comparaison avec des fibroblastes normaux dérivés des mêmes patients [101]. Sur le plan thérapeutique, les CAFs jouent aussi un rôle dans le développement de résistances aux traitements. C'est le cas avec le tamoxifène, dont l'effet sur des cellules épithéliales malignes est contré par la production de facteurs solubles (dont des MMPs) et l'activation des voies de signalisation MAPK/ERK1/2 et PI3K/AKT par les fibroblastes du stroma [102]. Une autre approche a décrit un couplage métabolique entre des cellules épithéliales mammaires cancéreuses (MCF7) et les CAFs. En produisant du lactate et des corps cétoniques, les CAFs augmentent l'activité mitochondriale des cellules épithéliales malignes et leur confèrent une résistance au tamoxifène [103]. Dans une troisième étude, les auteurs ont démontré que la sécrétion d'HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) par les CAFs entraîne une phosphorylation de Met dans les cellules épithéliales mammaires qui conduit à une résistance aux inhibiteurs de l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) dans les

cancers triple négatifs. En effet, l'association entre Met et l'EGFR a été rapportée dans plusieurs types de cancers et active des voies de signalisation intervenant dans la survie et la prolifération cellulaires [104].

b. Les cellules souches / stromales mésenchymateuses

Les MSCs sont des progéniteurs multipotents ayant la capacité de se différencier en plusieurs lignées du mésoderme. Elles résident majoritairement dans la moelle osseuse et sont mobilisées suite à un dommage tissulaire. En réponse à des signaux, elles passent dans la circulation et sont recrutées sur le lieu approprié [105]. De la même manière que le processus de cicatrisation, les tumeurs sont capables d'émettre des signaux pour attirer les MSCs dans le stroma [106]. Une fois arrivées dans le microenvironnement tumoral, ces MSCs peuvent se différencier en plusieurs types cellulaires, comme les CAFs ou les péricytes qui influencent la progression tumorale [107,108]. Par exemple, E. Spaeth a réussi à induire l'activation de MSCs dérivées de la moelle à l'aide de milieu conditionné issu de tumeur. Ces MSCs activées expriment des marqueurs de surface typiques de CAFs et ont la capacité de générer des structures microvasculaires [109].

Des études ont montré que des MSCs issues de la moelle s'incorporent dans le stroma de xénogreffes de cancer du sein en développement et augmentent le potentiel métastatique [110,111]. Ces cellules sont aussi capables de cibler et de s'incorporer spécifiquement dans les tumeurs et les métastases éloignées de la tumeur primaire après une injection systémique [112], ce qui prouve leur tropisme pour les tumeurs. De plus, elles secrètent un grand nombre de facteurs de croissance et de cytokines (VEGF, angiopoïétine, IL-6, IL-8, TGF β , PDGF, bFGF), dont certains agissent sur les cellules endothéliales et favorisent la formation de vaisseaux tumoraux [113]. Un modèle de co-culture 3D a indiqué que les MSCs induisaient une élongation et une migration de cellules mammaires cancéreuses invasives (MDA MB 231) par la sécrétion de TGF β [114]. Elles pourraient ainsi participer au phénomène de TEM et favoriser l'apparition de métastases. Les MSCs ont également une propriété immunosuppressive, en inhibant notamment la prolifération des cellules T (via la sécrétion de Pg, TGF β et HGF), créant des

conditions permissives au développement tumoral [115]. Enfin, des MSCs ont été observées dans le stroma de patients présentant un cancer du sein primaire [116].

c. Les cellules immunitaires

Le stroma tumoral comprend des cellules du système immunitaire qui en temps normal exercent une action anti-tumorale par la reconnaissance d'antigènes tumoraux spécifiques, conduisant à la destruction des cellules altérées. En effet, les cellules tumorales expriment des cytokines inflammatoires qui vont recruter des monocytes, des lymphocytes et des neutrophiles au voisinage de la tumeur. Les tumeurs sont d'ailleurs souvent associées à un état inflammatoire chronique.

Les macrophages associés aux tumeurs (TAMs) représentent le composant inflammatoire principal du stroma tumoral. Ils possèdent un phénotype M2 (immunosuppresseur) et sont capables de sécréter beaucoup d'IL-10 (pro-inflammatoire), peu d'IL-12, des prostaglandines et du TGF β . Ils participent ainsi à la suppression de la réponse immune anti-tumorale. Les macrophages soutiennent la croissance tumorale par leurs capacités à intervenir dans le remodelage tissulaire, la production de facteurs de croissance et pro-angiogéniques [117]. D'ailleurs, leur présence a été décrite au niveau du front d'invasion des tumeurs où se fait la dégradation de la MEC. Ceci suggère que les tumeurs exploitent les propriétés des macrophages, contribuant à favoriser la migration et l'invasion des cellules tumorales [118]. Il a été montré qu'une grande quantité de TAMs était associée à un mauvais pronostic pour les cancers du sein, de la prostate ou du côlon [119]. Enfin, l'accumulation des TAMs a aussi été corrélée à une augmentation de l'angiogenèse, via la production de VEGF et de PDGF. La déplétion en macrophages dans certains modèles de cancer du sein réduit le *switch* angiogénique et le remodelage vasculaire, limitant la progression tumorale [120].

Les lymphocytes appartiennent au système immunitaire adaptatif, dont la fonction est la reconnaissance du « non-soi » et l'élimination des éléments qui ne correspondent pas à cette définition. Deux obstacles réduisent l'efficacité de cette réponse immunitaire. Tout d'abord, les antigènes tumoraux sont en général faiblement immunogènes. De plus, les cellules tumorales sécrètent des cytokines

aux effets inhibiteurs sur la réponse immune, conduisant au développement d'un environnement permissif, peu propice à une réponse immune. De même, elles peuvent favoriser la différenciation en lymphocytes régulateurs [121].

Les neutrophiles sont recrutés précocement au cours du processus inflammatoire. Comme pour les TAMs, les cellules tumorales attirent les neutrophiles via des facteurs de croissance comme le GM-CSF (*granulocyte monocyte colony stimulating factor*) et le G-CSF (*granulocyte colony stimulating factor*). En retour, les neutrophiles produisent du HGF/SF (*hepatocyte growth factor / scatter factor*) qui augmente la migration des cellules tumorales et du VEGF et de l'IL8 qui participent à l'angiogenèse [122].

d. Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales forment les capillaires et l'endothélium des plus gros vaisseaux. Celles du microenvironnement tumoral présentent, comme les autres types cellulaires, des altérations quant à leur prolifération, leur migration et leurs interactions cellulaires. Sous l'effet de l'hypoxie, elles surexpriment notamment des récepteurs comme ceux de la famille du VEGFR (VEGFR1 ou Flt1, VEGFR2 ou KDR et VEGFR3) et des enzymes (héparanase, urokinase) [123]. Dans le même temps, les cellules tumorales et certaines cellules du microenvironnement (CAFs, MSCs) produisent des facteurs de croissance (VEGFA, B, C, D) qui vont stimuler la prolifération des cellules endothéliales. Ce processus paracrine permet par exemple à des précurseurs de cellules endothéliales dérivant de la moelle d'être recrutés au niveau des métastases en réponse au VEGFA [124].

Les cellules endothéliales ont un rôle particulièrement important dans l'angiogenèse et par conséquent dans la progression tumorale et le processus métastatique. Elles sont en effet capables de former un réseau vasculaire associé à la tumeur par bourgeonnement à partir de vaisseaux pré-existants ou par le recrutement de progéniteurs endothéliaux issus de la moelle [125]. Elles se trouvent à l'interface entre les cellules circulantes, les cellules tumorales, la MEC et tous les composants du stroma, ce qui leur confère un rôle central dans le développement tumoral et la formation des métastases.

e. Les cellules adipeuses

Le tissu adipeux, en tant qu'organe, joue un rôle dans la maintenance de la balance énergétique systémique, l'homéostasie du glucose et la réponse immunitaire. Dans le contexte de la glande mammaire, les adipocytes sont l'un des types cellulaires les plus abondants dans le stroma. Ils possèdent un profil sécrétoire large comprenant des adipokines, comme la leptine et l'adiponectine, l'HGF, le collagène VI, l'IL-6 et le TNF α [126]. Des études se sont intéressées aux effets du tissu adipeux dans la progression du cancer du sein. Par exemple, il a été montré que le collagène VI est fortement exprimé dans les adipocytes associés au cancer et est impliqué dans la progression tumorale mammaire *in vivo* [127]. De même, les cytokines sécrétées (IL-6, IL-8, CCL5, CXCL12/SDF-1) par les cellules souches dérivées des adipocytes (ADSC) ont une action sur la croissance et la survie des cellules cancéreuses mammaires. Elles favorisent notamment leurs capacités migratoires et invasives *in vitro* et *in vivo*, l'expansion des cellules souches cancéreuses et induisent la TEM dans les cellules cancéreuses par une voie dépendante du PDGF [128].

2. La matrice extracellulaire (MEC)

a. Composition

La matrice extracellulaire est un enchevêtrement complexe de macromolécules qui entourent les cellules. Elle leur apporte un support physique et confère une certaine rigidité aux tissus. Ces propriétés mécaniques dépendent de sa composition et de la proportion de ses différents constituants. Les macromolécules peuvent se regrouper en trois grands types : les protéines fibrillaires, les glycoprotéines et les polysaccharides [129].

La catégorie des protéines fibrillaires comprend des protéines capables de s'organiser en fibres structurales ou élastiques. C'est le cas des différents collagènes qui sont les protéines les plus abondantes de l'organisme et plus précisément des collagènes I, II et III. Ils sont synthétisés par les fibroblastes et confèrent aux tissus une résistance à la tension. L'élastine appartient également à cette catégorie et est

secrétée par les fibroblastes. Elle est particulièrement abondante dans les tissus soumis à des variations de taille ou de forme (peau, vaisseaux, poumons). En apportant une propriété élastique aux tissus, elle leur permet d'être étirés sans déchirement et de manière réversible.

Les glycoprotéines peuvent être présentes sous une forme circulante ou incorporées dans la matrice. Cette catégorie contient entre autre :

- les laminines, secrétées par plusieurs types cellulaires (musculaires, épithéliales) et liées à la MEC. Elles ont un rôle dans la structuration de la MEC et dans la liaison aux intégrines.
- La fibronectine et la vitronectine qui existent sous des formes solubles et insolubles. Elles favorisent l'adhérence via les intégrines $\alpha V\beta 3$ et $\alpha V\beta 5$ et la disposition des molécules matricielles, contribuant à l'organisation de la MEC. La fibronectine circulante est secrétée par les hépatocytes et les cellules endothéliales, tandis que sa forme insoluble dans la MEC l'est majoritairement par les fibroblastes. Ces deux protéines possèdent de nombreux sites de liaison pour des protéines de la MEC, des récepteurs membranaires et des protéines circulantes.
- les ténascines, qui modulent les interactions cellules-matrice et favorisent la mobilité cellulaire [130].

Enfin, les polysaccharides regroupent les glycosaminoglycanes (GAG) et les protéoglycanes, qui sont des GAG associés à une chaîne polypeptidique. Ils interviennent dans de nombreux processus physiologiques, comme la coagulation (héparine), la prolifération et la migration cellulaire (acide hyaluronique).

b. Les molécules solubles

Au sein du réseau formé par la MEC se trouvent des facteurs de croissance et des chimiokines qui modulent le comportement cellulaire. Ils sont libérés lorsque la MEC est dégradée par des enzymes. Par ce mécanisme, certains domaines protéiques sont rendus accessibles et des fragments peptidiques apparaissent, entraînant des stimulations cellulaires différentes des protéines intactes [131]. Parmi ces enzymes de dégradation, on retrouve les métalloprotéases (MMPs) dont une des

principales sources est le stroma tumoral [132]. En régulant la biodisponibilité des facteurs séquestrés dans la MEC, les MMPs contribuent au développement tumoral. Elles peuvent notamment favoriser l'angiogenèse, l'invasion tumorale et l'établissement de foyers métastatiques. Par exemple, des quantités élevées de MMP9 dans le sérum et le tissu de patients ont été corrélées avec un caractère invasif, la présence de métastases [133] et une issue défavorable [134].

3. Le cas de la périostine

La périostine (POSTN) est une protéine non collagénique décrite en 1993 par S. Takeshita et préalablement nommée OSF-2 (*osteoblast specific factor 2*). Cette protéine matricellaire appartient à la famille des protéines inductibles par le TGF β . L'épissage alternatif de son transcrit aboutit à l'existence de 8 isoformes chez l'Homme, dont la principale a une masse moléculaire de 93 kDa [135]. Initialement identifiée au niveau du périoste et du ligament parodontal [135,136] elle joue un rôle dans le développement de certains tissus tel les os, le cartilage ou le cœur mais aussi dans le remodelage tissulaire et la cicatrisation. Elle est exprimée par des cellules mésenchymateuses, comme les cellules vasculaires du muscle lisse, les fibroblastes ou les ostéoblastes [136,137]. Elle se lie aux intégrines (α V β 3 et α V β 5) et favorise l'adhésion et la migration des cellules épithéliales [138]. Dans les tissus adultes, on la retrouve dans des zones très spécifiques, généralement soumises à des contraintes mécaniques constantes. C'est le cas du périoste, qui recouvre les os et qui est sollicité lors des mouvements, du ligament parodontal soumis à la mastication ou des valves atrio-ventriculaires [136,139].

La protéine se compose de trois domaines principaux. L'extrémité N-terminale contient un domaine EMI (*Emilin-like*), riche en résidus cystéines, qui s'associe au collagène de type I et à la fibronectine. De par ses interactions, ce domaine participe principalement à la maintenance de la structure des tissus et des organes ou au processus de fibrose. La région centrale compte quatre domaines FAS1 (*Fascicline-like*) qui peuvent se lier aux intégrines, à la ténascine C et au BMP-1. C'est sur cette région que vont s'opérer les liaisons conduisant à une activation cellulaire ou à une inflammation. En effet, en interagissant avec les intégrines, la POSTN va moduler les interactions cellules-matrice, mais aussi l'adhésion, la prolifération et les processus

de différenciation. Enfin l'extrémité C-terminale donne naissance aux différentes isoformes et contient des sites de clivage protéolytiques (**Figure 16**) [140].

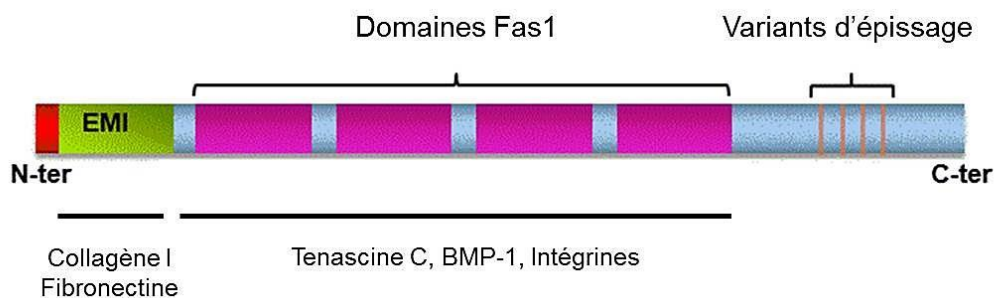


Figure 16 : Représentation des domaines protéiques de la périostine. (Adapté de Shino-Test Corporation).

L'analyse chez des souris $POSTN^{-/-}$ a montré un retard de croissance sévère ainsi que des défauts squelettiques, dentaires et cartilagineux (valves cardiaques) [139]. Compte tenu de sa localisation, la POSTN participe à la régénération de l'os suite à un stress mécanique. Ceci a été vérifié chez des souris déficientes en POSTN où le fémur présentait une surface et une épaisseur diminuées [140]. En cas de fracture osseuse, on observe un pic d'expression de la POSTN à J7 au niveau des cellules préostéoblastiques du périoste, ainsi que dans les MSCs indifférenciées au voisinage de la fracture [141]. La POSTN jouerait ainsi un rôle dans le recrutement (via ses propriétés adhésives) et dans l'engagement des précurseurs de l'ostéogenèse. Les tissus riches en collagène expriment aussi la POSTN, suggérant qu'elle pourrait être liée à la formation des fibres de collagène. Il a été en effet observé une réduction du diamètre des fibrilles de collagène chez des souris $POSTN^{-/-}$, indiquant une organisation aberrante de ces fibrilles. L'épaisseur du derme comprenant du collagène était également réduite chez ces souris [142].

De nombreuses études ont présenté un lien entre la POSTN et le cancer. Citons par exemple celle de K. Horiuchi qui a indiqué que le $TGF\beta$ stimule l'expression de la POSTN. Sachant que ce dernier est un inducteur de la TEM, la POSTN pourrait agir comme un médiateur de la dissémination métastatique [136]. De par ses interactions avec les intégrines, la POSTN jouerait un rôle dans la régulation de l'adhésion et de la migration des cellules tumorales dans des cas de cancers du sein, de l'ovaire et du côlon [138,143]. Il a aussi été montré que la liaison

avec l'intégrine $\alpha V\beta 3$ entraîne une expression accrue du VEGFR sur des cellules endothéliales et est associée à une activité pro-angiogénique de la POSTN [144]. En terme de prolifération cellulaire, R. Shao a observé que la surexpression de la POSTN dans certaines lignées tumorales (MDA MB 231, 293T et B16F1) augmentait le potentiel prolifératif et l'angiogenèse *in vivo* (xénogreffes sous cutanées), bien qu'il soit réduit *in vitro* [144]. De même, S. Bao a observé une croissance métastatique améliorée dans le cancer du côlon en relation avec l'expression de la POSTN. En effet, celle-ci empêche l'apoptose des cellules tumorales dans des conditions de stress (hypoxie, manque de nutriments) mais elle augmente la survie des cellules endothéliales, favorisant ainsi l'angiogenèse [143]. A travers ces résultats, nous voyons que la POSTN est impliquée dans les étapes de tumorigenèse et ce pour plusieurs types de cancers.

Dans des modèles de cellules épithéliales mammaires normales et cancéreuses, la surexpression de la POSTN a conduit à une formation accrue en nombre et en taille de mammosphères, ainsi qu'à l'augmentation de la population de cellules exprimant $CD24^{Low} / CD44^{High}$. Ces données montrent que la POSTN favorise un phénotype de cellules souches cancéreuses. Sa surexpression a également entraîné l'acquisition d'un phénotype invasif par les deux lignées cellulaires. Des similarités ont été observées entre les cellules épithéliales mammaires qui surexpriment la POSTN et les MSCs en termes de différenciation (lignées du mésoderme) et de capacité à promouvoir le potentiel métastatique de cellules mammaires cancéreuses. Ces données montrent que la POSTN peut jouer un rôle dans la progression du cancer du sein, notamment en encourageant un caractère CSCs et un phénotype similaire aux MSCs [145].

La production excessive de protéines de la MEC - comme le collagène, la fibronectine ou la POSTN - peut contribuer à la génération d'un microenvironnement de soutien aux tumeurs. Dans ce contexte, la POSTN joue un rôle important en régulant les fonctions cellulaires et les interactions cellules / matrice. Les altérations de la MEC peuvent avoir un impact sur les processus d'invasion et de métastase. De par ses interactions avec d'autres protéines de la MEC, la POSTN participe donc à son organisation et peut favoriser le développement tumoral et la progression métastatique (**Figure 17**) [146]. Que ce soit dans la niche métastatique ou pré-

métastatique, dans la niche maintenant le stock de cellules souches cancéreuses ou dans la niche périvasculaire, la POSTN est retrouvée surexprimée contribuant ainsi aux développement des tumeurs et des métastases [147].

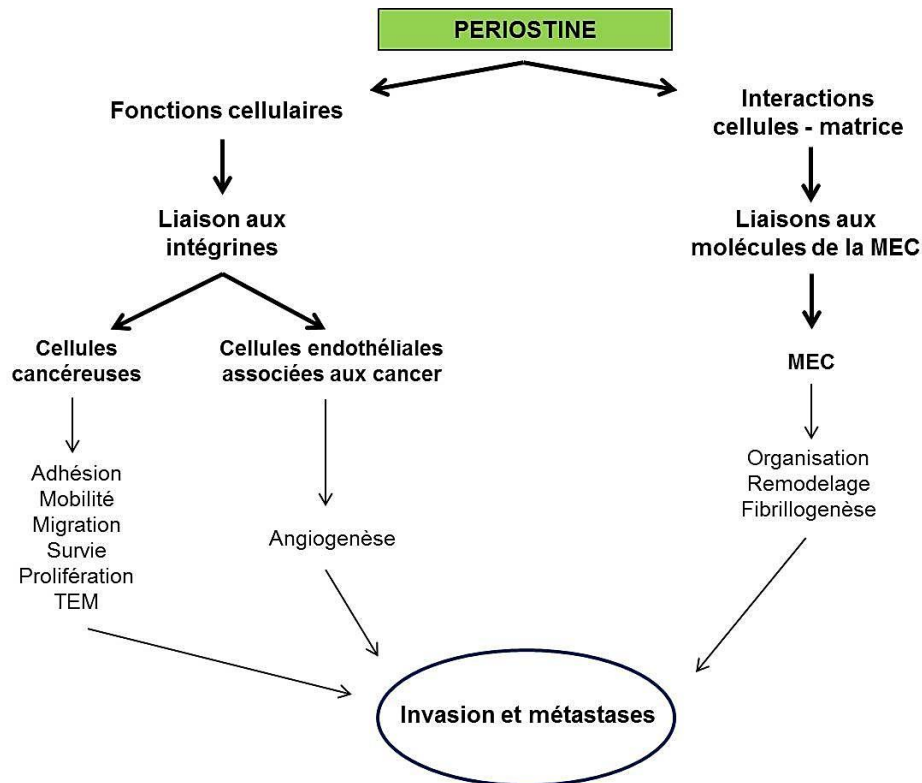


Figure 17 : Le rôle de la périostine dans le cancer. (Adapté de L. Morra, 2011, *Virchows Archiv : an International Journal of Pathology* [146]).

Une étude a décrit la capacité des cellules souches cancéreuses mammaires à induire l'expression de la POSTN dans des fibroblastes situés hors de la tumeur. En recréant ainsi l'environnement de la niche primaire, les CSCs mammaires ont plus de facilités à coloniser un site secondaire [148]. En effet, cette induction de la POSTN est nécessaire pour la colonisation puis la croissance des cellules métastatiques. Chez des souris KO pour la POSTN les métastases pulmonaires sont réduites de 90%, à l'inverse aucun changement n'est visible lorsque la POSTN est inhibée dans les cellules tumorales chez une souris sauvage [149]. Dans un modèle murin de métastases osseuses issues de cancer du sein, S. Contié a démontré que ces métastases étaient associées à une surexpression de la POSTN par les cellules stromales. Cette augmentation était également visible dans la circulation périphérique [150]. L'ensemble de ces observations indiquent que l'expression de la

POSTN par les cellules du microenvironnement est importante pour la dissémination des cellules tumorales et la formation de métastases.

L'étude de B. Quaresima a suggéré un lien entre la POSTN et une mutation spécifique de *BRCA1* (5083del19), où l'expression de la POSTN est augmentée dans les cellules transfectées avec cette séquence mutante. En revanche, elle est inhibée avec une séquence sauvage. Ces données ont été confirmées dans des tumeurs mammaires et des séra de porteurs de la mutation [151]. Enfin, d'un point de vue clinique, une expression élevée de la POSTN a été associée aux cancers mammaires [144,152,153]. De même, il a été montré une augmentation de la POSTN circulante chez des patientes atteintes de cancer du sein et présentant des métastases osseuses, par rapport aux patientes sans métastases [154].

B. Rôle du stroma dans l'initiation et la progression tumorale

Nous avons vu que le stroma est une structure riche et complexe. Les interactions entre les cellules cancéreuses et le stroma contribuent de manière significative à la progression tumorale, sous une forme « efférente » où les cellules cancéreuses stimulent une réponse dans le stroma, et sous une forme « afférente » où les cellules stromales activées et la MEC remodelée influent sur la malignité des cellules cancéreuses [99]. C'est ce réseau complexe, composé de cellules stromales variées, de MEC, de facteurs de croissance, de cytokines, d'enzymes et d'hormones qui est impliqué dans ces interactions. Si l'on s'intéresse plus particulièrement aux MSCs / CAFs, un certain nombre de travaux ont étudiés leurs rôles dans le processus cancéreux.

Premièrement, d'un point de vue métabolique, ces deux types cellulaires ont montré une capacité à moduler leur métabolisme et/ou celui des cellules tumorales, conduisant à stimuler la tumorigenèse. Par exemple, le rôle de la lysyl oxydase (LOX) dans le processus métastatique du cancer du sein a été souligné par C. El-Haibi. Dans cette étude, les MSCs dérivées de la moelle osseuse migrent au site tumoral et induisent la production de LOX par des cellules cancéreuses mammaires. Cette production *de novo* est suffisante pour augmenter les métastases au niveau des poumons et des os. Elle contribue également à stimuler la transcription de Twist,

médiateur d'une TEM déclenchée par les MSCs sur les cellules cancéreuses [155]. Un modèle de co-culture entre des cellules épithéliales mammaires cancéreuses *BRCA1*^{-/-} et des fibroblastes a montré le rôle protecteur de *BRCA1* contre le stress oxydatif en reproduisant les caractéristiques du microenvironnement. Ces cellules mutées produisent de grandes quantités d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui induisent un stress oxydatif et la glycolyse dans le stroma. En réponse, les fibroblastes vont passer à un métabolisme oxydatif mitochondrial et produire des combustibles pour les cellules cancéreuses. Ces changements métaboliques s'accompagnent dans les fibroblastes d'une perte de Cav-1 et d'une expression augmentée de MCT4 (transporteur de L-Lactate), ce qui a été retrouvé dans des tumeurs primaires de cancers du sein avec une mutation de *BRCA1* [156]. De la même manière, un *knockdown* de *BRCA1* dans des fibroblastes associés au cancer stimule la croissance tumorale. En effet, des fibroblastes déficients pour *BRCA1* (via un shRNA) montrent une augmentation de marqueurs de l'autophagie, de l'expression de HIF1- α (*Hypoxia Inducible Factor*) et de la production de corps cétoniques, qui vont alimenter les cellules cancéreuses [157]. Ces deux études montrent bien les interactions entre les cellules cancéreuses et le stroma.

Deuxièmement, les interactions peuvent avoir lieu via des régulations épigénétiques. Des cellules d'adénocarcinome pancréatique peuvent par exemple induire une méthylation de l'ADN dans des MSCs ou des CAFs, suite à un contact direct. Cette méthylation supprime l'expression de SOCS1, ce qui entraîne l'induction de cytokines et de facteurs de croissance dans le stroma. Les cellules cancéreuses créent ainsi un environnement qui supporte leur croissance [158]. Une autre étude a mis en contact des cellules épithéliales mammaires non cancéreuses et immortalisées (MCF10A) avec des CAFs issus de patients ayant développé ou non un cancer du sein. Le profil d'expression des MCF10A a ensuite été analysé et une hyperméthylation a été retrouvée sur un certain nombre de promoteurs pour les CAFs issus de patients avec un cancer, entraînant une diminution de l'expression des gènes concernés [159].

Troisièmement, la notion de contact entre les cellules cancéreuses et le stroma s'est révélée particulièrement importante. En effet, la co-culture avec contact entre

des MSCs et des cellules mammaires cancéreuses résulte en un changement d'expression génique dans les deux types cellulaires, favorisant le développement d'un environnement propice à la progression métastatique. Les MSCs induisent l'expression du miR-199a dans les cellules malignes, ce qui conduit à la répression de FOXP2. Cette cascade transcriptionnelle confère aux cellules cancéreuses des caractéristiques de cellules souches cancéreuses, augmentant ainsi leur capacité à initier des tumeurs et encourageant leur potentiel métastatique. Ces deux éléments ont d'ailleurs été retrouvés dans des cancers du sein en clinique [160]. Un modèle de xénogreffe a montré que des cellules mammaires cancéreuses stimulent la sécrétion *de novo* de la chimiokine CCL5 par les MSCs qui agit ensuite de manière paracrine sur les cellules cancéreuses pour augmenter leur mobilité, leur invasion et la formation de métastases. Cette induction coopérative de CCL5 requiert un contact entre les deux types cellulaires car elle n'a pas lieu lorsqu'elles sont séparées par une membrane perméable [110].

Enfin, les travaux d'A. Bergamashi ont défini quatre sous-classes de tumeurs mammaires en fonction de la composition de la MEC, ces sous-classes étant prédictives du devenir des patients. Par exemple, les tumeurs qui expriment fortement des inhibiteurs de protéases dans leur MEC sont associées à un bon pronostic, tandis que celles exprimant des intégrines et des MMPs sont associées à un mauvais pronostic et à un risque de récurrence [161]. Ces travaux montrent bien l'importance accordée au stroma dans la compréhension de la cancérogenèse.

C. Microenvironnement et transition épithéliomésenchymateuse (TEM)

1. Définition

Ce processus se définit par la capacité qu'ont certaines cellules à passer d'un phénotype épithélial à un phénotype mésenchymateux. Ce terme décrit une série d'événements au cours desquels les cellules épithéliales perdent leurs caractéristiques et acquièrent des propriétés typiques de cellules mésenchymateuses [162]. Ceci conduit à des modifications morphologiques (allongement des cellules), à une perte des jonctions cellules – cellules

caractéristiques d'un épithélium (jonctions serrées, adhérentes et communicantes) et de la polarisation apico-basale des cellules (**Figure 18**) [163,164].

Au cours du processus, on observe un changement progressif des marqueurs de surface : perte des marqueurs épithéliaux (E-cadhérine, cytokératines 9 et 18, laminine, desmoplakine...) et acquisition des marqueurs mésenchymateux (N-cadhérine, vimentine, fibronectine, β -caténine, Snail1, Slug ou Snail2, Twist...) [162]. Plus récemment, il a été montré que le programme de TEM comprend un ensemble dynamique d'états transitoires entre le phénotype épithélial et le phénotype mésenchymateux [165].

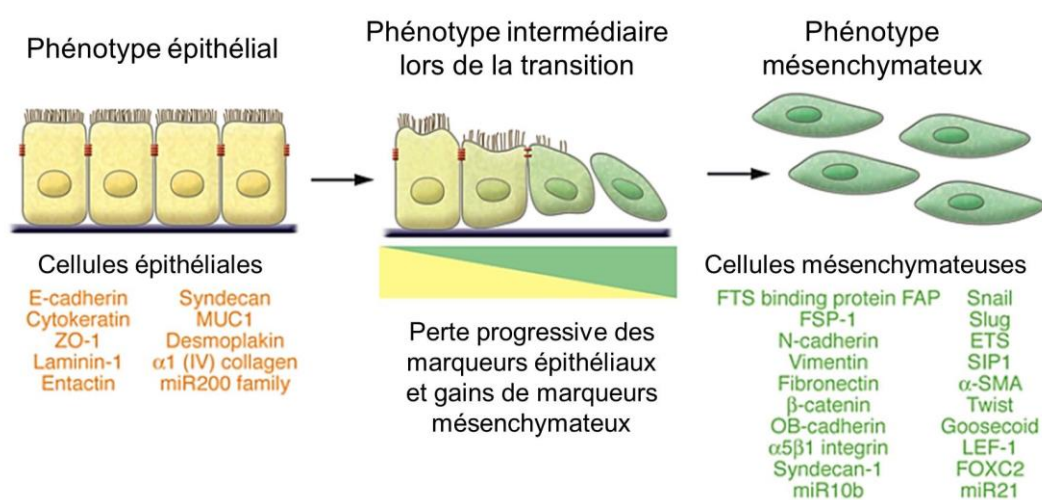


Figure 18 : La transition épithéliomésenchymateuse. (Adapté de R. Kalluri et RA Weinberg, 2009, *Journal of Clinical Investigation* [166]).

D'un point de vue physiologique, la transition épithéliomésenchymateuse joue un rôle important dans le remodelage tissulaire au cours de l'embryogenèse. Elle permet notamment la formation du 3^e feuillet embryonnaire (mésoderme), lors de la gastrulation chez les Triploblastiques, ainsi que la délamination de la crête neurale. Cette dernière consiste au détachement et à la migration d'une population de cellules dans l'ensemble de l'embryon, donnant naissance à une grande diversité de types cellulaires en fonction de leur localisation [167–169].

La TEM intervient également dans la réponse après une blessure. Au cours de la cicatrisation d'une plaie, les kératinocytes en bordure subissent une partie de ce processus et acquièrent un phénotype intermédiaire, qui leur permet de se déplacer tout en maintenant quelques contacts au lieu de migrer individuellement.

L'expression de Slug dans les kératinocytes du front de migration influence cet état. De même, son inactivation ou sa surexpression respectivement compromet ou accélère cette cicatrisation [170,171]. Enfin, à chaque cycle menstruel, l'épithélium de surface ovarien subit un processus semblable pendant la cicatrisation post-ovulatoire [172].

D'un point de vue pathologique, ce processus peut être activé de manière excessive, lors d'une inflammation chronique ou dans des conditions qui favorisent la rupture tissulaire pouvant stimuler une fibrose, où l'intégrité des tissus et le fonctionnement des organes sont compromis [173,174].

2. Rôles et conséquences dans la tumorigenèse

a. Généralités

Plusieurs observations supportent l'idée selon laquelle la TEM joue un rôle central dans la progression tumorale. Au cours de l'évolution vers un phénotype métastatique, les cellules cancéreuses acquièrent un profil d'expression génique et des propriétés mésenchymateuses. Il en résulte un changement dans les capacités d'adhésion, une activation de la protéolyse et de la motilité cellulaire [162]. Sous ce phénotype mésenchymateux, les cellules acquièrent une grande plasticité et possèdent des capacités de migration et d'invasion plus importantes, pouvant conduire au développement des métastases [175–177].

La TEM confère également des propriétés de cellules souches aux cellules qui la subissent et permettrait de générer des cellules souches cancéreuses. Les cellules souches normales et les cellules souches cancéreuses peuvent partager un phénotype mésenchymateux qui augmente leur capacité à préserver leur caractère souche, conserver leurs propriétés migratoires et répondre aux différents stimuli pendant leur expansion et leur différenciation [171]. D'ailleurs, l'association entre la TEM et la génération de cellules aux propriétés souches dans un modèle cellulaire mammaire a été démontrée [163]. Ces cellules étaient caractérisées par les expressions conjointes des CD44^{High} / CD24^{Low}, qui est une configuration associée

aux cellules souches cancéreuses mammaires [178]. Elles présentaient également une capacité augmentée à former des mammosphères, qui est une propriété associée aux cellules souches mammaires.

La TEM participe à l'hétérogénéité intratumorale et joue un rôle dans le développement des tumeurs mammaires de type basal et la génération de cellules cancéreuses mammaires avec des caractéristiques souches. Ces éléments établissent un lien entre la TEM et le gain de propriétés souches [166]. Il apparaît dans une autre étude que l'induction de la TEM dans les cellules souches cancéreuses mammaires pourrait être le résultat d'une voie de signalisation embryonnaire. En effet, l'activation d'Hedgehog (Hh), Wnt, Notch ou du TGF β entraîne une régulation à la hausse d'un groupe de facteurs de transcription qui conduisent à la TEM (**Figure 19**) [179].

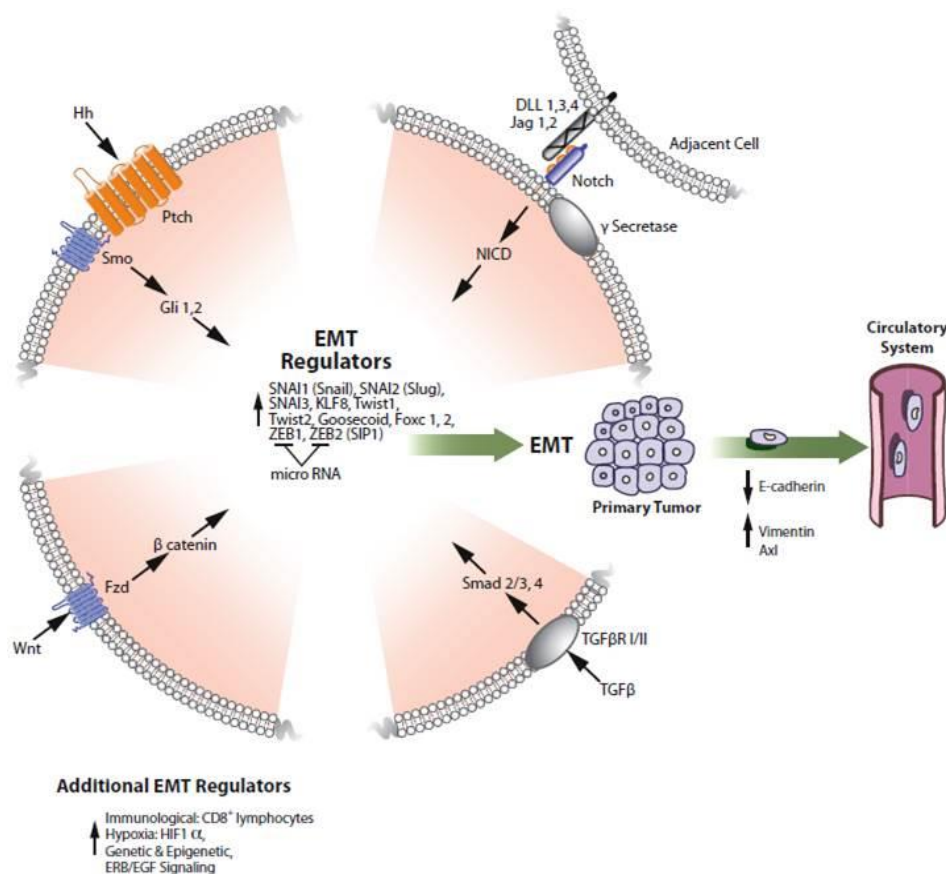


Figure 19 : Voies de signalisation embryonnaires conduisant à l'induction de la TEM. La signalisation des voies embryonnaires Hedgehog, Notch, Wnt et TGF β peut activer des régulateurs de la TEM pour induire des changements phénotypiques via différents intermédiaires de signalisation (D'après N. Takebe, 2011, *Breast Cancer Research* [179]).

b. Le TGF β

Le TGF β est reconnu comme l'un des principaux inducteurs de la TEM, qu'elle ait lieu au cours du développement, lors d'un cancer ou d'autres pathologies [180]. En conditions normales, une libération basale et continue de TGF β par des sources locales suffit à la maintenance de l'homéostasie d'un tissu. En revanche, dans des conditions de lésion tissulaire, le TGF β est abondamment relâché par les plaquettes et des composants du stroma, afin de prévenir l'inflammation et l'emballement de la prolifération cellulaire en vue de la régénération tissulaire. Ce dernier aspect s'observe aussi dans les tumeurs. En effet, le TGF β est fréquemment présent dans le microenvironnement tumoral, initialement comme un signal pour limiter la progression précancéreuse, mais ensuite comme un facteur que les cellules malignes peuvent utiliser à leur propre avantage [181].

Les sources tumorales de TGF β sont variées et incluent les cellules cancéreuses elles-mêmes mais aussi les cellules stromales. La présence de cellules infiltrant les tumeurs (leucocytes, macrophages...) coïncide avec la sécrétion de TGF β et est suspectée d'être une source de son accumulation au front d'invasion de la tumeur [182]. Des sources locales spécialisées de TGF β sont aussi importantes dans le contexte des métastases. Par exemple la matrice osseuse stocke le TGF β , qui se retrouve mobilisé lors des métastases ostéolytiques [183].

Il possède des effets suppresseurs de tumeur en participant à la régulation de l'homéostasie cellulaire, de la différenciation et de l'apoptose, mais également en contrant l'inflammation [181]. Au cours du processus tumoral, cette réponse suppressive peut être perdue. Les cellules cancéreuses utilisent alors le TGF β dans leur intérêt pour initier l'évasion face au système immunitaire, produire des facteurs de croissance, se différencier en un phénotype invasif et finalement aboutir à la dissémination métastatique. Lors de l'étape d'invasion et de dissémination, il va faciliter la TEM et la mobilisation de myofibroblastes [184]. Ces derniers produisent des cytokines (IL-8 et VEGF) et des chimiokines (CXCL12) qui soutiennent la prolifération des cellules cancéreuses, l'invasion et la néoangiogenèse.

c. Relation entre TEM et BRCA1

Les porteurs d'une mutation de *BRCA1* sont plus à risque de développer des tumeurs mammaires de type basal avec des métastases et un mauvais pronostic. Le processus de TEM a également été associé à ce type de tumeurs. Plusieurs travaux ont été menés afin d'éclaircir le lien potentiel entre *BRCA1* et la TEM.

Le travail de F. Bai a étudié un modèle murin qui développe des tumeurs de type luminal via la délétion de la protéine CDKN2C (ou p18) appartenant à la famille des inhibiteurs du cycle cellulaire. Cette délétion stimule la prolifération des cellules souches luminales mammaires [185]. L'ajout d'une mutation de *BRCA1* chez les souris déficientes pour cette protéine active la TEM et induit la dédifférenciation des cellules souches luminales, ce qui est étroitement associé à l'expansion de cellules souches basales et cancéreuses ainsi qu'à la formation de tumeurs de type basal [186]. En bloquant le développement des progéniteurs luminaux, la mutation de *BRCA1* transforme la tumeur luminale en tumeur basale [187]. D'un point de vue mécanistique, *BRCA1* se fixe sur le promoteur de Twist, l'un des facteurs de transcription associé à la TEM, et régule négativement sa transcription. L'étude a montré qu'une mutation de *BRCA1* était suffisante pour activer Twist avec pour conséquence l'induction du processus de TEM et l'augmentation de la formation tumorale [186]. Dans le modèle murin utilisé, il a été observé que les cellules tumorales positives pour *BRCA1* n'exprimaient que très peu de Twist, confirmant la régulation transcriptionnelle de *BRCA1*.

L'étude de TA Proia s'est intéressée à Slug, un autre facteur de transcription associé à la TEM. Elle a relevé de hauts niveaux protéiques de Slug dans des mastectomies prophylactiques et dans des tumeurs présentant une mutation de *BRCA1*. Elle a également montré qu'une mutation de *BRCA1* était associée à une stabilisation de la protéine Slug qui était aussi impliquée dans la régulation d'un phénotype basal [86]. Cette stabilisation pourrait aussi supporter le processus de TEM. La protéine Snail1 a, quant à elle, montré une capacité à induire la TEM *in vivo* dans des cellules de tumeur primaire et à promouvoir la récurrence. Les tumeurs récurrentes présentaient des cellules ayant subi une TEM. En clinique, une

expression élevée de Snail1 a été associée à une diminution de la survie sans rechute [188].

Enfin, les travaux de D. Tkocz ont montré que BRCA1 pouvait se lier au promoteur de *FOXC1* et réprimer sa transcription. L'expression de *FOXC1* a été associée à une mauvaise réponse à la thérapie conventionnelle dans les cancers du sein triple négatifs et de type basal. Ceci pourrait s'expliquer par l'importance de *FOXC1* pour la prolifération et la survie de lignées cellulaires basales et le lien entre cette expression et des marqueurs de la TEM (E-cadhérine, vimentine, fibronectine). *FOXC1* semble être un médiateur de l'agressivité des cancers de type basal et sa régulation par BRCA1 supporte l'idée que BRCA1 agit comme un suppresseur des facteurs de transcription liés à la TEM [189].

