

UNIVERSITÉ DE LILLE NORD DE FRANCE

LABORATOIRE INSERM U908

THESE DE DOCTORAT

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille (ED-446)

**Etude des mécanismes impliqués dans la
reprogrammation de cellules cancéreuses non-souches en
cellules souches cancéreuses induite par les radiations
ionisantes dans le cancer du sein**

Présentée et soutenue publiquement par

Justine BAILLEUL

Le 5 Juin 2018

Jury

Rapporteurs : Dr Géraldine Guasch-Grangeon

Dr Fabrice Lavial

Examinatrices : Dr Isabelle Van Seuningen

Dr Nathalie Théret

Membre invité : Dr Roland Bourette

Directeurs : Pr Xuefen Le Bourhis

Dr Chann Lagadec

UNIVERSITÉ DE LILLE NORD DE FRANCE

LABORATOIRE INSERM U908

THESE DE DOCTORAT

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille (ED-446)

**Etude des mécanismes impliqués dans la
reprogrammation de cellules cancéreuses non-souches en
cellules souches cancéreuses induite par les radiations
ionisantes dans le cancer du sein**

Présentée et soutenue publiquement par

Justine BAILLEUL

Le 5 Juin 2018

Jury

Rapporteurs : Dr Géraldine Guasch-Grangeon

Dr Fabrice Lavial

Examineurs : Dr Isabelle Van Seuningen

Dr Nathalie Théret

Membre invité : Dr Roland Bourette

Directeurs : Pr Xuefen Le Bourhis

Dr Chann Lagadec

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier l'INSERM et la région Hauts de France pour le financement de mes trois années de thèse. Je remercie également la Fondation ARC ainsi que l'IRCL qui m'ont permis de poursuivre ma thèse en m'apportant un financement supplémentaire.

Je remercie profondément le **Docteur Géraldine Guasch-Grangeon**, le **Docteur Fabrice Lavial**, le **Docteur Isabelle Van Seuningen** et le **Docteur Nathalie Théret** d'avoir accepté de relire et d'évaluer ce travail. Votre participation à mon jury de thèse m'honore beaucoup, et je vous remercie du temps que vous m'accordez. Merci également au **Docteur Roland Bourette** d'avoir accepté mon invitation à participer à ce jury et d'avoir suivi, chaque année, l'avancée de mon projet.

J'aimerais remercier le **Professeur Xuefen Le Bourhis**, directrice du laboratoire INSERM U908, pour m'avoir permis de réaliser d'abord mon master 2 recherche, puis ma thèse au sein du laboratoire. Je vous remercie également pour votre encadrement durant ma thèse et l'intérêt que vous avez toujours porté à mon travail. Enfin, je vous remercie d'avoir partagé vos expériences professionnelles comme personnelles, ces échanges ont été très enrichissants pour moi.

Je remercie ensuite le **Docteur Chann Lagadec** pour son encadrement durant mon master 2 recherche et ma thèse. J'ai beaucoup apprécié ces 5 années et en tant que première doctorante, je pense pouvoir dire que tu as été un très bon directeur de thèse. Travailler avec toi a été très formateur, à tout point de vue. Ton enthousiasme et ta motivation constituent de grands atouts, ils sont communicatifs et profitables à tous au laboratoire. Je te remercie également pour la confiance que tu m'as accordée, essentielle pour la progression de ce projet auquel j'ai été très honorée de participer. Tu m'as fait profiter de ton expérience et de tes connaissances qui ont été et resteront très bénéfiques pour moi dans les années à venir. Pour tout ça, un très grand merci, et bonne chance pour la suite de l'histoire.

Un grand merci à tous les membres de l'équipe, que ce soit à Lille 1 ou à l'IRCL. **Valérie Cendré**, merci pour toute ton aide administrative et le reste ; **Nathalie Z**, merci pour les conseils de bio mol et d'histo ; **Isabelle**, merci pour ton assistance technique, surtout pour les pipettes ; **Véronique H**, merci pour ta bonne humeur quotidienne ! **Eric**, merci pour l'aide dans la manip in vivo, et pour tous les conseils et discussions scientifiques ou non ; **Samuel**, merci de m'avoir toujours bien accueilli lors de mes venues fréquentes à l'IRCL et de m'avoir ouvert les portes de tes labos ; **Robert-Alain**, merci pour votre aide et tous les conseils de manip, surtout en bioch ; **Pierre-Olivier**, **Pamela**, merci pour vos conseils et remarques constructives en réunion ; **Valérie Chopin**, merci pour tes conseils, scientifiques et potagesques ! **Véronique F**, merci pour les discussions voyages qui m'ont fait rêver.