3. Implication du microenvironnement dans le processus de transition épithéliomésenchymateuse

Au cours de la progression tumorale, le programme de TEM est en partie induit et maintenu par une combinaison de signaux multiples (paracrines et juxtacrines) dérivés du stroma (**Figure 20**) [190]. On y trouve par exemple des facteurs de croissance (EGF, HGF, FGF et VEGF), des cytokines (TGF β), la prostaglandine et l'implication de voies de signalisation comme Wnt, Notch, Sonic Hedgehog [171]. D'autres facteurs du microenvironnement sont aussi liés à ce phénomène, telle l'hypoxie décrite comme un régulateur important de la TEM [191].

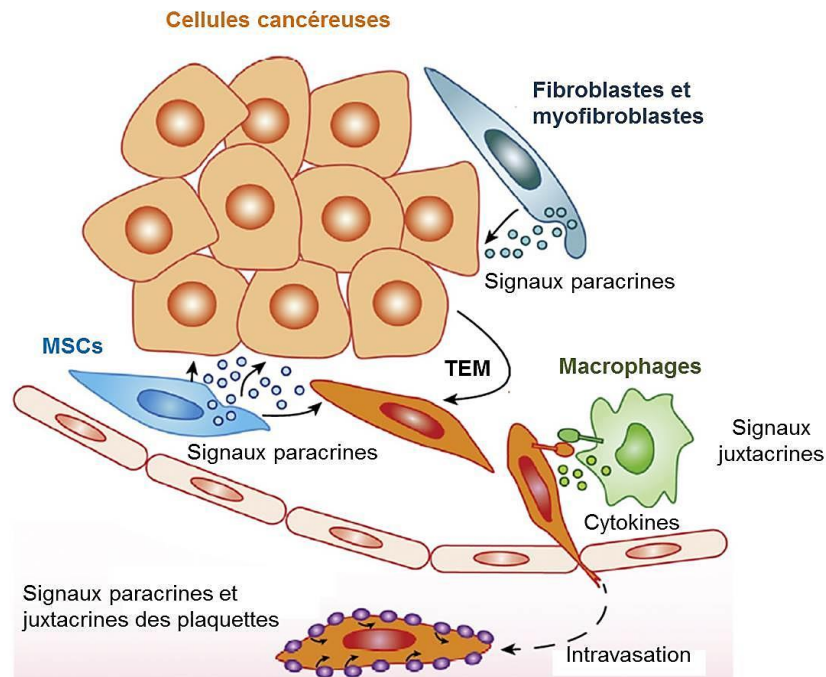


Figure 20 : Signaux du microenvironnement tumoral et TEM. (Adapté de X. Ye et RA Weinberg, 2015, *Trends in Cell Biology* [190]).

Parmi les cellules stromales jouant un rôle dans le phénomène de TEM, les MSCs et les CAFs occupent une place prépondérante. Les MSCs ont notamment montré une capacité à stimuler la TEM dans plusieurs types de cancers. Par exemple, des MSCs issues de la moelle induisent *in vitro* l'expression d'un panel de gènes relatifs à la TEM, réduisent l'expression de l'E-cadhérine et augmentent le potentiel invasif de cellules colorectales cancéreuses. Cette tendance est observée *in vivo* où la coinjection des deux types cellulaires permet la formation de tumeurs plus massives et l'augmentation de marqueurs mésenchymateux. Cette induction de la TEM passe par un contact et est médiée par l'expression membranaire de TGF β sur les MSCs, suite à l'interaction avec les cellules cancéreuses [192]. De la même manière dans le cancer du pancréas, il a été montré que des MSCs pré-traitées avec du TGF β induisaient la TEM (augmentation de Snail1 et Slug, diminution de l'E-cadhérine) sur une population de cellules pancréatiques malignes dans une co-culture *in vitro*. Le volume tumoral observé *in vivo* lors d'une coinjection de MSCs et de cellules pancréatiques était fortement augmenté en comparaison avec les cellules cancéreuses seules [193].

Concernant le cancer du sein, la co-culture de cellules mammaires malignes et de MSCs issues de la moelle entraîne une augmentation de l'expression de certains marqueurs de la TEM (Snail, Twist et Vimentine), montrant une nouvelle fois que les MSCs agissent comme un stimulus pour induire la TEM et augmenter ainsi le potentiel métastatique des cellules tumorales [194]. L'intervention des CAFs, très proches des MSCs, dans l'induction de la TEM a aussi été établie. La simple mise en contact de milieu conditionné de CAFs et de lignées de cancer du sein a induit un phénotype plus agressif incluant de la migration, de l'invasion et l'activation d'une TEM médiée par du TGF β 1 [195]. L'ensemble de ces résultats indique que le stroma participe au processus de TEM par la sécrétion de molécules mais aussi par le contact cellulaire.

Nous pouvons également relever le lien établi entre la POSTN et la TEM. En effet, la POSTN a été décrite non seulement comme un marqueur de la TEM mais aussi comme un inducteur de ce phénomène. W. Yan a montré que l'expression ectopique de POSTN dans une lignée maligne mais non invasive (293T) induisait la TEM et soutenait l'invasion et les métastases *in vivo*. Cette régulation positive de la POSTN était accompagnée de celle de la vimentine, de la fibronectine et de la forme active de la MMP9 [196]. CJ Kim a décrit des résultats similaires avec des lignées de cancer de la prostate. Le caractère invasif observé passait par une régulation négative de l'E-cadhérine *via* Snail. En revanche, des effets opposés ont été observés dans des lignées de cancer de la vessie, suggérant que la voie de régulation est dépendante de la lignée cellulaire [197].

La TEM représente donc une problématique majeure de par son implication dans les stades précoces de la maladie (initiation), mais aussi les stades tardifs (métastases).

D. Microenvironnement et angiogenèse

1. Définitions

a. Angiogenèse physiologique

L'angiogenèse se définit comme étant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir d'un réseau vasculaire préexistant [198,199]. Elle a pour principale fonction d'apporter de l'oxygène et des nutriments aux organes, ce qui permet leur croissance et leur bon fonctionnement. Ce processus est très actif au cours du développement embryonnaire (formation du placenta, croissance fœtale) mais plus restreint chez l'adulte. De manière physiologique, elle est impliquée dans les phénomènes de cicatrisation, de réparation cellulaire (ischémie) et lors du cycle menstruel chez la femme. L'angiogenèse est également observée dans certaines pathologies comme le cancer, le diabète et la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) [200]. Elle est régulée par une balance entre des molécules pro-angiogéniques (VEGF, PDGF, b-FGF, TGF β , IL-8...) et des molécules anti-angiogéniques (angiostatine, thrombospondine...) [201].

Ce processus peut se dissocier en deux grandes étapes : l'induction qui correspond à une dégradation de la membrane basale du vaisseau et la résolution qui aboutit à la reformation de cette membrane. Sous l'effet de facteurs pro-angiogéniques, les cellules endothéliales sont activées, la membrane basale dégradée et la MEC partiellement remodelée par des protéinases comme les MMPs. Les cellules endothéliales prolifèrent et migrent vers la source du stimulus (chimiotactisme), puis se réorganisent pour former des tubes capillaires. Des péricytes (pour les capillaires) et éventuellement des cellules musculaires lisses (pour les artérioles et veinules) sont recrutés pour se disposer autour des cellules endothéliales et une nouvelle membrane basale se forme. Cette organisation permet la stabilisation des nouvelles structures et leur perfusion [202].

b. Angiogenèse tumorale

La tumeur a comme tout organe des besoins en oxygène et en nutriments qui sont nécessaires à sa croissance, à sa survie puis à sa dissémination métastatique. Les travaux de J. Folkman ont suggéré en 1971 que l'angiogenèse était indispensable à la tumeur dès que celle-ci atteignait une taille de 2 mm [203]. Au début, la masse tumorale est avasculaire, puis au fur et à mesure de son développement, des conditions d'hypoxie vont apparaître, nécessitant la mise en place d'un réseau vasculaire. Cependant, contrairement aux vaisseaux sanguins normaux qui présentent une architecture organisée, régulière et fonctionnelle, les vaisseaux tumoraux sont caractérisés par des défauts structuraux et sont peu fonctionnels [204]. Ce sont souvent des capillaires formés par une monocouche non homogène de cellules endothéliales avec des jonctions lâches (capillaires fenestrés) provoquant des fuites hémorragiques. Ils comptent également de nombreuses ramifications [204,205].

L'ensemble de ces anomalies contribue à une perfusion sanguine irrégulière, ce qui maintient l'état d'hypoxie et la stimulation du processus d'angiogenèse. Cette vascularisation anormale empêche également la distribution de molécules thérapeutiques, entraînant une résistance de la tumeur aux traitements systémiques [204]. Dans de nombreux cancers (sein, vessie, estomac), l'augmentation de l'angiogenèse a d'ailleurs été associée à un mauvais pronostic, au développement de métastases et à une survie réduite [206].

c. Le switch angiogénique

De la même manière que le processus physiologique, l'angiogenèse tumorale est régulée par une balance entre molécules pro et anti-angiogéniques. L'initiation de cette angiogenèse résulte du déséquilibre entre ces facteurs et porte le nom de « switch angiogénique ». En réponse à un environnement hypoxique, les cellules tumorales vont produire des facteurs pro-angiogéniques et des enzymes protéolytiques, favorisant ainsi l'angiogenèse [201]. Sous l'effet de ces signaux et principalement du VEGF, l'activation des cellules endothéliales a lieu. Une fois activées, elles acquièrent des propriétés de prolifération et de migration [207], puis

elles vont se différencier pour former un nouveau vaisseau. La croissance de ce dernier est assurée par la sécrétion des facteurs pro-angiogéniques jusqu'à ce qu'il atteigne la tumeur (**Figure 21**). Afin de s'adapter à la croissance tumorale et aux besoins nutritifs de la tumeur, les cellules endothéliales des vaisseaux tumoraux sont maintenues dans un état d'activation et de prolifération permanent.

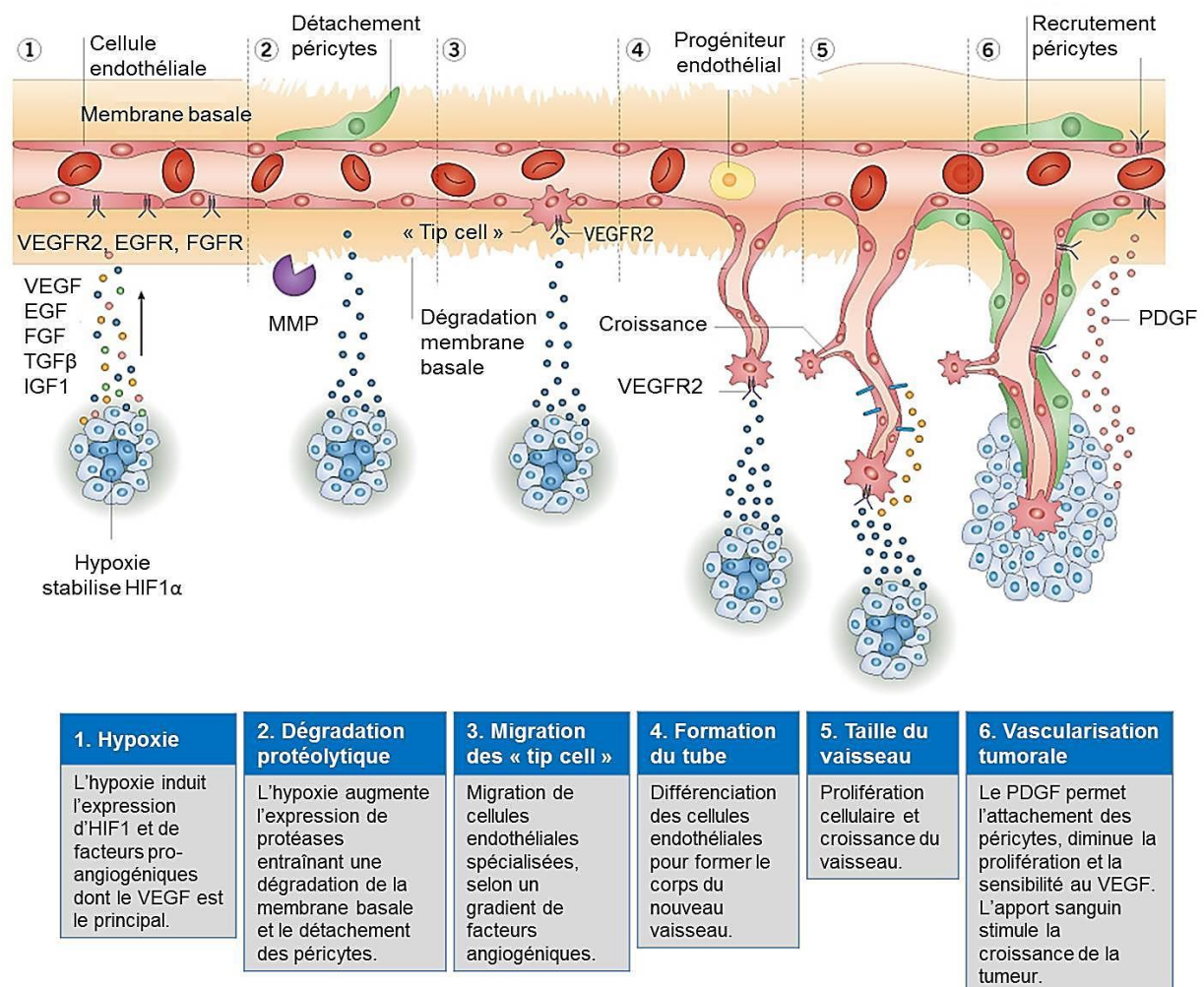


Figure 21 : Angiogenèse. (Adapté de Cancer Research Product Guide Tocris 2015).

Cette étape clef et fondamentale a lieu au début du processus de tumorigenèse puis lors de la dissémination métastatique. Bien que les cellules tumorales soient la principale source des molécules pro-angiogéniques, d'autres types cellulaires présents dans le stroma participent à leur sécrétion comme les fibroblastes, les cellules immunitaires, les cellules circulantes sans oublier le rôle joué par la MEC dans la libération de ces facteurs [208].

2. Hypoxie

L'hypoxie définit un état où la concentration en oxygène atteint des valeurs très faibles, comme dans les zones profondes des tumeurs. En effet, la prolifération de la masse tumorale se fait plus rapidement que celle d'un réseau vasculaire et les cellules tumorales se retrouvent rapidement dans un milieu déficient en oxygène, c'est-à-dire hypoxique [209]. D'un point de vue histologique, les tumeurs présentent souvent un noyau central de cellules nécrotiques résultant d'une baisse de la disponibilité en oxygène et d'une privation en nutriments (**Figure 22**) [209]. Ces conditions d'hypoxie entraînent une réponse moléculaire, dans les cellules normales et cancéreuses qui conduit à l'activation d'un facteur de transcription clef : HIF1 (*Hypoxia Inducible Factor*).

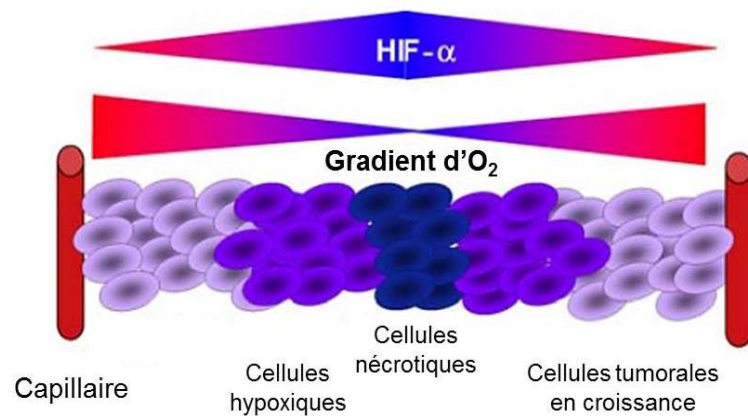


Figure 22 : Caractéristiques d'une masse tumorale hypoxique.

La concentration en oxygène diminue avec l'éloignement des capillaires. Le gradient d'HIF1 est inversement proportionnel à celui d'O₂. (Adapté de C. Brahimi-Horn, 2007, *Journal of Molecular Medicine* [209]).

a. HIF1

HIF1 est un hétérodimère constitué de deux sous-unités : HIF1-α et HIF1-β. Alors qu'HIF1-β est une protéine nucléaire exprimée constitutivement et indépendante de l'oxygène, HIF1-α est continuellement dégradée en conditions normoxiques par la voie du protéasome [210]. En revanche en hypoxie, HIF1-α transloque dans le noyau où il se dimérise avec HIF1-β. Le complexe formé agit comme un facteur de transcription de nombreux gènes en se liant à une séquence HRE (*Hypoxia Responsive Elements*) de leurs promoteurs [211]. Les gènes cibles

sont notamment impliqués dans l'angiogenèse (**Tableau 3**) comme l'angiopoïétine et le VEGF ou sont exploités par les cellules tumorales pour la survie, la progression et la résistance aux traitements [209,211].

Pro-angiogénique	Anti-angiogénique	Fonction
VEGF VEGFR-1, VEGFR-2 Angiopoïétine 2, Tie2		Initiation de l'angiogenèse Perméabilité vasculaire Détachement des péricytes Dégradation de la membrane basale
FGF, PDGF, Interleukines, intégrines	Thrombospondine-1 Angiostatine	Formation des néo-vaisseaux Prolifération et migration des cellules endothéliales et des péricytes
PDGF Angiopoïétine-1, endothéline-1, endogline	Vasoinhibine	Maturation Attachement des péricytes Dépôt de membrane basale Perméabilité vasculaire, vasoconstriction

Tableau 3 : Gènes impliqués dans l'angiogenèse et induits par HIF1- α .
(Adapté d'A. Desroches-Castan, 2014 [200]).

L'activité d'HIF1- α est régulée par trois enzymes prolyl hydroxylases (PHD1, 2 et 3). En présence d'oxygène, ces enzymes hydroxylent deux résidus proline, entraînant la reconnaissance d'HIF1- α par l'ubiquitine ligase von Hippel-Lindau (pVHL) et conduisant à sa dégradation par le protéasome. En hypoxie les PHD deviennent inactives permettant à HIF1- α de se lier à HIF1- β et d'activer leurs gènes cibles [212]. HIF1 peut également être activé en conditions non-hypoxiques par des oncogènes ou des facteurs de croissance, permettant à la tumeur de stimuler l'angiogenèse avant d'être privée d'oxygène [201].

L'importance de ce facteur de transcription a été démontrée chez la souris où une invalidation aboutit à une létalité embryonnaire au 10^{ème} jour. Les embryons présentent alors des malformations vasculaires, cardiaques et neuronales importantes [200].

b. Relation entre HIF1 et BRCA1

Les cancers du sein sporadiques présentent rarement des mutations dans le gène *BRCA1* [213]. En revanche une diminution de l'expression de *BRCA1* a été observée dans plusieurs cancers non-familiaux et est corrélée à un mauvais pronostic. Les travaux de RS Bindra indiquent que le microenvironnement et plus précisément l'hypoxie contribuent à l'instabilité génétique. Ils montrent en effet que l'hypoxie régule négativement l'expression de *BRCA1*. Ce changement d'expression passe par une modification de la liaison des protéines E2F sur le promoteur de *BRCA1*. La famille des protéines E2F comporte des formes activatrices et des formes répressives. Sous l'effet de l'hypoxie, la forme répressive se fixe plus favorablement sur le promoteur de *BRCA1*, entraînant une diminution de son expression. Nous avons vu précédemment que *BRCA1* est impliqué dans les processus de réparation de l'ADN comme la recombinaison homologue. La diminution de son expression va donc conduire à des réparations moins fidèles, passant par la voie du NHEJ (*Non Homologous End-Joining*) et à une instabilité génétique [214].

Une étude de M. Yan s'est intéressée au lien entre les membres de la voie de l'hypoxie (HIF1- α , VEGF, PHD et FIH (*Factor Inhibiting HIF*)) et les cancers du sein héréditaires. Ils ont pu montrer que le caractère agressif des tumeurs BRCA1 et de type basal pouvait être expliqué en partie par une augmentation du caractère hypoxique. En effet ces tumeurs sont associées à une forte expression d'HIF1- α et à une faible présence de ses inhibiteurs (PHD3 et FIH). En l'absence de PHD3, HIF1- α échappe à la dégradation, ce qui entraîne une augmentation de sa concentration et de son activité. Ces conditions favorisent la maintenance d'un état hypoxique et sont corrélées à un grade tumoral avancé. L'étude a également montré que ces tumeurs présentaient un statut négatif aux RE, rendant les traitements plus délicats [212].

Il a été montré que *BRCA1* joue un rôle dans la réponse hypoxique en régulant la stabilité d'HIF1- α et en modulant l'expression du *VEGF* [215]. Afin de déterminer si l'hypoxie est un effet tardif ou un réel événement cancérigène chez les patients avec une prédisposition familiale, P. Van der Groep a analysé l'expression de marqueurs de l'hypoxie dans des carcinomes canauxaires *in situ*. Ce type de carcinome est

considéré comme précurseur d'un cancer invasif. La surexpression d'HIF1- α a été trouvée dans 63% des cancers *BRCA1* contre 34% pour les non-mutés. Ces résultats indiquent que l'hypoxie joue un rôle plus important dans les tumeurs ayant une mutation pour *BRCA1* et qu'elle est présente au stade *in situ* du développement tumoral. Elle pourrait donc conduire la progression tumorale vers un stade invasif et plus agressif [216].

3. Implication du microenvironnement dans le processus d'angiogenèse

L'angiogenèse est désormais reconnue comme l'une des caractéristiques du cancer, en réponse à un besoin croissant en oxygène et nutriments, sans lesquels la tumeur demeurerait dans un état de dormance. La vascularisation tumorale requiert la coopération de plusieurs types cellulaires du microenvironnement : les cellules endothéliales qui adhèrent entre elles pour assurer l'intégrité du vaisseau, les péricytes qui entourent le vaisseau et dictent sa maturité et les précurseurs dérivés de la moelle. La mise en place de ce phénomène est souvent régulée par l'hypoxie. D'autres cellules viennent s'ajouter, comme les MSCs, les CAFs et les TAMs et contribuent à la vascularisation tumorale en produisant notamment une grande quantité de signaux pro-angiogéniques dans le stroma [149].

Le microenvironnement au front invasif de la tumeur est différent de celui situé au centre de la masse tumorale. L'oxygène étant plus disponible en périphérie, l'hypoxie a tendance à être associée au centre de la tumeur. La relation entre la concentration en oxygène et les cellules immunitaires peut accentuer la dissémination métastatique. En effet, l'hypoxie entraîne le recrutement des cellules immunitaires mais celles-ci vont se concentrer à la périphérie de la tumeur et soutenir l'invasion du cancer. Au cœur de la tumeur, l'hypoxie contribue à l'échappement des cellules cancéreuses en créant une pression de sélection qui favorise les cellules à caractère souche. Ces cellules migrent ensuite vers la bordure de la tumeur [149].

Dans le cas du cancer du sein, l'implication de l'hypoxie et des cellules stromales dans les processus d'angiogenèse et de métastase a été rapportée à plusieurs reprises.

Tout d'abord, l'injection de milieu conditionné de cellules mammaires cancéreuses cultivées en hypoxie entraîne chez la souris l'infiltration de cellules dérivées de la moelle dans le poumon, malgré l'absence d'une tumeur primaire [149]. La lysyl oxydase (LOX), l'une des cibles d'HIF a montré une capacité à recruter des cellules myéloïdes, ce qui facilite par la suite la colonisation métastatique dans le poumon [217]. Dans ces deux cas, l'hypoxie permet un recrutement cellulaire qui favorise le développement d'une niche métastatique.

En ce qui concerne les cellules du microenvironnement, A. Orimo a montré que la sécrétion de SDF-1 par des CAFs augmente la croissance et l'angiogenèse des tumeurs mammaires [101]. De même, la production d'angiopoïétine 2 par des cellules dérivées de la moelle permet la croissance tumorale en favorisant la vascularisation des nodules métastatiques dans le cancer du sein [218].

Enfin dans d'autres contextes cancéreux, la POSTN est aussi reliée à l'hypoxie et à l'angiogenèse. Sous l'effet de l'hypoxie, la POSTN a montré qu'elle augmente la survie de cellules cancéreuses de côlon mais également de cellules endothéliales des microvaisseaux [143]. Elle a aussi été retrouvée surexprimée dans des cancers gastriques où elle contribue à l'activité pro-angiogénique *via* la régulation de l'expression du VEGF [219].

Partie III

Cellules souches et modélisation de pathologie

A. Généralités sur les cellules souches

1. Définitions

Les cellules souches sont définies par deux caractéristiques principales. La première est l'auto-renouvellement, c'est à dire qu'elles sont capables de se diviser physiologiquement de manière illimitée, contrairement aux cellules cancéreuses, qui acquièrent cette propriété au cours d'un processus pathologique. Les cellules filles obtenues sont identiques à la cellule d'origine par conservation des propriétés génétiques, épigénétiques et phénotypiques. La seconde caractéristique de ces cellules est leur potentiel de différenciation, leur permettant de donner naissance à toutes les cellules spécialisées qui composent l'organisme.

Il existe plusieurs catégories de cellules souches selon leur capacité de différenciation. Les cellules totipotentes sont capables de produire tous les lignages embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme) et extra-embryonnaires (placenta et cordon ombilical). Elles sont donc en mesure de générer un organisme entier mais ne sont présentes qu'aux tout premiers stades du développement (zygote et morula). Les cellules pluripotentes donnent naissance aux lignages embryonnaires, y compris les lignées germinales, à l'exception des annexes extra-embryonnaires. Les cellules souches embryonnaires, isolées à partir de la masse cellulaire interne du blastocyste en sont l'exemple type. Ce potentiel de différenciation, très élevé chez ces deux premiers types cellulaires, diminue ensuite au cours du développement. Les cellules souches présentes chez l'embryon après le stade de blastocyste, chez le fœtus ou chez l'adulte sont qualifiées de multipotentes. Elles sont toujours capables de s'auto-renouveler mais elles sont déjà engagées dans une voie de différenciation. Chez le fœtus elles participent à l'organogénèse et à la constitution chez l'adulte d'un réservoir à vie de cellules souches tissu-spécifiques à potentiel de différenciation restreint pour assurer l'homéostasie du tissu. Parmi les cellules multipotentes, on peut citer les cellules de la crête neurale chez l'embryon et les cellules souches mésenchymateuses ou hématopoïétiques chez l'adulte.

2. Les cellules souches embryonnaires : ES

Les premières lignées de cellules ES ont été établies chez la souris et dérivées de la masse cellulaire interne de l'embryon au stade blastocyste [220,221]. Elles ont alors représenté un outil majeur pour étudier la différenciation et générer des modèles murins génétiquement modifiés [222,223].

Les premières lignées ES humaines ont quant à elles été obtenues en 1998 [224] et ont suscité un grand intérêt quant aux applications biologiques et médicales potentielles. En effet, il était envisagé d'étudier le développement embryonnaire ou encore de modéliser des pathologies liées à une mutation génétique. Cependant, l'utilisation de cellules embryonnaires a soulevé des questions éthiques, conduisant à la mise en place de législations limitant, voire interdisant l'exploitation de ces cellules en recherche. En France, certains travaux ont été autorisés, sous conditions dérogatoires, grâce à la loi de bioéthique de 2004.

B. Les cellules souches pluripotentes induites humaines : iPSCs

Afin de dépasser les limites engendrées par la législation et les considérations éthiques, de nouvelles méthodes permettant l'obtention de cellules pluripotentes ont été développées.

1. Obtention des premières iPSCs

En 2006, des cellules souches pluripotentes induites sont générées pour la première fois à partir de fibroblastes murins par S. Yamanaka et K. Takahashi [225]. Un premier travail a consisté à identifier les gènes impliqués dans le maintien de la pluripotence et dans l'auto-renouvellement des cellules ES murines. Cette étude a sélectionné 24 gènes et l'expression simultanée de ceux-ci a permis une reprogrammation des fibroblastes. Par la suite, 4 gènes ont été identifiés comme étant suffisants pour induire la reprogrammation : *OCT4* (ou *POU5F1*), *SOX2*, *KLF4* et *C-MYC*.

Les cellules obtenues par cette technique présentaient des caractéristiques similaires à celles des cellules ES en terme de morphologie, d'expression de marqueurs de surface et de facteurs de transcription. De même, elles étaient

capables d'auto renouvellement et de se différencier *in vitro* et *in vivo* vers les trois feuillets embryonnaires. Cette technique de reprogrammation en cellule iPSCs a été appliquée en 2007 à des cellules humaines [226,227] et ces recherches ont valu le Prix Nobel de Médecine à S. Yamanaka en 2012.

2. Caractéristiques des iPSCs

Les iPSCs présentent des caractéristiques communes aux cellules ES d'un point de vue morphologique, moléculaire et fonctionnel. Celles-ci permettent de les valider comme cellules souches pluripotentes.

Au niveau morphologique les iPSCs humaines présentent un rapport nucléocytoplasmique élevé et s'organisent en colonies compactes, arrondies et plates [228]. Elles prolifèrent rapidement et ont longtemps été cultivées sur une monocouche de fibroblastes embryonnaires murins (MEF) - préalablement traités par la mitomycine C ou par irradiation - pour en bloquer la prolifération. Aujourd'hui, d'autres techniques de culture existent (comme celle utilisant une couche de Matrigel) permettant de s'affranchir des MEF (« *feeder-free* »).

Sur le plan moléculaire, les principaux marqueurs de surface retrouvés sont le SSEA-3 (*Stage Specific Embryonic Antigen*), SSEA-4, TRA-1-60 (*Tumor Rejection Antigen*) et TRA-1-81. Au niveau nucléaire, on note l'expression de facteurs de transcription, dont l'activité est fondamentale pour le maintien de la pluripotence : OCT4, SOX2 et NANOG. De plus ces cellules présentent une forte activité télomérasique qui assure le maintien de la stabilité et de l'intégrité chromosomique au fur et à mesure des divisions et empêche ainsi la sénescence des cellules. Elles ont aussi une activité enzymatique importante par l'alcaline phosphatase.

Le caractère pluripotent des cellules souches peut être vérifié de deux manières. En condition non adhérente et dans un milieu favorisant la différenciation, les iPSCs peuvent former *in vitro* des corps embryonnaires ou EB (*embryoid bodies*). Ce sont des agrégats cellulaires en trois dimensions comportant les dérivés cellulaires des trois feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme), ce qui confirme leur caractère pluripotent. Le test de référence pour les iPSCs murines consiste à les injecter dans la masse interne d'un blastocyste, de le

réimplanter et de vérifier le chimérisme chez les souris obtenues, c'est-à-dire la présence de tissus originaires des iPSCs. Ce test est bien entendu impossible à réaliser avec les iPSCs humaines, pour des raisons éthiques évidentes. Il est remplacé par l'injection intramusculaire d'iPSCs chez la souris entraînant la formation d'un tératome. Celui-ci est composé de types cellulaires issus des trois feuillets embryonnaires et témoigne de la pluripotence des cellules [229].

3. La reprogrammation

a. Bref historique de la reprogrammation

La technologie utilisée pour générer des iPSCs a bénéficié des avancées obtenues par des travaux antérieurs sur la reprogrammation. Ce concept de reprogrammation cellulaire est proposé pour la première fois en 1962 par J. Gurdon, suite à un transfert nucléaire chez le Xénope. Il montre qu'il est possible de générer des têtards après la transplantation d'un noyau de cellule intestinale (cellule différenciée) dans un ovocyte énucléé [230]. Plus tard (1997), I. Wilmut reproduit ces résultats chez le mammifère avec la brebis Dolly [231]. Ces expériences ont montré que la différenciation ne modifie pas l'information génétique de la cellule différenciée à partir de la cellule souche pluripotente et que ce processus est réversible. Une autre technique a consisté à fusionner des cellules de carcinome embryonnaire avec des cellules différenciées. Les cellules résultantes avaient acquis les propriétés des cellules embryonnaires [232]. La dominance de cet état pluripotent par rapport à l'état différencié suggère l'existence de facteurs trans-activateurs solubles capables de conférer ces caractéristiques. Enfin, l'obtention des premières iPSCs en 2006 a nécessité une transduction virale de facteurs de transcription.

b. Les techniques de reprogrammation

Depuis la reprogrammation par rétrovirus de S. Yamanaka avec le « cocktail OSKM » (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *C-MYC*), suivie de celle par lentivirus de J. Thompson avec le « cocktail OSLN » (*OCT4*, *SOX2*, *LIN28*, *NANOG*), de nombreux vecteurs ont été développés. Il est possible de classer les techniques de reprogrammation selon leur caractère intégratif ou non (**Figure 23**).

Les vecteurs viraux intégratifs (rétrovirus et lentivirus) ont été les premiers utilisés. Malgré une bonne efficacité, leur intégration permanente dans le génome de la cellule a constitué leur principale limitation. Plusieurs analyses (génomiques et épigénomiques) ont révélé des anomalies comme l'apparition de modifications épigénétiques [233], de réarrangements génomiques et de caryotypes anormaux [14]. Cette insertion aléatoire augmente le risque mutagène et celui de la réactivation d'oncogènes, empêchant l'utilisation de ces cellules en thérapeutique. Par exemple, la réactivation de *C-MYC* conduit à la formation de tumeurs chez l'animal chimérique [234]. De plus, l'extinction des vecteurs peut être incomplète, laissant une expression résiduelle pouvant limiter la capacité de différenciation des cellules reprogrammées [235]. Ces premiers outils ont été améliorés par la conception de vecteurs excisables, basés sur le système de recombinaison ou de transposons.

Les vecteurs viraux non intégratifs (adénovirus, virus de Sendai) ont ensuite été utilisés car ils présentent l'avantage de ne pas intégrer leur génome dans celui de la cellule transduite. Le virus de Sendai est actuellement le plus utilisé. Son génome reste dans le cytoplasme et son expression diminue au cours de la culture, aboutissant à son élimination complète [236].

D'autres techniques ont continué à être développées en adoptant différents outils : épisomes non-intégratifs dérivés du virus Epstein-Barr (réplication lors des cycles de division cellulaire, efficacité faible mais augmentée par l'association de petites molécules) [237], ARNm apportés par des transfections répétitives [238], protéines recombinantes (efficacité très faible) [239,240].

La reprogrammation reste donc une étape délicate dont l'efficacité et la cinétique dépendent de nombreux paramètres tels que l'espèce étudiée, le choix de la cellule de départ (type cellulaire, âge) et la technique utilisée.

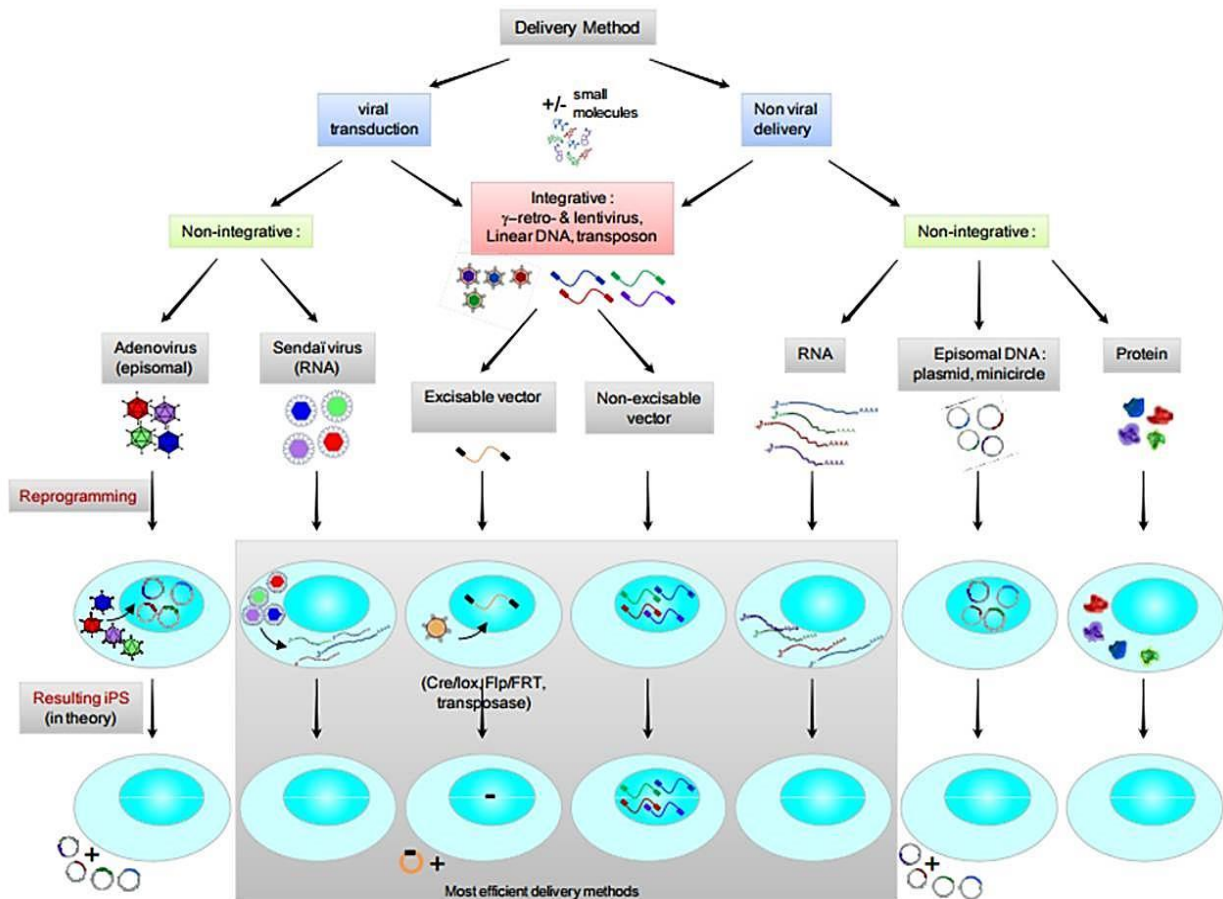


Figure 23 : Les différents vecteurs utilisés pour la reprogrammation de cellules différenciées en iPSCs. (D'après E. Bayart, 2013, *Current Gene Therapy* [241]).

c. Les mécanismes de la reprogrammation

Le processus de reprogrammation prend 3 à 4 semaines pour des cellules humaines et implique des remaniements génomiques, épigénomiques, phénotypiques et métaboliques de la cellule somatique. Au fur et à mesure que le processus moléculaire progresse, l'expression virale des transgènes va diminuer pour laisser place à une expression endogène des facteurs OSKM (**Figure 24**).

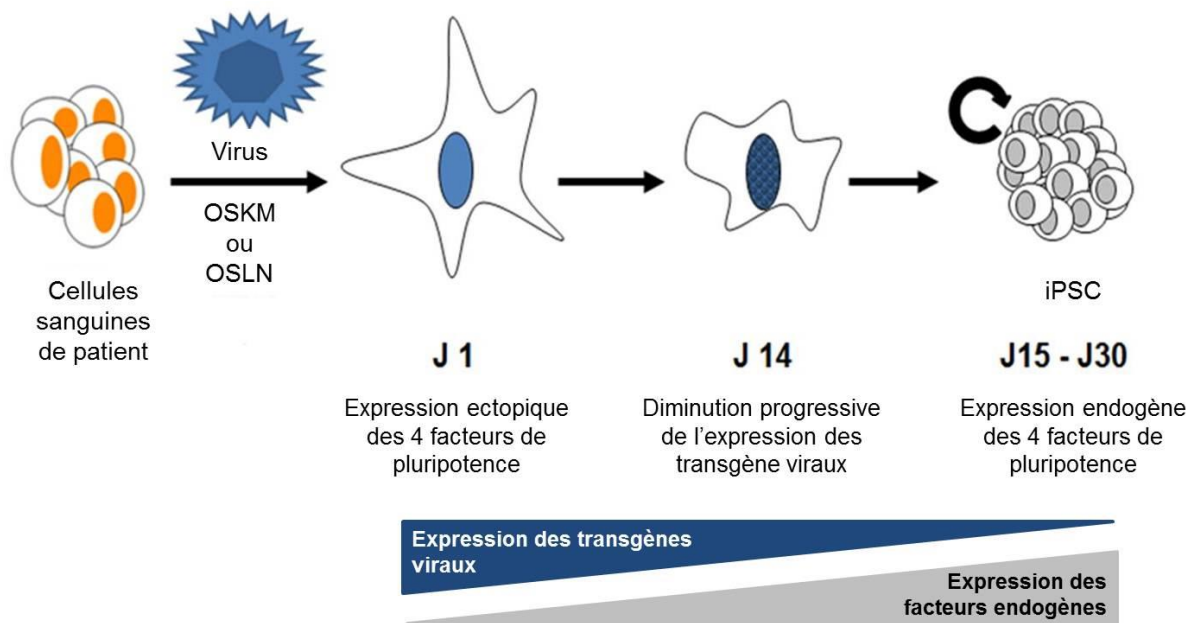


Figure 24 : Schéma de la reprogrammation de cellules sanguines de patients en iPSCs par transduction virale. (D'après O. Féraud).

Cette progression vers la pluripotence se fait via plusieurs « vagues » transcriptionnelles conduisant à des modifications successives (**Figure 25**) [242]. L'expression des transgènes va entraîner une méthylation des gènes somatiques aboutissant à une diminution de leur expression, notamment les marqueurs mésenchymateux. En effet, dans le cas d'un fibroblaste, il présente une origine mésenchymateuse, tandis que la cellule souche est épithéliale. Une transition mésenchymo-épithéliale (MET) doit donc avoir lieu et elle est rendue possible par la surexpression concomitante de gènes épithéliaux (E-cadhérine) et de molécules d'adhésion (EpCam). Cette MET est également accompagnée d'une augmentation de la prolifération et d'une transition métabolique, passant d'un métabolisme oxydatif mitochondrial à un type glycolytique. Suivent ensuite l'expression endogène de facteurs de pluripotence, qui vont peu à peu remplacer les facteurs exogènes, ainsi que la réactivation de la télomérase. L'ensemble des modifications cellulaires et génomiques a pu être visualisé au cours de la reprogrammation par des techniques d'imagerie métabolique [243].