Mélanie A, Nicole, Christine, je ne peux que vous remercier pour tout, vous avez rendu mes allers-retours Lille1-IRCL tellement moins pénibles, et m'avez souvent facilité la vie. Je n'oublierai pas votre bonne humeur. **Samy**, je te remercie également pour ta bonne humeur et ton soutien. Bon courage pour la fin de ta thèse. Je me dois également de remercier **Nathalie J, Emilie F, Emeline, Hélène** et **Emeric** pour toute votre aide sur les tris. Vous avez contribué à la bonne réalisation de ma thèse à un moment ou à un autre et je vous en remercie. **Emmanuel**, je te remercie pour toute ton assistance sur la manip in vivo, qui aurait été nettement moins simple sans toi. Enfin, merci à **Lu** et **Roland** pour votre accueil à l'IBL. J'ai passé de bons moments en congrès avec vous. Lu, bon courage pour la suite, je suis très heureuse d'avoir partagé ces années et ces mêmes épreuves de thèse avec toi. Roland, merci pour tous vos conseils avisés lors des CST. Je vous souhaite le meilleur pour la poursuite de votre projet.

La **CSC team** mérite un paragraphe séparé, pour la bonne ambiance dans le(s) bureau(x), notre magnifique table de pause souvent alimentée pour combler notre appétit, et l'œuvre minionesque qui égaye le bureau. **Nadège**, je te remercie pour tout, j'ai beaucoup aimé travailler avec toi et pas que (tes gâteaux ont aussi pesé dans la balance ;-D). Je te souhaite le plus de réussite possible pour ta thèse, le "big vecteur", les souris. Garde ta motivation et ton sourire ! Continue d'organiser des sorties, ça fait du bien à tout le monde ! **Karine**, je te remercie pour le temps que tu as passé à m'écouter et à me motiver. Tu es autant la chirurgienne que la maman de l'équipe. Travailler avec toi a été très enrichissant et je t'en remercie. Merci également pour ton aide sur la partie cancer du sein ! **Marie D**, j'ai beaucoup apprécié te transmettre ce que je savais, je ne serai plus là pour te demander si tu t'en sors, mais je suis sûre de connaître déjà la réponse ! J'espère que tu décrocheras ta bourse de thèse, que tu mérites. **Jérémy**, merci pour les conseils et coups de main, bon courage pour la suite ! **Ihsan**, ton arrivée a apporté encore un peu de bonne humeur dans l'équipe. Tu as partagé avec moi ton expérience d'ancienne doctorante et tu as su me reconforter en cas de doute. Merci pour tout ça. Je te souhaite le meilleur pour la suite.

J'ai toujours apprécié la cohésion entre tous les doctorants au labo. Continuez à vous soutenir mutuellement, c'est important ! **Bernadette**, je pense ne pas me tromper en disant que tu seras la suivante à soutenir, alors bon courage pour la rédaction et la soutenance ! **Romain**, je n'oublierai pas le rendez-vous du mardi matin, post-Walking Dead, qui était un passage obligé et très appréciable. Garde la pêche et bon courage pour la fin. **Jordan**, merci pour tes astuces dignes de MacGyver et bonne chance pour ta thèse. **Clément**, le blind-test "qu'est ce que Clément est en train de siffler ?" va me manquer. Continue d'imposer Classic 21 au labo ! Bon courage pour ta thèse ! **Quentin**, merci pour tes blagues, continue d'imposer ton style à l'IRCL, ça va percer ! Bon courage pour ta thèse. **Marie W** et **Sarah** : bonne chance pour la fin du M2, j'espère que vous obtiendrez toutes votre bourse. **Martin M**, bon courage également pour ton M2 et la reprise de tes études

de médecine. Merci également à tous les stagiaires qui sont passés par là et qui ont participé, chacun à leur manière, à la bonne entente de tous !