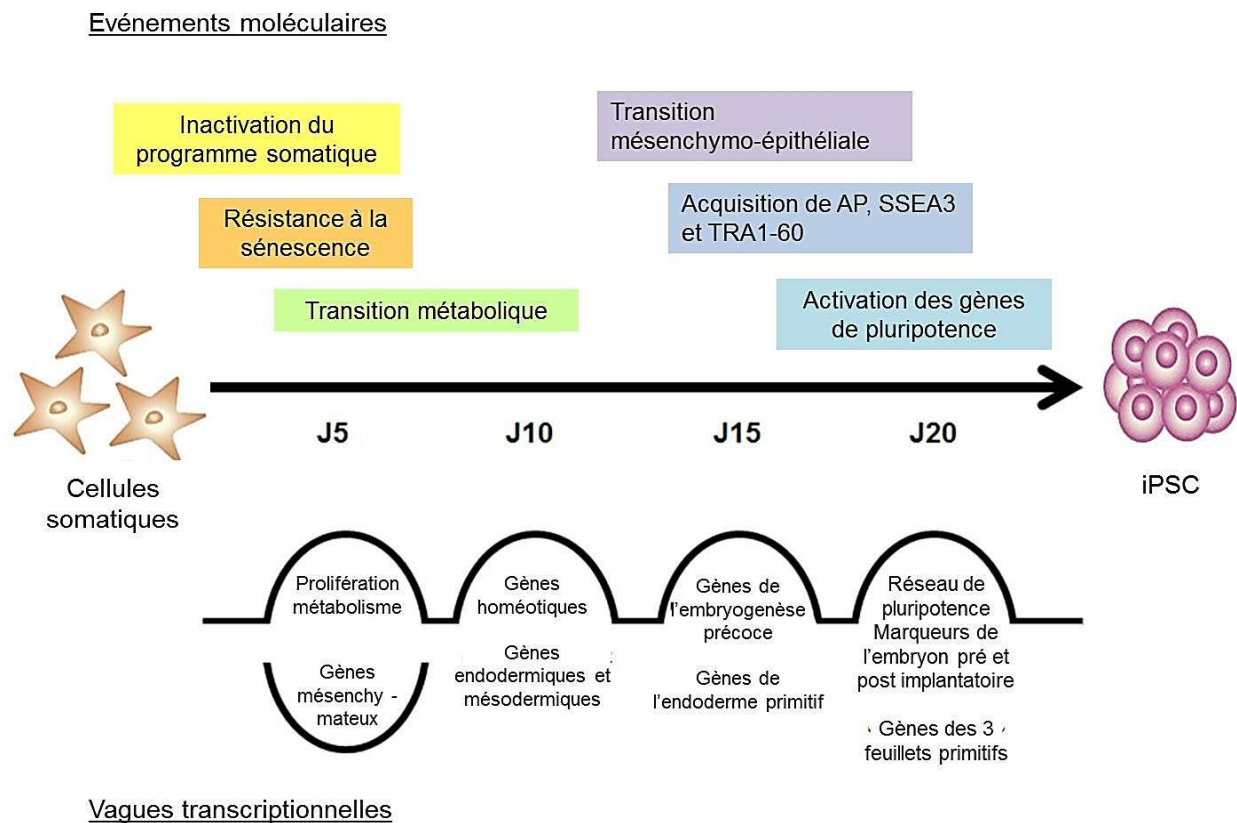


Figure 25 : Mécanismes moléculaires et vagues transcriptionnelles au cours de la reprogrammation chez l'Homme. (Adapté de Y. Xu, 2016, *Trends in Cell Biology* [244]).

4. Applications des iPSCs

De par leurs propriétés, les iPSCs représentent un intérêt majeur à la fois en recherche, notamment par la modélisation de pathologies dans le but d'étudier leur développement, leurs caractéristiques et de réaliser un criblage moléculaire (**Figure 26**); mais également pour des applications thérapeutiques comme la médecine régénératrice. Les techniques étant améliorées, leur obtention est relativement simple et on peut en disposer de quantités quasi illimitées.

a. Recherche : modélisation pathologique et criblage

En théorie, les iPSCs peuvent donner tous les types cellulaires de l'organisme. D'un point de vue pratique, la mise au point des protocoles de différenciation et l'obtention *in fine* de cellules différenciées n'ont pas été les mêmes pour tous les types cellulaires. Aujourd'hui, la communauté scientifique dispose des protocoles de

différenciation pour de nombreux types cellulaires (cellules neurales, endothéliales, rétiniennes, cardiaques, hématopoïétiques, mésenchymateuses...) mais certains restent encore difficiles à obtenir (muscle squelettique). Les protocoles disponibles ont permis cependant d'étudier les mécanismes de la différenciation et du développement.

A partir d'une biopsie chez un patient porteur d'une anomalie génétique, il est possible de reprogrammer les cellules puis de les différencier dans un ou plusieurs types cellulaires d'intérêt. Cette reprogrammation a conduit à la création de modèles de pathologies pour lesquelles il n'existait pas ou peu de modèles cellulaires pertinents. Ils permettent ainsi d'étudier les mécanismes de la pathologie, l'impact des altérations génétiques, de tenter d'apporter une correction ou encore d'évaluer des molécules.

Aujourd'hui, de nombreux groupes s'intéressent aux organoïdes, qui représentent des modèles tridimensionnels d'un tissu ou d'un organe. Ces organoïdes améliorent la modélisation, puisqu'ils présentent une organisation spatiale proche de celle dans l'organisme, voire des fonctionnalités similaires.

Une grande partie des drogues testées lors d'essais cliniques sont abandonnées à cause de l'apparition d'effets toxiques. Afin d'évaluer la toxicité préclinique de molécules ou médicaments (hépatotoxicité, cardiotoxicité, tératogénicité), les iPSCs saines ou spécifiques de pathologies, différenciées ou non, peuvent servir de modèles *in vitro* [23]. Dans une plus large mesure, elles peuvent être utilisées pour étudier la variabilité du métabolisme des médicaments au sein de la population, en lien avec les différences génotypiques existant entre un individu et un autre [245].

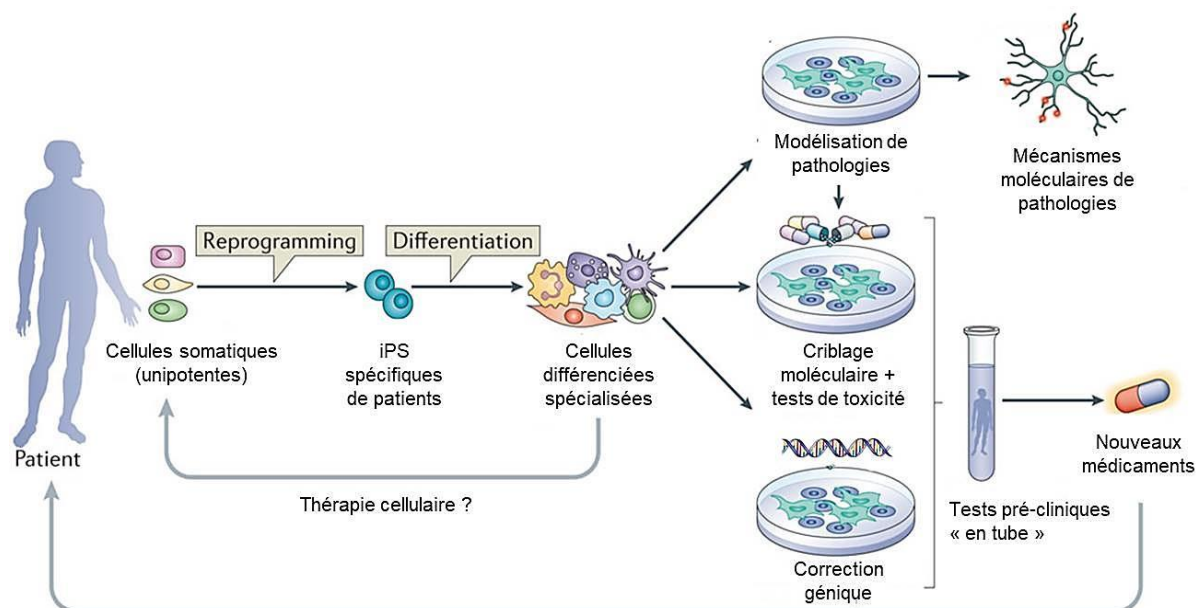


Figure 26 : Dérivation, différenciation et application des cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) spécifiques de patient. (Adapté de M. Bellin, 2012, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [246]).

b. Clinique : thérapie cellulaire et médecine régénératrice

Les iPSCs ouvrent de nouvelles perspectives en thérapie génique, leur intérêt majeur étant la possibilité de faire une correction de l'anomalie génétique. Une fois corrigées et différenciées en cellules d'intérêt, elles pourraient être réintroduites chez le patient. Cette stratégie présente l'avantage d'être applicable à tous les types cellulaires. Cependant, certains obstacles restent à résoudre comme l'amélioration des techniques de recombinaison homologue et de reprogrammation afin de garantir une sécurité optimale.

En médecine régénératrice, les premiers essais cliniques à partir des progéniteurs différenciés des cellules souches embryonnaires humaines ont été initiés aux USA dans les dégénérescences de la macula et le diabète, puis en France dans l'insuffisance cardiaque sévère par le Pr P. Menasché, (hôpital européen Georges Pompidou).

Le premier essai clinique mondial utilisant les iPSCs autologues a été réalisé au Japon (Riken). L'étude de phase I initiée en 2014 sur deux patients atteints de dégénérescence maculaire liée à l'âge consistait à reprogrammer les cellules de

peau prélevées du patient en une iPSC pour la différencier en progéniteurs épithéliaux de la rétine. Après de nombreux tests qualitatifs et fonctionnels, ces dernières ont été implantées sur un film et greffées dans l'œil [247]. Les résultats à distance pour deux patients ont été rapportés cette année indiquant que le traitement avait stabilisé la vision et empêché sa détérioration [248]. Cette étude prévue initialement pour 6 patients a été arrêtée compte tenu du coût élevé et d'une logistique trop complexe. En revanche, une banque haplotypée d'iPSCs allogéniques est en cours de réalisation au Japon ainsi que dans les pays occidentaux organisés dans un consortium international.

C. Les cellules souches / stromales mésenchymateuses : MSCs

1. Historique

En 1968, à partir d'une culture de moelle osseuse de souris, A. Friedenstein est le premier à décrire des cellules non-hématopoïétiques, adhérentes au plastique et présentant une morphologie fibroblastique. Il observe l'apparition de colonies lorsque ces cellules sontensemencées à très faible densité, d'où leur dénomination de *Colony Forming Unit – Fibroblasts* (CFU-F). Elles sont également capables de développer du tissu fibreux, de l'os et de la moelle osseuse après injection sous la capsule rénale de rongeur [249,250]. Au fil du temps, plusieurs termes ont été utilisés pour décrire ces cellules, comme celui de cellules souches stromales [251] ou bien cellules souches mésenchymateuses [252] pour souligner la capacité de renouvellement et le potentiel de différenciation. Elles ont aussi pris le nom de cellules progénitrices mésenchymateuses [253] ou encore cellules souches squelettiques [254]. En 2006, l'*International Society for Cellular Therapy* propose le terme de cellules stromales mésenchymateuses multipotentes.

2. Localisation

Les MSCs sont présentes dans tout l'organisme mais ne représentent qu'une fraction minoritaire des cellules (0,001 – 0,01% dans la moelle osseuse) [255]. La principale source des MSCs est la moelle osseuse mais elles peuvent être isolées à partir d'autres tissus, comme le sang de cordon, le placenta, le sang périphérique,

les os, la pulpe dentaire, le cartilage, le tissu adipeux ou encore les muscles. Une localisation périvasculaire a également été mise en évidence et expliquerait la présence de ces MSCs dans l'ensemble des tissus vascularisés [256]. En effet, la caractérisation des cellules constituant la paroi des vaisseaux sanguins a notamment montré la présence de MSCs, dont l'identité peut être confondue avec celle des péricytes qui entourent les vaisseaux, compte tenu de leur proximité phénotypique et de différenciation [257].

L'existence de plusieurs origines tissulaires pose la question sur l'identité, le rôle et la réelle localisation des MSCs. En effet, les MSCs provenant de différents tissus possèdent des similitudes quant à leur potentiel de différenciation, mais montrent une hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle [258–262]. De plus, le phénotype des MSCs natives est différent de celui *in vitro*. Le changement d'environnement et les conditions de culture entraînent des réarrangements conduisant à la perte de certains marqueurs et à l'acquisition d'autres [263,264]. Ces MSCs constituent donc une population hétérogène, qu'il convient de caractériser avant toute utilisation.

3. Caractérisation

a. Critères d'identification

Compte tenu de l'hétérogénéité cellulaire présentée précédemment et des différentes dénominations qui existent, une standardisation concernant la définition de ces cellules était nécessaire. En 2006, le *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee* de l'*International Society for Cellular Therapy* a donc proposé trois critères minimum d'identification des MSCs humaines [265] :

- adhérence au plastique dans des conditions de culture normales
- expression spécifique d'un panel de marqueurs de surface :
 - expression positive pour les CD73, CD90 et CD105
 - expression négative pour les CD34, CD45, CD11b/CD14, CD79a/CD19 et HLA-DR

- potentiel de différenciation multipotent *in vitro*, dans des conditions standards, en ostéoblastes, chondroblastes et adipocytes, dérivant du feuillet embryonnaire mésodermique.

Plus tard, d'autres marqueurs sont venus s'ajouter à cette liste. On attend par exemple une expression positive pour le CD271, Stro-1, les molécules d'adhésion comme CD106 et ICAM-1, tandis qu'une expression négative est attendue pour les molécules costimulantes CD80, CD86, CD40 ou les molécules d'adhésion CD31 et CD56. Enfin, il faut noter que ces marqueurs ne sont pas exactement les mêmes selon les espèces et l'origine tissulaire des MSCs.

La multipotence des MSCs se vérifie par leur capacité à se différencier en plusieurs types cellulaires tels que ceux décrits précédemment ou encore les myocytes et les ténocytes (**Figure 27**). Elles peuvent également donner, dans des conditions expérimentales définies, d'autres types cellulaires comme des neurones, cardiomyocytes, hépatocytes ou cellules endothéliales.

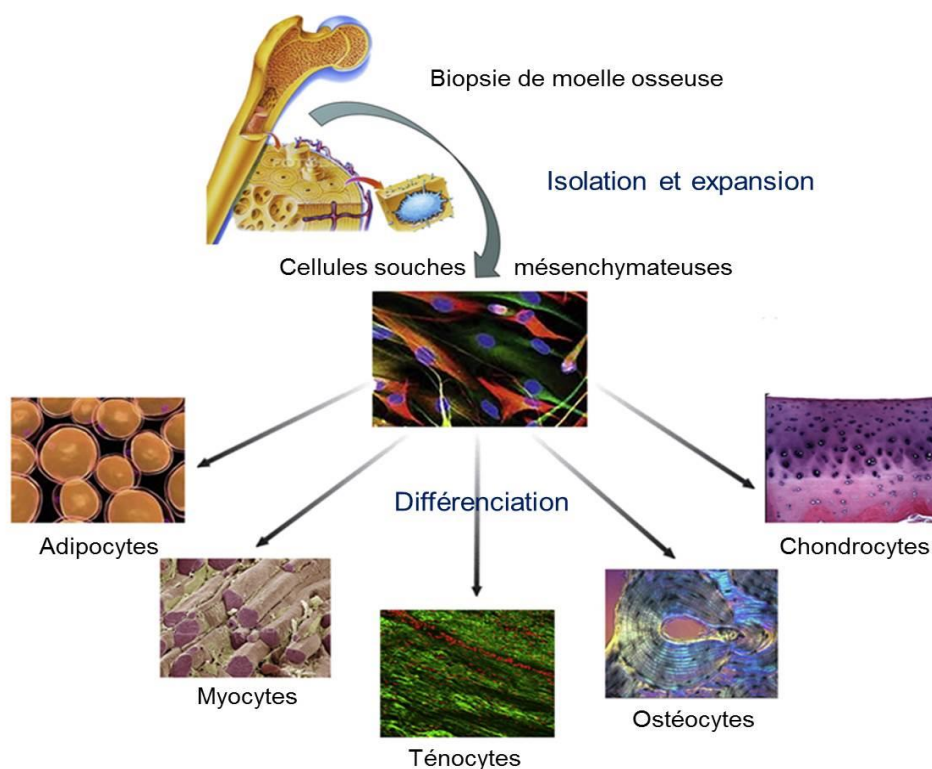


Figure 27 : Capacités de différenciation des cellules souches mésenchymateuses. (Adapté de A. Nixon, 2012, *Journal of Shoulder and Elbow Surgery* [266]).

b. Plasticité

En plus de leur potentiel de différenciation multipotent, les MSCs possèdent une propriété plastique intra-tissulaire. Cette plasticité peut se définir comme la capacité des cellules à modifier leur voie de différenciation selon le microenvironnement dans lequel elles se trouvent. Les MSCs peuvent donc transiter d'un état de différenciation à un autre (transdifférenciation) sous l'influence de facteurs extracellulaires. Par exemple, L. Song a montré que des MSCs différenciées en ostéoblastes pouvaient se réorienter dans la voie de différenciation adipogénique et chondrogénique [267]. Il est probable que ces transitions passent par un état de dédifférenciation.

Ce phénomène de plasticité s'intègre bien au modèle de *lineage priming* [264]. Selon ce modèle (d'abord avancé pour les cellules souches hématopoïétiques (CSH)) les cellules souches expriment, avant toute induction de différenciation vers leurs différents lignages, certains gènes caractéristiques de ces lignages, dont certains facteurs-clés de transcription. La différenciation se traduit ensuite par l'augmentation des facteurs correspondant à la voie induite et par la diminution des facteurs des voies alternatives. Il a été montré que des MSCs issues de la moelle osseuse expriment, avant même de s'engager dans l'une des voies, des gènes de différenciation des voies adipogénique, ostéogénique, chondrocytaire, vasculaire et en partie endothéliale. A l'inverse, des gènes impliqués dans la différenciation hépatique, myocardique ou neuronale ne sont pas exprimés [264]. Le modèle hiérarchique de différenciation, comme pour le système hématopoïétique, où les cellules souches sont des entités prédéfinies donnant naissance à des progéniteurs et des précurseurs, n'est donc pas applicable aux MSCs.

4. Obtention de MSCs à partir de cellules souches pluripotentes

Comme nous l'avons dit précédemment, les MSCs adultes sont majoritairement obtenues à partir de la moelle osseuse et du tissu adipeux. D'autres modes d'obtention ont été étudiés, notamment via la différenciation de cellules souches pluripotentes. De nombreux protocoles ont été mis au point et ils peuvent être groupés en trois concepts généraux [268]. Les protocoles du premier groupe sont

principalement basés sur l'isolation des cellules différenciées autour des colonies de cellules souches pluripotentes. Cette isolation se fait généralement après un changement dans les techniques de culture qui maintiennent les cellules dans un état pluripotent. Ces protocoles collectent ensuite les cellules présentant une morphologie de MSC. Un second groupe inclut les protocoles mettant en jeu une induction active de la différenciation mésenchymateuse. Dans ce cas, il y a introduction d'un milieu de culture défini et une séparation éventuelle des cellules différenciées à l'aide des marqueurs de surface. Enfin, des protocoles plus stricts impliquant les voies de signalisation connues pour induire la formation du mésoderme ont été développés. La différenciation des cellules souches pluripotentes est induite à l'aide de facteurs de croissance et d'inhibiteurs de voies spécifiques.

Malgré les différences entre ces protocoles, certains éléments restent semblables. Plusieurs semaines sont généralement nécessaires pour obtenir des MSCs entièrement différenciées. De plus, l'ensemble de ces protocoles donnent une population homogène, sans contamination avec d'autres phénotypes cellulaires. Enfin, la différenciation est complète et aucun reste de cellule indifférenciée n'est retrouvé.

Au cours de ce travail, c'est un protocole appartenant au deuxième groupe qui a été utilisé afin de générer des MSCs à partir d'iPSCs. Ce protocole établi dans l'Unité comporte un milieu de culture propre aux MSCs et après environ trois semaines de culture et un ou deux passages, une population homogène est obtenue et caractérisée par les marqueurs de surface en cytométrie [269].

5. Rôles

Les MSCs exercent des fonctions variées et spécifiques dépendant du tissu d'origine et du contexte physiologique dans lequel elles se trouvent.

a. Activité paracrine

L'une des principales propriétés des MSCs, les impliquant dans de nombreux mécanismes cellulaires, est leur activité sécrétoire. En effet, elles produisent un ensemble de molécules agissant notamment sur le maintien de l'homéostasie :

facteurs de croissance (bFGF, HGF, TGF β), cytokines (IL-1a, 1b, IL-6, IL-7, IL8, IL11), facteurs anti-inflammatoires et anti-apoptotiques ou encore des facteurs pro-angiogéniques (VEGF). Par ces éléments solubles, elles soutiennent et régulent les cellules avoisinantes.

b. Niche hématopoïétique

Au sein de la moelle osseuse, les MSCs constituent un microenvironnement approprié pour l'hématopoïèse. En participant à l'homéostasie du squelette, via leur différenciation en ostéoblastes et adipocytes, elles apportent un soutien à celle-ci. Elles fournissent également une structure physique aux CSH en sécrétant des éléments de la matrice (laminine, fibronectine, collagène, protéoglycanes) et régulent leur prolifération et leur différenciation par la sécrétion de cytokines et facteurs de croissance.

c. Immunomodulation

Les MSCs possèdent de nombreux effets immunomodulateurs et interagissent étroitement avec les différentes cellules de l'immunité. Elles sont notamment capables de supprimer la différenciation et la maturation des cellules dendritiques mais aussi de réduire la prolifération des lymphocytes T et des cellules NK (*natural killer*) (**Figure 28**). En altérant le profil d'expression des médiateurs de l'immunité, les MSCs induisent un phénotype anti-inflammatoire ou immunotolérant [270]. Plus précisément, l'inhibition du TNF α (*tumor necrosis factor α*) et l'augmentation de l'IL-10 affectent la maturation et les propriétés fonctionnelles des cellules dendritiques. Lorsque les MSCs se trouvent dans un environnement inflammatoire, elles inhibent la sécrétion d'IFN γ (interféron γ) et augmentent celle d'IL-4, ce qui entraîne une augmentation de la proportion de lymphocytes Treg (régulateurs). Cependant, en présence d'IFN γ , les MSCs produisent de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO), dont l'activité enzymatique dégrade le tryptophane, résultant en une diminution de la prolifération des lymphocytes T [271]. Dans ces conditions, elles secrètent également davantage de prostaglandine 2 (PGE2), qui a un rôle immunosuppresseur [272]. Les MSCs d'origine embryonnaire possèdent des propriétés immunomodulatrices similaires aux MSCs des tissus adultes [269,273].

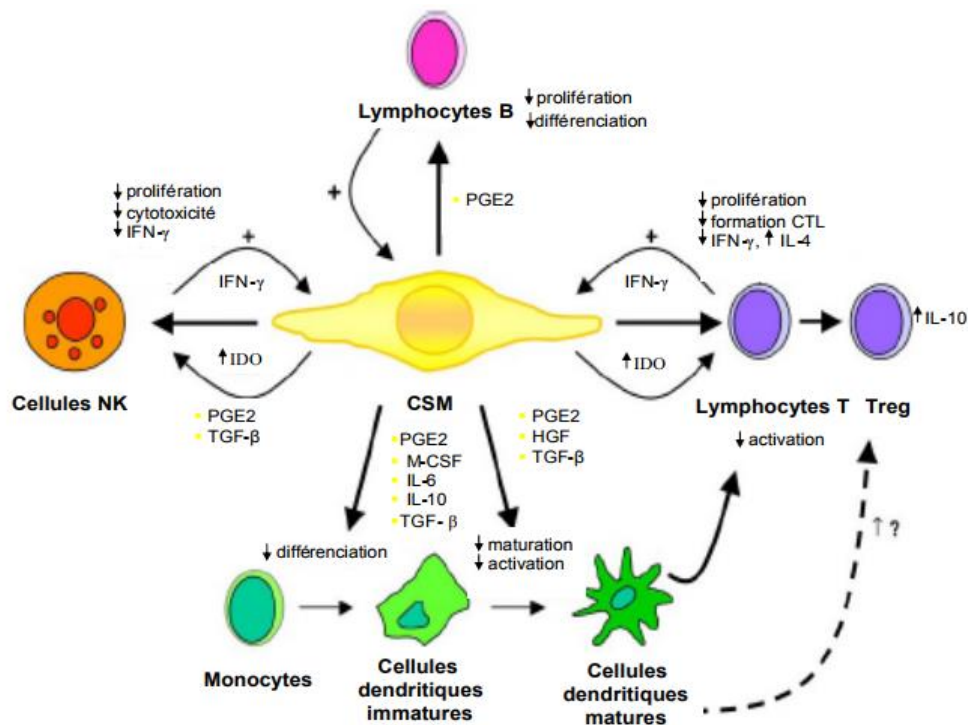


Figure 28 : Effets immunomodulateurs des MSCs. (Adapté d'AJ Nauta, 2007, *Blood* [274]). CTL: lymphocytes T cytotoxiques, HGF: hepatocyte growth factor, IDO: indolamine 2,3-dioxygénase, PGE2: prostaglandine E2, TGFβ: transforming growth factor.

Les MSCs sont également caractérisées par leur absence d'immunogénicité. Elles expriment faiblement les antigènes CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe I mais pas le CMH de classe II ni les molécules de co-stimulation (CD40, 80 et 86). Néanmoins, l'expression du CMH II peut être induite après stimulation par l'IFNγ [275]. Cette capacité des MSCs à inhiber les réponses immunes et à échapper à la reconnaissance immunitaire en fait des outils intéressants pour les greffes allogéniques et le traitement de maladies immunes comme la réaction du greffon contre l'hôte (GVHD : *graft versus host disease*).

d. Stimulation angiogénique

Les MSCs possèdent un pouvoir angiogénique [276] grâce notamment aux facteurs qu'elles sécrètent et qui ont un rôle majeur dans l'angiogenèse : VEGF, FGF2, angiopoïétine-1 (Ang-1), CCL2, IL-6, PLGF (*placenta growth factor*) [277–279]. Les MSCs semblent agir sur plusieurs étapes de l'angiogenèse. T. Kinnaird a par exemple montré que la prolifération et la migration des cellules endothéliales étaient favorisées par le sécrétome des MSCs [280]. De plus, une étude montre que les

facteurs libérés par les MSCs préservent et stabilisent les vaisseaux déjà formés en agissant comme des péricytes [281].

Cette activité proangiogénique est l'un des mécanismes responsables des effets bénéfiques observés dans les pathologies d'origine ischémique. Les MSCs ont montré un effet majeur dans des cas d'ischémies cardiaques et rénales. D'une part, sur la restauration fonctionnelle de la filtration glomérulaire dans des modèles d'insuffisance rénale chronique [282] et, d'autre part, sur la fraction d'éjection ventriculaire dans des modèles d'infarctus du myocarde [283].

e. Réparation tissulaire et applications thérapeutiques

Les nombreux facteurs sécrétés par les MSCs contribuent à la régénération des tissus endommagés en réduisant la réponse au stress et l'apoptose des cellules atteintes et en régulant l'inflammation [268]. De plus, les MSCs sont capables de migrer depuis la circulation vers les tissus, lorsque des signaux spécifiques d'une lésion sont émis [284]. Compte tenu de leurs propriétés de différenciation et leur faible immunogénicité, les MSCs ont été utilisées dans de nombreux essais cliniques, avec des indications variées : rhumatologie (arthrose, polyarthrite rhumatoïde), cardiologie (accident vasculaire cérébral, infarctus du myocarde, ischémie des membres inférieurs), dégénérescence musculaire (myopathies), diabète, maladies auto-immunes (lupus), rejet de greffe. Par exemple, des MSCs issues de plusieurs sources (pancréas, tissu adipeux, foie et moelle osseuse) ont pu être différenciées en cellules endocrines ayant un phénotype de cellules β productrices d'insuline [285].

L'une des limitations de l'administration systémique de MSCs reste la faible proportion du nombre de cellules parvenant à coloniser la zone lésée. Cependant, grâce à leurs forts potentiels, en particulier immunomodulateur, les MSCs restent très intéressantes et sont testées pour de nombreuses applications [286,287].

Objectifs

Au cours de ce travail de thèse, nous avons étudié les conséquences fonctionnelles et moléculaires de la délétion hétérozygote du gène *BRCA1* dans les cellules stromales sur la transformation et la progression tumorales de cellules épithéliales mammaires. Plus précisément, nous avons cherché à comprendre et identifier au sein du stroma *BRCA1*^{+/-} les déterminants moléculaires favorisant le développement d'un cancer du sein et comment ils participent à la progression tumorale. Afin de modéliser un stroma humain porteur d'une délétion de *BRCA1* nous avons utilisé le modèle des iPSCs permettant de reprogrammer le génotype d'une patiente porteuse d'une mutation *BRCA1* et de générer les MSCs avec le même fond génétique *BRCA1*^{+/-}. Des MSCs normales (*BRCA1*^{+/+}) issues d'iPSCs de donneurs sains ont servi de contrôle et ont été comparées aux MSCs *BRCA1*^{+/-}.

L'unité INSERM U935 est adossée à la Plateforme ESTeam Paris Sud (www.esteamparisud.fr) et coordonne l'infrastructure INGESTEM (www.ingestem.fr). Plus de 60 iPSCs normales et pathologiques ont été générées par l'équipe et la banque contient trois iPSCs *BRCA1* d'une même famille avec délétion de l'exon 17. D'autres iPSCs avec d'autres mutations *BRCA1* sont en cours de génération.

La caractérisation des iPSCs *BRCA1*^{+/-} a fait l'objet d'une publication dans le journal *Stem Cell Research* (**Annexe 4**). Le travail de ma thèse s'est focalisé sur l'étude fonctionnelle des MSCs générées à partir des iPSCs *BRCA1*^{+/-}. Ces travaux nous ont conduits à étudier plus particulièrement la voie de l'angiogenèse et les capacités migratoires de ces MSCs en relation avec une augmentation de la sécrétion d'une protéine de la matrice extracellulaire, la périostine. Les résultats obtenus sont présentés dans l'article « *Mesenchymal stem cells-derived induced pluripotent stem cells with heterozygous deletion of BRCA1 drives breast cancer tumor growth and metastasis via upregulation of periostin and angiogenesis* » soumis à publication dans la revue *Cell Stem Cell*.

Des résultats complémentaires effectués sur des cellules épithéliales mammaires normales sont présentés. Nous décrivons l'influence du stroma BRCA1-muté dans le processus de transition épithéliomésenchymateuse et dans la migration liée à la voie Sonic Hedgehog.

Nous terminerons par une brève présentation d'un modèle de culture 3D permettant de générer des organoïdes mammaires.

Résultats

A. Article 1 : “*Mesenchymal stem cells-derived induced pluripotent stem cells with heterozygous deletion of BRCA1 drives breast cancer tumor growth and metastasis via upregulation of periostin and angiogenesis*”

Les cellules souches mésenchymateuses stromales dérivées de cellules souches pluripotentes induites avec délétion hétérozygote de BRCA1 facilitent la progression tumorale et les métastases dans le cancer du sein par une régulation positive de la périostine et de l'angiogenèse.

Ces travaux ont eu pour but d'évaluer l'implication du gène de prédisposition *BRCA1* dans les MSCs sur l'initiation, le développement et la progression tumorale en comparaison avec des MSCs non-mutées. Les résultats démontrent que les MSCs *BRCA1*^{+/-} possèdent un potentiel pro-angiogénique supérieur comparé aux MSCs normales (WT). Ce potentiel a notamment été confirmé par la surexpression d'HIF-1 α et de facteurs angiogéniques (PDGF α , PDGF β , VEGF α , TEK, Angpt1) en normoxie et en hypoxie et par la formation de structures vasculaires *in vitro* et *in vivo*. Elles secrètent également une plus grande quantité de POSTN qui est impliquée dans l'adhésion et la migration cellulaires. Les MSCs *BRCA1*^{+/-} présentent des capacités migratoires plus élevées que les MSCs WT et ces capacités sont réduites lorsque la POSTN est inhibée à l'aide d'un *knockdown* par siRNA. Nous avons également montré chez la souris immunodéficiente que la co-injection d'une lignée de cancer du sein triple négatif (4T1) et de MSCs *BRCA1*^{+/-} stimule la croissance tumorale et le développement de métastases pulmonaires en comparaison avec les MSCs *BRCA1*^{+/+} ou les 4T1 seules. Ces résultats sont corrélés avec la détection de POSTN dans les tumeurs issues du groupe avec les MSCs *BRCA1*^{+/-}, ainsi que d'un réseau vasculaire tumoral plus développé.

Mesenchymal stem cells – derived induced pluripotent stem cells with heterozygous deletion of BRCA1 drives breast cancer tumor growth and metastasis via upregulation of periostin and angiogenesis

Lucie Portier¹, Christophe Desterke¹, Noufissa Oudrhiri^{1,2}, Fatima Dkhissi³, Nicolas Gendron^{4,5}, Irene Viela⁶, Ali G. Turhan^{1,2,7,8}, Annelise Bennaceur-Griscelli^{1,2,7,8} and Frank Griscelli^{1,2,5,6}

¹ UMR-S 935, INSERM - University of Paris Sud, 94800 Villejuif, France

² ESTeam Paris Sud, INGESTEM National IPSC Infrastructure, UPSud, University of Paris-Saclay, 94800, Villejuif, France

³ UMR-S1082, INSERM, University of Poitiers, 86073 Poitiers, France

⁴ UMR-S 1140, INSERM European Georges Pompidou Hospital, Paris, France

⁵ University of Paris Descartes, Faculty Sorbonne Paris Cité, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris, France

⁶ Gustave Roussy Institut, Department of Biopathology, 94800 Villejuif, France.

⁷ Division of Hematology, APHP-Paris Sud University hospitals, Le Kremlin Bicêtre 94275 and Villejuif, 94800, France

⁸ University Paris Sud, UPSud, Faculty of Medicine, Le Kremlin Bicêtre 94275 France..

Running title: heterozygous deletion of BRCA1 drives angiogenesis

Keywords: Mesenchymal Stem Cells, angiogenesis, periostin

To whom correspondence should be addressed: Professor Frank Griscelli

INSERM UMR-S 935, University Paris Sud

Human Embryonic Stem Cell Core Facility

Institut André Lwoff, Bâtiment A CNRS

7 rue Guy Moquet 94802 Villejuif, France

Hôpital Paul Brousse

Tel : 33 1 42 11 51 93

Fax : 33 1 45 59 37 18

E-mail: franck.griscelli@gustaveroussy.fr

ABSTRACT

Mesenchymal Stem/Stromal cells (MSCs) are recruited to the tumor microenvironment and influence tumor progression through multiple mechanisms. The functional role of MSCs in hereditary breast cancer associated to BRCA1 mutation has been explored by using BRCA1 haploinsufficient patient-specific induced pluripotent stem cells (iPSC). Transcriptome profiling of MSC-derived BRCA1^{+/-} iPSC (MSCs BRCA1^{+/-}) revealed a unique pro-angiogenic signature represented by a high expression level of HIF-1 α , of angiogenic factors belonging to the VEGF, PDGF, ANGPT subfamilies in addition to periostin (POSTN), a component of the extra cellular matrix involved in cell adhesion, motility and migration. In contrast to wild type MSC, conditioned medium from MSC BRCA1^{+/-} increased the capacity of HUVEC to form tube-like structures *in vitro* and are more efficient in forming vessel like-structures *in vivo* by using the matrigel plug angiogenesis assay. The migration capacity of MSC BRCA1^{+/-} was significantly increased and markedly normalized after knockdown of POSTN in MSCs by a siRNA. BRCA1 mutant MSCs co-injected with 4T1 breast cancer cells into mice mammary fat pads promotes tumor growth and spontaneous lung metastasis. Our findings highlight a contributing role of BRCA1 haploinsufficiency in stromal cells by establishing a permissive micro-environmental niche in BRCA1-associated tumorigenesis. Importantly, human MSC derived from BRCA1 mutant patient specific-iPSC model provide a valuable tool for understanding the pro-tumor activity of MSCs and for drug discovery. This unique model open new therapeutic avenues for the prevention and personalized treatment of BRCA1-associated hereditary breast cancer.

INTRODUCTION

A tumor represents a complex structure containing malignant cells strictly coupled with a tumor stroma containing a large variety of cells that are highly implicated in cancer initiation and development, in vascular network growth, in local invasion and in metastasis. This non-malignant compartment forms a substantial volume that could account for up to 70% of the tumor mass in breast cancer playing also a pivotal role in drug resistance (1).

Mesenchymal Stem/Stromal cells (MSCs) are becoming increasingly acknowledged as important stromal facilitators of tumor development and are shown to be integral components of the cancer stroma in experimental as well as in clinical settings (2-5). In the context of breast carcinomas, MSCs have been shown to display pro-malignant phenotype (6,7) and to promote breast cancer progression, invasion and metastasis (8-13). Several observations have described a cross talk between MSCs and breast cancer cells (BBCs). BBCs can stimulate the secretion of the chemokine CCL5 from MSCs, which then can act in a paracrine fashion on the chemokine receptor CCR5 located on BBC, enhancing their motility, invasion and metastasis (14). MSCs were also shown to cause aberrant expression of micro-RNAs by BBCs, providing BBCs with enhanced cancer stem cell (CSC) properties (15) or to promote the production of lysyl oxidase (LOX) from BBCs, found to be sufficient to enhance the metastasis of weakly metastatic cancer cells to the lungs and bones (16).

A small fraction of breast cancers (~1–5%) are attributed to familial mutations in the *BRCA 1 and 2* cancer susceptibility genes conferring elevated lifetime risks of breast, ovarian and other cancers, and mechanisms underlying tumor formation are still unknown. BRCA1 is known to be involved in several signaling pathways and cellular processes, such as DNA damage response, regulation of cell cycle progression, apoptosis and ubiquitination. Pathological variants in BRCA1 give rise to a non-functional protein, due either to small insertions or deletions and both alleles in BRCA1 gene must be mutated and lost for cancer to develop. Approximately, 85–90% of hereditary BRCA1 mutation carriers will develop breast cancer (17) with a mostly aggressive breast tumor phenotype, basal-like, triple-negative [ER(-), PR(-) HER2(-)] (18-19), associated with a strong stromal reaction. The mechanistic role of stromal cells harboring BRCA1 germline mutation in the pathogenesis of breast cancer remains to be clarify. It has been shown that phenotypic aberrations take

place early in pre-tumoral normal cells with a “first hit” germline mutation. Indeed, BRCA1 heterozygosity induces some significant molecular alterations in apparently normal epithelial cells, such as, gene expression profiles, activation status of intracellular signalling cascades (*i.e.*, hormone receptors), differentiation degree, and genomic stability (20,21). To date, molecular and functional consequences of BRCA1 heterozygosity in stromal cells remain poorly investigated. We suggest that mesenchymal stem cells carrying mutations in the cancer susceptibility genes BRCA could operate as oncogenic events enabling malignant transformation and tumor progression in BRCA1 carriers. Identification of key altered factors in BRCA1 haplo-insufficient stromal cells might therefore enable preventing or reverting therapeutical strategies. To modeling human stromal cells carrying heterozygous BRCA1 mutation, we used a BRCA1 mutant human induced pluripotent stem cells (iPSC) (22) derived from blood cells of a patient with an inherited breast cancer. We found for the first time a well genotype-phenotype correlation, and a relationship between genetic alterations in MSCs and their influence on tumor growth and metastasis. Interestingly, BRCA1 mutant MSC-derived iPSC models offer a framework to study whether drugs could ultimately modulate the penetrance of BRCA1 defects during developmental windows of susceptibility.

MATERIALS AND METHODS

Generation of MSCs from hiPSCs

The induced pluripotent stem cells (iPSCs) were produced and maintained on feeder cells as previously described (22). Briefly, iPSCs with an exon 17 deletion in BRCA1 gene were obtained by reprogramming peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from a patient, using Oct3/4, Sox2, Klf4, and cMyc transgene factors (23). These iPSCs exhibit typical markers of pluripotency (Nanog, Sox2, SSEA4 and TRA-1-60) and a capacity of differentiation into the three germ layers (22). To produce mesenchymal stem cells (MSCs), we used our previously described protocol (24). Briefly, iPSCs were detached using DPBS (Life Technologies), supplemented with 0.5 mM EDTA (Life Technologies) and 1.8 mg/l NaCl (Sigma), and seeded in a Geltrex-coated culture plate with Essential 8 medium (Life Technologies) and 1% penicillin/streptomycin. After 80% of confluence the medium was changed containing Minimum Essential Medium alpha (MEM α , Gibco), supplemented with 10% of foetal bovine serum (Hyclone), 1 ng/mL basic fibroblast growth factor, 0.1 mmol/L nonessential amino acids, 1 mmol/L L-glutamine, 0.1 mmol/L β -mercaptoethanol, and one times penicillin-streptomycin (all from Invitrogen). Medium was changed every day. After 3-4 weeks of culture, MSCs were characterized by flow cytometry, western blot analysis and RT-PCR. For hypoxia condition culture, cells were maintained at 37°C in 2% O₂.

We used for some experiments as additional control samples, adult bone marrow derived-MSCs.

Transcriptome and Bioinformatics analysis

Total RNA was extracted from MSC-derived iPS cells by using TRIzol protocol (Ambion) according to the manufacturer's instructions. Integrity of RNA was assessed on Bioanalyzer 2100 (Agilent technologies). RNA material that passed quality control was used to perform aRNA probes by T7 RNA amplification following manufacturer instructions (Affymetrix). aRNA labelled microarray probes were hybridized on Affymetrix microarray human gene version ST2.0. After extraction of signal on Affymetrix scanner, the matrix was normalized by RMA algorithm with Expression Console version 1.4.1.46 (Affymetrix). Transcriptome data were submitted on Gene Expression Omnibus database under accession number GSE

104693. Significance analysis for microarray (SAM) algorithm [288] was used to find differential expressed genes between MSCs derived from iPSCs BRCA1+/- and MSCs derived from WT iPSCs: genes with a fold change over 2 in absolute value were kept after affecting a False Discovery Rate (FDR) less than 5 percent. Unsupervised principal component analysis was performed with FactoMineR R-package [289]. Functional enrichment was performed with standalone software Goelite version 1.5 [290]. Geneset enrichment analysis (GSEA) was performed between both MSCs (27). Reactome and Gene Ontology biological process gene sets were used from MSigDB version 1.5 to perform the analysis. Angiogenesis and lymphangiogenesis related enriched gene sets in MSCs BRCA1+/- samples as compared to WT MSCs samples were selected (positive Normalized Enrichment Score with p-value $p < 0.05$ and False discovery rate less than 0.25). Genes enriched in each angiogenic gene set were pooled in order to perform unsupervised classification (complete distances – Euclidean metric) with package gplots in R environment version 3.0.2. Angiogenic up regulated genes in MSCs BRCA1+/- samples and enriched by GSEA analysis were also used to build a functional enrichment network with Cytoscape software version 3.0.2: octagon elements represent enriched geneset, circle element represent corresponding enriched genes, edges represent link between genes and functions (genesets). Size of the octagon is representative of the number of connected genes and colour scale of the octagon from yellow to purple is dependent of the Normalized enrichment score (NES) obtained in GSEA analysis (28).