J'aimerais aussi remercier **Mélanie L** et **Simon**, je suis très heureuse d'avoir croisé votre route à la fac et d'avoir ensuite partagé cette aventure avec vous. Mélanie, tous mes tris à l'IRCL m'ont paru moins longs grâce à toi et à ta bonne humeur, qui a résisté à toutes les épreuves. Je vous souhaite le meilleur à Stockholm, personnellement et professionnellement, profitez-en bien !

Barbara, je retiendrai tes coiffures impressionnantes, ton rire tellement communicatif, nos encouragements mutuels pendant le M2 et après, et surtout toutes nos discussions à propos de tout. On a (très) souvent été sur la même longueur d'onde, et c'était toujours rassurant de discuter avec toi ! Mes 3 ans et quelques mois de thèse ainsi que le M2 n'auraient clairement pas été les mêmes sans toi, alors merci. On l'a fait et on peut être fières de nous ;-) Je te souhaite le meilleur pour la suite, quelle qu'elle soit.

Merci aussi à toutes les personnes qui sont parties du labo. **Léo**, tu as été un excellent formateur. Tu m'as appris beaucoup de choses et tous tes conseils se sont avérés utiles, sur les manips et sur la vie au labo. Merci pour tout. **Matthieu**, l'ex-pilier du labo. Merci pour tous tes conseils et tout le temps que tu as passé à écouter mes plaintes. Tu m'as souvent remotivée et je n'oublierai pas non plus nos discussions farfelues, ni ton "protocole en 3 étapes". **Constance**, ton arrivée au labo a été très bénéfique. Tu t'es toujours comportée en grande sœur prête à tout pour nous motiver et remonter le moral. Merci aussi pour tes conseils techniques. **Sophie**, j'ai beaucoup aimé travailler avec toi. Toujours partante pour aller boire un verre, ta bonne humeur était contagieuse au labo. Je retiendrai surtout la galette des rois ! Enfin, merci aux internes médecins passés par là, et tout particulièrement **Raphaëlle**. Tu m'as beaucoup aidé l'année du M2 et j'ai appris à relativiser, "c'est pas grave". J'espère encore un peu te croiser dans les couloirs du COL. Merci aussi à **Geoffrey**, **Thomas L**, **Thomas B** et **Samia** pour avoir apporté un autre point de vue au laboratoire !

Un merci spécial à tous mes "vieux" amis : non pas que vous êtes vieux, mais ça commence à faire un bout de temps, et vous êtes toujours là. Vous avez soigné mon asociabilité des derniers mois de thèse en me faisant sortir de cette bulle, et je vous en remercie tous : **Aline**, **Caroline**, **Estelle**, **Hugo**, **Prishan**, **Kritish**, **Alice**, **Tanguy**, **Déborah**, **Martin L**, **Méline**, **Loïck** ! Merci pour les soirées, les sorties, les discussions et tous les bons moments passés ensemble. **Aline**, je te souhaite d'avoir enfin le boulot de tes rêves à Tokyo. Merci pour ton accueil à Londres ! **Caroline**, merci pour tout, tu as depuis très longtemps été une oreille attentive en plus d'une très très bonne amie et tu le restes encore maintenant. **Estelle**, **Hugo**, votre amitié est essentielle et malgré les inquiétudes, l'éloignement n'y changera rien. Estelle, merci pour tout ce yoga, le petit échappatoire hebdomadaire (ou presque). Hugo, non, une

bonne fois pour toute, je n'ai pas travaillé sur les zebrafish. **Prishan**, reste toi-même, tu es unique et sans toi notre groupe d'amis ne serait pas le même. Faudra quand même que tu te connectes un peu plus souvent pour nous donner de tes nouvelles ! Je n'ai pas de mots pour vous dire à tous ma reconnaissance pour votre soutien et je vous souhaite à tous le meilleur ! On a hâte de tous vous accueillir chez nous à l'autre bout du monde.