Matrigel tube formation assay

One hundred microliters of matrigel was added to a 48-well culture plate and incubated at 37°C for 1 hr. HUVEC as endothelial cells were seeded at a density of 6×10^4 cells per well in 280 μ l of EBM-2 on matrigel with 70 μ l of conditioned medium (CM) recovered from cultured MSC BRCA1+/+ or MSC BRCA1+/- in normoxia or hypoxia conditions. CM was previously concentrated through Amicon tubes (Millipore) with 3400g centrifugation for 20 minutes. After 18 hr of incubation under normal culture conditions, the vascular tube formation was examined by phase-contrast microscopy and evaluated by scoring using the Angiogenesis Analyzer plugin of ImageJ software.

RT-Q-PCR analysis

Total RNA was extracted using TRIzol protocol (Ambion) according to the manufacturer's instructions and treated with DNase 1 (Invitrogen). RNA was reversed transcribed to obtain cDNA using AffinityScript Multiple Temperature cDNA Synthesis Kit (Agilent) according to the manufacturer's instructions. Real-time qPCR reactions were performed using FastStart Universal SYBR Green Master Mix (Roche) on an Agilent Mx3005p. The thermal cycling conditions comprised an initial denaturation step at 95°C for 10 min and 50 cycles at 95°C for 15 s and 65°C for 1 min. Results were visualized on the MxPro software (Agilent) and analyzed by the $2\Delta\Delta C_t$ method.

Immunoblot analysis

Cells were lysed on ice with 1X RIPA buffer (Pierce) supplemented with protease inhibitors (Complete mini EDTA free Protease Inhibitor cocktail tablets, Roche) and centrifuged at 12 000g for 20 min at 4°C. Cell lysates were separated by electrophoresis on 4-20% Tris-Glycine gel (Invitrogen) and transferred onto a nitrocellulose membrane. After blocking with TBS Tween 5% BSA for 1 h at room temperature with gentle shaking, membranes were incubated with primary antibodies at 4°C overnight. The used primary antibodies were rabbit anti-human HIF-1 α (D2U3T, Cell Signalling), rabbit anti-human POSTN (ab83739, Abcam) and anti-human β -actine (A3854, Sigma). They were detected using HRP conjugated secondary antibody and the signal was revealed by chemiluminescence with SuperSignal West Dura or Femto reagents (ThermoFisher). Images were acquired with G:BOX iChemi Chemiluminescence Image Capture system (Syngene) and data analyzed with ImageJ software. For BRCA1 detection, cells (4×10^6) were lysed with 100 μ l NuPageTM LDS Sample Buffer (ThermoFisher Scientific). Equivalent amounts of protein of each sample were analyzed by SDS page transferred onto nitrocellulose membranes using the iBlot Dry Blotting system (Thermo Fisher Scientific) and probed with anti-BRCA1 monoclonal antibody (Merck Millipore, MS110) at 1/75 or anti actin antibody (Sigma Aldrich) at 1/2000. Immunodetection was performed using chemiluminescent substrate Luminata Forte (Merck Millipore). Intensity of bands was quantified by computer densitometry of western blot bands (ImageJ software).

ELISA

Supernatants of cultured MSCs were harvested after 1hr, 4hr and 8hr of culture in both normoxia and hypoxia culture conditions. A sandwich based ELISA assay was used to determine the amount of human Periostin production in supernatant of MSCs according to the manufacturer's instructions (DuoSet ELISA DY3548B, R&D Systems). The absorbance was detected at 450 nm using a Modulus II microplate multimode reader (Turner Biosystems).

Immunofluorescence

Cells were fixed in 4% PFA for 15 min at room temperature. After washing with PBS, cells were permeabilized when necessary with PBS containing 0.25% Triton X-100 for 10 min. Primary antibodies (rabbit anti-NCadherin, IgG, SinoBiological; mouse anti-Vimentin, IgG1, BD Pharmingen) were incubated in PBS with 1% BSA for 45 min at room temperature. After washing three times with PBS containing 0.1% Triton, cells were incubated for 45 min at room temperature with fluorochrome conjugated anti-rabbit and anti-mouse secondary antibodies diluted in PBS/1% BSA. Finally, nucleus were stained with DAPI (1ug/ml) and mounted with Dako Mountain Medium (Dako).

Flow cytometry

Phenotype of MSCs was characterized and analysed by flow-cytometry. Briefly, MSCs were suspended in PBS and incubated during 45 min at 4°C in the dark with following antibodies: CD34 (APC, BD Bioscience), CD45 (PerCP, Miltenyi), CD73 (PE, BD Bioscience), CD90 (PE, Beckman), CD105 (PE, Beckman). For intracellular staining, MSCs were previously fixed in PFA 4% and permeabilized with 0.25% saponin. Stained MSCs were then washed with PBS and analyzed by flow cytometry (MACSQuant, Miltenyi Biotec).

Transfection of MSCs with siRNA

The MSCs were knock down for POSTN by using siRNA. MSCs were seeded in six-well plates until 80-90% of confluence and transfected with 2.8 μ M of POSTN siRNA (Thermofisher) using Viromer Blue transfection reagent (Lipocalyx) according to the manufacturer's instructions. As nonspecific control, scramble sequence siRNA were

used at the same concentration. In order to control the transfection efficiency we used a GFP siRNA (Dharmacon) in the same conditions.

Wound healing assay

The MSCs were analyzed for their migration capacity. MSCs were plated in six-well plates to grow into a monolayer. A linear wound was made on cell monolayers with a sterile pipette tip. Phase-contrast microscopy images were regularly taken and the wound area was measured by analyzing the images using ImageJ software. In experiments using knock down MSCs, transfection protocol with POSTN siRNA was performed twelve hours before the wound healing assay.

MTT assay

The MSCs were seeded into 24-well plates at a density of 1.5×10^4 cells/well. After 24, 48 and 72 hours of culture, cell viability was tested by removing half of the medium and adding 20 μ L of 5 mg/mL tetrazolium salt solution (Sigma) in each well and incubated at 37°C for 4 hours. After removing the medium, formazan crystals were dissolved with DMSO and the absorbance was read at 570 nm with a Modulus II microplate multimode reader (Turner Biosystems).

***In vivo* Matrigel plug assay**

Human Progenitor endothelial cells (PEC) were obtained from cord blood as previously described (29). Matrigel plugs were prepared on ice with PBS as control or by mixing 1.5×10^6 PEC with 1.5×10^6 MSCs and re-suspended in 200 μ l phenol red-free Matrigel (BD Bioscience). The mixture was implanted in the backs of 8-week-old male athymic nu/nu mice (Janvier Labs, France) by subcutaneous injection using a 25-gauge needle. After 10 days the plugs were removed, fixed and embedded in paraffin for histologic analysis.

Animal studies

We used for *in vivo* experiments the 4T1 cell line as a breast cancer model corresponding to an aggressive triple negative murine cell line. We derived 4T1-Luc-GFP clones after transducing the cells with retroviruses harbouring a Luciferase-GFP cassette. MSCs BRCA1+/+ or BRCA1+/- (3×10^5) were mixed with 4T1-Luc-GFP (10^5) and re-suspended in 100 μ l of PBS (ratio: 3:1). The mixture was injected in the fat pad

of anesthetized NOD-SCID mice (Taconic, France), one implant per mouse as subjected (30). MSCs and 4T1-Luc-GFP were respectively injected alone as a control. Tumor growth was monitored twice per week and IVIS analysis was performed on the day 18 of sacrifice. Primary tumor and metastasis in lungs were removed for histology and immuno-histochemistry analysis.

Immunohistochemistry

Samples of paraffin-embedded sections from fat pad 4T1 tumor and lung 4T1 metastasis were stained to explore the expression level of POSTN and GFP proteins. After deparaffinization and rehydration, antigen retrieval was performed in 10 mM sodium citrate for 15 min using a pressure cooker. A blocking with 3% hydrogen peroxide for 10 min was performed, followed by a protein blocking for 1hr with PowerVision IHC/ISH Super Blocking (Leica Biosystems). Sections were incubated with the primary antibodies during 1hr at room temperature (POSTN 1:100, ab83739, GFP 1:1000, ab290). For detection of the primary antibodies, a poly HRP anti-mouse/rabbit IgG (Leica Biosystems) was used. All slides were counterstained with Mayer's hemalum solution. For GFP staining, images were taken and analyzed on ImageJ software to determine the area of lung metastasis. Paraffin sections of 4T1 tumor were prepared to quantify the number of intra-tumoral vessels by murine CD34 immunostaining as previously described (31). Digital images of immunohistochemically stained tissue slides were obtained at × 20 magnification using a slide scanner (NanoZoomer 2.0-HT, Hamamatsu, Japan). Scanned slides were uploaded on the Calopix database (Tribvn Healthcare, Châtillon, France).

Statistical Analysis

Each experiment was performed at least twice. Statistical significance was evaluated using the Student's t test (unilateral and unpaired).

RESULTS

Derivation and characterization of mesenchymal stem cells (MSCs) from human iPS cells.

MSCs were derived from a normal WT iPSC used as a control and from an iPSC carrying a germline exon 17 deletion in BRCA1 gene (Fig.1A). Both iPSC-derived MSCs have typical MSC morphology (Fig. 1A) expressing mesenchymal markers such as N-Cadherin, Vimentin by immunostaining (Fig. 1B), and *Snail1*, *Snail2*, *N-Cadherin*, *Vimentin* by RT-PCR (Fig.1C). The karyotype of both MSCs was normal (46XX) (Fig.1D). The phenotype of both MSCs was similar, as they expressed CD73, CD90 and CD105 and lacked the expression of CD34 and CD45 (Fig.1E). BRCA1-deleted MSCs expressed by immunoblotting 50% less of BRCA1 protein in comparison with the WT MSC (ratio of 0.57) (Fig. 1G).

Increased angiogenesis potential in MSCs BRCA1+/-

Transcriptome analysis was performed on MSCs BRCA1+/- and compared to WT homolog samples. Significance analysis for microarray (SAM) algorithm allowed identification of differential expressed genes (DEG) between the two conditions. The majority of the DEG (219/261) was found to be up regulated in condition BRCA1+/- as compared to the WT type. This differential expression profile allowed to significantly discriminate BRCA1+/- samples from the WT type by unsupervised classification (Fig. 2A) and by principal component analysis (p-value=0.00014, Fig 2B). Functional enrichment on Gene Ontology (biological process) database performed with overexpressed genes in BRCA1+/- samples revealed an important implication of genes categorized by adhesion function but more particularly in anatomical structure development (Fig. 2C). A functional network of genes implicated in development was built (Fig.2D). The network revealed the importance of developmental genes in this differential expression gene expression profile and suggests that BRCA1 may play a role in mesenchymal-derived iPSCs.

Gene set enrichment analysis performed on gene set collection from hallmarks database allowed to highlight an increase of angiogenesis functionality in BRCA1-deleted-MSCs (NES = +1.64, p-value < 0.0001, Fig. 3A). Also, gene set enrichment analysis performed on geneset collection from Gene Ontology database confirmed implication of angiogenic process in this gene expression profile with: Gene Ontology

Angiogenesis Sprouting (NES = +1.91, p-value < 0.0001, Fig.3A) and Gene Ontology Angiogenesis and lymphoangiogenesis (respectively NES = +1.51, p-value < 0.0001, and NES = +1.28, p-value < 0.0001 (Fig.3A). Unsupervised classification performed with altered angiogenic related genes allowed to discriminate BRCA1 samples from their WT homologs (Fig. 3B). Angiopoietin 1 (*ANGPT1*), which is implicated in angiogenesis, (Fig. 3C) is also particularly up regulated (FC=+28) in BRCA1 samples as compared WT homologs. As shown on the angiogenesis network (Fig. 3C) several molecules have been found up regulated belonging to different classes of molecules such as: receptors (*PDGFRB*, *PDGFRA*, *LRP5*, *TEK*), ligands (*ANGPT1*, *PDGFA*, *VEGFB*, *BMP4*, *GREM1*, *THBS1*, *ANG*, *CTGF*), transcription factors (*FOXC2*, *MEIS1*, *MSX1*, *EPAS1*, *HOXB3*, *KLF5*, *ELK3*) and extracellular matrix components (*POSTN*, *LUM*, *MMP2*, *SPP1*).

Pro angiogenic activity of MSCs BRCA1+/- leads to up regulation of HIF-1 α and angiogenic factor

HIF-1 α is expressed at a significantly high level under hypoxic conditions and heterodimerizes with HIF-1 β to form HIF-1, following translocation into the nucleus in order to initiate the transcription of several angiogenic factors (32). In order to investigate the relationship between BRCA1 deletion and HIF-1 α expression, we conducted culture under hypoxic and normoxic conditions. Under both conditions, the expression level of HIF-1 α was increased in MSCs BRCA1+/- as shown by western blot analysis. Under normoxic condition, MSCs BRCA1+/- secreted a 2-fold increase of HIF-1 α after 8 hr of culture (Fig. 4A) and 2.5-fold after 4 and 8 hr in hypoxic culture condition (Fig. 4B), compared to WT MSCs and to bone marrow-derived MSCs. These results suggest that the loss of one allele of BRCA1 can trigger the stabilization of HIF-1 α and/or can prevent its degradation, in the presence of oxygen. These results also suggest that the up regulation of HIF-1 α in MSCs BRCA1+/- can trigger the expression of a variety of genes encoding hypoxia-inducible proteins related to angiogenesis. To verify the angiogenic potential of both MSCs, we quantified the mRNA encoding angiogenic molecules, such as hypoxia-inducible *VEFG*, *PDGF* and *ANGPT* subfamily in comparison with primary endothelial cells (HUVEC). Compared to WT MSCs and HUVEC, many of these factors were significantly over expressed in MSCs BRCA1+/- under hypoxia such as *PDGFa*,

VEGF α , *ANGPT1* and *ANGPT2*, acting as ligands for respectively, *PDGFR α* , *KDR/flk1*, *Flt1*, and *TEK/TIE2* that were also up regulated in MSCs BRCA1+/-, under normoxic, and hypoxic conditions (Fig. 4C). Interestingly, *VEGF β* mediating lymphangiogenesis was also 2- and 2.5-fold increased in MSCs BRCA1+/- under respectively normoxic and hypoxic conditions as compared to WT MSCs.

To evaluate the potential pro-angiogenic activity of MSCs BRCA1+/-, we first performed an *in vitro* matrigel angiogenesis assay based on the formation of tube-like structures from primary human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). We observed a significant increase of tube-like structures on extracellular matrix with condition medium (CM) from MSCs BRCA1+/- cultured in normoxia (Fig. 4D) and hypoxia (data not shown). CM enhances significantly the length and number of total branches, with an increase of extremities and segments (Fig. 4E).

We then used an *in vivo* method to determine the contribution of MSCs BRCA1+/- in triggering an efficient vessel network. We measured angiogenesis in three dimensions using matrigel plug angiogenesis assay in mice, as a more representative model of human body. Endothelial Progenitor Cells (PEC) were mixed with the same amount of MSCs BRCA1+/+ or MSCs BRCA1+/- and subcutaneously injected in nude mice and the plugs analyzed after 10 days. At macroscopic level, plugs generated with MSCs BRCA1+/- displayed hemorrhagic areas whereas their control group counterparts appeared much less vascularized (Fig. 4F). Histological analysis of the plugs generated with MSCs BRCA1+/- revealed the presence of complete tube like-vessel structures, with lumen containing a large number of red blood cells (Fig. 4F). These kinds of structures were never found in plugs generated with WT MSCs or generated with only PECs. Thus only MSCs BRCA1+/- were able to exert angiogenic paracrine effect on PECs with inducing large and organized vessel networks.

BRCA1 haplo-insufficiency induces up-regulation of Periostin and increases MSCs migration.

Periostin (POSTN) mRNA was highly up-regulated in MSCs BRCA1+/- (fold change x 8 in gene expression array analysis) as compared to WT MSCs. To confirm this result we compared the amount of POSTN mRNA by RT-PCR, and protein level by

western blot and by ELISA in cell supernatants from MSCs BRCA1^{+/-} and WT MSCs. POSTN mRNA levels were significantly enhanced with a 2.5 fold changes in MSCs BRCA1^{+/-} compared to WT MSCs, in contrast to iPSC producing very low level of POSTN (Fig. 5A). Soluble POSTN was detected in supernatant during 8 hours of cultured MSCs BRCA1^{+/-}, at 17 fold higher level compared to WT MSC (6599 $\pm$ 286 versus 385 $\pm$ 50 pg/ml) (Fig. 5B). POSTN at 93 KDa was measured by western blot analysis and was 2.4 fold highly expressed in MSCs BRCA1^{+/-} after 8 hours of culture compared to WT MSCs (Fig. 5C). Since POSTN is known to activate signalling pathways promoting integrin-dependent cell adhesion and motility we performed a wound-healing assay with both MSCs. The gap closure rate was measured at four different times after having made a linear scratch/wound on both cell monolayers. As expected, MSCs BRCA1^{+/-} migrate faster compared to WT MSCs (Fig. 5D) and the wound was found to be closed after 24 h compared to WT MSCs in which a gap was still present at 48h (Fig. 5E). Since proliferation rate could interfere with the measurement of migration, we performed a MTT proliferation assay over 72 hr. As shown on Fig. 5F, proliferative rate of both MSCs was identical in culture at low concentration of serum (Fig. 5F). To confirm the functional relevance and the involvement of POSTN in the observed cell motility of MSCs BRCA1^{+/-}, we analyzed the consequences of POSTN knockdown. We transiently transfected siRNAs directed against POSTN into MSCs BRCA1^{+/-} and MSCs BRCA1^{+/+}, and screened cell motility in wound-healing assay after scratching. We first optimized the efficacy of transfection by using a fluorophore labelled siRNA (Accell Green Non-targeting control siRNA) and reached an efficacy of 95.3% after transfection of 2.8 μ M of siRNA (Fig. 6A). POSTN mRNA was undetectable and inhibited by 90 and 99% in MSCs BRCA1^{+/+} and MSCs BRCA1^{+/-} respectively (Fig. 6B). After 48 hours of culture, knockdown of POSTN significantly reduced cell motility of MSCs BRCA1^{+/-}, with 38% of inhibition ($P=3.17 \times 10^{-10}$) (Fig. 6C) in comparison with control cells. A gap was still present after 48h of culture, in contrast to the MSCs BRCA1^{+/-} transfected with the control siRNA for which the wound was already completely closed (Fig. 6D). These findings confirm that the activation of the POSTN secretion by BRCA1 heterozygosity in MSCs promotes cell motility and potentially the migration and invasion of breast cancer cells.

MSC BRCA1+/- promotes breast tumor cell growth and metastasis.

In order to investigate the effect of MSCs on tumor growth *in vivo* and on tumor invasion capacity, we followed the behaviour of 4T1 breast tumor cell line, in the presence or the absence of MSCs. 4T1 carrying a luciferase expressing cassette (Luc-4T1) allowed us to track metastasis in lung by bioluminescence imaging analysis. Luc-4T1 cells alone, or pre-mixed with MSCs BRCA1+/- or MSCs BRCA1+/+ were injected into the mammary fat pad of NOD-SCID mice and tumor volume was serially measured. A progressive tumor growth was significantly enhanced by both MSCs but with a higher rate in presence of MSCs BRCA1+/- in comparison with WT MSCs. On day 18, tumors from 4T1+ MSC BRCA1+/- co-transplantation group were 1.9-fold larger compared to the tumors derived after injection of 4T1 cell alone, whereas the co-transplantation of 4T1 cells with WT MSCs were not significantly larger compared to the 4T1 derived-group (Fig. 7A). These results highlight a selective role of MSCs BRCA1+/- in drastic tumor growth enhancement with larger tumors, confirmed by bioluminescence imaging analysis (Fig. 7B). This increase of tumor size was correlated with the expression of POSTN, detected by immunohistochemistry on tumor section at day 18 (Fig. 7C). Intratumoral angiogenesis assessed by CD34 immunostaining of tumor sections was found to be significantly increased in presence of MSCs BRCA1+/- (Fig.7C). A well-developed vessel network with a complete structure of new vessels was detected in 4T1 tumor section co injected with MSCs BRCA1+/- (score of 7.3 ± 0.1) with a less score in 4T1 with WT MSCs or alone (score of respectively 5.5 ± 0.11 and 2.4 ± 0.11) (Fig. 7D). To test whether MSCs BRCA1+/- enriched in POSTN and angiogenic factors promotes migration and metastasis, we measured the occurrence of lung metastases in the 3 groups of mice. MSCs BRCA1+/- significantly enhance spontaneous metastasis of 4T1 tumors in lungs, 18 days after transplantation with more and higher positive lung areas (6764 ± 275) than those with WT MSCs (5243 ± 382) or without any MSCs (3147 ± 195) (Fig. 7E, F), as also confirmed by bioluminescence imaging analysis (Fig. 7B).

DISCUSSION

The aim of the study was to evaluate the contribution of BRCA1-deleted MSCs (MSCs BRCA1+/-) in breast tumor development and progression, in comparison to MSCs containing two copies of BRCA1 gene (MSCs BRCA1+/+). In this study, MSCs BRCA1+/- were produced by iPSCs that were generated after reprogramming blood cells (PBMC) from a patient, with a heterozygous deletion of the BRCA1 gene within the Exon 17 (22).

By gene expression array analysis, we first identified a set of interrelated transcripts whose actions converge to the deregulation, in MSC BRCA1+/-, of several important biological processes implicated in the blood vessel development, in cell adhesion and in integrin-mediated signaling pathways. Indeed, we identified 261 different genes that have significantly ($p=0.00014$) discriminated both cell lines. More than 20% of these genes were implicated in angiogenesis process and in angiogenesis sprouting such as *VEGFb*, *PDGFa* and *ANGPT1* as well as their related receptors (*PDGFRB*, *PDGFRA*, *TEK*). Since all these factors are known to be regulated by HIF-1 α (33), we first investigated the relationship between BRCA1 deletion and HIF-1 α after having exposed the cells to hypoxia and normoxia. Under both culture conditions, MSCs BRCA1+/- showed clearly an increase of HIF-1 α level by western blot analysis compared to WT MSCs. These results are in accordance with the previous reports showing that HIF-1 α was also up regulated in fibroblasts, which were genetically modified for BRCA1 using a shRNA lentiviral approach in comparison to normal fibroblasts in counterpart (34). In this work, they hypothesized that shBRCA1 fibroblasts in comparison to parental fibroblasts decreased the level of the Succinate Dehydrogenase Subunit B (SDHB, a complex II subunit), resulting to an excess of succinate in the cytoplasm that could inhibit PHD oxidation of HIF-1 α , leading to the stabilization of HIF-1 α and to an increase of the half-life of the protein (35). Similar results were observed in clinical settings on several cohorts of patients with sporadic and hereditary breast carcinogenesis showing a significantly over expression of HIF-1 α in BRCA1-related cancers (36). In patients with hereditary breast cancers a positive association of HIF-1 α with high tumor grade and relapse-free survival was observed (37). One potential mechanism of these results may be explained by a probable decrease of prolyl hydroxylase enzymes 3 (PHD3), which participates with

the tumor suppressor von Hippel-Lindau protein to the proteasomal-degradation of HIF-1 α (38).

In accordance with these previous results, we hypothesized that in response to hypoxia, HIF-1 α , becomes stabilized in MSC BRCA1+/-, which can translocate into the nucleus in order to regulate a variety of hypoxia inducible target genes (39). As expected, a significant up regulation of several hypoxia inducible genes was observed exclusively in MSCs BRCA1+/- compared to WT MSCs including, *VEFGa*, *VEGFc*, *PDGFa*, *ANGPT1*, *ANGPT2*. Regarding these results we thus concluded that MSC BRCA1+/- may display a more pro-angiogenic potential, which was confirmed *in vitro* and *in vivo*. Indeed, *in vitro* conditioned medium of MSCs BRCA1+/- was shown to be more efficient to differentiate HUVEC into tube-like structures compared to WT MSCs and MSCs BRCA1+/-, which were shown to efficiently activate endothelial progenitor cells to form vessel like-structures *in vivo* using matrigel plug angiogenesis assay.

By gene expression array analysis, western blot analysis and RT-PCR, MSCs BRCA1+/- were shown to also over express periostin (POSTN). In addition, an ELISA performed on cell supernatant also showed that only MSCs BRCA1+/- can efficiently produce POSTN compared to WT MSCs. POSTN is a secreted cell adhesion protein normally expressed in mesenchyme-derived cells (40). The N-terminal region of the protein influences cell function, while the C-terminal influences cell-matrix interactions. Through its FAS domains, POSTN binds to integrins and activates the Akt/PKB and the FAK-mediated signalling pathways, leading to increased tumor invasion, migration and metastasis. The C-terminal region of the protein regulates the cell-matrix organization and interactions by binding extracellular matrix (ECM) proteins such as collagen I/V, fibronectin, heparin and POSTN itself (41). As POSTN is involved in cell adhesion, motility and migration, we first conducted a wound-healing assay showing that MSCs BRCA1+/- have a superior capacity to migrate in comparison to WT MSCs. This effect was significantly reversed when MSC BRCA1+/- were transfected with POSTN-specific siRNA. POSTN was previously shown to be involved in the epithelial-mesenchymal transition (EMT) of carcinoma cells (42-46) a process that is responsible for dissemination of primary tumor epithelial cells to the sites of metastasis and for the dedifferentiation program that leads to increased malignant behaviour of the tumor (47). In order to determine how both MSCs can affect tumor progression, we have performed an *in vivo* study to

follow the behaviour of breast carcinoma cells when co-injected into the mammary fat pad of NOD-SCID mice. We used a syngenic tumor model using the triple-negative breast 4T1 tumor cell line, known to be highly tumorigenic and invasive and unlike most tumor models, can spontaneously metastasize from the primary tumor in the mammary gland to multiple distant sites including the lung similarly to that of human mammary cancer (48). We demonstrated that MSCs BRCA1^{+/-} enhanced 4T1 tumor growth and lung metastasis when co-injected into mice mammary fat pads in contrast to the co-injection of MSCs BRCA1^{+/+} in counterpart. These effects were significantly correlated with an increase of intra-tumoral angiogenesis assessed by murine CD34 immuno-staining on tumor sections and with the detection of POSTN immuno-reactive protein by immuno-histochemistry. These results suggest that through modulation by MSCs BRCA1^{+/-}, secreting high level of POSTN, 4T1 cancer cells could acquire higher self-renewal ability compared to WT MSC, which is one of the characteristic of cancer stem cells. Indeed, POSTN is known to be involved in the epithelial-mesenchymal transition (EMT) of various carcinoma cells participating in the dissemination of primary tumor epithelial cells to metastasis sites and in the dedifferentiation program that leads to increased malignant behaviour of the tumor by increasing breast cancer stem cell phenotypes as previously suggested (49). We also confirm that the promoting effect of MSCs BRCA1^{+/-} on 4T1 tumor growth and dissemination is related to increased tumor vessel networks prompting lung metastasis. Several factors secreted by MSCs BRCA1^{+/-} were shown to influence angiogenesis, including VEGFa, VEGFc, PDGFa, ANGPT1, ANGPT2. Our results further provide that MSCs BRCA1^{+/-} create a more favorable vascularised microenvironment than MSCs BRCA1^{+/+} in counterpart. The co-injection of 4T1 cells with MSCs BRCA1^{+/-} showed a significant increase of vessels that appeared thicker compared to the co-injection of WT MSCs or to the injection of 4T1 alone. These results revealed for the first time that BRCA1 haplo-insufficiency in MSCs *per se* strongly affect the tumor microenvironment by promoting tumor angiogenesis through the release of angiogenic factors under hypoxia and the release of POSTN promoting angiogenesis through paracrine regulation on adhesion and migration of endothelial cells. Interestingly, POSTN is also able to regulate the immunosuppressive function of immature myeloid cell in ER-negative breast cancer patients promoting premetastatic niche formation in the lungs during breast tumor metastasis (50). It is

not excluded that MSCs BRCA1+/- might also facilitate the progression of lung metastasis by regulating immunosuppressive function of myeloid cells.

Our findings suggest that POSTN may play a crucial role in BRCA1-deleted breast cancer initiation, progression and dissemination and could represent a prognostic biomarker in order to predict worse survival outcomes in specific subgroups of patients developing aggressive and invasive triple negative breast cancers. Furthermore our findings suggest that POSTN represents a new potential target for the prevention and treatment of breast tumor metastasis. Moreover MSCs BRCA1+/- derived from iPSCs could be an appropriate source of cells for high throughput drug screening and testing new drugs on MSC's targets specifically associated to germline BRCA1 mutation and predisposing to develop breast and/or ovarian cancers.

FIGURES

Figure 1. MSCs differentiated from human iPSCs exhibit characteristics of MSCs BRCA1^{+/-} and MSCs BRCA1^{+/+}. **A**, Morphology of iPSCs and iPSC-derived MSCs characterized by spindle-shaped cells. **B**, Immunofluorescence images of iPSC-derived MSCs stained with N-Cadherin and Vimentin mesenchymal markers. **C**, Expression of mesenchymal markers (Snail 2, N-Cadherin, Vimentin and Snail 1) by RT-QPCR in both cell lines. **D**, BRCA1-deleted MSCs exhibit a normal karyotype. **E**, Expression of characteristic MSC markers by flow cytometry. White histograms indicate a negative expression. **G**, Western blot of the deleted BRCA1 protein and wild-type and levels in MSCs BRCA1^{+/-} and MSCs BRCA1^{+/+}. Immunoblotting showing that BRCA1 protein level is decreased in the BRCA1-mutated MSCs.

Figure 2. Differential expressed genes implicated between MSCs BRCA1^{+/-} and MSCs BRCA1^{+/+}. **A**, Transcriptome heatmap with unsupervised classification performed on differential expressed genes between MSCs BRCA1^{+/-} and MSCs BRCA1^{+/+}. **B**, Principal component analysis performed on differential expressed genes between MSCs BRCA1^{+/-} and MSCs BRCA1^{+/+}. **C**, Gene Ontology Biological Process functional enrichment performed with genes up regulated in BRCA1^{+/-} MSCs as compared to BRCA1^{+/+} MSCs. **D**, Functional enrichment performed with developmental functionalities enriched by up regulated in MSCs BRCA1^{+/-} as compared to MSCs BRCA1^{+/+}.

Figure 3. Angiogenesis activation in transcriptome of MSCs BRCA1^{+/-}. **A**, angiogenesis and lymphangiogenesis related genesets enriched on geneset collection of Hallmarks and Gene Ontology Biological Process (GO-BP) from MSigDB version 5.2 (NES: Normalized Enrichment Score). **B**, Unsupervised clustering (Euclidean distances) performed with angiogenic genes found activated in MSCs BRCA1^{+/-}. **C**, Angiogenic related functional network performed with genes up regulated in MSCs BRCA1^{+/-} as compared WT MSCs (NES: normalized enrichment score).

Figure 4. Pro angiogenic property of MSCs BRCA1^{+/-}. **A**, Western blot of the relative HIF-1 α levels in MSCs BRCA1^{+/-}, MSCs BRCA1^{+/+} and Bone Marrow derived-

MSCs at 1, 4 and 8 hr of culture under normoxia. **B**, Western blot of the relative HIF-1 α levels in MSCs BRCA1+/-, MSCs BRCA1+/+ and Bone Marrow derived-MSCs at 1, 4 and 8 hr of culture under hypoxia. **C**, Expression by RT PCR of a variety of genes encoding hypoxia-inducible protein in HUVEC and in MSCs BRCA1+/- and MSCs BRCA1+/+ harvested for 4 days under normoxia and hypoxia. **D**, Matrigel angiogenesis assay using HUVEC and conditioned medium from MSCs BRCA1+/- and MSCs BRCA1+/+ showing the total branches lengths and number and the number of extremities. **E**, Representative images of tube-like structures on an extracellular matrix. **F**, Plug angiogenesis assay performed with MSCs BRCA1+/- and MSCs BRCA1+/+ showing the plug after 10 days at macroscopic levels and after histological analysis after Hematoxylin and Eosin staining. Plugs performed with MSCs BRCA1+/- shows the presence of complete tube like-vessel structures, with lumen containing a large number of red blood cells (arrows).

Figure 5. Periostin (POSTN) expression and wound-healing assay. **A**, Quantitative RT PCR for POSTN in MSCs and iPSCs. **B**, ELISA for POSTN in supernatant of MSCs BRCA1+/- and MSCs BRCA1+/+ after 1, 4 and 8 hr of culture. **C**, Western blot of the relative POSTN levels in MSCs BRCA1+/- and MSCs BRCA1+/+ after 1, 4 and 8 hr of culture under normoxia. **D**, Cell migration ability measured by a wound-healing assay. Compared with control cells (MSCs BRCA1+/+) the migration distance of MSCs BRCA1+/- was significantly greater for MSCs BRCA1+/- . **E**, Representative photomicrographs of the gaps of MSCs BRCA1+/- and MSCs BRCA1+/+ for each culture condition at different time points (6, 24, 30, 48 hr) after scratching in a wound healing assay. **F**, Proliferation assays using a MTT test on MSCs BRCA1+/- and MSCs BRCA1+/+ after 1, 2 and 3 days of culture.

Figure 6. Wound-healing assay with MSCs BRCA1+/- and MSCs BRCA1+/+ after transfection with siRNA against POSTN. **A**, Evaluation of the transfection efficacy on MSCs BRCA1+/- using fluorophore labelled siRNA. **B**, Knockdown of POSTN mRNA in both cell lines evaluated by quantitative RT PCR. **C**, Cell migration ability was measured by a wound-healing assay with transfected cell lines by POSTN siRNA and siRNA control. **D**, Representative photomicrographs of the gaps of MSCs BRCA1+/- and MSCs BRCA1+/+ after transfection for each culture condition at different time points (24 and 48 hr) after scratching in a wound healing assay.

Figure 7. MSCs BRCA1+/- enhance 4T1 tumor formation and lung metastasis. **A**, To evaluate the *in vivo* tumorigenic potential of 4T1 cells, a total of either 10^5 Luc-expressing 4T1 cells alone or premixed with 3×10^5 MSCs BRCA1+/- or MSCs BRCA1+/, were injected into the mammary fat pad. Tumor growth was recorded. Data are presented as the mean $\pm$ SD. **B**, Representative images of tumorigenesis visualized by bioluminescence imaging analysis at day 18. **C**, Right: CD34 immunostaining of tumor sections showing within MSCs BRCA1+/- co-transplanted tumors a well-developed vessel network with complete structure of new vessels as compared with the 4T1 co injected with WT MSCs or alone, left: immunohistochemistry of POSTN immunoreactive material on tumor section showing cells positive for POSTN (arrows). **D**, The extent of intratumoral vascularization was assessed by CD34 immunostaining and quantified by assessing the percentage of segmented tissue area positive for CD34 at day 18. **E**, Quantification of lung metastatic areas at day 18. **F**, The extent of lung metastasis is shown after 18 days within the whole lung area after immuno histochemical staining of GFP.

Acknowledgements

We sincerely thank, Olivia Bawa, Olivier Féraud and Dominique Divers for technical assistance, Ibrahim Casal for animal care, Paule Opolon for anatomopathological analysis, and acknowledge Marianne Mackenthun for editing for critical reading.

This work was performed with grants from ANR Programme d'Investissements d'Avenir of INGESTEM National Infrastructure (ANR-11-INBS-0009-INGESTEM), Inserm, University Paris Sud and Vaincre le Cancer NRB.

REFERENCES

- 1 Desmoulière A, Guyot C, Gabbiani G. The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *Int J Dev Biol.* 2004;48:509–17.
- 2 Liu S, Ginestier C, Ou SJ, Clouthier SG, Patel SH, Monville F, et al. Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks. *Cancer Res.* 2011;71:614–24.
- 3 McLean K, Gong Y, Choi Y, Deng N, Yang K, Bai S, et al. Human ovarian carcinoma-associated mesenchymal stem cells regulate cancer stem cells and tumorigenesis via altered BMP production. *J Clin Invest.* 2011;121:3206–19.
- 4 Studeny M, Marini FC, Dembinski JL, Zompetta C, Cabreira-Hansen M, Bekele BN, et al. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96:1593–603.
- 5 Kidd S, Spaeth E, Dembinski JL, Dietrich M, Watson K, Klopp A, et al. Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem Cells.* 2009;27:2614–23.
- 6 Yan X, Fu C, Chen L, Qin J, Zeng Q, Yuan H, et al. Mesenchymal stem cells from primary breast cancer tissue promote cancer proliferation and enhance mammosphere formation partially via EGF/EGFR/Akt pathway. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;132:153–64.
- 7 Jung Y, Kim JK, Shiozawa Y, Wang J, Mishra A, Joseph J, et al. Recruitment of mesenchymal stem cells into prostate tumours promotes metastasis. *Nat Commun.* 2013;4:1795.
- 8 Cuiffo BG, Campagne A, Bell GW, Lembo A, Orso F, Lien EC, et al. MSC-regulated microRNAs converge on the transcription factor FOXP2 and promote breast cancer metastasis. *Cell Stem Cell.* 2014;15:762–74.
- 9 Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature.* 2007;449:557–63.
- 10 Goldstein RH, Reagan MR, Anderson K, Kaplan DL, Rosenblatt M. Human bone marrow-derived MSCs can home to orthotopic breast cancer tumors and promote bone metastasis. *Cancer Res.* 2010;70:10044–50.
- 11 Liu S, Ginestier C, Ou SJ, Clouthier SG, Patel SH, Monville F, et al. Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks. *Cancer Res.* 2011;71:614–24.

- 12 El-Haibi CP, Bell GW, Zhang J, Collmann AY, Wood D, Scherber CM, et al. Critical role for lysyl oxidase in mesenchymal stem cell-driven breast cancer malignancy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109:17460–5.
- 13 Chaturvedi P, Gilkes DM, Wong CCL, Kshitiz, Luo W, Zhang H, et al. Hypoxia-inducible factor-dependent breast cancer-mesenchymal stem cell bidirectional signaling promotes metastasis. *J Clin Invest*. 2013;123:189–205.
- 14 Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*. 2007;449:557–63.
- 15 Cuiffo BG, Campagne A, Bell GW, Lembo A, Orso F, Lien EC, et al. MSC-regulated microRNAs converge on the transcription factor FOXP2 and promote breast cancer metastasis. *Cell Stem Cell*. 2014;15:762–74.
- 16 El-Haibi CP, Bell GW, Zhang J, Collmann AY, Wood D, Scherber CM, et al. Critical role for lysyl oxidase in mesenchymal stem cell-driven breast cancer malignancy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109:17460–5.
- 17 Rosen EM, Fan S, Pestell RG, Goldberg ID. BRCA1 gene in breast cancer. *J Cell Physiol*. 2003;196:19–41.
- 18 Foulkes WD, Stefansson IM, Chappuis PO, Bégin LR, Goffin JR, Wong N, et al. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95:1482–5.
- 19 Stefansson OA, Jonasson JG, Johannsson OT, Olafsdottir K, Steinarsdottir M, Valgeirsdottir S, et al. Genomic profiling of breast tumours in relation to BRCA abnormalities and phenotypes. *Breast Cancer Res*. 2009;11:R47.
- 20 Bellacosa A, Godwin AK, Peri S, Devarajan K, Caretti E, Vanderveer L, Bove B, Slater C, Zhou Y, Daly M, Howard S, Campbell KS, Nicolas E, et al. Altered gene expression in morphologically normal epithelial cells from heterozygous carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2010;3:48-61.
- 21 Rennstam K, Ringberg A, Cunliffe HE, Olsson H, Landberg G, Hedenfalk I. Genomic alterations in histopathologically normal breast tissue from BRCA1 mutation carriers may be caused by BRCA1 haploinsufficiency. *Genes Chromosomes Cancer*. 2010;49:78-90.
- 22 Griscelli F, Oudrhiri N, Feraud O, Divers D, Portier L, Turhan AG, Bennaceur Griscelli A. Generation of induced pluripotent stem cell (iPSC) line from a patient with triple negative breast cancer with hereditary exon 17 deletion of BRCA1 gene. *Stem Cell Res*. 2017 ;24:135-138.
- 23 Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131:861–72.

- 24 Giuliani M, Oudrhiri N, Noman ZM, Vernochet A, Chouaib S, Azzarone B, Durrbach A, Bennaceur-Griscelli A. Human mesenchymal stem cells derived from induced pluripotent stem cells down-regulate NK-cell cytolytic machinery. *Blood*. 2011; 12:3254-62.
- 25 Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001;98,5116–5121.
- 26 Lê S, Josse J, Husson F. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *J. Stat. Softw.* 2008;25, 1–18.
- 27 Zambon AC, Gaj S, Ho I, Hanspers K, Vranizan K, Evelo CT, Conklin BR, Pico AR, Salomonis, N. GO-Elite: a flexible solution for pathway and ontology over-representation. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 2012;28, 2209–2210.
- 28 Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich, A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005;102,15545–15550.
- 29 Cline MS, Smoot M, Cerami E, Kuchinsky A, Landys N, Workman C, Christmas R, Avila-Campilo I, Creech M, Gross B, et al. Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. *Nat. Protoc.* 2007; 2, 2366–2382.
- 30 Smadja MD, Basire A, Amelot A, Conte A, Bièche I, Le Bonniec BF, Aiach M, Gaussem P. Thrombin bound to a fibrin clot confers angiogenic and haemostatic properties on endothelial progenitor cells. *J Cell Mol Med.* 2008;12, 975–986.
- 31 Rashid OM, Nagahashi M, Ramachandran S, Dumur C, Schaum J, Yamada A, Terracina KP, Milstien S, Spiegel S, Takabe. An improved syngeneic orthotopic murine model of human breast cancer progression. *K Breast Cancer Res Treat.* 2014;147, 501-12.
- 32 Dianat N, Le Viet B, Gobbo E, Auger N, Bièche I, Bennaceur-Griscelli A, Griscelli F. Midkine lacking its last 40 amino acids acts on endothelial and neuroblastoma tumor cells and inhibits tumor development. *Mol Cancer Ther.* 2015;1, 213-24.
- 33 Michel G, Minet E, Ernest I, Durant F, Rémacle J and Michiels C. Molecular modeling of the hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). *Theoretical Chemistry Accounts.* 1999;101:51-56.
- 34 Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, et al. Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature.* 1998;394:485–90.
- 35 Salem AF, Howell A, Sartini M, Sotgia F, Lisanti MP. Downregulation of stromal BRCA1 drives breast cancer tumor growth via upregulation of HIF-1 α , autophagy and ketone body production. *Cell Cycle.* 2012;11:4167–73.

- 36 Guzy RD, Sharma B, Bell E, Chandel NS, Schumacker PT. Loss of the SdhB, but Not the SdhA, subunit of complex II triggers reactive oxygen species-dependent hypoxia-inducible factor activation and tumorigenesis. *Mol Cell Biol*. 2008;28:718–31.
- 37 van der Groep P, Bouter A, Menko FH, van der Wall E, van Diest PJ. High frequency of HIF-1alpha overexpression in BRCA1 related breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;111:475–80.
- 38 Yan M, Rayoo M, Takano EA, Thorne H, KConFab Investigators, Fox SB. BRCA1 tumours correlate with a HIF-1alpha phenotype and have a poor prognosis through modulation of hydroxylase enzyme profile expression. *Br J Cancer*. 2009;101:1168–74.
- 39 Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 1999;399:271–5.
- 40 Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 16, 4604-13.
- 41 Morra L, Moch H. Periostin expression and epithelial-mesenchymal transition in cancer: a review and an update. *Virchows Arch*. 2011;459:465–75.
- 42 Norris RA, Damon B, Mironov V, Kasyanov V, Ramamurthi A, Moreno-Rodriguez R, et al. Periostin regulates collagen fibrillogenesis and the biomechanical properties of connective tissues. *J Cell Biochem*. 2007;101:695–711.
- 43 Li P, Oparil S, Feng W, Chen Y-F. Hypoxia-responsive growth factors upregulate periostin and osteopontin expression via distinct signaling pathways in rat pulmonary arterial smooth muscle cells. *J Appl Physiol*. 2004;97:1550–1558; discussion 1549.
- 44 Bao S, Ouyang G, Bai X, Huang Z, Ma C, Liu M, et al. Periostin potently promotes metastatic growth of colon cancer by augmenting cell survival via the Akt/PKB pathway. *Cancer Cell*. 2004;5:329–39.
- 45 Gillan L, Matei D, Fishman DA, Gerbin CS, Karlan BY, Chang DD (2002) Periostin secreted by epithelial ovarian carcinoma is a ligand for alpha(V)beta(3) and alpha(V)beta(5) integrins and promotes cell motility. *Cancer Res* 62:5358–5364
- 46 Yan W, Shao R. Transduction of a mesenchyme-specific gene periostin into 293T cells induces cell invasive activity through epithelial-mesenchymal transformation. *J Biol Chem*. 2006;281:19700–8.
- 47 Kim CJ, Sakamoto K, Tambe Y, Inoue H. Opposite regulation of epithelial-to-mesenchymal transition and cell invasiveness by periostin between prostate and bladder cancer cells. *Int J Oncol*. 2011;38:1759–66.

- 48 Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:442–54.
- 49 Kaur P, Nagaraja GM, Zheng H, Gizachew D, Galukande M, Krishnan S, et al. A mouse model for triple-negative breast cancer tumor-initiating cells (TNBC-TICs) exhibits similar aggressive phenotype to the human disease. *BMC Cancer*. 2012;12:120.
- 50 Lambert AW, Wong CK, Ozturk S, Papageorgis P, Raghunathan R, Alekseyev Y, et al. Tumor Cell-Derived Periostin Regulates Cytokines That Maintain Breast Cancer Stem Cells. *Mol Cancer Res*. 2016;14:103–13.
- 51 Wang Z, Xiong S, Mao Y, Chen M, Ma X, Zhou X, et al. Periostin promotes immunosuppressive premetastatic niche formation to facilitate breast tumour metastasis. *J Pathol*. 2016;239:484–95.

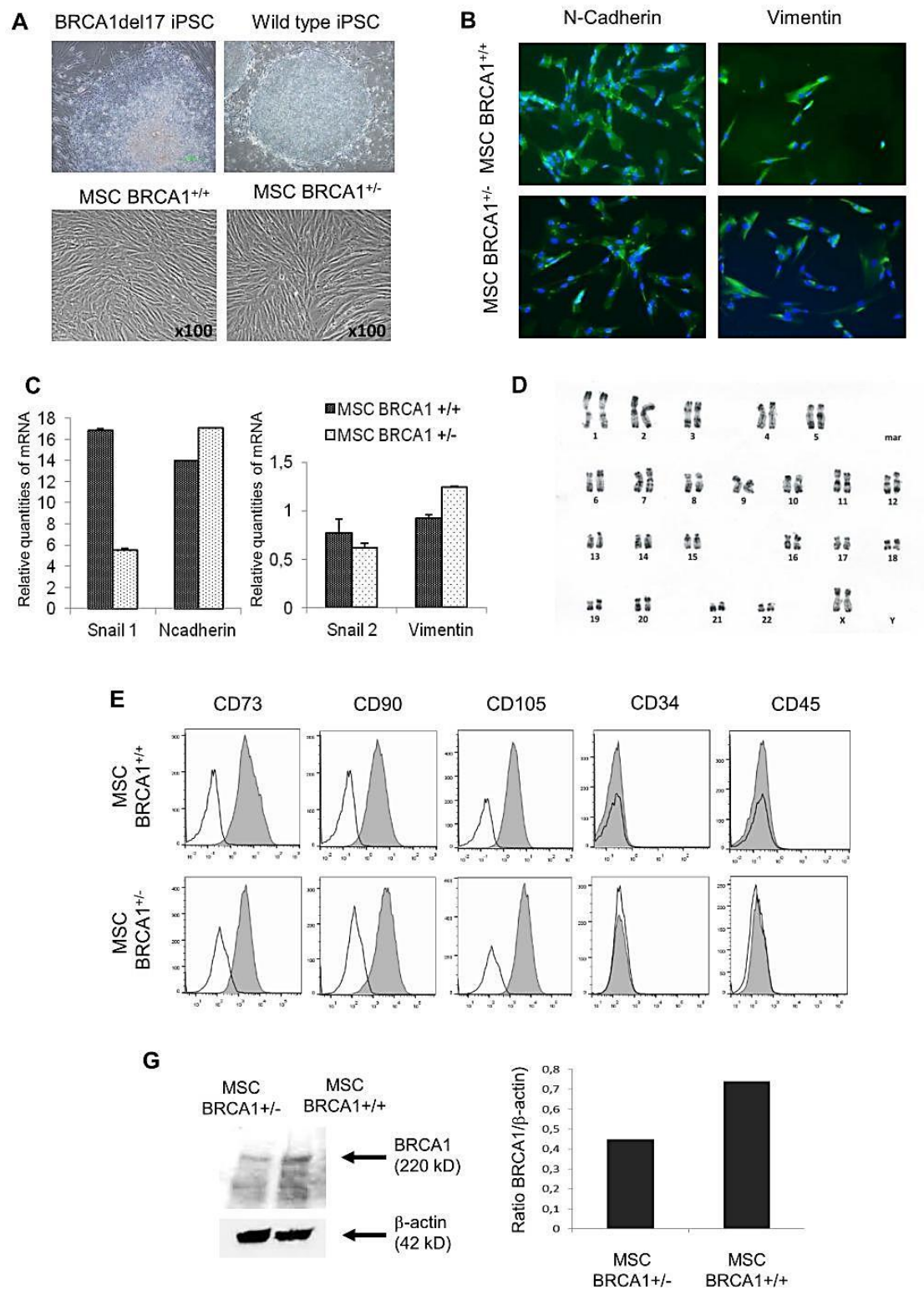


Figure 1

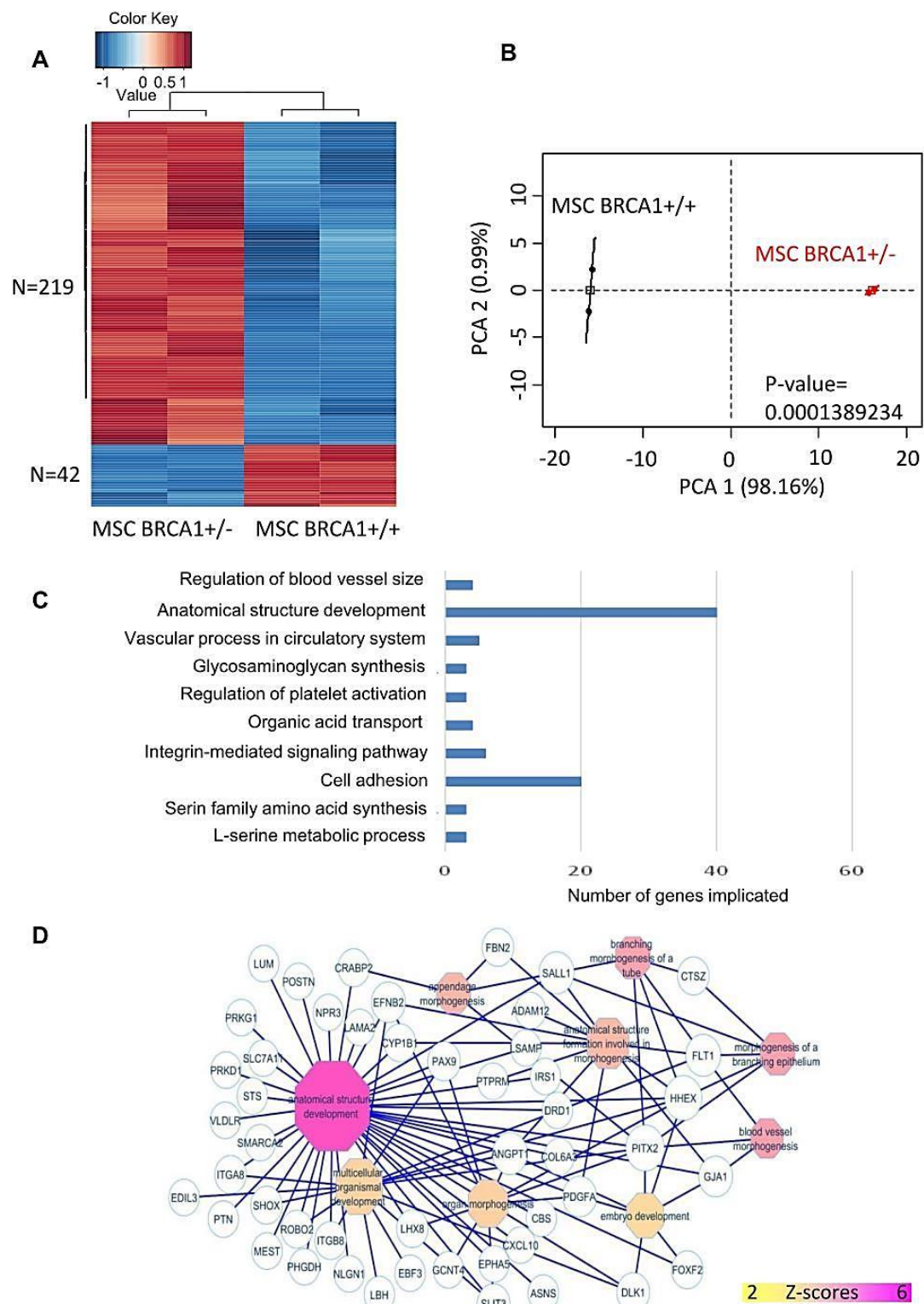


Figure 2

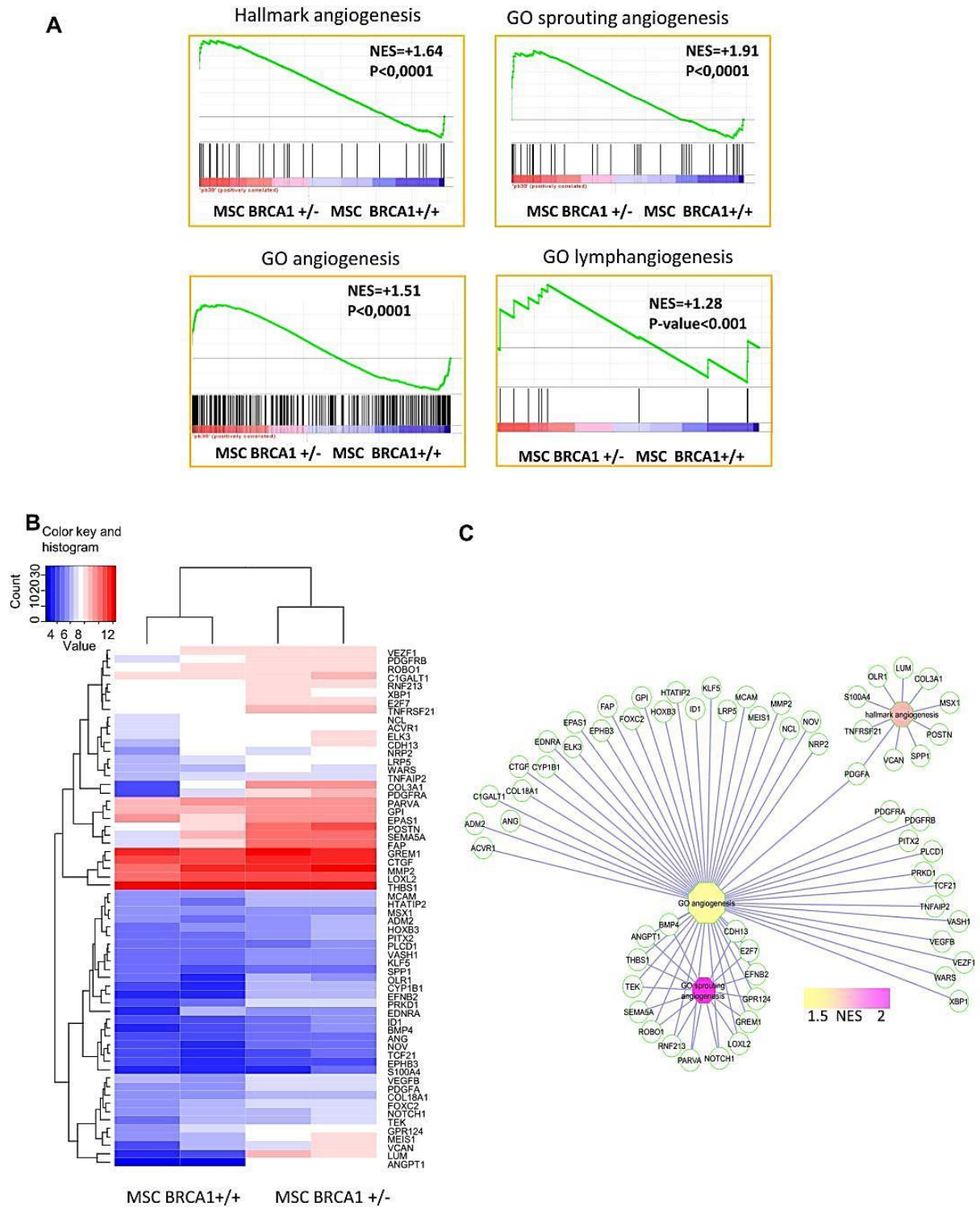


Figure 3

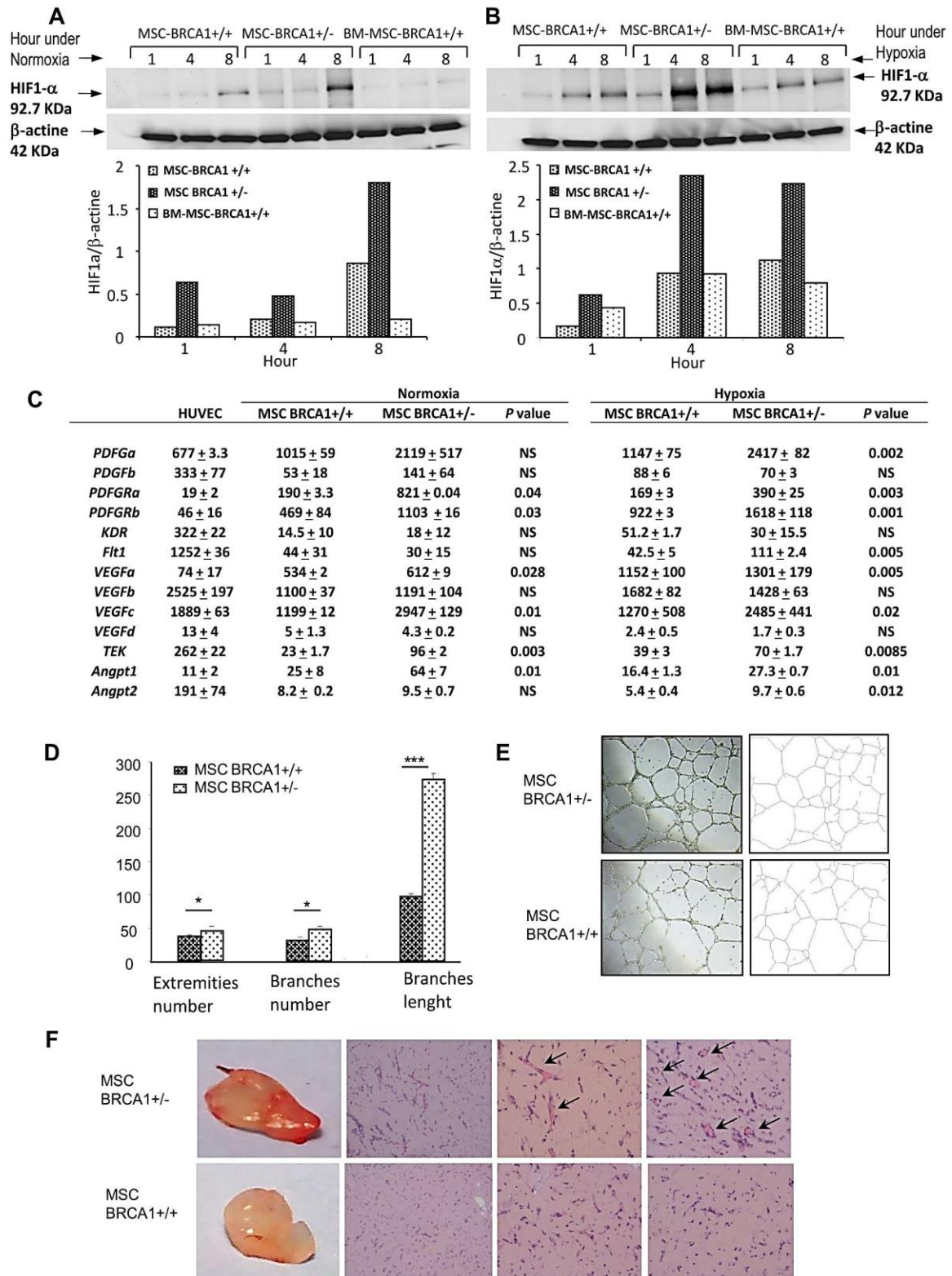


Figure 4

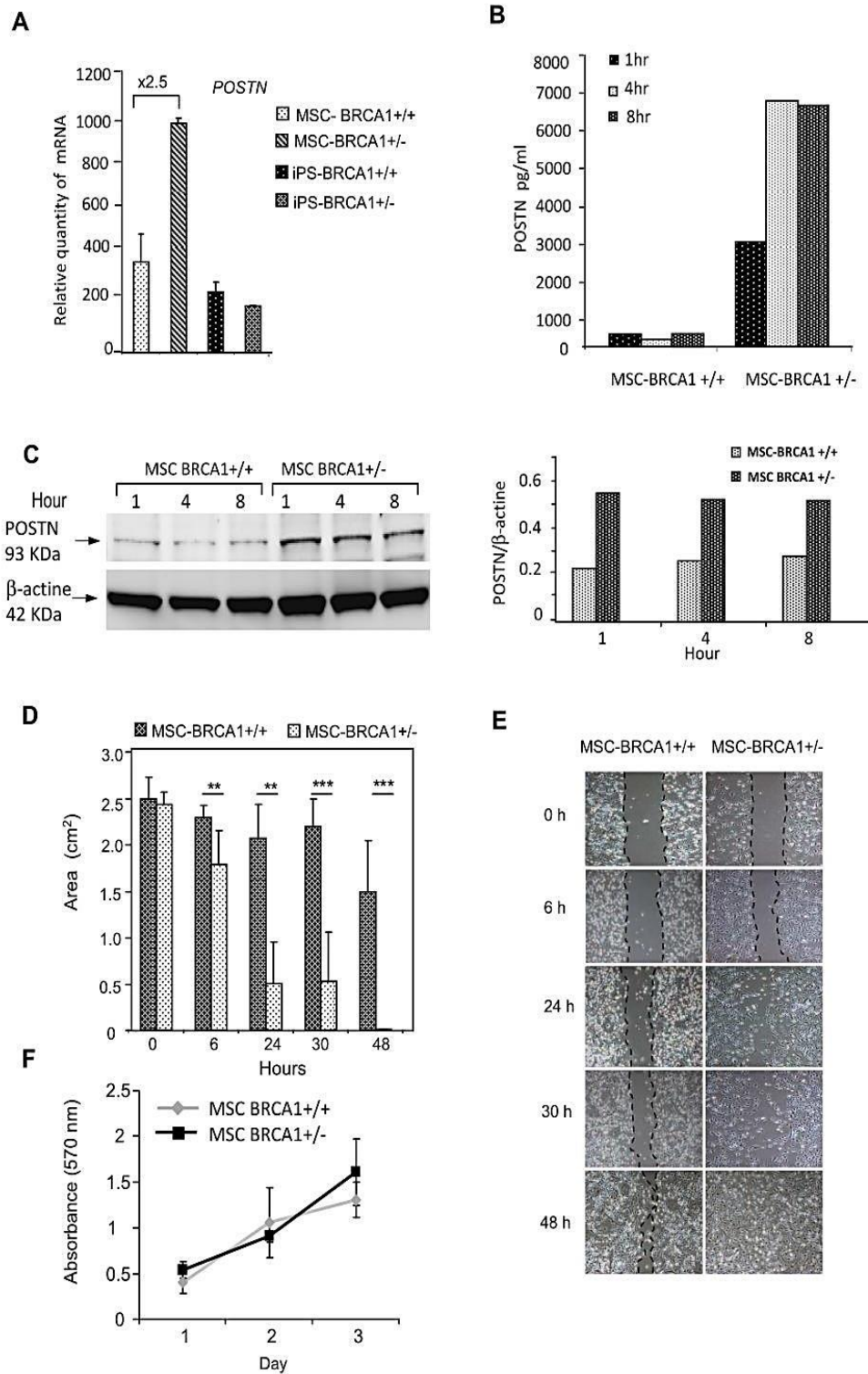


Figure 5

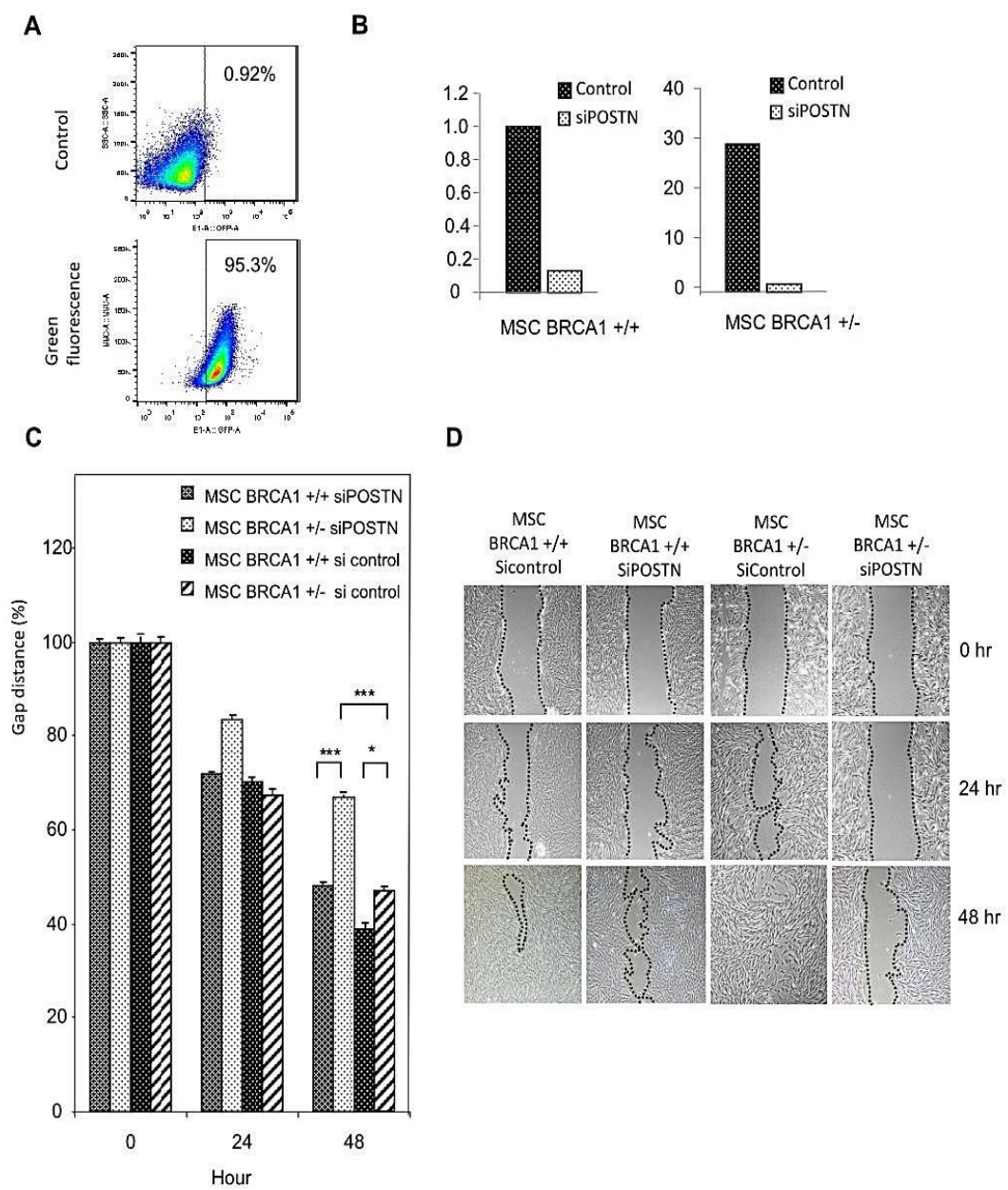


Figure 6

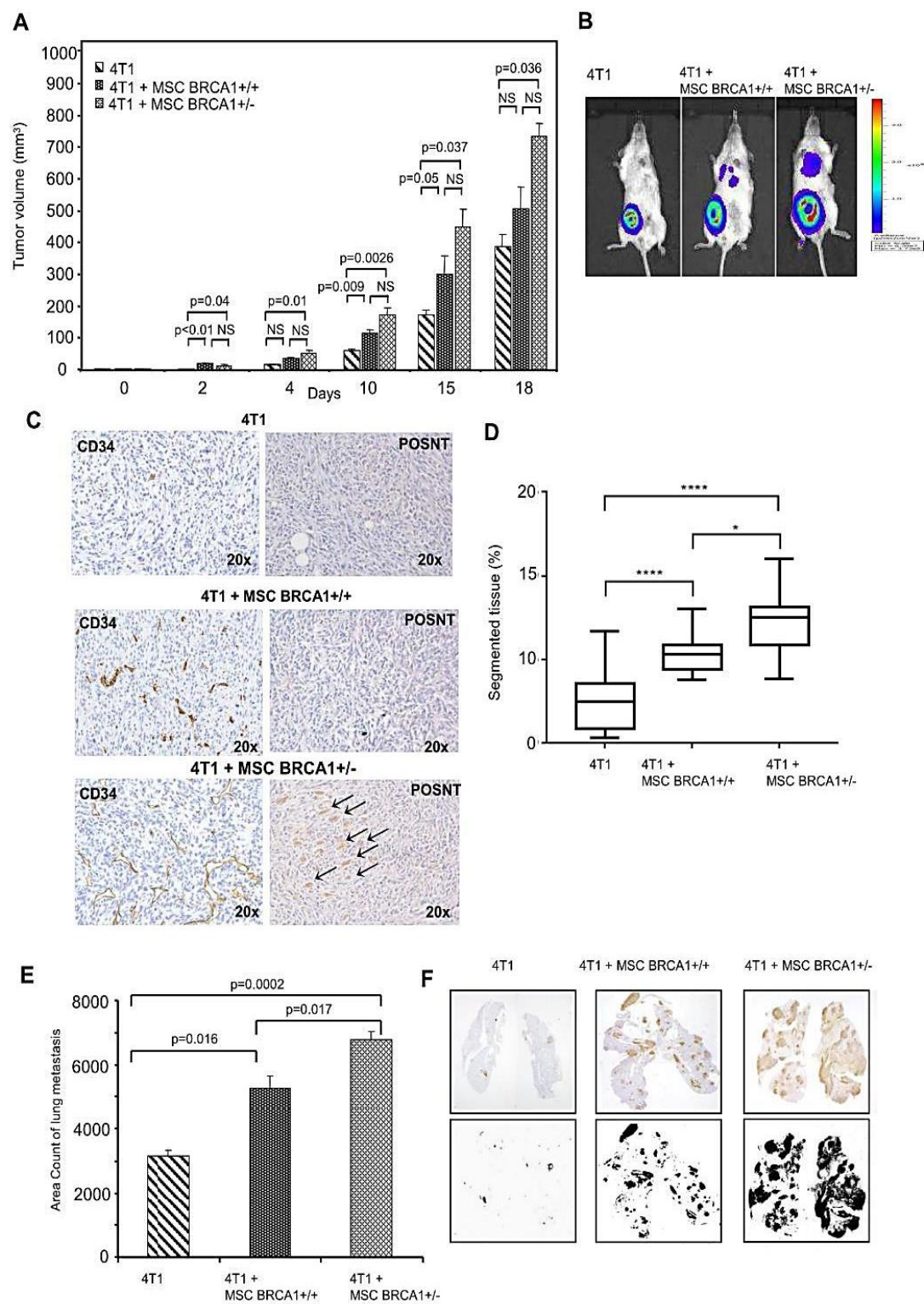


Figure 7

B. Résultats complémentaires 1 : les MSCs BRCA1-muté favorisent l'induction de la transition épithéliomésenchymateuse des cellules épithéliales mammaires.

Dans le but d'étudier l'influence d'un stroma muté pour *BRCA1* sur l'initiation de la transformation tumorale de cellules épithéliales mammaires, nous avons émis l'hypothèse de travail suivante:

- le stroma *BRCA1*^{+/-} stimule le processus de TEM sur des cellules épithéliales mammaires normales.
- le stroma *BRCA1*^{+/-} favorise et stabilise la conversion des cellules épithéliales mammaires luminales en cellules plus immatures de type basal « mésenchymateuse-like ».

Pour tester ces hypothèses, nous avons initié des co-cultures en *transwell* entre des MSCs et des cellules épithéliales mammaires normales immortalisées (hTERT-HME1). Une analyse des marqueurs de surface a été réalisée en fin de co-culture par cytométrie et les cellules ont été conservées pour une analyse transcriptomique.

Matériels et méthodes :

Culture cellulaire en transwell

Un insert, formé d'une membrane poreuse (Millicell hanging cell culture insert - 0,4µm - Millipore) est posé par-dessus les puits d'une plaque 6 puits. Les hTERT-HME1 sont mises en culture sur cette membrane. Pour la condition avec du TGFβ1, celui-ci est ajouté à une concentration de 2,5 ng/ml. Pour la co-culture avec les MSCs, celles-ci sont cultivées au fond des puits de la plaque de culture. Le milieu de culture utilisé est le MEBM (Lonza) et est changé tous les 3 jours. A J9, les cellules sont décollées et analysées.

Cytométrie en flux

Les hTERT-HME1 sont décollées de la membrane, lavées au PBS 1X (Gibco) et fixées au PFA 4% pendant 20 min. Les marquages avec les anticorps suivants sont réalisés : CD24 (FITC – BD Pharmingen), CD44 (PE – BD Pharmingen), CD324 (PE – BD Pharmingen), CD325 (FITC - SinoBiological), Vimentine (AF488 – BD Pharmingen) et CK18 (FITC – Interchim). Pour les marquages intracellulaires, les

cellules sont perméabilisées avec une solution de PBS / 0,25% saponine. L'incubation des anticorps se fait pendant 45 min à + 4°C et à l'abri de la lumière. Les cellules sont ensuite lavées et analysées au cytomètre (MACSQuant – Miltenyi Biotec).

Test de blessure

Les hTERT-HME1 sont mises en culture dans une plaque 6 puits jusqu'à former un tapis cellulaire homogène. A confluence, une blessure linéaire est réalisée à l'aide d'un cône de pipette stérile. Les cellules sont lavées et les différents milieux ajoutés : MEBM (Lonza) pour la condition contrôle ou 50% MEBM / 50% milieu conditionné de MSCs. La metformine est ajoutée à une concentration de 3mM. Des photos au microscope à contraste de phase sont prises régulièrement et la surface des blessures a été analysée avec le logiciel ImageJ.

Résultats :

Le modèle (**Figure 29 A**) utilisé ici comprend un *transwell*, constitué d'une membrane poreuse sur laquelle sont cultivées les cellules épithéliales mammaires (hTERT-HME1) (**Figure 29 B**). Les molécules solubles dans le milieu circulent à travers cette membrane.

Dans un premier temps, nous avons validé notre modèle en étudiant l'effet du TGFβ1 seul, inducteur reconnu de la TEM sur des cellules épithéliales mammaires. En présence de TGFβ1, deux marqueurs caractéristiques de la TEM sont modifiés. L'expression de l'E-cadhérine (marqueur épithélial) diminue, passant de 8% en condition normale à 1,2% avec le TGFβ1 et l'expression de la vimentine (marqueur mésenchymateux) augmente passant de 78% à 91% (**Figure 29 C**). La perte d'un marqueur épithélial et le gain d'un marqueur mésenchymateux indiquent que le TGFβ1 a initié un processus de TEM dans les cellules épithéliales mammaires. Concernant les caractéristiques d'immaturité de cellules souches cancéreuses, on voit que l'ajout de TGFβ1 entraîne une diminution de l'expression du CD24 qui passe de 83% à 13%. Le TGFβ1 contribue ainsi à augmenter la population de cellules souches cancéreuses CD24^{Low} / CD44^{High}, l'expression du CD44 étant déjà assez élevée chez les hTERT-HME1.

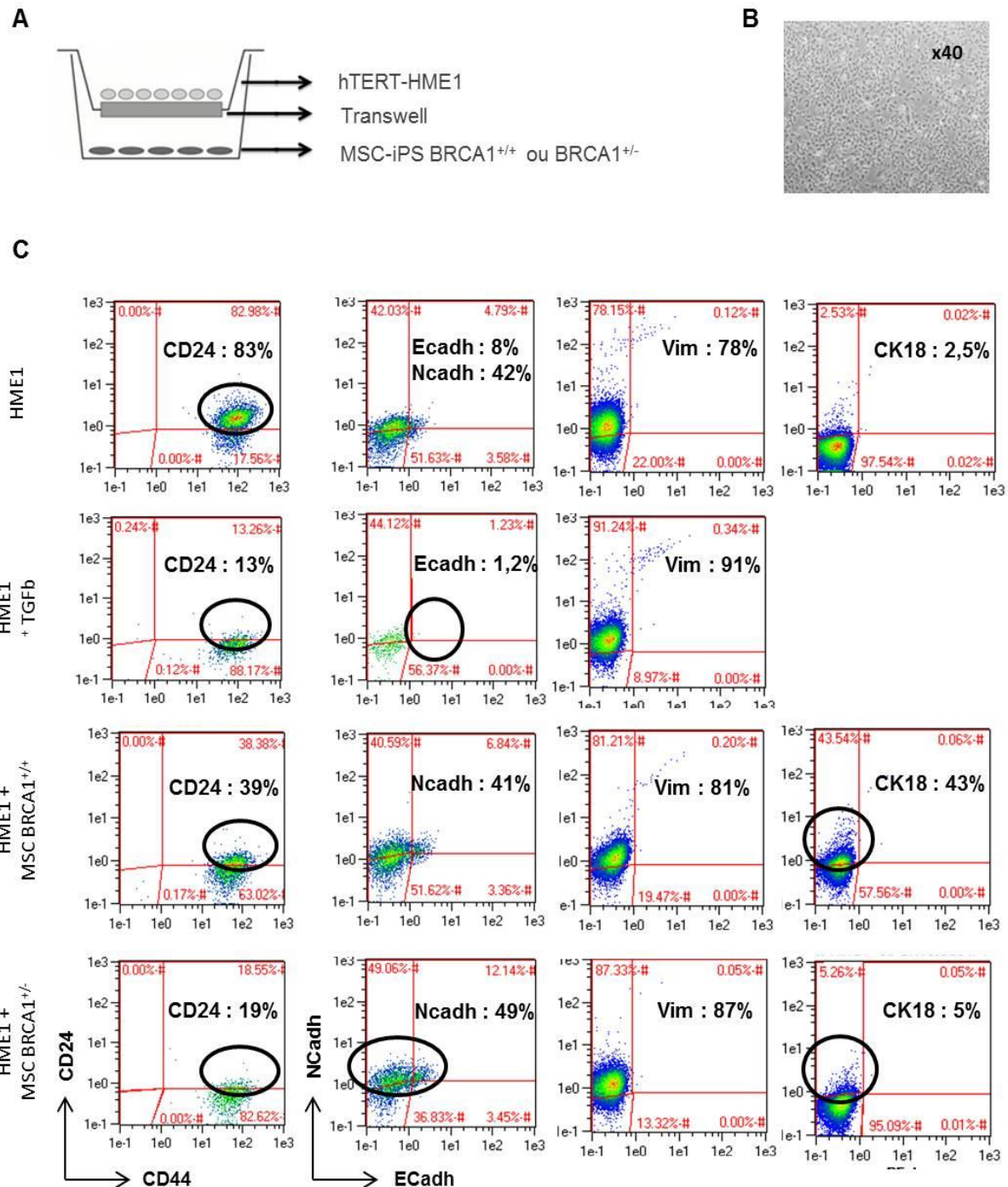


Figure 29 : Modèle d'étude et analyse des marqueurs de surface de la TEM et de la *stemness* sur des cellules épithéliales mammaires.

(A) : Modèle de co-culture avec *transwell*, (B) : Morphologie des cellules épithéliales mammaires hTERT-HME1, (C) : Analyse de marqueurs de la TEM et de cellules épithéliales immatures « basal-like ».

Dans un second temps, nous avons étudié l'effet des MSCs sur ces mêmes cellules épithéliales mammaires. Concernant la TEM, les MSCs BRCA1^{+/-} entraînent une légère augmentation de l'expression de la N-cadhérine (marqueur

mésenchymateux) qui passe de 42% en condition normale à 49%. Son expression basale n'est pas modifiée avec les MSCs BRCA1^{+/+}. L'autre marqueur mésenchymateux, la vimentine voit son expression augmenter très légèrement avec les MSCs BRCA1^{+/+} mais cette augmentation est plus marquée avec les MSCs BRCA1^{+/-} (78% vs 87%). L'expression de la vimentine avec le stroma BRCA1-muté se retrouve à un niveau similaire de celle avec le TGFβ1 (**Figure 29 C**). La présence d'un stroma muté entraîne donc une légère augmentation des marqueurs mésenchymateux et de la TEM.

En ce qui concerne les caractéristiques des cellules souches cancéreuses, on observe une diminution de l'expression du CD24 avec les deux stromas. L'expression passe de 83% en condition normale à 39% avec les MSCs BRCA1^{+/+} et à 19% avec les MSCs BRCA1^{+/-}. La présence d'un stroma semble favoriser la population des cellules souches cancéreuses, cette tendance étant accentuée avec le stroma BRCA1-muté. Enfin, l'expression de la cytokératine 8 est diminuée avec les MSCs BRCA1^{+/-} en comparaison avec les MSCs BRCA1^{+/+}. Cette cytokératine étant associée à un caractère luminal, sa diminution pourrait conduire à l'induction d'un caractère basal que l'on retrouve principalement dans les cancers agressifs.

Ces résultats nous permettent de dire que les MSCs BRCA1^{+/-} favorisent le processus de TEM dans des cellules épithéliales mammaires, l'acquisition d'un caractère souche cancéreux (*stemness*) et d'un caractère non luminal. Ces changements sont donc favorables à une initiation de la transformation tumorale et pourraient en partie contribuer à la survenue de cancers chez des patients présentant une mutation de *BRCA1*. La co-culture s'étant réalisée sans contact entre les deux types cellulaires, nous posons alors la question d'un possible effet paracrine des MSCs sur les cellules épithéliales mammaires.

Les conséquences moléculaires dans les cellules épithéliales mammaires en présence des facteurs générés par les MSCs lors de la co-culture en *transwell* ont été étudiées à travers une étude du transcriptome pour explorer de potentielles voies de signalisation impliquées dans l'initiation tumorale. Nous avons relevé 186 éléments surexprimés dans les cellules épithéliales mammaires cocultivées avec les MSCs BRCA1^{+/-} (**Figure 30 A**). On observe un cluster central entre la condition

contrôle et la co-culture avec les MSCs BRCA1^{+/+} ce qui signifie que les deux conditions sont proches. Après un enrichissement fonctionnel (Reactome et KEGG), la voie de signalisation Sonic Hedgehog est apparue comme l'un des acteurs des changements observés (**Figure 30 B**).

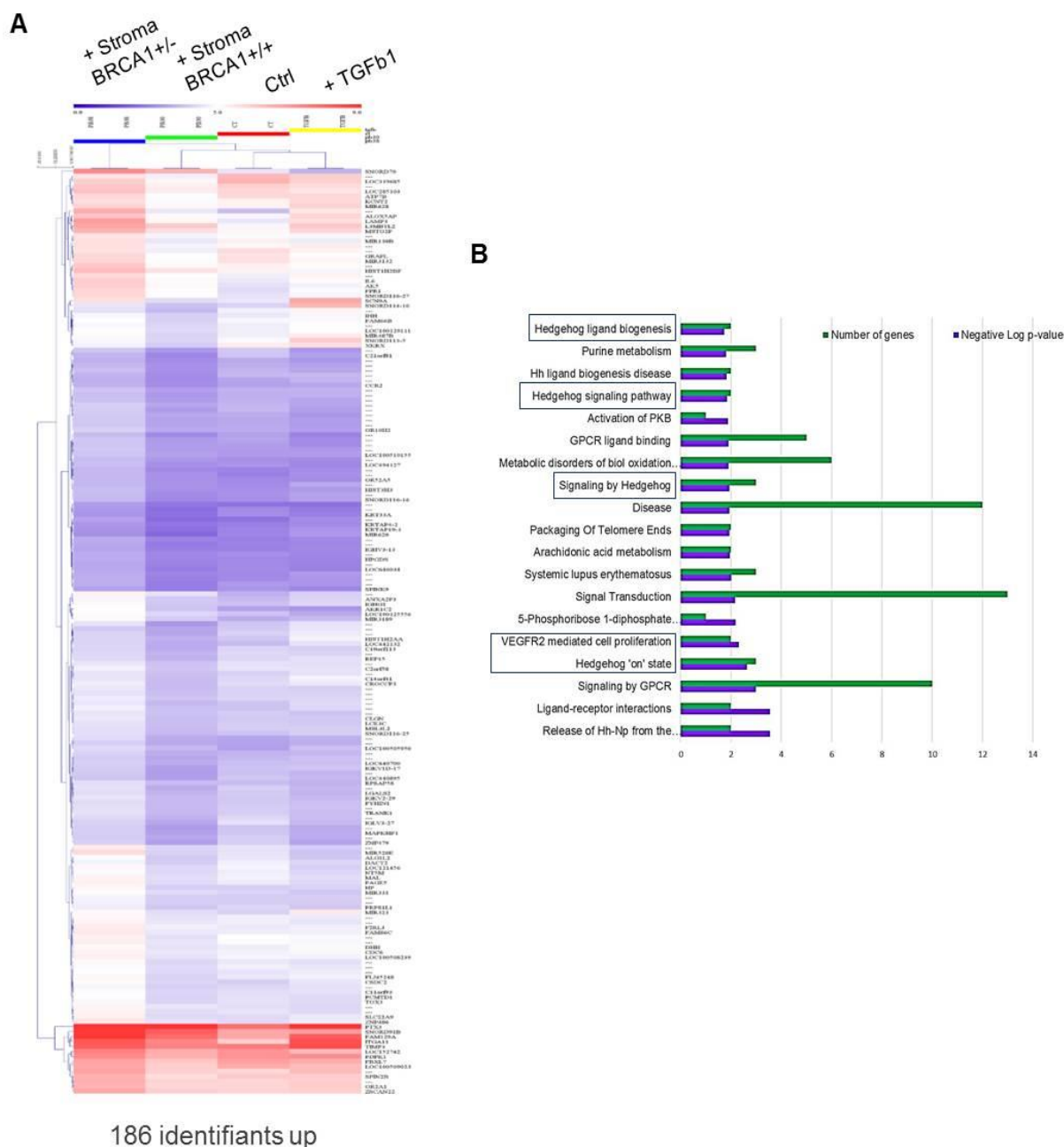


Figure 30 : Signature moléculaire des cellules épithéliales mammaires après co-culture avec les MSCs.