Ma famille a été d'un soutien inconditionnel et je vous remercie pour ça. **Maman** et **Papa**, vous m'avez aidée à relativiser et vous m'avez encouragée quand j'en ai eu besoin, en particulier ces derniers mois. Merci de m'avoir laissé suivre ma voie, d'avoir cru en moi et de m'avoir apporté votre soutien. Merci aussi pour vos relectures ! **Steph, Julien**, vous avez supporté mes plaintes fréquentes et l'arrivée de **Ninon** a été un réconfort et un petit rayon de soleil en Octobre. Merci à tous les trois ! **Cécile, Sébastien, Eloïse, Elanor**, je vous remercie pour les escapades haut-marnaises qui m'ont toujours fait du bien et qui me manqueront. A vous tous de venir chez nous quand nous serons partis pour nos prochaines aventures !

Je remercie également toute ma **belle-famille**. Mention spéciale pour **Emilie** et **Emeric**, bénéficiaire de votre expérience a été essentiel pour moi. Emeric, c'est par ton intermédiaire que j'ai trouvé mon stage de M2, donc encore merci ! J'espère aussi vous voir tous où que nous soyons, dans les prochains mois.

Enfin, last but not least, **Axel**, je te remercie pour tout ce que tu as fait pour moi depuis 9 ans, et particulièrement pendant ces 4 dernières années. Tu as compris ce que représentait pour moi la réalisation de ma thèse, et tu en as accepté les conditions. Tu m'as toujours poussée et encouragée, tu m'as aidée à ne pas baisser les bras dans les moments difficiles, surtout les derniers mois. Tu as aussi été là pour me faire faire des pauses quand j'en ai eu besoin. Pour tout ça, je te remercie énormément. La préparation de notre mariage, ainsi que le mariage lui-même pendant la thèse a été une bouffée d'air. Merci de partager ma vie, et vivement que se concrétise notre projet de vivre à l'étranger ! (Sinon, on retourne quand en Islande ?!)

RESUME

L'identification des cellules souches cancéreuses (CSC) dans les tumeurs hématologiques et solides a donné naissance à de nombreuses études fondamentales et translationnelles. Cependant, des études récentes démontrent l'existence d'une plasticité des cellules cancéreuses. En effet, les cellules cancéreuses non souches (non-CSC) différenciées peuvent générer des CSC en réponse à divers stimuli (chimiothérapie, radiothérapie, hypoxie...). Ainsi, la radiothérapie entraîne l'induction de CSC à partir de non-CSC, *in vitro*. Cette reprogrammation pourrait participer aux résistances aux traitements, accroître le risque de récives et intervenir dans le développement métastatique. Malgré tout, les mécanismes à l'origine de la reprogrammation demeurent méconnus, et il apparaît essentiel d'identifier des cibles thérapeutiques pour prévenir l'apparition de CSC.

Dans le cadre de ma thèse, j'ai mis en évidence que le milieu conditionné de non-CSC irradiées induit la reprogrammation en CSC de cancer du sein. J'ai pu observer par puce à protéines et test ELISA que l'irradiation entraîne la sécrétion spécifique de chimiokines, dont CXCL1 et CCL5. Le rôle de ces chimiokines dans la reprogrammation a été étudié par traitement à l'aide de protéines recombinantes et d'anticorps neutralisants, ainsi que par des inhibiteurs pharmacologiques ciblant les récepteurs. Ces expériences ont permis de montrer l'implication de CXCL1, CCL5 et leurs récepteurs dans la reprogrammation *in vitro*. De plus, l'inhibition *in vivo* de CXCL1 et CCL5, combinée à la radiothérapie dans un modèle murin de xénogreffes induit une augmentation de la survie. Pour finir, l'étude, à partir des bases de données cliniques issues d'analyses transcriptomiques, montre que l'expression des chimiokines et de leurs récepteurs est corrélée à des signatures de CSC, de sous-types plus agressifs dans le cancer du sein, et à une survie sans métastases diminuée.

L'ensemble de mes résultats indique donc un rôle des chimiokines dans la reprogrammation de non-CSC en CSC et qu'elles peuvent constituer des cibles thérapeutiques intéressantes, en combinaison avec les traitements traditionnels.