(A) : Heatmaps des gènes dérégulés dans les cellules épithéliales mammaires.
(B) : Histogrammes des enrichissements fonctionnels positifs des voies de signalisation.

L'étude du transcriptome nous a orientés sur la voie de signalisation Sonic Hedgehog et sur la migration. En effet, il a été montré que la voie Sonic Hedgehog était activée anormalement dans certains types de cancers. Elle participe à l'initiation et la progression tumorale en stimulant la prolifération et la migration, en favorisant le processus de TEM et en induisant la *stemness*. En lien avec les cancers du sein triple négatifs, son activation est corrélée avec un diagnostic jeune, une forte prolifération, une taille de tumeur élevée, de l'invasion, des métastases et un mauvais pronostic. L'un des inhibiteurs de cette voie de signalisation est la metformine, utilisée en clinique chez les patients diabétiques et à l'étude dans les cancers du sein.

Afin d'explorer la possible implication de la voie Sonic Hedgehog, nous avons réalisé un test de blessure sur les cellules épithéliales mammaires avec et sans metformine. Les résultats obtenus nous ont permis de montrer que le milieu conditionné des MSCs favorise la migration des cellules épithéliales mammaires et donc la fermeture de la brèche. Cette migration est plus rapide avec le milieu conditionné des MSCs BRCA1^{+/-}. A T10h, la surface restante de la blessure par rapport à sa valeur initiale est significativement plus faible avec les milieux conditionnés des deux MSCs, la différence étant plus marquée avec les MSCs BRCA1^{+/-} (**Figure 31 A et C**). A T24h, la brèche est très difficilement observable, voire entièrement refermée selon les zones pour les conditions avec milieu conditionné. Lorsque l'on ajoute de la metformine, la migration des cellules épithéliales mammaires est ralentie dans toutes les conditions, même si elle reste plus importante avec le milieu conditionné des MSCs BRCA1^{+/-} (**Figure 31 B et D**). Ceci nous indique que la voie Sonic Hedgehog est probablement impliquée dans ce phénomène de migration. A T24h, les brèches sont encore distinctes, contrairement à la condition sans metformine. La surface reste plus faible avec le milieu conditionné des MSCs BRCA1^{+/-}. Le milieu conditionné des MSCs BRCA1^{+/-} accélère donc la migration des cellules épithéliales mammaires en présence d'un inhibiteur de la voie Sonic Hedgehog.

Ces résultats indiquent que les MSCs semblent moduler la voie Sonic Hedgehog. Il sera important de compléter ce travail par une étude pharmacologique

à l'aide d'autres inhibiteurs ou bien de shRNA de SHH pour approfondir le rôle de cette voie de signalisation dans les étapes d'initiation et de progression tumorale.

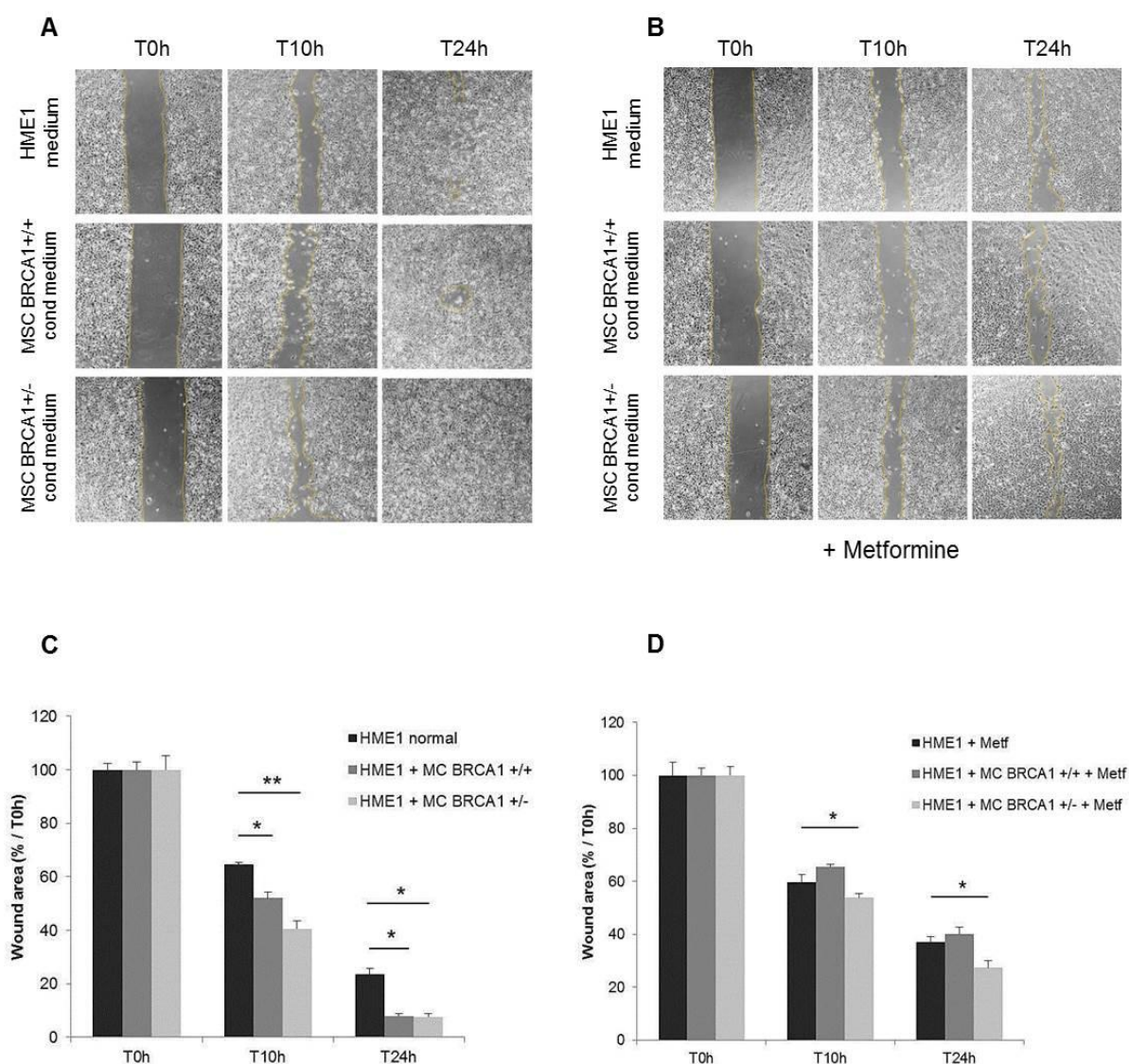


Figure 31 : Le milieu conditionné favorise la migration des cellules épithéliales mammaires avec et sans inhibiteur de la voie Sonic Hedgehog.

(A et B) : Photographies à T0h, T10h et T24h de la fermeture de la blessure sans (A) ou avec (B) metformine dans le milieu. (C et D) : Surface de la blessure, exprimée en pourcentage par rapport au temps T0h en condition sans (C) ou avec (D) metformine.

C. Résultats complémentaires 2 : mise en place d'un modèle de culture cellulaire 3D et génération d'organoïdes

Dans le but de reproduire des conditions plus physiologiques, les chercheurs de l'unité mettent en place des protocoles de génération d'organoïdes *in vitro* auxquels j'ai participé pour les cellules épithéliales mammaires. L'optimisation du protocole a été réalisée avec les cellules épithéliales normales hTERT-HME1 qui sont mélangées à une matrice de collagène mise en suspension dans du milieu de culture (**Figure 32 A**). Après environ 21 jours, on observe des structures 3D (**Figure 32 B**) avec une distinction nette des populations luminales et basales qui s'orientent différemment au sein de cette structure 3D (**Figure 32 C**).

Nous avons utilisé ce modèle pour réaliser des co-cultures entre les cellules épithéliales mammaires et les MSCs. Afin de distinguer les deux types cellulaires, nous avons d'abord généré une lignée hTERT-HME1-Luc-GFP. Les MSCs et les hTERT-HME1-Luc-GFP ont été co-cultivées en même temps dans la matrice de collagène à un ratio (3:1). Nous avons observé la formation d'organoïdes dans toutes les conditions, excepté celle des MSCs seules (**Figure 32 D**). Nous montrons également que la transfection des hTERT-HME1 permet de visualiser la GFP dans la matrice et de distinguer les deux types cellulaires (**Figure 32 E**). Les premiers résultats obtenus n'ont pas permis d'observer de différence significative en terme de vitesse de croissance, de taille finale et de structure entre les organoïdes formés à partir de hTERT-HME1 seules et ceux formés en présence de MSCs. Cependant des mises au point restent nécessaires, notamment en ce qui concerne le nombre initial de cellules et le temps auquel elles sont ajoutées. En effet, bien que mises en même temps, les contacts entre les MSCs et les cellules mammaires restent peu nombreux. Enfin l'extraction des organoïdes reste un problème technique, notamment si l'on souhaite passer à des analyses moléculaires. Il faut également noter qu'avec le temps et les tensions exercées par les cellules, la matrice se replie et se dégrade, rendant l'observation et l'extraction plus délicates.

La mise en place de ce modèle 3D va se poursuivre au sein de l'unité, dans le but de parvenir à une caractérisation fonctionnelle et architecturale des cellules épithéliales mammaires luminales versus basal-like et d'étudier l'effet des MSCs sur

le développement des organoïdes ainsi générés. Nous pourrions également envisager la réalisation de tests de criblage de molécules.

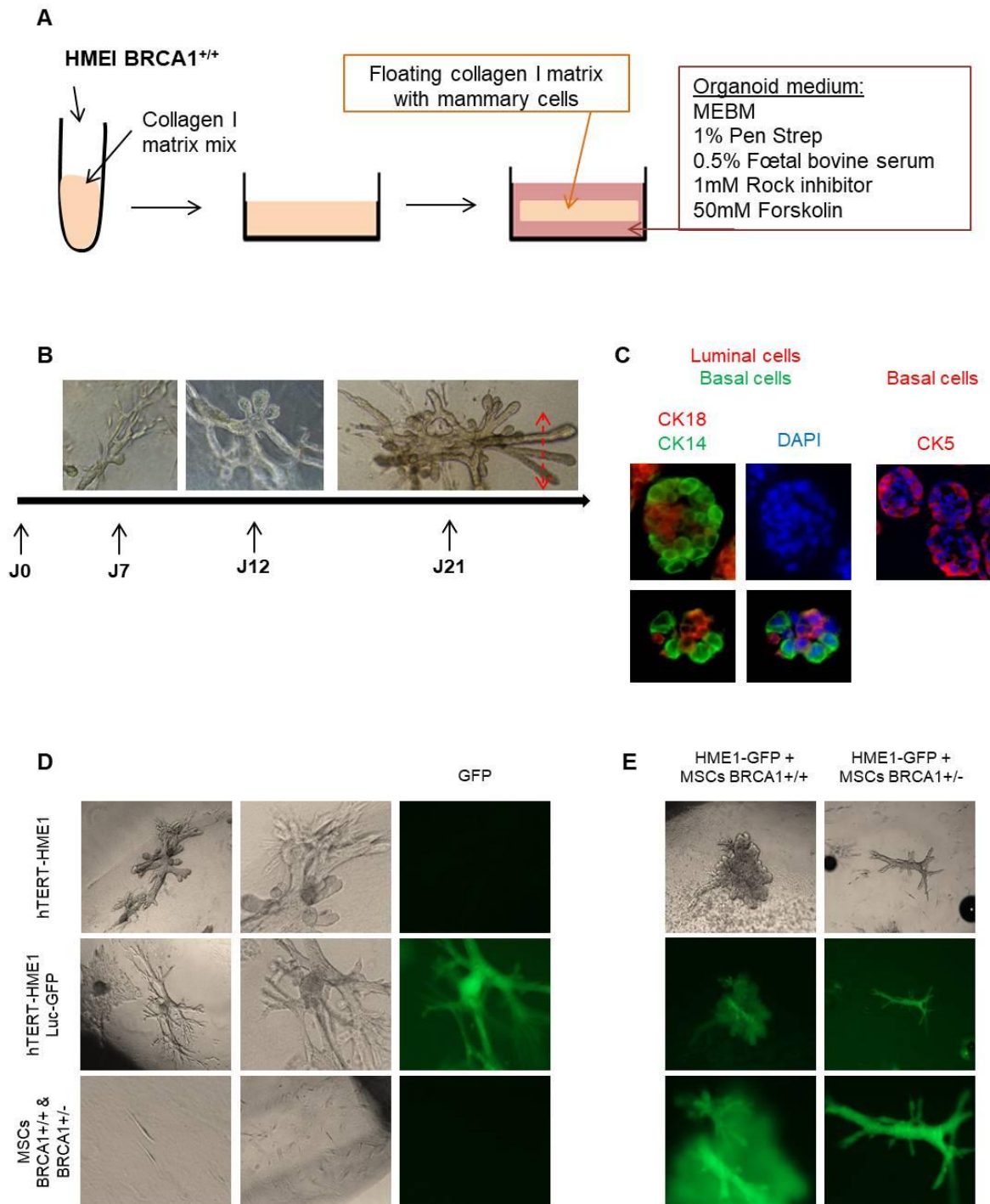


Figure 32 : Modèle de culture 3D et génération d'organoïdes.

(A) : Schéma de culture des organoïdes. (B) : Photographies du développement des organoïdes à J7, J12 et J21. (C) : Immunofluorescence sur des coupes d'organoïdes révélant les populations luminales et basales. (D et E) : Photographies d'organoïdes obtenus après culture seule (D) ou coculture (E).

Discussion - Perspectives

Le cancer du sein représente un enjeu majeur de santé publique. En France, il s'agit du premier cancer féminin en termes d'incidence et de mortalité. Certaines formes héréditaires sont associées à une mutation hétérozygote du gène *BRCA1*. Ce travail avait pour principal objectif d'étudier l'influence du stroma sur les étapes précoces du développement tumoral ainsi que sur le processus métastatique. Plus précisément, c'est l'impact d'une mutation hétérozygote sur le gène de prédisposition *BRCA1* qui a été évalué à travers l'utilisation de MSCs *BRCA1*-muté comme stroma tumoral.

La présence d'une mutation sur le gène *BRCA1* a déjà été associée à plusieurs phénomènes amenant des conditions propices au développement d'une tumeur. Compte tenu de son rôle dans la réparation de l'ADN, une mutation de *BRCA1* peut avoir comme conséquences des défauts de réparation et par la suite une accumulation de mutations, conférant à la cellule des propriétés pro-tumorales. Cette mutation étant germinale, elle se retrouve dans toutes les cellules de l'organisme. Les conséquences touchent donc à la fois les cellules épithéliales mammaires à l'origine des cellules cancéreuses mais également les autres types cellulaires du tissu mammaire qui composent le microenvironnement. Dans un contexte *BRCA1*-muté, ce microenvironnement a notamment montré des modifications métaboliques qui supportent la croissance tumorale. La perte de *BRCA1* entraîne la génération de ROS qui induisent un stress oxydatif dans le stroma et un passage à un métabolisme oxydatif. Cette perte entraîne également une augmentation de marqueurs de l'autophagie, de l'expression d'HIF-1 α et de la production de corps cétoniques. Dans ces conditions, le stroma *BRCA1*-muté fournit alors de l'énergie utilisée par les cellules cancéreuses et favorise ainsi leur croissance [156,157].

Parmi ce microenvironnement tumoral, nous nous sommes intéressés aux MSCs. Celles-ci ont démontré des capacités à promouvoir l'initiation tumorale et les métastases via l'expression de miRNA, la sécrétion de chimiokines ou bien d'enzymes. En induisant l'expression du miR-199a dans des cellules mammaires malignes, les MSCs leur apportent des caractéristiques de cellules souches

cancéreuses qui participent aux promotions tumorale et métastatique [160]. En stimulant la production de LOX par les cellules cancéreuses, les MSCs augmentent la formation de métastases pulmonaires et osseuses et contribuent à déclencher une TEM via la transcription de Twist [155]. Le signal des MSCs peut également être émis en réponse aux cellules cancéreuses. C'est le cas de la chimiokine CCL5 dont la sécrétion par les MSCs est stimulée par les cellules malignes et qui augmente leur mobilité et leurs capacités invasives [110]. Nous avons également porté notre attention sur une protéine spécifique de la MEC, la périostine. Dans un contexte de cancer du sein, son expression a non seulement été corrélée à la formation de métastases d'un point de vue expérimental [148,149] et clinique [154], mais une étude a en plus suggéré un lien avec une mutation de *BRCA1* [151]. Enfin, elle a montré une capacité à stimuler l'angiogenèse qui est un acteur majeur de la croissance et de la dissémination tumorales. Le processus d'angiogenèse intervient en effet très tôt dans le développement de la masse tumorale. De nombreux signaux y contribuent, en particulier l'hypoxie médiée par HIF-1 α . Ces signaux proviennent des cellules cancéreuses elles-mêmes mais également des cellules qui composent le microenvironnement tumoral, comme les CAFs, les MSCs ou les adipocytes [291].

Nous avons montré que les MSCs pouvaient être impliquées dans l'initiation et la stimulation du processus de TEM, lui-même fortement associé à l'acquisition de caractéristiques de cellules souches et d'un phénotype propice à la migration. Nous savons également que la POSTN participe à la tumorigenèse. Enfin nous avons souligné la contribution des cellules stromales dans l'initiation et la poursuite du processus d'angiogenèse. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'association d'une mutation sur *BRCA1* et la présence d'un stroma modélisé par des MSCs pouvait avoir une influence sur l'initiation du processus tumoral et sa progression. Les MSCs *BRCA1*-muté pourraient notamment initier plus précocement la transformation tumorale des cellules mammaires et accélérer le phénomène, conduisant à une dissémination métastatique plus agressive. Notre modèle d'étude s'est basé sur l'obtention de MSCs ayant une mutation sur le gène *BRCA1* via la technologie des iPSCs qui a permis la reprogrammation de cellules de patientes porteuses de cette mutation.

Nos travaux ont permis de mettre en évidence l'implication des MSCs dans le processus d'angiogenèse dans un modèle de cancer du sein BRCA1-muté. Les MSCs BRCA1^{+/-} expriment d'un point de vue protéique une quantité plus importante du facteur pro-angiogénique HIF-1 α après des cultures réalisées en normoxie et en hypoxie par comparaison avec des MSCs BRCA1^{+/+}. La surexpression de certains facteurs relatifs à l'angiogenèse et inductibles par HIF-1 α a été observée par la suite dans ces MSCs BRCA1^{+/-}. L'ajout de milieu conditionné issu des deux types de MSCs sur des cellules endothéliales (HUVEC) et la formation de *plugs in vivo* ont confirmé ce caractère pro-angiogénique des MSCs BRCA1-muté. En effet, le milieu conditionné des MSCs BRCA1^{+/-} favorise la formation de branches dans les structures tubulaires formées sur Matrigel. *In vivo*, les MSCs BRCA1^{+/-} injectées avec des progéniteurs endothéliaux ont permis la formation de structures vasculaires que l'on n'observait pas avec des MSCs WT.

L'expression de la périostine, protéine matricielle, est plus élevée (protéine et surnageant) dans les MSCs BRCA1^{+/-}, suggérant des propriétés adhésives et / ou migratoires différentes par rapport aux MSCs BRCA1^{+/+}. Un test de migration a confirmé cette hypothèse, montrant que les MSCs BRCA1-muté migraient plus rapidement que les MSCs WT. Ces capacités migratoires supérieures sont d'ailleurs conservées après transfection des MSCs avec un ARN interférant dirigé contre la périostine.

Enfin les MSCs BRCA1^{+/-} sont capables d'augmenter le caractère agressif de cellules mammaires malignes (4T1). Dans un modèle murin, nous avons injecté une lignée mammaire murine mimant un cancer de type triple négatif avec nos MSCs. Le groupe ayant reçu les 4T1 plus les MSCs BRCA1^{+/-} présentait des volumes tumoraux supérieurs aux groupes ayant reçu les 4T1 seules ou avec les MSCs WT. Les MSCs BRCA1-muté ont donc favorisé la croissance tumorale mais également la colonisation métastatique au niveau du poumon. L'analyse des tumeurs a permis la détection de POSTN et a montré une augmentation de l'angiogenèse dans les tissus provenant du groupe 4T1 + MSCs BRCA1^{+/-}.

Nos résultats montrent que les MSCs BRCA1-muté induisent des modifications du microenvironnement tumoral qui permettent de promouvoir l'angiogenèse tumorale et la dissémination des cellules malignes.

Le profil transcriptomique des MSCs révèle une signature pro-angiogénique particulière. Cependant, il aurait été intéressant de réaliser cette analyse sur d'autres échantillons, comme les iPSCs à l'origine des MSCs afin de voir si cette signature est présente dans la cellule d'origine avant la différenciation. La comparaison avec des MSCs issues d'autres sources ou à des passages différents aurait également pu apporter des précisions quant à la spécificité du profil observé. De même, afin de relier nos résultats avec les données cliniques, il aurait été intéressant de disposer d'échantillons (biopsies de la tumeur voire des métastases, séra) de patients porteurs de la mutation étudiée et d'analyser l'expression de la POSTN. En effet, comme l'étude de B. Quaresima l'a évoqué, l'expression de la POSTN est augmentée dans des cellules transfectées par une séquence mutée de *BRCA1* et ces données ont été confirmées dans les tumeurs mammaires et les séra des patients portant cette mutation [151].

La POSTN pourrait par ailleurs être considérée comme un marqueur biologique pronostique en évaluant sa présence dans le stroma tumoral après une biopsie ou bien en détectant sa forme circulante. Un autre aspect pronostic peut être considéré. En effet, la POSTN est un facteur lié à la régénération de l'os et nous savons que les cancers du sein présentent généralement des métastases osseuses. La formation de ces métastases pourrait peut-être être décelée grâce à l'analyse de la POSTN et permettre la mise en place d'un traitement préventif. En plus d'être utilisée comme marqueur biologique, la POSTN pourrait également servir de cible pour un traitement, avec un anticorps monoclonal directement dirigé contre elle par exemple. La société Tanox, rachetée en 2007 par Genentech a développé le lebrikizumab, un anticorps monoclonal humanisé qui bloque l'IL-13. Cette cytokine est notamment responsable de l'inflammation des voies aériennes chez certains patients asthmatiques et est capable de stimuler l'expression de la POSTN. Des essais sont actuellement en cours dans l'asthme, la BPCO, la dermatite atopique et la fibrose pulmonaire. L'utilisation du lebrikizumab pourrait être envisagée dans le but de bloquer la POSTN et ses effets pro-tumorigènes.

Lors du test de tubulogenèse, nous avons cultivé des HUVEC qui est une lignée classiquement utilisée et représentative des cellules endothéliales. Il pourrait être intéressant d'avoir des cellules endothéliales issues d'une glande mammaire normale et issues d'une tumeur. Cela permettrait d'avoir une idée plus précise de l'impact de la mutation *BRCA1* sur les cellules endothéliales en ce qui concerne l'angiogenèse pour le cancer du sein. Cependant, l'obtention de cellules endothéliales nécessite l'accès à une grande quantité de tissu afin de récupérer un nombre suffisant de cellules. De plus, les cultures primaires ont un potentiel de prolifération limité, ce qui suggère d'obtenir du tissu mammaire et d'isoler les cellules endothéliales pour chaque expérience, bien que ceci introduise un biais compte tenu de l'origine variable des biopsies. Les cellules endothéliales issues de tumeurs peuvent porter des anomalies génétiques présentes dans les cellules malignes. Dans notre cas, il y a d'une part la mutation *BRCA1* présente dans toutes les cellules de l'organisme qu'il serait intéressant de comparer avec des tumeurs non *BRCA1*. D'autre part les cellules malignes accumulent souvent plusieurs anomalies que l'on peut retrouver dans les cellules endothéliales [292,293]. Ces éléments contribuent à la variabilité expérimentale, qu'il ne faut pas négliger lors de l'analyse des résultats.

Au cours de ce travail, nous avons également démontré que les MSCs *BRCA1*^{+/-} induisent une augmentation des marqueurs mésenchymateux dans des cellules épithéliales mammaires immortalisées et l'acquisition d'un caractère souche cancéreux (CD24^{Low} / CD44^{High}). Ces résultats semblent indiquer que la mutation de *BRCA1* dans des MSCs favorise leurs propriétés pro-tumorales. Les analyses suivantes nous ont orientés sur la voie de signalisation Sonic Hedgehog, liée à la migration cellulaire, que nous avons testée sur les cellules épithéliales mammaires immortalisées en présence de milieu conditionné de MSCs. Nous avons observé que le milieu conditionné des MSCs *BRCA1*^{+/-} entraîne une migration plus rapide des cellules épithéliales mammaires. Cette tendance était similaire en présence d'un inhibiteur (metformine) de la voie SHH, confirmant l'effet pro-tumoral des MSCs *BRCA1*-muté.

Afin de compléter ces résultats, la confirmation de l'implication de la voie SHH reste nécessaire et l'utilisation d'autres inhibiteurs ou bien d'un shRNA serait intéressante afin de valider et d'étudier plus en détails le rôle de cette voie. En ce qui

concerne le processus de TEM, nos analyses ont été réalisées après une co-culture en *transwell*. Or nous avons évoqué que le contact cellule-cellule pouvait être important voire nécessaire pour l'initiation de certains phénomènes [160,192]. Il apparaît donc pertinent de poursuivre les études en réalisant une co-culture directe, notamment avec la lignée hTERT-HME1-Luc-GFP qui permettrait de séparer les deux types cellulaires en fin d'expérience. Les cellules pourraient alors être analysées pour leurs marqueurs et un transcriptome apporterait des informations complémentaires à celles de la co-culture sans contact. Le différentiel entre ces deux conditions pourrait mettre en avant certaines voies de signalisation impliquées dans des phénomènes pro-tumorigènes. Une autre limite de ce travail réside dans le fait que la lignée épithéliale mammaire ne comporte pas de mutation pour *BRCA1*. Or, en cas de mutation germinale, l'ensemble des cellules possède cette mutation. Une amélioration de ce modèle pourrait donc passer par l'ajout d'une mutation dans les cellules épithéliales mammaires.

Récemment, des travaux ont souligné l'impact d'une haploinsuffisance de *BRCA1* sur les statuts d'expression de RANK (*Receptor Activator of Nuclear factor KappaB*) et de son ligand RANKL dans des tissus pré-tumoraux, qui comportent des cellules initiatrices du cancer répondeuses à RANKL. Ils ont montré que dans les cellules *BRCA1*^{+/-}, l'expression de RANKL était régulée à la hausse, tandis que celle de RANK n'était pas altérée. Cette haploinsuffisance a donc pour conséquence une activation autonome de l'expression de RANKL. Or en activant NF-κB, la voie RANKL / RANK va promouvoir l'expansion et la maintenance d'une population de cellules cancéreuses aux propriétés souches, mais également la migration cellulaire, l'invasion et les métastases via l'induction de la TEM dans les cellules cancéreuses. En revanche, en augmentant l'expression de RANKL, l'haploinsuffisance de *BRCA1* rend les cellules initiatrices du cancer plus sensibles au dénosumab qui est un anticorps monoclonal humanisé se fixant sur RANKL et l'inactivant. En effet, le dénosumab neutralise RANKL et bloque la survie et la prolifération des cellules *BRCA1*^{+/-} sous forme de mammosphères, état associé aux cellules souches cancéreuses [294]. Des résultats similaires ont été obtenus en présence d'amplificateurs de l'état souche cancéreux comme le phénomène de TEM ou l'activation d'HER2. En combinant le dénosumab à un traitement par la metformine, on observe une synergie quant à la diminution de la population de cellules initiatrices

du cancer et leurs capacités d'autorenouvellement dans des cellules cancéreuses de type basal et *BRCA1*^{+/-}. En effet, la metformine semble réduire l'expression de RANKL, rendant les cellules *BRCA1*-muté plus sensibles à l'action du dénosumab. Nous pouvons rappeler que la metformine a déjà été associée à une diminution de l'incidence et de la mortalité des cancers, notamment dans le sein. La combinaison dénosumab / metformine est donc une stratégie à l'étude dans la prévention et le traitement des tumeurs mammaires associées à *BRCA1* et RANKL [295]. Ces travaux ont permis l'identification d'une voie de signalisation qui peut être ciblée dans la population des cellules à l'origine du développement des tumeurs de type basal chez les porteurs d'une mutation de *BRCA1*. Le blocage de RANKL est donc une stratégie prometteuse dans la prévention des cancers du sein associés à une mutation de *BRCA1* [296].

Une étude récente s'est intéressée au lien entre les mutations de *BRCA1/2* et l'hypothèse de la géroncogenèse. Cette hypothèse postule que la diminution du métabolisme cellulaire normal, qui se produit naturellement avec le vieillissement, apporte une prédisposition aux tissus normaux pour le développement d'un cancer. Les auteurs proposent l'idée selon laquelle des mutations sur les gènes *BRCA1/2* pourraient accélérer ce phénomène dans les épithéliums mammaires et ovariens. Ils suggèrent ainsi que l'haploinsuffisance de *BRCA1/2* est suffisante pour produire des changements métaboliques chroniques et spécifiques d'un type cellulaire (épithélium). Ces changements aboutiraient à un état métabolique permissif et compatible avec l'instabilité génomique présente dans ces épithéliums. Ils ont aussi montré que cet avantage métabolique pouvait être supprimé en pré-traitant des cellules porteuses d'une mutation de *BRCA1* (185delAG) avec de la metformine [297]. Ces données montrent qu'un style de vie « métaboliquement sain » et que l'utilisation de molécules anti-métaboliques pour stopper ou reverser la reprogrammation métabolique induite par l'haploinsuffisance de *BRCA1/2* pourrait être une nouvelle stratégie de prévention et de traitement pour les patients porteurs d'une mutation germinale.

L'un des intérêts majeurs des iPSCs est la conservation des propriétés génétiques et épigénétiques de la cellule d'origine. Ces cellules permettent ainsi de modéliser des pathologies en lien avec une ou plusieurs anomalies génétiques,

comme certains syndromes spécifiques ou les cancers de manière plus générale. C'est le cas du syndrome de Li-Fraumeni, causé par la présence d'une mutation germinale de *TP53* et conférant une prédisposition à plusieurs types de cancers (ostéosarcomes, sarcomes des tissus mous, cancers du sein, tumeurs cérébrales, leucémies). Cette pathologie héréditaire a été modélisée grâce à la technologie des iPSCs et a permis d'étudier le rôle de la mutation de *TP53* dans le développement d'un ostéosarcome [298]. A partir de fibroblastes prélevés chez le patient, des iPSCs ont été générées et différenciées en ostéoblastes. Les ostéoblastes obtenus présentaient des caractéristiques d'ostéosarcome, telle qu'une différenciation ostéoblastique déficiente, une capacité à former des tumeurs et un profil d'expression génique similaire. Un autre exemple a consisté à générer des iPSCs à partir d'un adénocarcinome du pancréas présentant une mutation de *KRAS*. Une fois injectées chez la souris, ces cellules formaient des tératomes dont certaines zones progressaient ensuite vers des lésions invasives. L'analyse protéomique de ces zones a confirmé la proximité entre ces cellules et celles d'adénocarcinome de pancréas observées en clinique [299]. Ce modèle a donc permis d'étudier la progression de cette maladie et plus spécifiquement les étapes précoces en lien avec une mutation de *KRAS*. Enfin, nous pouvons également citer la génération par le laboratoire de plusieurs lignées d'iPSCs portant une mutation sur un oncogène et prédisposant au cancer. Plusieurs travaux ont ainsi été menés sur des lignées mutées sur le gène *RET* pour la modélisation de néoplasies endocriniennes de type 2 [300] ou sur le gène *BCR-ABL* pour la leucémie myéloïde chronique [301]. Il faut également souligner que la reprogrammation de cellules cancéreuses comportant des mutations sur des gènes suppresseurs de tumeur (*TP53*, *RB*, *PTEN*) est difficile, probablement à cause des modifications oncogéniques et épigénétiques, de l'accumulation de dommages de l'ADN et de l'induction de la sénescence au cours de la reprogrammation [302].

En ce qui concerne le gène *BRCA1*, une seule étude antérieure à la nôtre rapporte la génération de plusieurs iPSCs *BRCA1*-muté. Ces iPSCs ont été obtenues à partir de biopsies cutanées de plusieurs membres d'une même famille sur trois générations, porteurs ou non d'une mutation de *BRCA1*. Les analyses ont montré que l'expression des allèles muté et sauvage était maintenue de manière équivalente dans les fibroblastes, les iPSCs et les tératomes générés. Aucune

différence n'a été observée dans les capacités de différenciation entre les iPSCs normales et mutées mais une augmentation de l'expression de PKC-theta dans les iPSCs mutées a été mise en évidence. Une expression élevée de cette protéine avait déjà été observée dans des lignées cancéreuses mammaires mutées pour *BRCA1* [303].

L'obtention de tissu mammaire, tout comme les biopsies de moelle osseuse restent difficile, principalement dans le but d'en extraire des MSCs. C'est pourquoi la différenciation à partir d'iPSCs représente une source alternative de MSCs. Cette différenciation est d'autant plus intéressante qu'elle permet d'associer un génotype (mutation de *BRCA1*) à des observations phénotypiques sur ces cellules et d'étudier les conséquences de cette mutation sur le développement tumoral. Au cours de ce travail, nous nous sommes principalement intéressés aux effets des MSCs sur d'autres types cellulaires mais pas aux effets inverses. Les interactions entre le stroma et les cellules malignes sont multiples et bidirectionnelles. Il est donc probable que les cellules épithéliales mammaires, quel que soit leur stade d'engagement dans le processus de tumorigenèse, aient une influence sur les MSCs à proximité pouvant favoriser leur potentiel pro-tumoral. Il serait donc intéressant de réaliser un transcriptome des MSCs après une co-culture au contact ou non de la tumeur et de regarder les voies de signalisation modifiées.

Afin de compléter ces travaux, la poursuite d'études *in vivo* semble nécessaire. En effet, nous avons vu que les MSCs *BRCA1*^{+/-} favorisent le développement tumoral et le processus métastatique à partir de cellules mammaires murines ayant des caractéristiques de cancer du sein triple négatif. Nous pouvons nous demander quel serait l'effet de ces MSCs dans l'initiation (à l'aide de la lignée hTERT-HME1-Luc-GFP avec et sans mutation de *BRCA1*) et la progression tumorale (à l'aide de lignées tumorales humaines *BRCA1*^{+/+}, *BRCA1*^{+/-} et *BRCA1*^{-/-}). Ces modifications géniques par CRISPR/Cas9 sont en cours d'élaboration dans l'unité pour la poursuite de ce travail. Par ailleurs, l'unité développe des protocoles de différenciation épithéliale mammaire à partir des iPSCs dans le but d'obtenir une glande mammaire spécifique du génotype du patient. Cela reste encore un défi.

Dans le but de complexifier les modèles d'étude et de les rendre plus proches de la physiologie, nous pouvons envisager trois approches complémentaires.

Premièrement, la mise en place d'un système de culture 3D permet de dépasser les contraintes observées en 2D. Non seulement les cellules s'assemblent dans des conformations plus physiologiques qu'un simple tapis cellulaire mais elles développent également des interactions spécifiques qui participent à la structure du système et à sa fonctionnalité. C'est pourquoi plusieurs modèles ont été élaborés avec l'utilisation de matrices (collagène, hydrogels, capsules d'alginate, organe décellularisé...) ou la réalisation de cultures « en goutte » (*hanging drop*). Ces modèles laissent les cellules s'organiser dans l'espace avec moins de contraintes et établir des interactions se rapprochant des conditions réelles. Les organes (ou structures) partiellement reproduits, appelés organoïdes, permettent alors d'étudier la mise en place de la structure dans le temps et dans l'espace, les interactions entre les cellules et la réponse à des tests de criblage de molécules.

Deuxièmement, la plupart des microenvironnements tumoraux présentés sont le résultat de co-cultures limitées à deux types cellulaires (cellules cancéreuses et cellules stromales d'intérêt). Or nous savons que le microenvironnement tumoral est très hétérogène. C'est pourquoi, il serait intéressant de développer un modèle pluricellulaire de microenvironnement en combinant par exemple dans notre cas des cellules épithéliales mammaires, des MSCs, des fibroblastes, des cellules endothéliales, des adipocytes... On pourrait y associer une matrice dont la composition est proche de la MEC, afin de se rapprocher de la structure d'une glande mammaire. Des modèles de ce type ont récemment été publiés comme celui d'A. Amann qui combine une lignée de cancer pulmonaire, des fibroblastes et des cellules endothéliales [304] ou celui d'Y. Wang qui forme des sphéroïdes avec des cellules hépatiques malignes, des fibroblastes, des cellules endothéliales et de la MEC [305]. Néanmoins quelques difficultés résident dans la mise au point d'un tel modèle, comme la définition d'un milieu de culture qui convienne à l'ensemble des types cellulaires, la multiplicité des conditions d'étude pour comparer l'influence de chaque élément en fonction des autres, ou encore la variabilité induite par les sources cellulaires.

Nous pourrions à l'aide des iPSCs du génotype d'un patient obtenir la diversité des types cellulaires que l'on retrouve dans le stroma tumoral. Nous pourrions ainsi modéliser un microenvironnement multicellulaire BRCA1-muté avec des fibroblastes,

des cellules endothéliales et des adipocytes. Des co-cultures *in vitro* seraient envisageables pour étudier l'influence des différents éléments du stroma sur des cellules épithéliales mammaires et inversement l'influence de la tumeur sur les profils épigénétiques et moléculaires des cellules stromales. Par ailleurs, l'apport du stroma humain dans le développement et la réponse thérapeutique des nouvelles drogues sur les tumeurs humaines pourra être analysé à l'aide des modèles *in vivo* PDX (*Patient Derived Xenograft*) de cancer du sein muté ou non pour *BRCA1*.

Le développement des technologies de bioimpression et d'ingénierie tissulaire a apporté une autre dimension dans la modélisation et la construction de tissus et organes. Par exemple, la technique du *micropatterning* permet de diriger l'adhésion cellulaire sur une culture en 2D, de piloter la géométrie des cellules et d'organiser partiellement la structure. Les techniques de bioimpression permettent de déposer les différents éléments d'une structure couche par couche et de mieux contrôler l'environnement des cellules d'intérêt. Elles ont permis de mieux comprendre les relations forme – fonction : selon la disposition cellulaire, la prolifération, la différenciation, le caractère pluripotent ou les capacités de branchement peuvent être différentes. L'utilisation de ces techniques peut donc être un moyen de reproduire un microenvironnement tumoral et d'étudier les phénomènes de progression tumorale et de dissémination métastatique.

Les décès par cancer du sein sont rarement dus à la tumeur primaire, qui peut généralement être retirée par chirurgie et / ou traitée par chimiothérapie et radiothérapie. Nous avons pu constater avec notre modèle que le microenvironnement a un rôle prépondérant dans le développement tumoral et la dissémination métastatique dans les cancers de manière générale et dans le cancer du sein en particulier. C'est pourquoi la compréhension des mécanismes de dissémination et d'implantation des cellules tumorales dans le but de former des métastases représente un enjeu majeur dans la prévention et la prise en charge de la maladie.

Annexes

Annexe 1 : Classification TNM du cancer du sein, 7^e édition 2010, et stade UICC

Le système TNM distingue le stade clinique pré-thérapeutique, noté « cTNM », et le stade anatomopathologique post-chirurgical, noté « pTNM ».