ABSTRACT

Cancer stem cells (CSCs) identification in hematologic and solid tumors has paved the way to many fundamental and translational studies. However, recent studies have highlighted cancer cells plasticity. Indeed, differentiated non-cancer stem cells (non-CSCs) can generate CSCs upon various stimuli (chemotherapy, radiotherapy, hypoxia...). In particular, radiotherapy induces CSCs from non-CSCs, *in vitro*, that are similar to pre-existing CSCs. This reprogramming could be involved in treatments resistance, recurrence risk and metastatic development. Nevertheless, reprogramming mechanisms remain unknown, and identification of new therapeutic targets seems essential to prevent CSC emergence.

During my PhD thesis, I have shown that conditioned media of irradiated non-CSCs induces CSC reprogramming in breast cancer. By protein arrays and ELISA assays, I have demonstrated that irradiation lead to specific chemokines secretion, such as CXCL1 and CCL5. To study chemokines involvement in reprogramming, I performed recombinant proteins and neutralizing antibodies treatments, as well as pharmaceutical inhibitors treatments targeting chemokines receptors. These experiments allowed me to demonstrate the involvement of CXCL1, CCL5 and their receptors in *in vitro* reprogramming. Moreover, *in vivo* inhibition of CXCL1 and CCL5, combined with radiotherapy, lead to an increased survival, in a xenografted mouse model. Finally, transcriptomic analysis from clinical databases has shown that chemokines and receptors expression correlated with CSC signatures and more aggressive breast cancer subtypes, as well as a decreased metastasis-free survival.

Altogether, these findings denote the involvement of chemokines in non-CSCs reprogramming into CSCs in breast cancer, and the potential of chemokines to constitute new therapeutics targets, in combination with conventional anti-cancer treatments.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	1
RESUME	5
ABSTRACT	7
SOMMAIRE	9
TABLE DES ILLUSTRATIONS	15
<i>FIGURES</i>	15
<i>TABLEAUX</i>	18
ABREVIATIONS ET ACRONYMES	19
INTRODUCTION	25
I. Le cancer du sein	25
A. Généralités sur la glande mammaire	25
1. Anatomie et histologie	25
2. Développement de la glande mammaire	27
3. Cellules souches mammaires	28
B. Généralités sur le cancer du sein	30
1. Epidémiologie	30
2. Etapes du développement de la tumeur mammaire	33
3. Mécanismes de la tumorigenèse mammaire	34
a. Altérations génétiques	35
b. Modifications épigénétiques	36
c. Influence du microenvironnement tumoral et du système immunitaire	37
C. Hétérogénéité des tumeurs mammaires	39
1. Différentes entités cliniques	40
2. Classifications	41
a. Classification clinique : stade TNM (Tumor / Nodes / Metastasis)	41
b. Classification anatomopathologique	42
c. Classification moléculaire	42
D. Thérapies anti-cancéreuses	44
1. Schéma thérapeutique classique	44
2. Radiothérapie et radiobiologie	47
a. Effets de la radiothérapie	48
b. Voies de résistance à la radiothérapie	50

II. Les cellules souches cancéreuses	51
A. Propriétés des cellules souches normales	51
1. Potentialité des cellules souches	51
2. Auto-renouvellement	52
3. Facteurs et voies de signalisation associés aux cellules souches	53
a. Facteurs associés à la pluripotence	53
b. Voies de signalisation	55
B. Les cellules souches cancéreuses	57
1. Historique et définition	57
2. Modèles de développement et origines du cancer	58
a. Modèle de développement stochastique	58
b. Modèle de développement hiérarchique	59
c. Modèle de plasticité cellulaire	61
3. Marqueurs et isolement des CSC	61
a. Marqueurs de surface	61
b. Activité enzymatique de l'ALDH - test Aldefluor	62
c. Exclusion de colorants vitaux - Side population	63
d. Activité faible du protéasome	63
e. Capacité de formation de sphères	64
f. Tumorigénicité <i>in vivo</i>	64
4. La niche des CSC	65
a. Communication intercellulaire	65
b. Rôle de la MEC	66
c. Hypoxie et angiogenèse	67
C. CSC et thérapies anti-cancéreuses classiques	68
1. Résistance aux thérapies	68
a. Chimiorésistance	68
b. Radiorésistance	69
2. Mécanismes de résistance	69
2. Ciblage thérapeutique des CSC	73
III. Plasticité des cellules cancéreuses et reprogrammation	75
A. Plasticité des cellules normales	75
B. EMT et CSC : plasticité des cellules cancéreuses	76

1. La transition épithélio-mésenchymateuse	76
2. Lien entre l'EMT et les CSC	76
C. Reprogrammation et conversion de non-CSC en CSC	79
1. Conditions d'induction de la reprogrammation	79
a. Reprogrammation radio-induite	79
b. Reprogrammation chimio-induite	81
2. Mécanismes à l'origine de la reprogrammation	82
a. Facteurs et voies de signalisation propres aux cellules souches	82
b. Mécanismes épigénétiques	82
c. Métabolisme cellulaire	83
d. Rôle de l'hypoxie	83
e. Axe IL-6/NF- κ B	84
IV. Les chimiokines	87
A. Généralités sur les chimiokines et leurs récepteurs	87
1. Les chimiokines : structure et classification	87
2. Les récepteurs de chimiokines	91
a. Structure et classification	91
b. Activation et mode d'action des récepteurs	93
c. Rôles physiologiques des chimiokines	96
B. Rôles des chimiokines et leurs récepteurs dans la biologie du cancer	96
1. Les chimiokines : des facteurs pronostiques du cancer	97
2. Rôles dans la tumorigenèse	102
a. Microenvironnement tumoral	102
b. Progression tumorale et angiogenèse	103
c. Métastases	105
d. Résistances	106
C. Implication des chimiokines dans la régulation des CSC mammaires	108
1. CXCR4, marqueur de CSC potentiel	108
2. Soutien et enrichissement des CSC	109
a. CXCL12/CXCR4/CXCR7	109
b. CXCL10/CXCR3	110
c. CXCL7/CXCR1/CXCR2	110
d. CXCL8/CXCR1/CXCR2	111

e. CCL2/CCR2	112
f. CCL5/CCR1/CCR3/CCR5	113
g. CCL19/CCL21/CCR7	113
CONTEXTE ET OBJECTIFS DE LA THESE	117
MATERIEL & METHODES	121
RESULTATS	135
I. Etude du milieu conditionné : effets et analyse du contenu	135
A. Effets du milieu conditionné sur la reprogrammation	135
B. Analyse du contenu du milieu conditionné	140
II. Etude du rôle des chimiokines	144
A. Etude de l'effet du traitement aux chimiokines recombinantes	144
B. Etude de l'effet de l'inhibition de CXCL1 et CCL5	146
III. Etude du rôle des récepteurs de chimiokines	149
A. Analyse de l'expression des récepteurs de chimiokines	149
B. Etude de la capacité de reprogrammation selon l'expression des récepteurs CCR1, CXCR2 et CXCR3	155
C. Etude de la cinétique d'expression des récepteurs CCR1, CXCR2 et CXCR3	163
D. Etude de la capacité de reprogrammation en fonction de l'expression du récepteur CCR5	167
E. Etude de l'inhibition pharmacologique des récepteurs CCR1, CCR5, CXCR2 et CXCR3	170
IV. Etude in vivo de l'effet de l'inhibition de CXCL1 et CCL5	173
A. Etablissement de la lignée SUM159PT-LUC et injections en souris	173
B. Suivi du volume tumoral	175
C. Evaluation de la survie et du bien-être des souris	179
D. Etude de l'enrichissement en CSC dans les xéno greffes	181
E. Etude de la survenue de métastases dans les souris xéno greffées	187
V. Corrélations cliniques des chimiokines et leurs récepteurs dans le cancer du sein	189
A. Etude de la corrélation entre l'expression de chimiokines et leurs récepteurs et des signatures géniques dans le cancer du sein	189
B. Etude de la corrélation entre l'expression de chimiokines et leurs récepteurs et la survie sans métastases dans le cancer du sein	199
VI. Résultats complémentaires et préliminaires	205
A. Sécrétion de chimiokines par les CSC ALDH+	205