Tumeur Primaire T

Tx : la tumeur primitive ne peut pas être évaluée

T0 : la tumeur primitive n'est pas palpable

- Tis : carcinome *in situ*
- Tis (DCIS) : carcinome canalaire *in situ*
- Tis (CLIS) : carcinome lobulaire *in situ*
- Tis (Paget) : maladie de Paget du mamelon sans tumeur sous-jacente
- N. B. La maladie de Paget associée à une tumeur est classée en fonction de la taille de la tumeur

T1 : tumeur ≤ 2 cm dans sa plus grande dimension

T1mic : micro-invasion ≤ 1 mm dans sa plus grande dimension

- T1b : $1 \text{ mm} < \text{tumeur} \leq 5 \text{ mm}$ dans sa plus grande dimension
- T1a : $5 \text{ mm} < \text{tumeur} \leq 1 \text{ cm}$ dans sa plus grande dimension
- T1c : $1 \text{ cm} < \text{tumeur} \leq 2 \text{ cm}$ dans sa plus grande dimension

T2 : $2 \text{ cm} < \text{tumeur} \leq 5 \text{ cm}$ dans sa plus grande dimension

T3 : tumeur $> 5 \text{ cm}$ dans sa plus grande dimension

T4 : tumeur, quelle que soit sa taille, avec une extension directe soit à la paroi thoracique (a), soit à la peau (b)

- T4a : extension à la paroi thoracique en excluant le muscle pectoral
- T4b : œdème (y compris peau d'orange) ou ulcération de la peau du sein, ou nodules de perméation situés sur la peau du même sein
- T4c : T4a + T4b
- T4d : cancer inflammatoire

Ganglions lymphatiques régionaux pN

Nx : l'envahissement des ganglions lymphatiques régionaux ne peut pas être évalué (par exemple déjà enlevés chirurgicalement ou non disponibles pour l'analyse anatomopathologique du fait de l'absence d'évidement)

N0 : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique et absence d'examen complémentaire à la recherche de cellules tumorales isolées

- N0 (i-) : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique, étude immunohistochimique négative (IHC)
- N0 (i+) : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique, IHC positive, avec des amas cellulaires $\leq 0,2$ mm (considéré comme sans métastase ganglionnaire)
- N0 (mol-) : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique, biologie moléculaire négative (RT-PCR : *reverse transcriptase polymerase chain reaction*)
- N0 (mol+) : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique, biologie moléculaire positive (RT-PCR)

N1mi : micrométastases $> 0,2$ mm et ≤ 2 mm

N1 : envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires ou/et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique

- N1a : envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires
- N1b : envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique
- N1c : envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique (pN1a + pN1b)

N2 : envahissement de 4 à 9 ganglions axillaires ou envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects, en l'absence d'envahissement ganglionnaire axillaire

- N2a : envahissement de 4 à 9 ganglions axillaires avec au moins un amas cellulaire > 2 mm
- N2b : envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects, en l'absence d'envahissement ganglionnaire axillaire

N3 : envahissement d'au moins 10 ganglions axillaires ou envahissement des ganglions sous-claviculaires (niveau III axillaire) ou envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects avec envahissement ganglionnaire axillaire ou envahissement de plus de 3 ganglions axillaires et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique ou envahissement des ganglions sus-claviculaires homolatéraux

- N3a : envahissement d'au moins 10 ganglions axillaires (avec au moins un amas cellulaire > 2 mm) ou envahissement des ganglions sous-claviculaires
- N3b : envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects avec envahissement ganglionnaire axillaire ou envahissement de plus de 3 ganglions axillaires et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique
- N3c : envahissement des ganglions sus-claviculaires homolatéraux

Métastases à distance (M)

Mx : renseignements insuffisants pour classer les métastases à distance

M0 : absence de métastases à distance

M1 : présence de métastase(s) à distance

Classification par stade UICC

0 Tis N0 M0

I T1 N0 M0

IIA T0 N1 M0 ; T1 N1 M0 ; T2 N0 M0

IIB T2 N1 M0 ; T3 N0 M0

IIIA T0 N2 M0 ; T1 N2 M0 ; T2 N2 M0 ; T3 N1 M0 ; T3 N2 M0

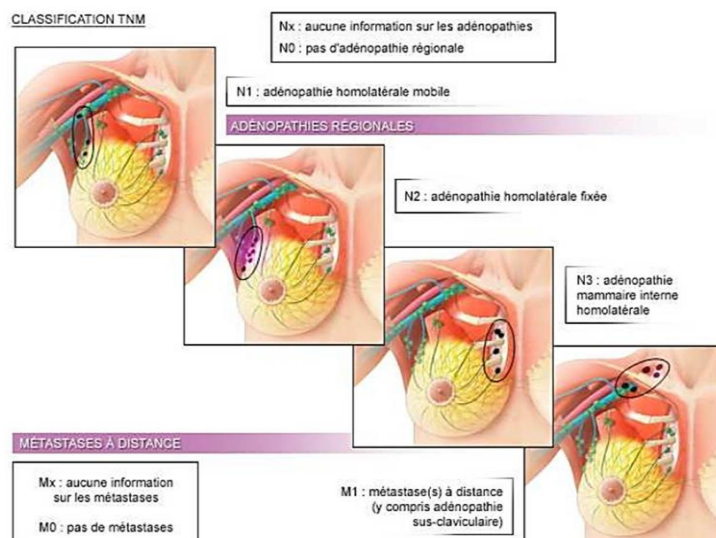
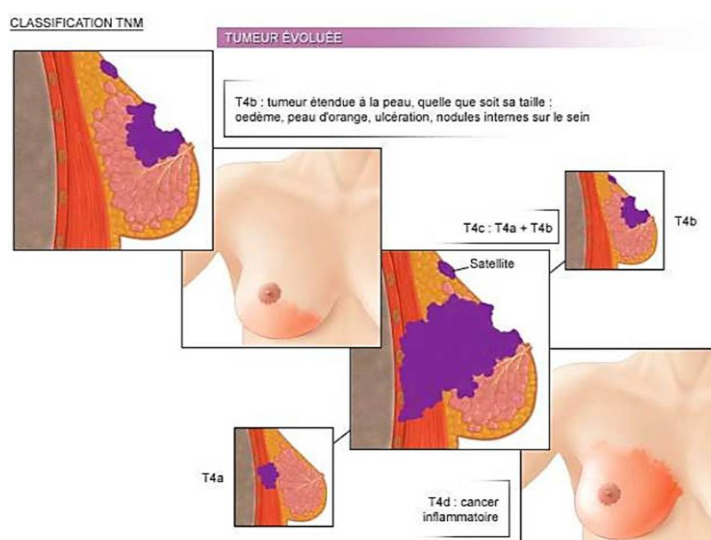
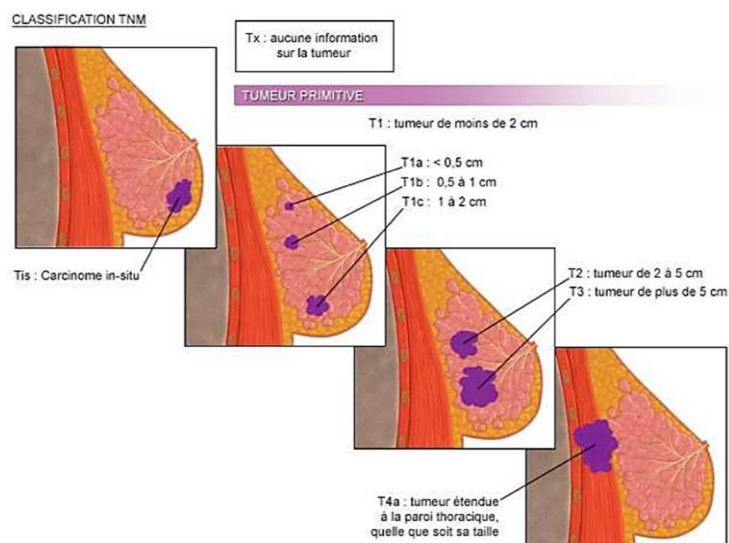
IIIB T4 N0 M0 ; T4 N1 M0 ; T4 N2 M0

IIIC Tous T N3 M0

IV Tous T Tous N M1

Annexe 2 : Classification TNM du cancer du sein illustrée

Adapté de Natom Images – Illustrations libres de droit sur l'anatomie et la santé – 2012



Annexe 3 : Description des marqueurs cellulaires testés

Marqueur	Description	Expression normale	Notes supplémentaires / Relations supposées avec le cancer
CD 24	Petite glycoprotéine de surface, de type mucine, impliquée dans l'adhésion cellulaire. Étant le ligand de la P-sélectine, elle assure l'adhésion des monocytes ou des neutrophiles aux cellules endothéliales activées ou aux plaquettes, les deux exprimant la P-sélectine.	Neuroblastes différenciés, la plupart des lymphocytes B.	Plusieurs études ont montré qu'une forte expression de CD24 est associée à une survie plus courte des patients dans différents cancers. Dans les tumeurs, sa capacité à se lier à la P-sélectine semble importante pour le potentiel métastatique en facilitant les interactions (cellules endothéliales et plaquettes). Elle a aussi été décrite comme un nouveau marqueur diagnostique de tumeur.
CD 31	Glycoprotéine transmembranaire (PECAM-1), elle participe à la médiation de l'adhésion cellule-cellule endothéliale et joue un rôle dans le contact endothélial avec les cellules environnantes (leucocytes, par exemple).	Cellules endothéliales et hématopoïétiques.	Les cellules endothéliales circulantes, qui se sont détachées des vaisseaux, possèdent ce marqueur et joueraient un rôle dans l'angiogenèse tumorale.
CD 34	Glycoprotéine transmembranaire appartenant à la famille des sialomucines. Sa fonction n'est pas encore clairement définie.	Cellules souches hématopoïétiques et cellules endothéliales des petits vaisseaux.	
CD 44	Glycoprotéine de surface et récepteur de l'acide hyaluronique, qui interagit avec d'autres ligands (collagènes, MMP). Elle est impliquée dans les interactions cellule-cellule, l'adhésion et la migration (chromosome 11 chez l'Homme).	Nombreux types cellulaires de mammifères.	L'expression de CD44 ⁺ /CD24 ⁻ est couramment utilisée comme marqueur des CSC du sein et est utilisée pour trier les cellules mammaires cancéreuses dans une population enrichie en cellules avec des caractéristiques souches.
CD 45	Glycoprotéine transmembranaire exprimée par la plupart des cellules hématopoïétiques. Son expression persiste chez les leucocytes, tandis qu'elle se perd chez les plaquettes et les érythrocytes au cours de leur différenciation.	Cellules souches hématopoïétiques.	Retrouvé dans les lymphomes, les leucémies lymphoïdes chroniques à cellules B et les leucémies aiguës non lymphoïdes.

Marqueur	Description	Expression normale	Notes supplémentaires / Relations supposées avec le cancer
CD 73	Protéine d'adhésion ancrée, aussi appelée ecto-5'-nucleotidase (E5NT), elle catalyse la déphosphorylation de la purine extracellulaire et des nucléotides de pyrimidine en leurs nucléosides correspondants. Elle participe aux signaux de co-stimulation dans l'activation des cellules T et possède plusieurs fonctions à travers la régulation différentielle des cellules endothéliales, de certaines populations B et T et des cellules dendritiques folliculaires.	Ubiquitaire dans la plupart des tissus normaux, y compris l'endothélium et certaines cellules hématopoïétiques.	Une régulation positive de CD73 est associée à un phénotype cancéreux hautement invasif, une chimiorésistance et une promotion tumorale dans le cancer du sein. Marqueur diagnostique et cible thérapeutique pour le cancer du pancréas.
CD 90	Aussi appelée Thy-1, c'est une protéine d'ancrage fortement N-glycosylée. Elle peut être utilisée comme marqueur de plusieurs cellules souches et pour les processus axonaux des marqueurs neuronaux.	Thymocytes (précurseur de cellules T dans le thymus), neurones, MSCs, cellules hématopoïétiques, cellules dendritiques folliculaires, NK, endothélium, certains fibroblastes et myofibroblastes.	Cellules de mélanome métastatique circulantes ; marqueur de CSCs de gliomes de haut grade.
CD 105	Aussi appelée endogline, END, HHT1, FLJ41744, ORW et ORW1, c'est une glycoprotéine membranaire de type I et appartient au complexe du récepteur au TGFβ. Son rôle crucial dans l'angiogenèse en fait une protéine importante pour les cellules cancéreuses (croissance, survie et processus métastatique). Son expression est généralement faible dans les cellules endothéliales au repos, mais une fois la néoangiogenèse amorcée, ces cellules deviennent actives dans les vaisseaux tumoraux, les tissus enflammés, la peau (psoriasis), les lésions vasculaires et au cours de l'embryogenèse.	L'endogline a un rôle dans le remodelage vasculaire et le développement du système cardiovasculaire. Son expression est régulée au cours du développement du cœur.	Dans le cancer du sein, par exemple, la diminution de la forme complète de l'endogline et l'augmentation de la forme soluble sont en corrélation avec les métastases des cellules cancéreuses.

Marqueur	Description	Expression normale	Notes supplémentaires / Relations supposées avec le cancer
CD 146	Aussi connue sous le nom de Mel-CAM, MCAM, MUC18, A32 antigen, et S-Endo-1, il s'agit d'une molécule d'adhésion couramment utilisée comme marqueur de cellules endothéliales.	Marqueur de MSCs isolées d'organes fœtaux et adultes. Son expression pourrait être liée à la multipotence.	Marqueur de mauvais pronostic de nombreuses tumeurs (rein, poumon, sein, ostéosarcomes, cancers gastriques) et promoteur de l'invasion métastatique en favorisant la TEM.
CD 271	Aussi appelé NGFR, TNFRSF16, p75 (NTR), Bex3, Ngfrap1, il se lie au NGF, BDNF, NT-3 and NT-4 et a une fonction de suppresseur de tumeur en participant à la survie et la mort cellulaires.	MSCs, neurones.	Son expression pourrait être impliquée dans l'invasion périneurale dans les cancers du pancréas, de la prostate et du sein (canalaire infiltrant).
CD 324	Aussi connue sous le nom de CDH1 ou E-cadhérine, il s'agit d'une protéine transmembranaire, de la famille des cadhérines, qui sont des protéines d'adhésion cellulaire dépendantes du calcium. Son association avec les caténines est nécessaire à la formation des jonctions adhérentes entre les cellules épithéliales.	Cellules épithéliales du côlon, de l'utérus, foie, kératinocytes, cerveau, cœur, muscle, rein et pancréas.	Son expression est souvent régulée à la baisse dans les cancers hautement invasifs et peu différenciés. En effet, une régulation à la baisse diminue la force de l'adhésion cellulaire au tissu, entraînant une augmentation de la mobilité des cellules. La perte d'expression ou de fonction est donc impliquée dans la progression cancéreuse en augmentant la prolifération, l'invasion et les métastases. Des mutations de ce gène sont corrélées avec des cancers gastriques, colorectaux, du sein, de l'ovaire et de la thyroïde. Elle joue un rôle comme suppresseur de l'invasion et est un gène suppresseur de tumeur dans les cancers lobulaires du sein préinvasifs.

Marqueur	Description	Expression normale	Notes supplémentaires / Relations supposées avec le cancer
CD 325	Aussi connue sous le nom de CDH2 ou N-cadhérine, elle appartient à la même famille que CD324. Son expression est ubiquitaire, avec des niveaux différents selon le type de cellules endocrines. Elle joue un rôle dans le développement neuronal et est impliquée dans la différenciation et la migration neuronale, ainsi que dans la croissance et la fasciculation axonale. L'expression est régulée à la hausse dans les CSH humaines lors de l'activation de la culture. Le blocage de sa fonction ou de son expression entraîne l'apoptose	Expression sur les cellules épithéliales en lien avec la production d'hormones : thymus, glande pituitaire, pancréas, foie, glandes surrénales, endomètre utérin, ovaires et estomac, ainsi que dans le tissu neuronal.	Associée au phénomène de TEM, la N-cadhérine se retrouve exprimée de façon positive dans les cellules ayant réalisée la transition. Elle est caractéristique d'un phénotype mésenchymateux et donc potentiellement mobile, pouvant conduire au détachement des cellules cancéreuses et à leur migration dans l'organisme.
CK 14	Il s'agit d'une kératine de type I, protéine appartenant au groupe des filaments intermédiaires. Elle s'associe avec une kératine de type II (kératine 5) pour former le cytosquelette des cellules épithéliales.	Associée à un phénotype de type basal dans la glande mammaire.	Des mutations sont associées à 2 pathologies non cancéreuses : <i>epidermolysis bullosa simplex</i> et <i>dermatopathia pigmentosa reticularis</i> .
CK 18	Il s'agit d'une kératine de type I, protéine appartenant au groupe des filaments intermédiaires. Elle s'associe avec une kératine de type II (kératine 5) pour former le cytosquelette des cellules épithéliales	Associée à un phénotype de type luminal dans la glande mammaire.	Présente dans certains cancers gastro-intestinaux.
Vimentine	La vimentine est un filament intermédiaire de type III (IF), protéine exprimée dans les cellules mésenchymateuses. Toutes ces protéines sont exprimées de façon très régulée pendant le développement et la vimentine est le composant majeur du cytosquelette des cellules mésenchymateuses. Pour cette raison, elle est souvent utilisée comme un marqueur de cellules mésenchymateuses dérivées ou de cellules subissant une TEM à la fois pendant le développement normal et la progression métastatique.	Cellules mésenchymateuses (fibroblastes, chondrocytes, cellules endothéliales et cellules musculaires vasculaires lisses).	Une augmentation de son expression est corrélée à une augmentation de la motilité et de l'invasion des cellules tumorales mammaires.

Annexe 4 : Publication complémentaire

Les MSCs BRCA1^{+/-} utilisées dans ce travail ont été différenciées à partir d'iPSCs. Les iPSCs BRCA1^{+/-} ont été générées par une méthode de transduction virale non-intégrative (virus de Sendai) comprenant les facteurs Oct3/4, Sox2, Klf4 et c-Myc à partir de cellules mononuclées du sang cryopréservées d'une patiente de 56 ans. Cette lignée (PB38) ainsi obtenue a été caractérisée quant à l'expression des marqueurs de pluripotence, de son caryotype, de sa capacité à former des tératomes *in vivo* et de la présence d'une mutation sur le gène *BRCA1*. La lignée PB38 a fait l'objet d'une publication dans la revue *Stem Cell Research* à laquelle j'ai participé dans le cadre de la caractérisation après reprogrammation. La publication est reproduite ci-après.



Contents lists available at ScienceDirect

Stem Cell Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scr

Lab resource: Stem Cell Line

Generation of induced pluripotent stem cell (iPSC) line from a patient with triple negative breast cancer with hereditary exon 17 deletion of BRCA1 gene



Frank Griscelli^{a,b,c,d,*}, Noufissa Oudrhiri^{a,b,e}, Olivier Feraud^{a,b}, Dominique Divers^{a,b}, Lucie Portier^b, Ali G. Turhan^{a,b,e,f}, Annelise Bennaceur Griscelli^{a,b,e,f}

^a ESteam Paris Sud, INGEMEM National IPSC Infrastructure, UPSud, Université Paris-Saclay, Villejuif 94800, France

^b UMR-S 935, INSERM, Université Paris Sud, Villejuif 94800, France

^c Gustave Roussy, Department of Biopathology, Villejuif 94800, France

^d University Paris Descartes, Faculty Sorbonne Paris Cité, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris, France

^e Division of Hematology, APHP-Paris Sud University hospital, Le Kremlin Bicêtre 94275, Villejuif 94800, France

^f University Paris Sud, Faculty of Medicine, Le Kremlin Bicêtre 94275, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 August 2017

Received in revised form 29 August 2017

Accepted 11 September 2017

Available online 14 September 2017

ABSTRACT

BRCA1 germline mutation confers hereditary predisposition for breast and ovarian cancer. To understand the physiopathology of mammary and ovarian epithelial cancer transformation, and to identify early driver molecular events, we have generated an iPSC line from a patient carrying a germline exon 17 deletion in BRCA1 gene (BRCA1Ex17 iPSC) in a high-risk family context. Blood cells were reprogrammed using non-integrative virus of Sendai. The BRCA1-deleted iPSC had normal karyotype, harboured a deletion in the exon 17 of the BRCA1 gene, expressed pluripotent hallmarks and had the differentiation capacity into the three germ layers.

© 2017 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Resource table

Unique stem cell line identifier	UPSFR011-A
Alternative name of stem cell line	BRCA1del17 iPSC (PB38)
Institution	University Paris Sud UMR 935 – ESteam Paris Sud/INGEMEM
Contact information of distributor	annelise.bennaceur@aphp.fr franck.griscelli@gustaveroussy.fr Ali.turhan@aphp.fr
Type of cell line	iPSC
Origin	Human
Additional origin info	Applicable for human ESC or iPSC
Cell source	Age: 56
Method of reprogramming	Sex: female
Associated disease	Ethnicity if known: Caucasian
Gene/locus	Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)
Method of modification	Sendai virus
Gene correction	None
Name of transgene or resistance	BRCA1
Inducible/constitutive system	No modification
Date archived/stock date	No
	No applicable
	No applicable
	August 2013

Cell line repository/bank
Ethical approval

N/A
Informed consent of the patient obtained and archived at ESteam Paris Sud Stem cell core facility.
Ethics: Project approved by Inserm Ethical committee

Resource utility

BRCA1Ex17-deleted iPSCs will be useful to study the effects of the deletion on gene expression, genome stability and on mechanisms of DNA repair, to model tumor transformation and to discover new drugs to cure patients with a hereditary predisposition to develop breast and ovarian cancers.

Resource details

BRCA1 (BRCA1) is a tumor-suppressor gene and plays a pivotal role in the maintenance of genomic stability by controlling DNA repair via homologous recombination. It plays also a major role in the regulation of cell cycle on S-phase, G2/M, spindle checkpoint and in maintenance of chromosome stability (Venkitaraman, 2002). High penetrance germline mutation in one allele of BRCA1 leads to 45% increased risk of developing breast cancer and 40% of risk to develop an ovarian neoplasia

* Corresponding author at: UMR-S 935, INSERM – Université Paris Sud, Villejuif 94800, France.

E-mail address: franck.griscelli@gustaveroussy.fr (F. Griscelli).

at the age of 70. Over 1000 different mutations associated with the disease have been identified and collected on the public Breast Cancer Information Core Database (BIC database), according to the ethnicity and geographical area. It has been shown that 70–80% of BRCA1 mutations are pathological and produce a non-functional protein. These mutations include frameshift or nonsense mutations, deleterious missense mutations resulting in amino acid substitution or intronic variants with splicing effect in functional motives of the BRCA1 protein. 1% of all the coding variants are due to large deletions. The complete and effective BRCA1 protein function is still not fully understood and it remains unclear why BRCA1 mutations are preferentially associated with increased incidence of cancer in epithelial tissues. In contrast to mouse BRCA1^{+/−} models, haploinsufficiency of BRCA1 in human leads to early molecular and cellular alterations with gene copy number gains and losses in key tumor suppressors and oncogenes in epithelial primary cells from disease-free breast tissue. Deficiencies in error-free DNA damage repair have been observed in genetically engineered human mammary epithelial cells (HMEC) before development of cancer and before BRCA1 loss (Sedic et al., 2015). Considering the large array of BRCA1 genotype and various breast tumor phenotype associated with BRCA1 signature, development of human iPSC models will be useful in order to define the pathogenicity or the neutrality of BRCA1 mutations or variants of unknown significance.

In this work we have derived iPSC line from a patient who developed a triple negative breast cancer in a context family cancer and whose cells harboured a germline BRCA1 exon 17 deletion confirmed by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) (Engert et al., 2008).

Tumor was a typical BRCA1-associated breast cancer (Foulkes et al., 2003), i.e. immature basal-like cancer negative for estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PgR) and HER2neu receptor, with a high mitotic count and histological grade IV. Cryopreserved peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were reprogrammed by non-integrative transduction of Oct3/4, Sox2, Klf4, and cMyc (Takahashi et al., 2007). Typical iPSC colonies on mouse embryonic fibroblast feeders (MEF) (Fig. 1A) or in feeder-free conditions exhibited typical markers of pluripotency by expressing Nanog, Sox2 (Fig. 1B) SSEA4 and TRA-1-60 (Fig. 1C). Karyotype analysis before reprogramming and in iPSC cells were normal (Fig. 1D) and the iPSCs harboured the BRCA1 exon 17 deletion (Fig. 1E). The differentiation capacity into the three germ layers were confirmed by teratoma formation assays (Fig. 1F). Microsatellite genotyping showed identical pattern within PBMC and BRCA1 deleted-iPSC confirming the correct origin of the iPSC line (Supplementary Fig. 1).

Materials and methods

Reprogramming, pluripotency markers and teratoma assay

Four days before reprogramming, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were thawed, cultured and expanded in MyelocultTM medium (Stem Cell Technologies) supplemented with 1% penicillin-streptomycin (Life technologies), hSCF 100 ng/mL, hFLT-3100 ng/mL, hIL-3 20 ng/mL, hIL-6 20 ng/mL, and hIL-7 20 ng/mL (all of them from

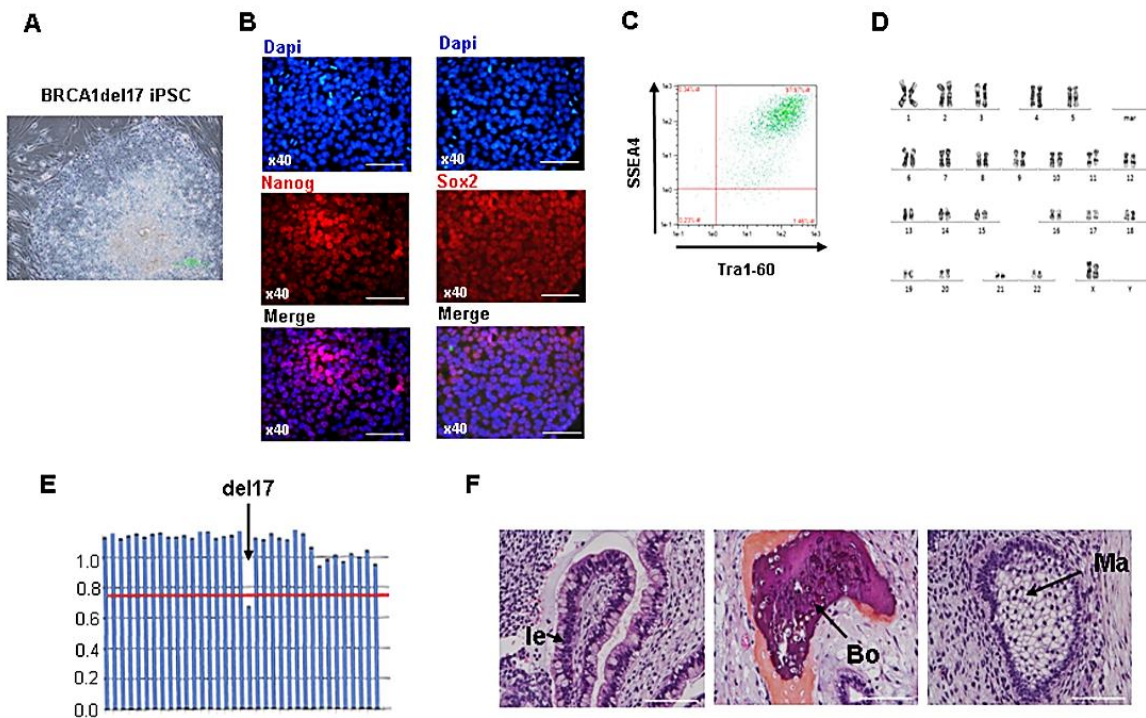


Fig. 1. Characterization of the iPSC cell line with deletion in the Exon17 of the BRCA1 gene. Panel A: Phase contrast imaging of BRCA1del17 iPSC colonies (polyclonal stock) grown on MEF stromal cells at passage 60. Panel B: iPSC colonies positive for Nanog and Sox2 by immuno fluorescence staining. Panel C: FACS evaluation of pluripotency markers using a double SSEA4 and TRA-1-60 staining confirming the presence of cell surface pluripotency markers on BRCA1del17 iPSC. Panel D: Cytogenetics analysis showing a normal Karyotype analysis (46,XX). Panel E: Detection of the heterozygous deletion of the Exon 17 of the BRCA1 gene in the BRCA1del17 iPSC by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) analysis. Abscissa represents BRCA1 gene and ordinate represents fluorescent intensity of amplification. For each probe, the ratio < 0.75 stands for deletion. Panel F: Pathological analysis of a teratoma from BRCA1del17 iPSC, showing a normal ectodermal, endodermal and mesodermal differentiation with the absence of histological malignant or dysplastic tissues. Ma: malpighian epithelium, le: intestinal epithelium, Bo: bone structure.

Table 1

Tests performed on BRCA1del17 iPSC cell lines for their characterization including; the morphology, the phenotype, the STR and the mutation analysis, and the teratoma assay.

Classification	Test	Result	Data
Morphology	Photography	Normal morphology	Fig. 1 panel A
Phenotype	Immunocytochemistry	Staining/expressed of pluripotency markers: Nanog, Sox2	Fig. 1 panel B
	Flow cytometry	Assess antigen levels & cell surface markers e.g. Tra-1-60 and SSEA4: 97.97%	Fig. 1 panel C
Genotype	Karyotype (G-banding) and resolution	46XX Resolution 450–500	Fig. 1 panel D
Identity	Microsatellite PCR (mPCR)	DNA Profiling Performed	Supplementary Fig. 1
Mutation analysis (if applicable)	STR analysis	3 sites tested	Supplementary Fig. 1
	Sequencing	Heterozygous deletion	Fig. 1 panel E
Microbiology and virology	Southern Blot OR WGS	Not performed	Not performed
	Mycoplasma	Mycoplasma testing by luminescence: Negative	Not shown but available with author
Differentiation potential	Embryoid body formation OR Teratoma formation OR Scorecard	Teratoma with three germ layers formation	Fig. 1 panel F
Donor screening (optional)	HIV 1 + 2 Hepatitis B, Hepatitis C	Negative	Not shown but available with author
Genotype additional info (optional)	Blood group genotyping	Not performed	Not performed
	HLA tissue typing	Not performed Class I and Class II	Not performed

Peprotech). 2×10^5 PBMC were transduced overnight with Sendai viruses containing Oct3/4, Sox2, Klf4, and cMyc (CytoTune®-iPS Sendai Reprogramming Kit, Life technologies) each of them at multiplicity of infection (MOI) of 15. Medium was changed daily for the next 2 days and cells were resuspended in expansion medium. At day + 3, cells were recovered by centrifugation and plated on Mitomycin-C-treated mouse embryonic fibroblasts (MEF, CD1 strain) in expansion medium for 2 additional days. At day 6, half of the medium was changed to human pluripotent stem cell medium (hPSC medium) based on DMEM/F12 supplemented with 20% Knock Out Serum Replacer, 1 mM L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin, 100 μ M 2-mercaptoethanol (all of them from Life technologies) and 12.5 ng/mL basic FGF (Miltenyi Biotech). A pool of reprogrammed colonies was then recovered after 26 passages and expanded in feeder free conditions on Geltrex™ matrix in Essential 8 medium (Life technologies). For FACS analysis of pluripotency marker expression, iPSC were stained with antibodies listed on Table 2. For teratoma formation assay, the iPSCs were injected in the rear leg muscle of NSG mouse (Animal Experimentation approval n° 534/201504221 1271381v2). Histopathology study was performed after 8 to 10 weeks of tumor growth. Teratomas were generated in triplicate in order to be able to analyze the development of potentially malignant tumor tissue within teratomas tissues.

Genomic analysis

For conventional karyotype cells were trypsinized with TrypLETM Express (Life technologies) and treated with 0.075 M KCl (Life technologies) to obtain an osmotic shock. Cell suspension was then prefixed with 1 mL of fixative composed of Methanol/Acetic Acid (3:1) and resuspended in 10 mL of fixative and centrifuged 10 min at 130 x g two times before a final resuspension in 10 mL of fixative. Cells were then spread on slides and stained with Giemsa. A minimum of 10 metaphases were captured and analyzed using an automated imaging system (Meta Systems). The detection of the BRCA1 deletion was performed by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) analysis according to the protocol supplied by the manufacturer of the SALSA-MLPA Kit P002 (MRC-Holland, Amsterdam, Netherlands). The products generated by MLPA were analyzed using the Coffalyser. Net MLPA analysis software.

Microsatellite short tandem repeat analysis

Genomic DNA from BRCA1 deleted-iPSC and PBMC were extracted with DNeasy blood & Tissue kit (Ref 69,504, Qiagen) and PCR performed with fluorescently labeled primers permitting to detect (CA)_n repeats on 3 different Locus: Locus 1 (chromosome 18q22) Locus 2

Table 2

List of antibodies used for immunocytochemistry and cytometry and list of primers used for STR analysis located in three different loci.

Antibodies used for immunocytochemistry/flow-citometry			
	Antibody	Dilution	Company Cat # and RRID
Pluripotency Marker, IF for Nanog	Rabbit anti-h Nanog	1/100	Abcam Cat# Ab21624 RRID:AB_446437
Pluripotency Marker, IF for Sox2	Rabbit anti-h Sox2	1/500	Millipore Cat# AB5603 RRID:AB_2286686
Secondary antibody for IF	PE647 – Goat anti rabbit	1/800	Invitrogen Cat# A20991 RRID:AB_2535705
Pluripotency Marker, FACS	PE Mouse anti-SSEA4	1/10	BD Biosciences Cat# 560128, RRID:AB_1645533
Pluripotency Marker, FACS	Alexa 647 Mouse anti-Tra-1-60	1/20	BD Biosciences Cat# 560850, RRID:AB_10565983
Primers			
STR analysis	Target	Forward/reverse primer (5'–3')	
	Locus 1	Forward: 6-FAM-5' ATTTCTAAGAGGACTCCCAACT 3' Reverse: 5' ATATTTTGAAACTCAGGAGCAT 3'	
STR analysis	Locus 2	Forward: 6-FAM-5' TGGCCTGAATAGACATAAAAA 3' Reverse: 5' AATCTGGGCGACAAGAGTGA 3'	
	Locus 3	Forward: 6-FAM-5' CAGTGTAACTGGGGGC 3' Reverse: 5' GCCTGGGTGACAAAGCA 3'	

(chromosome 1q32) and locus 3 (chromosome 16q24). The PCR amplicons are separated by size using electrophoresis and the dye labeled products identified by DNA sequencing (48-capillary ABI3730 Applied Biosystems) by using the GeneMapper Software (Applied Biosystems). Primers used for the Short Tandem Repeat analysis are listed on Table 2.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scr.2017.09.003>.

Acknowledgements

This work was performed with grants from ANR Programme d'Investissements d'Avenir of INGESTEM National Infrastructure (ANR-11-INBS-0009-INGESTEM), Inserm, University Paris Sud and Vaincre le Cancer NRB. We are grateful to the patient carrying the BRCA1 deletion.

References

- Engert, S., Wappenschmidt, B., Betz, B., Kast, K., Kutsche, M., Hellebrand, H., Goecke, T.O., Kiechle, M., Niederacher, D., Schmutzler, R.K., Meindl, A., July 2008. MLPA screening in the BRCA1 gene from 1,506 German hereditary breast cancer cases: novel deletions, frequent involvement of exon 17, and occurrence in single early-onset cases. *Hum. Mutat.* 29 (7), 948–958.
- Foulkes, W.D., Stefansson, I.M., Chappuis, P.O., Begin, L.R., Goffin, J.R., Wong, N., Trudel, M., Akslen, L.A., 2003. Germline brca1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 95, 1482–1485.
- 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., Nääär, A.M., Blasco, M.A., Hinds, P.W., Kuperwasser, C., 2015. Haploinsufficiency for BRCA1 leads to cell-type-specific genomic instability and pre-mature senescence. *Nat. Commun.* 6, 7505.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S., 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131 (5), 861–872.
- Venkitaraman, A.R., January 25, 2002. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 108 (2), 171–182.

Bibliographie

1. Verbeke S. Étude des voies de signalisation du récepteur p75NTR impliquées dans la croissance des cellules de cancer du sein. 2010.
2. Short RV, Austin CR. *Reproduction in mammals*. 2nd ed. Cambridge [Cambridgeshire] ; New York : Cambridge University Press; 1982.
3. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015; **65**:87–108.
4. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; **136**:E359-386.
5. Binder-Foucard F, Belot A, Delafosse P, Remontet L, Woronoff A-S, Bossard N. *Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012. Partie 1 - Tumeurs solides*. Saint-Maurice: Institut de veille sanitaire; 2013:122.
6. Ribassin-Majed L, Le-Teuff G, Hill C. [The frequency of cancer in France: Most recent data and trends]. *Bull Cancer (Paris)* 2017; **104**:20–29.
7. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; **144**:646–674.
8. Marshall E. Breast cancer. Dare to do less. *Science* 2014; **343**:1454–1456.
9. Rizzolo P, Silvestri V, Tommasi S, *et al.* Male breast cancer: genetics, epigenetics, and ethical aspects. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2013; **24 Suppl 8**:viii75-viii82.
10. Silvestri V, Barrowdale D, Mulligan AM, *et al.* Male breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: pathology data from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2. *Breast Cancer Res BCR* 2016; **18**:15.
11. Hall JM, Lee MK, Newman B, *et al.* Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 1990; **250**:1684–1689.
12. Ford D, Easton DF. The genetics of breast and ovarian cancer. *Br J Cancer* 1995; **72**:805–812.
13. Rowell S, Newman B, Boyd J, King MC. Inherited predisposition to breast and ovarian cancer. *Am J Hum Genet* 1994; **55**:861–865.
14. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, *et al.* A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994; **266**:66–71.
15. Rosen EM, Pishvaian MJ. Targeting the BRCA1/2 tumor suppressors. *Curr Drug Targets* 2014; **15**:17–31.

16. Shiovitz S, Korde LA. Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2015; **26**:1291–1299.
17. Foulkes WD. Inherited susceptibility to common cancers. *N Engl J Med* 2008; **359**:2143–2153.
18. Venkitaraman AR. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 2002; **108**:171–182.
19. Foulkes WD, Stefansson IM, Chappuis PO, *et al.* Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003; **95**:1482–1485.
20. Stefansson OA, Jonasson JG, Johannsson OT, *et al.* Genomic profiling of breast tumours in relation to BRCA abnormalities and phenotypes. *Breast Cancer Res BCR* 2009; **11**:R47.
21. Hartmann LC, Lindor NM. The Role of Risk-Reducing Surgery in Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 2016; **374**:454–468.
22. Couch FJ, Johnson MR, Rabe KG, *et al.* The prevalence of BRCA2 mutations in familial pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* 2007; **16**:342–346.
23. Ginsburg OM, Kim-Sing C, Foulkes WD, *et al.* BRCA1 and BRCA2 families and the risk of skin cancer. *Fam Cancer* 2010; **9**:489–493.
24. Anon. Wiley: TNM Classification of Malignant Tumours, 8th Edition - James D. Brierley, Mary K. Gospodarowicz, Christian Wittekind.
25. Dai X, Li T, Bai Z, *et al.* Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res* 2015; **5**:2929–2943.
26. Vallejos CS, Gómez HL, Cruz WR, *et al.* Breast cancer classification according to immunohistochemistry markers: subtypes and association with clinicopathologic variables in a peruvian hospital database. *Clin Breast Cancer* 2010; **10**:294–300.
27. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; **406**:747–752.
28. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**:10869–10874.
29. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012; **490**:61–70.
30. Curtis C, Shah SP, Chin S-F, *et al.* The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* **486**:346.
31. Dawson S-J, Rueda OM, Aparicio S, Caldas C. A new genome-driven integrated classification of breast cancer and its implications. *EMBO J* 2013; **32**:617–628.

32. Turner N, Tutt A, Ashworth A. Hallmarks of “BRCAness” in sporadic cancers. *Nat Rev Cancer* 2004; **4**:814–819.
33. Lips EH, Mulder L, Oonk A, *et al.* Triple-negative breast cancer: BRCAness and concordance of clinical features with BRCA1-mutation carriers. *Br J Cancer* 2013; **108**:2172–2177.
34. Lord CJ, Ashworth A. BRCAness revisited. *Nat Rev Cancer* 2016; **16**:110–120.
35. Brooks MD, Burness ML, Wicha MS. Therapeutic Implications of Cellular Heterogeneity and Plasticity in Breast Cancer. *Cell Stem Cell* 2015; **17**:260–271.
36. Molyneux G, Geyer FC, Magnay F-A, *et al.* BRCA1 basal-like breast cancers originate from luminal epithelial progenitors and not from basal stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; **7**:403–417.
37. Pal B, Chen Y, Bert A, *et al.* Integration of microRNA signatures of distinct mammary epithelial cell types with their gene expression and epigenetic portraits. *Breast Cancer Res BCR* 2015; **17**:85.
38. Rosen EM, Fan S, Pestell RG, Goldberg ID. BRCA1 gene in breast cancer. *J Cell Physiol* 2003; **196**:19–41.
39. Zhu Q, Pao GM, Huynh AM, *et al.* BRCA1 tumour suppression occurs via heterochromatin-mediated silencing. *Nature* 2011; **477**:179–184.
40. Rosen EM, Fan S, Ma Y. BRCA1 regulation of transcription. *Cancer Lett* 2006; **236**:175–185.
41. Gowen LC, Johnson BL, Latour AM, Sulik KK, Koller BH. Brca1 deficiency results in early embryonic lethality characterized by neuroepithelial abnormalities. *Nat Genet* 1996; **12**:191–194.
42. Ludwig T, Chapman DL, Papaioannou VE, Efstratiadis A. Targeted mutations of breast cancer susceptibility gene homologs in mice: lethal phenotypes of Brca1, Brca2, Brca1/Brca2, Brca1/p53, and Brca2/p53 nullizygous embryos. *Genes Dev* 1997; **11**:1226–1241.
43. Clark SL, Rodriguez AM, Snyder RR, Hankins GDV, Boehning D. Structure-Function Of The Tumor Suppressor BRCA1. *Comput Struct Biotechnol J* 2012; **1**.
44. Huen MSY, Sy SMH, Chen J. BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; **11**:138–148.
45. Welcsh PL, Owens KN, King MC. Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. *Trends Genet TIG* 2000; **16**:69–74.
46. Arnold MA, Goggins M. BRCA2 and predisposition to pancreatic and other cancers. *Expert Rev Mol Med* 2001; **3**:1–10.
47. Welcsh PL, Schubert EL, King MC. Inherited breast cancer: an emerging picture. *Clin Genet* 1998; **54**:447–458.

48. Fan S, Ma YX, Wang C, *et al.* Role of direct interaction in BRCA1 inhibition of estrogen receptor activity. *Oncogene* 2001; **20**:77–87.
49. Monteiro ANA. BRCA1: the enigma of tissue-specific tumor development. *Trends Genet TIG* 2003; **19**:312–315.
50. Marquis ST, Rajan JV, Wynshaw-Boris A, *et al.* The developmental pattern of Brca1 expression implies a role in differentiation of the breast and other tissues. *Nat Genet* 1995; **11**:17–26.
51. Mueller CR, Roskelley CD. Regulation of BRCA1 expression and its relationship to sporadic breast cancer. *Breast Cancer Res BCR* 2003; **5**:45–52.
52. Magdinier F, Billard LM, Wittmann G, *et al.* Regional methylation of the 5' end CpG island of BRCA1 is associated with reduced gene expression in human somatic cells. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2000; **14**:1585–1594.
53. Rice JC, Ozcelik H, Maxeiner P, Andrulis I, Futscher BW. Methylation of the BRCA1 promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA levels in clinical breast cancer specimens. *Carcinogenesis* 2000; **21**:1761–1765.
54. Wu L, Wang F, Xu R, *et al.* Promoter methylation of BRCA1 in the prognosis of breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2013; **142**:619–627.
55. Gorrini C, Gang BP, Bassi C, *et al.* Estrogen controls the survival of BRCA1-deficient cells via a PI3K-NRF2-regulated pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; **111**:4472–4477.
56. De Lorenzo SB, Patel AG, Hurley RM, Kaufmann SH. The Elephant and the Blind Men: Making Sense of PARP Inhibitors in Homologous Recombination Deficient Tumor Cells. *Front Oncol* 2013; **3**:228.
57. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, *et al.* Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 2005; **434**:913–917.
58. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, *et al.* Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 2005; **434**:917–921.
59. Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; **68**:820–823.
60. Staff S, Nupponen NN, Borg A, Isola JJ, Tanner MM. Multiple copies of mutant BRCA1 and BRCA2 alleles in breast tumors from germ-line mutation carriers. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; **28**:432–442.
61. Konishi H, Mohseni M, Tamaki A, *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 U S A* 2011; **108**:17773–17778.
62. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; **253**:49–53.

63. Børresen-Dale A-L. TP53 and breast cancer. *Hum Mutat* 2003; **21**:292–300.
64. Foulkes WD. BRCA1--sowing the seeds crooked in the furrow. *Nat Genet* 2008; **40**:8–9.
65. Thompson ME, Jensen RA, Obermiller PS, Page DL, Holt JT. Decreased expression of BRCA1 accelerates growth and is often present during sporadic breast cancer progression. *Nat Genet* 1995; **9**:444–450.
66. Yang Q, Sakurai T, Mori I, *et al.* Prognostic significance of BRCA1 expression in Japanese sporadic breast carcinomas. *Cancer* 2001; **92**:54–60.
67. Lambie H, Miremadi A, Pinder SE, *et al.* Prognostic significance of BRCA1 expression in sporadic breast carcinomas. *J Pathol* 2003; **200**:207–213.
68. Hanby AM, Kelsell DP, Potts HW, *et al.* Association between loss of heterozygosity of BRCA1 and BRCA2 and morphological attributes of sporadic breast cancer. *Int J Cancer J Int Cancer* 2000; **88**:204–208.
69. Beckmann MW, Picard F, An HX, *et al.* Clinical impact of detection of loss of heterozygosity of BRCA1 and BRCA2 markers in sporadic breast cancer. *Br J Cancer* 1996; **73**:1220–1226.
70. Staff S, Isola J, Tanner M. Haplo-insufficiency of BRCA1 in sporadic breast cancer. *Cancer Res* 2003; **63**:4978–4983.
71. Buchholz TA, Wu X, Hussain A, *et al.* Evidence of haplotype insufficiency in human cells containing a germline mutation in BRCA1 or BRCA2. *Int J Cancer J Int Cancer* 2002; **97**:557–561.
72. Geisler JP, Hatterman-Zogg MA, Rathe JA, Buller RE. Frequency of BRCA1 dysfunction in ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002; **94**:61–67.
73. Russell PA, Pharoah PD, De Foy K, *et al.* Frequent loss of BRCA1 mRNA and protein expression in sporadic ovarian cancers. *Int J Cancer J Int Cancer* 2000; **87**:317–321.
74. Yoshikawa K, Honda K, Inamoto T, *et al.* Reduction of BRCA1 protein expression in Japanese sporadic breast carcinomas and its frequent loss in BRCA1-associated cases. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 1999; **5**:1249–1261.
75. Taylor J, Lymboura M, Pace PE, *et al.* An important role for BRCA1 in breast cancer progression is indicated by its loss in a large proportion of non-familial breast cancers. *Int J Cancer J Int Cancer* 1998; **79**:334–342.
76. Wilson CA, Ramos L, Villaseñor MR, *et al.* Localization of human BRCA1 and its loss in high-grade, non-inherited breast carcinomas. *Nat Genet* 1999; **21**:236–240.
77. Baldwin RL, Nemeth E, Tran H, *et al.* BRCA1 promoter region hypermethylation in ovarian carcinoma: a population-based study. *Cancer Res* 2000; **60**:5329–5333.

78. Atlas E, Stramwasser M, Whiskin K, Mueller CR. GA-binding protein alpha/beta is a critical regulator of the BRCA1 promoter. *Oncogene* 2000; **19**:1933–1940.
79. Bochar DA, Wang L, Beniya H, *et al.* BRCA1 is associated with a human SWI/SNF-related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer. *Cell* 2000; **102**:257–265.
80. Arizti P, Fang L, Park I, *et al.* Tumor suppressor p53 is required to modulate BRCA1 expression. *Mol Cell Biol* 2000; **20**:7450–7459.
81. Scully R, Anderson SF, Chao DM, *et al.* BRCA1 is a component of the RNA polymerase II holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**:5605–5610.
82. Ruffner H, Joazeiro CA, Hemmati D, Hunter T, Verma IM. Cancer-predisposing mutations within the RING domain of BRCA1: loss of ubiquitin protein ligase activity and protection from radiation hypersensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**:5134–5139.
83. Tibbetts RS, Cortez D, Brumbaugh KM, *et al.* Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. *Genes Dev* 2000; **14**:2989–3002.
84. Bellacosa A, Godwin AK, Peri S, *et al.* Altered gene expression in morphologically normal epithelial cells from heterozygous carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *Cancer Prev Res Phila Pa* 2010; **3**:48–61.
85. Rennstam K, Ringberg A, Cunliffe HE, Olsson H, Landberg G, Hedenfalk I. Genomic alterations in histopathologically normal breast tissue from BRCA1 mutation carriers may be caused by BRCA1 haploinsufficiency. *Genes Chromosomes Cancer* 2010; **49**:78–90.
86. Proia TA, Keller PJ, Gupta PB, *et al.* Genetic predisposition directs breast cancer phenotype by dictating progenitor cell fate. *Cell Stem Cell* 2011; **8**:149–163.
87. Lim E, Vaillant F, Wu D, *et al.* Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat Med* 2009; **15**:907–913.
88. Liu S, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, *et al.* BRCA1 regulates human mammary stem/progenitor cell fate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**:1680–1685.
89. Curtis CD, Thorngren DL, Nardulli AM. Immunohistochemical analysis of oxidative stress and DNA repair proteins in normal mammary and breast cancer tissues. *BMC Cancer* 2010; **10**:9.
90. Foray N, Randrianarison V, Marot D, Perricaudet M, Lenoir G, Feunteun J. Gamma-rays-induced death of human cells carrying mutations of BRCA1 or BRCA2. *Oncogene* 1999; **18**:7334–7342.
91. Chiang H-C, Elledge R, Larson P, Jatoi I, Li R, Hu Y. Effects of Radiation Therapy on Breast Epithelial Cells in BRCA1/2 Mutation Carriers. *Breast Cancer Basic Clin Res* 2015; **9**:25–29.

92. Hallam S, Govindarajulu S, Hockett B, Bahl A. BRCA1/2 Mutation-associated Breast Cancer, Wide Local Excision and Radiotherapy or Unilateral Mastectomy: A Systematic Review. *Clin Oncol R Coll Radiol G B* 2015; **27**:527–535.
93. Wu Z-Q, Li X-Y, Hu CY, Ford M, Kleer CG, Weiss SJ. Canonical Wnt signaling regulates Slug activity and links epithelial-mesenchymal transition with epigenetic Breast Cancer 1, Early Onset (BRCA1) repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; **109**:16654–16659.
94. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* 1989; **8**:98–101.
95. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 2009; **9**:239–252.
96. Öhlund D, Elyada E, Tuveson D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *J Exp Med* 2014; **211**:1503–1523.
97. Paunescu V, Bojin FM, Tatu CA, *et al.* Tumour-associated fibroblasts and mesenchymal stem cells: more similarities than differences. *J Cell Mol Med* 2011; **15**:635–646.
98. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; **6**:392–401.
99. Luo H, Tu G, Liu Z, Liu M. Cancer-associated fibroblasts: a multifaceted driver of breast cancer progression. *Cancer Lett* 2015; **361**:155–163.
100. Witkiewicz AK, Dasgupta A, Sotgia F, *et al.* An absence of stromal caveolin-1 expression predicts early tumor recurrence and poor clinical outcome in human breast cancers. *Am J Pathol* 2009; **174**:2023–2034.
101. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, *et al.* Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 2005; **121**:335–348.
102. Pontiggia O, Sampayo R, Raffo D, *et al.* The tumor microenvironment modulates tamoxifen resistance in breast cancer: a role for soluble stromal factors and fibronectin through β 1 integrin. *Breast Cancer Res Treat* 2012; **133**:459–471.
103. Martinez-Outschoorn UE, Goldberg A, Lin Z, *et al.* Anti-estrogen resistance in breast cancer is induced by the tumor microenvironment and can be overcome by inhibiting mitochondrial function in epithelial cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2011; **12**:924–938.
104. Mueller KL, Madden JM, Zoratti GL, Kuperwasser C, List K, Boerner JL. Fibroblast-secreted hepatocyte growth factor mediates epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor resistance in triple-negative breast cancers through paracrine activation of Met. *Breast Cancer Res BCR* 2012; **14**:R104.
105. Karp JM, Leng Teo GS. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell* 2009; **4**:206–216.

106. El-Haibi CP, Karnoub AE. Mesenchymal stem cells in the pathogenesis and therapy of breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010; **15**:399–409.
107. Kidd S, Spaeth E, Klopp A, Andreeff M, Hall B, Marini FC. The (in) auspicious role of mesenchymal stromal cells in cancer: be it friend or foe. *Cytotherapy* 2008; **10**:657–667.
108. Mishra PJ, Mishra PJ, Humeniuk R, *et al.* Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 2008; **68**:4331–4339.
109. Spaeth EL, Dembinski JL, Sasser AK, *et al.* Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PloS One* 2009; **4**:e4992.
110. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, *et al.* Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 2007; **449**:557–563.
111. Kidd S, Spaeth E, Dembinski JL, *et al.* Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem Cells Dayt Ohio* 2009; **27**:2614–2623.
112. Loebinger MR, Kyrtatos PG, Turmaine M, *et al.* Magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells homing to pulmonary metastases using biocompatible magnetic nanoparticles. *Cancer Res* 2009; **69**:8862–8867.
113. Feng B, Chen L. Review of mesenchymal stem cells and tumors: executioner or coconspirator? *Cancer Biother Radiopharm* 2009; **24**:717–721.
114. McAndrews KM, McGrail DJ, Ravikumar N, Dawson MR. Mesenchymal Stem Cells Induce Directional Migration of Invasive Breast Cancer Cells through TGF- β . *Sci Rep* 2015; **5**:16941.
115. Spaeth E, Klopp A, Dembinski J, Andreeff M, Marini F. Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther* 2008; **15**:730–738.
116. Liu S, Ginestier C, Ou SJ, *et al.* Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks. *Cancer Res* 2011; **71**:614–624.
117. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; **420**:860–867.
118. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 2004; **4**:71–78.
119. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 2002; **196**:254–265.
120. Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 2006; **124**:263–266.

121. Chouaib S, Asselin-Paturel C, Mami-Chouaib F, Caignard A, Blay JY. The host-tumor immune conflict: from immunosuppression to resistance and destruction. *Immunol Today* 1997; **18**:493–497.
122. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2008; **8**:618–631.
123. Dutour A, Rigaud M. Tumor endothelial cells are targets for selective therapies: in vitro and in vivo models to evaluate antiangiogenic strategies. *Anticancer Res* 2005; **25**:3799–3807.
124. Rafii S, Lyden D, Benezra R, Hattori K, Heissig B. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat Rev Cancer* 2002; **2**:826–835.
125. Chouaib S, Kieda C, Benlalam H, Noman MZ, Mami-Chouaib F, Rüegg C. Endothelial cells as key determinants of the tumor microenvironment: interaction with tumor cells, extracellular matrix and immune killer cells. *Crit Rev Immunol* 2010; **30**:529–545.
126. Landskroner-Eiger S, Qian B, Muise ES, *et al.* Proangiogenic contribution of adiponectin toward mammary tumor growth in vivo. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2009; **15**:3265–3276.
127. Iyengar P, Espina V, Williams TW, *et al.* Adipocyte-derived collagen VI affects early mammary tumor progression in vivo, demonstrating a critical interaction in the tumor/stroma microenvironment. *J Clin Invest* 2005; **115**:1163–1176.
128. Mao Y, Keller ET, Garfield DH, Shen K, Wang J. Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2013; **32**:303–315.
129. Fernandes J. Etude de la formation d'agrégats multicellulaires de carcinomes ovariens et du remodelage du microenvironnement tumoral. 2010.
130. Tucker RP, Chiquet-Ehrismann R. The regulation of tenascin expression by tissue microenvironments. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1793**:888–892.
131. Maquart FX, Siméon A, Pasco S, Monboisse JC. [Regulation of cell activity by the extracellular matrix: the concept of matrikines]. *J Soc Biol* 1999; **193**:423–428.
132. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 2010; **141**:52–67.
133. Nabeshima K, Inoue T, Shimao Y, Sameshima T. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol Int* 2002; **52**:255–264.
134. Radisky ES, Radisky DC. Matrix metalloproteinases as breast cancer drivers and therapeutic targets. *Front Biosci Landmark Ed* 2015; **20**:1144–1163.
135. Takeshita S, Kikuno R, Tezuka K, Amann E. Osteoblast-specific factor 2: cloning of a putative bone adhesion protein with homology with the insect protein fasciclin I. *Biochem J* 1993; **294** (Pt 1):271–278.

136. Horiuchi K, Amizuka N, Takeshita S, *et al.* Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor beta. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 1999; **14**:1239–1249.
137. Lindner V, Wang Q, Conley BA, Friesel RE, Vary CPH. Vascular injury induces expression of periostin: implications for vascular cell differentiation and migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; **25**:77–83.
138. Gillan L, Matei D, Fishman DA, Gerbin CS, Karlan BY, Chang DD. Periostin secreted by epithelial ovarian carcinoma is a ligand for alpha(V)beta(3) and alpha(V)beta(5) integrins and promotes cell motility. *Cancer Res* 2002; **62**:5358–5364.
139. Rios H, Koushik SV, Wang H, *et al.* periostin null mice exhibit dwarfism, incisor enamel defects, and an early-onset periodontal disease-like phenotype. *Mol Cell Biol* 2005; **25**:11131–11144.
140. Kudo A. Periostin in fibrillogenesis for tissue regeneration: periostin actions inside and outside the cell. *Cell Mol Life Sci CMLS* 2011; **68**:3201–3207.
141. Conway SJ, Izuhara K, Kudo Y, *et al.* The role of periostin in tissue remodeling across health and disease. *Cell Mol Life Sci CMLS* 2014; **71**:1279–1288.
142. Norris RA, Damon B, Mironov V, *et al.* Periostin regulates collagen fibrillogenesis and the biomechanical properties of connective tissues. *J Cell Biochem* 2007; **101**:695–711.
143. Bao S, Ouyang G, Bai X, *et al.* Periostin potently promotes metastatic growth of colon cancer by augmenting cell survival via the Akt/PKB pathway. *Cancer Cell* 2004; **5**:329–339.
144. Shao R, Bao S, Bai X, *et al.* Acquired expression of periostin by human breast cancers promotes tumor angiogenesis through up-regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2 expression. *Mol Cell Biol* 2004; **24**:3992–4003.
145. Wang X, Liu J, Wang Z, *et al.* Periostin contributes to the acquisition of multipotent stem cell-like properties in human mammary epithelial cells and breast cancer cells. *PLoS One* 2013; **8**:e72962.
146. Morra L, Moch H. Periostin expression and epithelial-mesenchymal transition in cancer: a review and an update. *Virchows Arch Int J Pathol* 2011; **459**:465–475.
147. Cui D, Huang Z, Liu Y, Ouyang G. The multifaceted role of periostin in priming the tumor microenvironments for tumor progression. *Cell Mol Life Sci CMLS* 2017.
148. Malanchi I, Santamaria-Martínez A, Susanto E, *et al.* Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature* 2011; **481**:85–89.
149. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* 2013; **19**:1423–1437.

150. Contié S, Voorzanger-Rousselot N, Litvin J, Clézardin P, Garnero P. Increased expression and serum levels of the stromal cell-secreted protein periostin in breast cancer bone metastases. *Int J Cancer* 2011; **128**:352–360.
151. Quaresima B, Romeo F, Faniello MC, *et al.* BRCA1 5083del19 mutant allele selectively up-regulates periostin expression in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2008; **14**:6797–6803.
152. Puglisi F, Puppini C, Pegolo E, *et al.* Expression of periostin in human breast cancer. *J Clin Pathol* 2008; **61**:494–498.
153. Sutton CW, Rustogi N, Gurkan C, *et al.* Quantitative proteomic profiling of matched normal and tumor breast tissues. *J Proteome Res* 2010; **9**:3891–3902.
154. Sasaki H, Yu C-Y, Dai M, *et al.* Elevated serum periostin levels in patients with bone metastases from breast but not lung cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2003; **77**:245–252.
155. El-Haibi CP, Bell GW, Zhang J, *et al.* Critical role for lysyl oxidase in mesenchymal stem cell-driven breast cancer malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; **109**:17460–17465.
156. Martinez-Outschoorn UE, Balliet R, Lin Z, *et al.* BRCA1 mutations drive oxidative stress and glycolysis in the tumor microenvironment: implications for breast cancer prevention with antioxidant therapies. *Cell Cycle Georget Tex* 2012; **11**:4402–4413.
157. Salem AF, Howell A, Sartini M, Sotgia F, Lisanti MP. Downregulation of stromal BRCA1 drives breast cancer tumor growth via upregulation of HIF-1 α , autophagy and ketone body production. *Cell Cycle Georget Tex* 2012; **11**:4167–4173.
158. Xiao Q, Zhou D, Rucki AA, *et al.* Cancer-Associated Fibroblasts in Pancreatic Cancer Are Reprogrammed by Tumor-Induced Alterations in Genomic DNA Methylation. *Cancer Res* 2016; **76**:5395–5404.
159. Lin H-JL, Zuo T, Lin C-H, *et al.* Breast cancer-associated fibroblasts confer AKT1-mediated epigenetic silencing of Cystatin M in epithelial cells. *Cancer Res* 2008; **68**:10257–10266.
160. Cuiffo BG, Campagne A, Bell GW, *et al.* MSC-regulated microRNAs converge on the transcription factor FOXP2 and promote breast cancer metastasis. *Cell Stem Cell* 2014; **15**:762–774.
161. Bergamaschi A, Tagliabue E, Sørlie T, *et al.* Extracellular matrix signature identifies breast cancer subgroups with different clinical outcome. *J Pathol* 2008; **214**:357–367.
162. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; **7**:131–142.
163. Mani SA, Guo W, Liao M-J, *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008; **133**:704–715.

164. Nieto MA. Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. *Science* 2013; **342**:1234850.
165. Nieto MA, Huang RY-J, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell* 2016; **166**:21–45.
166. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; **119**:1420–1428.
167. Nieto MA. The early steps of neural crest development. *Mech Dev* 2001; **105**:27–35.
168. Shook D, Keller R. Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. *Mech Dev* 2003; **120**:1351–1383.
169. Radisky DC. Epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci* 2005; **118**:4325–4326.
170. Arnoux V, Nassour M, L’Helgoualc’h A, Hipskind RA, Savagner P. Erk5 controls Slug expression and keratinocyte activation during wound healing. *Mol Biol Cell* 2008; **19**:4738–4749.
171. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009; **139**:871–890.
172. Ahmed N, Maines-Bandiera S, Quinn MA, Unger WG, Dedhar S, Auersperg N. Molecular pathways regulating EGF-induced epithelial-mesenchymal transition in human ovarian surface epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; **290**:C1532–1542.
173. Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 2002; **110**:341–350.
174. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 2003; **112**:1776–1784.
175. Kasimir-Bauer S, Hoffmann O, Wallwiener D, Kimmig R, Fehm T. Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in primary breast cancer patients with circulating tumor cells. *Breast Cancer Res BCR* 2012; **14**:R15.
176. Giordano A, Gao H, Anfossi S, *et al.* Epithelial-mesenchymal transition and stem cell markers in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Mol Cancer Ther* 2012; **11**:2526–2534.
177. Barrière G, Riouallon A, Renaudie J, Tartary M, Rigaud M. Mesenchymal and stemness circulating tumor cells in early breast cancer diagnosis. *BMC Cancer* 2012; **12**:114.
178. Sleeman KE, Kendrick H, Ashworth A, Isacke CM, Smalley MJ. CD24 staining of mouse mammary gland cells defines luminal epithelial, myoepithelial/basal and non-epithelial cells. *Breast Cancer Res BCR* 2006; **8**:R7.

179. Takebe N, Warren RQ, Ivy SP. Breast cancer growth and metastasis: interplay between cancer stem cells, embryonic signaling pathways and epithelial-to-mesenchymal transition. *Breast Cancer Res BCR* 2011; **13**:211.
180. Moreno-Bueno G, Peinado H, Molina P, *et al.* The morphological and molecular features of the epithelial-to-mesenchymal transition. *Nat Protoc* 2009; **4**:1591–1613.
181. Massagué J. TGFbeta in Cancer. *Cell* 2008; **134**:215–230.
182. Yang L, Huang J, Ren X, *et al.* Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis. *Cancer Cell* 2008; **13**:23–35.
183. Kingsley LA, Fournier PGJ, Chirgwin JM, Guise TA. Molecular biology of bone metastasis. *Mol Cancer Ther* 2007; **6**:2609–2617.
184. De Wever O, Mareel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol* 2003; **200**:429–447.
185. Pei X-H, Bai F, Smith MD, *et al.* CDK inhibitor p18(INK4c) is a downstream target of GATA3 and restrains mammary luminal progenitor cell proliferation and tumorigenesis. *Cancer Cell* 2009; **15**:389–401.
186. Bai F, Chan HL, Scott A, *et al.* BRCA1 Suppresses Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Stem Cell Dedifferentiation during Mammary and Tumor Development. *Cancer Res* 2014.
187. Bai F, Smith MD, Chan HL, Pei X-H. Germline mutation of Brca1 alters the fate of mammary luminal cells and causes luminal-to-basal mammary tumor transformation. *Oncogene* 2013; **32**:2715–2725.
188. Moody SE, Perez D, Pan T, *et al.* The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence. *Cancer Cell* 2005; **8**:197–209.
189. Tkocz D, Crawford NT, Buckley NE, *et al.* BRCA1 and GATA3 corepress FOXC1 to inhibit the pathogenesis of basal-like breast cancers. *Oncogene* 2012; **31**:3667–3678.
190. Ye X, Weinberg RA. Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. *Trends Cell Biol* 2015.
191. Gort EH, Groot AJ, van der Wall E, van Diest PJ, Vooijs MA. Hypoxic regulation of metastasis via hypoxia-inducible factors. *Curr Mol Med* 2008; **8**:60–67.
192. Mele V, Muraro MG, Calabrese D, *et al.* Mesenchymal stromal cells induce epithelial-to-mesenchymal transition in human colorectal cancer cells through the expression of surface-bound TGF-β. *Int J Cancer J Int Cancer* 2014; **134**:2583–2594.
193. Kabashima-Niibe A, Higuchi H, Takaishi H, *et al.* Mesenchymal stem cells regulate epithelial-mesenchymal transition and tumor progression of pancreatic cancer cells. *Cancer Sci* 2013; **104**:157–164.

194. Martin FT, Dwyer RM, Kelly J, *et al.* Potential role of mesenchymal stem cells (MSCs) in the breast tumour microenvironment: stimulation of epithelial to mesenchymal transition (EMT). *Breast Cancer Res Treat* 2010; **124**:317–326.
195. Yu Y, Xiao C-H, Tan L-D, Wang Q-S, Li X-Q, Feng Y-M. Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF- β signalling. *Br J Cancer* 2014; **110**:724–732.
196. Yan W, Shao R. Transduction of a mesenchyme-specific gene periostin into 293T cells induces cell invasive activity through epithelial-mesenchymal transformation. *J Biol Chem* 2006; **281**:19700–19708.
197. Kim CJ, Sakamoto K, Tambe Y, Inoue H. Opposite regulation of epithelial-to-mesenchymal transition and cell invasiveness by periostin between prostate and bladder cancer cells. *Int J Oncol* 2011; **38**:1759–1766.
198. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; **386**:671–674.
199. Geudens I, Gerhardt H. Coordinating cell behaviour during blood vessel formation. *Dev Camb Engl* 2011; **138**:4569–4583.
200. Desroches-Castan A. Inhibition de l'angiogenèse tumorale: criblage d'une chimiothèque et caractérisation d'un nouveau composé agissant sur la voie de signalisation Ras-ERK. 2014.
201. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011; **473**:298–307.
202. Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2003; **3**:422–433.
203. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; **285**:1182–1186.
204. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; **407**:249–257.
205. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 2005; **307**:58–62.
206. Turner HE, Harris AL, Melmed S, Wass JAH. Angiogenesis in endocrine tumors. *Endocr Rev* 2003; **24**:600–632.
207. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; **9**:653–660.
208. Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, *et al.* Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* 1998; **94**:715–725.
209. Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouyssegur J. Hypoxia and cancer. *J Mol Med Berl Ger* 2007; **85**:1301–1307.

210. Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 1997; **272**:22642–22647.
211. Vaupel P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *The Oncologist* 2004; **9 Suppl 5**:10–17.
212. Yan M, Rayoo M, Takano EA, Thorne H, KConFab Investigators, Fox SB. BRCA1 tumours correlate with a HIF-1alpha phenotype and have a poor prognosis through modulation of hydroxylase enzyme profile expression. *Br J Cancer* 2009; **101**:1168–1174.
213. Futreal PA, Liu Q, Shattuck-Eidens D, *et al.* BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science* 1994; **266**:120–122.
214. Bindra RS, Gibson SL, Meng A, *et al.* Hypoxia-induced down-regulation of BRCA1 expression by E2Fs. *Cancer Res* 2005; **65**:11597–11604.
215. Kang HJ, Kim HJ, Rih J-K, *et al.* BRCA1 plays a role in the hypoxic response by regulating HIF-1alpha stability and by modulating vascular endothelial growth factor expression. *J Biol Chem* 2006; **281**:13047–13056.
216. van der Groep P, van Diest PJ, Smolders YHCM, *et al.* HIF-1 α overexpression in ductal carcinoma in situ of the breast in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *PLoS One* 2013; **8**:e56055.
217. Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, *et al.* Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* 2006; **440**:1222–1226.
218. Mazzeri R, Pucci F, Moi D, *et al.* Targeting the ANG2/TIE2 axis inhibits tumor growth and metastasis by impairing angiogenesis and disabling rebounds of proangiogenic myeloid cells. *Cancer Cell* 2011; **19**:512–526.
219. Qiu F, Shi C, Zheng J, Liu Y. Periostin mediates the increased pro-angiogenic activity of gastric cancer cells under hypoxic conditions. *J Biochem Mol Toxicol* 2013; **27**:364–369.
220. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; **292**:154–156.
221. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; **78**:7634–7638.
222. Doyle A, McGarry MP, Lee NA, Lee JJ. The construction of transgenic and gene knockout/knockin mouse models of human disease. *Transgenic Res* 2012; **21**:327–349.
223. Hockemeyer D, Jaenisch R. Induced Pluripotent Stem Cells Meet Genome Editing. *Cell Stem Cell* 2016; **18**:573–586.

224. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; **282**:1145–1147.
225. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; **126**:663–676.
226. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; **131**:861–872.
227. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; **318**:1917–1920.
228. Courtot A-M, Magniez A, Oudrhiri N, *et al.* Morphological analysis of human induced pluripotent stem cells during induced differentiation and reverse programming. *BioResearch Open Access* 2014; **3**:206–216.
229. Heins N, Englund MCO, Sjöblom C, *et al.* Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio* 2004; **22**:367–376.
230. Gurdon JB, Elsdale TR, Fischberg M. Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. *Nature* 1958; **182**:64–65.
231. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Cloning Stem Cells* 2007; **9**:3–7.
232. Miller RA, Ruddle FH. Pluripotent teratocarcinoma-thymus somatic cell hybrids. *Cell* 1976; **9**:45–55.
233. Lister R, Pelizzola M, Kida YS, *et al.* Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011; **471**:68–73.
234. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; **448**:313–317.
235. González F, Boué S, Izpisua Belmonte JC. Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming à la carte. *Nat Rev Genet* 2011; **12**:231–242.
236. Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2009; **85**:348–362.
237. Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, *et al.* Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 2009; **324**:797–801.
238. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, *et al.* Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 2010; **7**:618–630.
239. Kim D, Kim C-H, Moon J-I, *et al.* Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 2009; **4**:472–476.

240. Zhou W, Freed CR. Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio* 2009; **27**:2667–2674.
241. Bayart E, Cohen-Haguenauer O. Technological overview of iPS induction from human adult somatic cells. *Curr Gene Ther* 2013; **13**:73–92.
242. Cacchiarelli D, Trapnell C, Ziller MJ, et al. Integrative Analyses of Human Reprogramming Reveal Dynamic Nature of Induced Pluripotency. *Cell* 2015; **162**:412–424.
243. Sandt C, Féraud O, Oudrhiri N, et al. Identification of spectral modifications occurring during reprogramming of somatic cells. *PLoS One* 2012; **7**:e30743.
244. Xu Y, Zhang M, Li W, et al. Transcriptional Control of Somatic Cell Reprogramming. *Trends Cell Biol* 2016; **26**:272–288.
245. Ulvestad M, Nordell P, Asplund A, et al. Drug metabolizing enzyme and transporter protein profiles of hepatocytes derived from human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Biochem Pharmacol* 2013; **86**:691–702.
246. Bellin M, Marchetto MC, Gage FH, Mummery CL. Induced pluripotent stem cells: the new patient? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; **13**:713–726.
247. Kamao H, Mandai M, Okamoto S, et al. Characterization of human induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium cell sheets aiming for clinical application. *Stem Cell Rep* 2014; **2**:205–218.
248. Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, et al. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N Engl J Med* 2017; **376**:1038–1046.
249. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968; **6**:230–247.
250. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970; **3**:393–403.
251. Owen M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl* 1988; **10**:63–76.
252. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc* 1991; **9**:641–650.
253. Dennis JE, Merriam A, Awadallah A, Yoo JU, Johnstone B, Caplan AI. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 1999; **14**:700–709.
254. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell* 2008; **2**:313–319.
255. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; **284**:143–147.

256. Crisan M, Yap S, Casteilla L, *et al.* A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 2008; **3**:301–313.
257. Caplan AI. All MSCs are pericytes? *Cell Stem Cell* 2008; **3**:229–230.
258. Simmons PJ, Gronthos S, Zannettino A, Ohta S, Graves S. Isolation, characterization and functional activity of human marrow stromal progenitors in hemopoiesis. *Prog Clin Biol Res* 1994; **389**:271–280.
259. Bensidhoum M, Chapel A, Francois S, *et al.* Homing of in vitro expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment. *Blood* 2004; **103**:3313–3319.
260. Nasef A, Zhang YZ, Mazurier C, *et al.* Selected Stro-1-enriched bone marrow stromal cells display a major suppressive effect on lymphocyte proliferation. *Int J Lab Hematol* 2009; **31**:9–19.
261. Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, Servida F, Lumini C, Deliliers GL. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol* 2002; **30**:783–791.
262. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells Dayt Ohio* 2006; **24**:1294–1301.
263. Jones EA, Kinsey SE, English A, *et al.* Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum* 2002; **46**:3349–3360.
264. Delorme B, Ringe J, Pontikoglou C, *et al.* Specific lineage-priming of bone marrow mesenchymal stem cells provides the molecular framework for their plasticity. *Stem Cells Dayt Ohio* 2009; **27**:1142–1151.
265. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; **8**:315–317.
266. Nixon AJ, Watts AE, Schnabel LV. Cell- and gene-based approaches to tendon regeneration. *J Shoulder Elbow Surg* 2012; **21**:278–294.
267. Song L, Tuan RS. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2004; **18**:980–982.
268. Luzzani CD, Miriuka SG. Pluripotent Stem Cells as a Robust Source of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell Rev* 2017; **13**:68–78.
269. Giuliani M, Oudrhiri N, Noman ZM, *et al.* Human mesenchymal stem cells derived from induced pluripotent stem cells down-regulate NK-cell cytolytic machinery. *Blood* 2011; **118**:3254–3262.

270. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; **105**:1815–1822.
271. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Göbel U, Däubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 2004; **103**:4619–4621.
272. Shi Y, Su J, Roberts AI, Shou P, Rabson AB, Ren G. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol* 2012; **33**:136–143.
273. Giuliani M, Bennaceur-Griscelli A, Nanbakhsh A, et al. TLR ligands stimulation protects MSC from NK killing. *Stem Cells Dayt Ohio* 2014; **32**:290–300.
274. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 2007; **110**:3499–3506.
275. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2003; **31**:890–896.
276. Planat-Benard V, Silvestre J-S, Cousin B, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 2004; **109**:656–663.
277. Hung S-C, Pochampally RR, Chen S-C, Hsu S-C, Prockop DJ. Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. *Stem Cells Dayt Ohio* 2007; **25**:2363–2370.
278. Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells Dayt Ohio* 2007; **25**:2648–2659.
279. Boomsma RA, Geenen DL. Mesenchymal stem cells secrete multiple cytokines that promote angiogenesis and have contrasting effects on chemotaxis and apoptosis. *PloS One* 2012; **7**:e35685.
280. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res* 2004; **94**:678–685.
281. Caplan AI, Correa D. The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell* 2011; **9**:11–15.
282. Alfaro C, Roubey C, Chaaya R, et al. Intraparenchymal injection of bone marrow mesenchymal stem cells reduces kidney fibrosis after ischemia-reperfusion in cyclosporine-immunosuppressed rats. *Cell Transplant* 2012; **21**:2009–2019.
283. Mias C, Lairez O, Trouche E, et al. Mesenchymal stem cells promote matrix metalloproteinase secretion by cardiac fibroblasts and reduce cardiac ventricular fibrosis after myocardial infarction. *Stem Cells Dayt Ohio* 2009; **27**:2734–2743.

284. Liu Z-J, Zhuge Y, Velazquez OC. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 2009; **106**:984–991.
285. Brooke G, Cook M, Blair C, *et al.* Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. *Semin Cell Dev Biol* 2007; **18**:846–858.
286. Yi T, Song SU. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Arch Pharm Res* 2012; **35**:213–221.
287. Gimble JM, Bunnell BA, Casteilla L, Jung JS, Yoshimura K. Phases I-III Clinical Trials Using Adult Stem Cells. *Stem Cells Int* 2011; **2010**:604713.
288. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**:5116–5121.
289. Lê S, Josse J, Husson F. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *J Stat Softw* 2008; **25**:1–18.
290. Zambon AC, Gaj S, Ho I, *et al.* GO-Elite: a flexible solution for pathway and ontology over-representation. *Bioinforma Oxf Engl* 2012; **28**:2209–2210.
291. De Palma M, Biziato D, Petrova TV. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2017; **17**:457–474.
292. Hida K, Hida Y, Amin DN, *et al.* Tumor-associated endothelial cells with cytogenetic abnormalities. *Cancer Res* 2004; **64**:8249–8255.
293. Streubel B, Chott A, Huber D, *et al.* Lymphoma-specific genetic aberrations in microvascular endothelial cells in B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 2004; **351**:250–259.
294. Cuyàs E, Corominas-Faja B, Martín MM-S, *et al.* BRCA1 haploinsufficiency cell-autonomously activates RANKL expression and generates denosumab-responsive breast cancer-initiating cells. *Oncotarget* 2017; **8**:35019–35032.
295. Cuyàs E, Martin-Castillo B, Bosch-Barrera J, Menendez JA. Metformin inhibits RANKL and sensitizes cancer stem cells to denosumab. *Cell Cycle Georget Tex* 2017; **16**:1022–1028.
296. Nolan E, Vaillant F, Branstetter D, *et al.* RANK ligand as a potential target for breast cancer prevention in BRCA1-mutation carriers. *Nat Med* 2016; **22**:933–939.
297. Menendez JA, Folguera-Blasco N, Cuyàs E, Fernández-Arroyo S, Joven J, Alarcón T. Accelerated geroncogenesis in hereditary breast-ovarian cancer syndrome. *Oncotarget* 2016; **7**:11959–11971.
298. Lee D-F, Su J, Kim HS, *et al.* Modeling familial cancer with induced pluripotent stem cells. *Cell* 2015; **161**:240–254.
299. Kim J, Hoffman JP, Alpaugh RK, *et al.* An iPSC line from human pancreatic ductal adenocarcinoma undergoes early to invasive stages of pancreatic cancer progression. *Cell Rep* 2013; **3**:2088–2099.

300. Hadoux J, Féraud O, Griscelli F, *et al.* Generation of an induced pluripotent stem cell line from a patient with hereditary multiple endocrine neoplasia 2A (MEN2A) syndrome with RET mutation. *Stem Cell Res* 2016; **17**:154–157.
301. Telliam G, Féraud O, Griscelli F, *et al.* Generation of an induced pluripotent stem cell line from a patient with chronic myeloid leukemia (CML) resistant to targeted therapies. *Stem Cell Res* 2016; **17**:235–237.
302. Banito A, Gil J. Induced pluripotent stem cells and senescence: learning the biology to improve the technology. *EMBO Rep* 2010; **11**:353–359.
303. Soyombo AA, Wu Y, Kolski L, *et al.* Analysis of induced pluripotent stem cells from a BRCA1 mutant family. *Stem Cell Rep* 2013; **1**:336–349.
304. Amann A, Zwierzina M, Koeck S, *et al.* Development of a 3D angiogenesis model to study tumour - endothelial cell interactions and the effects of anti-angiogenic drugs. *Sci Rep* 2017; **7**:2963.
305. Wang Y, Takeishi K, Li Z, *et al.* Microenvironment of a tumor-organoid system enhances hepatocellular carcinoma malignancy-related hallmarks. *Organogenesis* 2017:1–12.

Autres sources :

- Institut National du Cancer, consulté de mai à septembre 2017.
<http://www.e-cancer.fr/cancerinfo/les-cancers/cancer-du-sein/points-cles>.
- Fondation ARC pour la Recherche sur le cancer, consulté de mai à septembre 2017.
<http://www.fondation-arc.org/Les-cancers-du-sein/les-cancers-du-sein.html>,
- La Ligue contre le cancer, consulté de mai à septembre 2017.
<http://www.ligue-cancer.net/localisation/sein>.
- Haute Autorité de Santé, consulté de mai à septembre 2017.
http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1741170/fr/depistage-du-cancer-du-sein-en-france-identification-des-femmes-a-haut-risque-et-modalites-de-depistage.
- BRCA France, consulté de mai à septembre 2017.
<https://www.brcafrance.fr/>.
- Info Cancer, consulté de mai à septembre 2017.
<http://www.arcagy.org/infocancer/index.html>.

- Recommandations et référentiels : femmes porteuses d'une mutation de BRCA1 ou BRCA2, Avril 2017.
- Guide affection longue durée, Cancer du sein, HAS et INCa, Janvier 2010.
- Guide patient, Les traitements des cancers du sein, Cancer Info, La Ligue et INCa, Octobre 2013.
- OnkoLogiK, consulté de mai à septembre 2017.
http://www.oncologik.fr/index.php/Interregion:Sein_%28principes_de_prise_en_charge%29.

Titre : Etude de l'influence du stroma BRCA1 muté sur les étapes précoces de transformation tumorale dans le modèle du cancer du sein.

Mots clés : cancer du sein, *BRCA1*, cellules souches / stromales mésenchymateuses, microenvironnement, angiogenèse, transition épithélio-mésenchymateuse, cellules souches pluripotentes induites.

Résumé : L'objectif de ce travail a consisté à évaluer le rôle d'un microenvironnement avec une haplo-insuffisance hétérozygote du gène *BRCA1* dans les événements précoces de la transformation tumorale du cancer du sein. Dans ce but, nous avons modélisé un stroma *BRCA1*-muté en utilisant des cellules souches / stromales mésenchymateuses (MSCs) obtenues par différenciation de cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) issues d'une patiente porteuse de la mutation (MSCs *BRCA1*^{+/−}). Ces cellules mutées pour *BRCA1* ont été comparées à des MSCs sans la mutation (MSCs *BRCA1*^{+/+}) générées à partir d'iPSCs *BRCA1*^{+/+}. Ce travail de thèse a porté sur l'influence du stroma *BRCA1*-muté à travers deux axes : le caractère pro-angiogénique des MSCs *BRCA1*^{+/−} et l'induction d'une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) sur des cellules mammaires normales (HME1). Nous montrons que les MSCs *BRCA1*-muté présentent des propriétés pro-angiogéniques significativement augmentées en surexprimant le facteur hypoxique HIF-1α et des facteurs de la famille du VEGF, PDGF et Angpt se traduisant par des capacités augmentées à former des structures vasculaires *in vitro* et *in vivo*. Les MSCs *BRCA1*-muté présentent également des capacités migratoires supérieures en produisant et sécrétant la périostine (POSTN), une protéine de la matrice extracellulaire impliquée dans l'adhésion, la motilité et la migration cellulaires. Ces capacités ont été validées par une approche de siRNA spécifique pour la POSTN. *In vivo*, nous montrons que la co-injection de MSCs *BRCA1*-muté et de cellules malignes mammaires murines (4T1-Luc-GFP) a permis d'augmenter significativement la croissance tumorale et la formation de métastases pulmonaires. Ces résultats sont corrélés avec la détection de la POSTN *in situ* et avec la formation d'un réseau vasculaire tumoral développé, quantifié par marquage du CD34. Par ailleurs nous avons démontré qu'un surnageant de MSCs *BRCA1*^{+/−} peut induire une TEM des cellules HME1 en favorisant l'acquisition d'un phénotype souche cancéreux (CD24^{Low}/CD44^{High}) et en accélérant leur migration. Enfin nous avons initié la production *in vitro* d'organoïdes mammaires en utilisant des MSCs et des HME1 afin d'étudier plus précisément les mécanismes moléculaires de cette TEM après contact et des possibles événements précoces de la transformation maligne. Nos résultats indiquent que les MSCs peuvent participer à l'initiation tumorale et à la progression métastatique dans un contexte d'une mutation hétérozygote du gène *BRCA1*. La POSTN pourrait représenter à la fois un marqueur pronostique mais également une cible thérapeutique pour ces cancers du sein héréditaires.

Title : Influence of BRCA1-mutated stroma on the early steps of the tumoral transformation in the breast cancer model.

Keywords : Breast cancer, *BRCA1*, mesenchymal stem / stromal cells, microenvironment, angiogenesis, epithelial-mesenchymal transition, induced pluripotent stem cells.

Abstract : The aim of this study was to evaluate the role of a *BRCA1* heterozygous haplo-deficient microenvironment in the early events of tumour transformation of breast cancer. For this purpose we modeled a *BRCA1*-mutated stroma using mesenchymal stem / stromal cells (MSCs) obtained by differentiation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) from a patient carrying the mutation (MSCs *BRCA1*^{+/−}). These *BRCA1*-mutated cells were compared to MSCs without the mutation (MSCs *BRCA1*^{+/+}) generated from iPSCs *BRCA1*^{+/+}. This study focuses on two aspects of *BRCA1*-mutated stroma, namely the pro-angiogenic properties of *BRCA1*^{+/−} MSCs and the induction of an epithelial-mesenchymal transition (EMT) on normal breast cells (HME1). We have shown that *BRCA1*-mutated MSCs exhibit enhanced pro-angiogenic properties by overexpressing the hypoxic factor HIF-1α and factors from VEGF, PDGF and Angpt families resulting in increased capacities to form vascular structures *in vitro* and *in vivo*. *BRCA1*-mutated MSCs exhibit also higher migratory capabilities by production and secretion of periostin (POSTN), an extracellular matrix protein, which is involved in cell adhesion, motility and migration. These capacities have been validated by a specific siRNA approach for POSTN. *In vivo*, the coinjection of *BRCA1*-mutated MSCs with murine breast cancer cell line (4T1-Luc-GFP) promotes tumour growth and the formation of lung metastases. These results are correlated with *in situ* POSTN detection and with the formation of a developed tumour vascular network, quantified by CD34 staining. We also demonstrated that supernatant of *BRCA1*^{+/−} MSCs can induce an EMT on HME1 cells by promoting the acquisition of stemness properties (CD24^{Low}/CD44^{High}) and accelerating their migration. Finally we initiated the *in vitro* production of mammary organoids using MSCs and HME1 in order to study more precisely the molecular mechanisms of this EMT after contact and possible early events of the malignant transformation. These results indicate that MSCs can participate to tumour initiation and metastatic progression in heterozygous *BRCA1*-mutated background. POSTN could represent a prognostic marker and a therapeutic target for these hereditary breast cancers.