B. Implication des vésicules extracellulaires dans la reprogrammation	208
DISCUSSION & PERSPECTIVES	215
I. Mise en place de l'étude de la reprogrammation	216
II. Reprogrammation radio-induite : rôle des chimiokines et de leurs récepteurs	218
1. Rétro-contrôle des cellules ALDH+ par les chimiokines ?	218
2. Expression des récepteurs et population reprogrammable	219
3. Identification de voies de signalisation impliquées dans la reprogrammation	221
4. Rôle potentiel de la sénescence	222
III. Potentiel thérapeutique du ciblage de la reprogrammation	223
1. Croissance tumorale	223
2. Survie sans métastases	225
3. Enrichissement en CSC	226
IV. Perspectives - Les vésicules extracellulaires, inducteurs potentiels de la reprogrammation	228
V. Perspectives - Rôle du stress oxydant dans la biologie des CSC et dans la reprogrammation	230
BIBLIOGRAPHIE	237
ANNEXE 1	279
ANNEXE 2	280
ANNEXE 3	300

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

Figure 1. Anatomie de la glande mammaire.	25
Figure 2. Histologie de la glande mammaire.	26
Figure 3. Evolution de la glande mammaire au cours de la vie.	28
Figure 4. Modèle de la hiérarchie cellulaire de l'épithélium mammaire.	30
Figure 5. Evolution de l'incidence et de la mortalité par cancer du sein de 1980 à 2012 en France.....	31
Figure 6. Etapes de la cancérisation d'un épithélium canalaire mammaire.	33
Figure 7. Histologie des principales formes cliniques de cancer du sein.	41
Figure 8. Courbes de survie associées aux différents sous-types moléculaires de cancer du sein.	43
Figure 9. Schéma thérapeutique classique pour le traitement du cancer du sein non métastatique.	46
Figure 10. Origine et potentialité des cellules souches embryonnaires et adultes.	52
Figure 11. Modèles de développement tumoral.	59
Figure 12. Hiérarchie épithéliale mammaire normale et cancéreuse.	60
Figure 13. Interaction et adaptation de la niche pour les CSC.	66
Figure 14. Mécanismes de résistance des CSC aux thérapies anti-cancéreuses conventionnelles.	72
Figure 15. Modèle de plasticité des CSC.	78
Figure 16. Mécanismes inducteurs de la reprogrammation.	85
Figure 17. Représentation de la structure des chimiokines.	87
Figure 18. Réseau des chimiokines et de leur(s) récepteur(s).	91
Figure 19. Structure d'un récepteur de chimiokines et signalisation induite par la fixation du ligand.	94
Figure 20. Rôle des chimiokines dans la progression tumorale.	106
Figure 21. Rôle des chimiokines dans le maintien et l'enrichissement des CSC mammaires au sein du microenvironnement tumoral.	111
Figure 22. Protocole de traitement au milieu conditionné (CM).	122
Figure 23. Protocole de traitement des souris SCID.	131
Figure 24. Induction de CSC après radiothérapie et traitements au milieu conditionné.	138
Figure 25. Induction de CSC ZsGreen-cODC+ après radiothérapie.....	139

Figure 26. Sécrétion de chimiokines et de cytokines induite par la radiothérapie. ..	141
Figure 27. Validation de la sécrétion de chimiokines après irradiation.	143
Figure 28. Effets de traitements aux chimiokines sur l'induction de CSC.	145
Figure 29. Effets doses de CXCL1, CCL19 et CCL5 sur l'induction de CSC.	145
Figure 30. Effet de l'inhibition de CXCL1 et CCL5 sur l'induction de CSC.	148
Figure 31. Expression membranaire des récepteurs de chimiokines en fonction du marqueur ALDH après irradiation dans les SUM159PT.	151
Figure 32. Expression membranaire des récepteurs de chimiokines en fonction du marqueur ALDH dans les MDA-MB-231 et HCC70.	153
Figure 33. Expression membranaire des récepteurs de chimiokines en fonction du marqueur ALDH dans les MDA-MB-231 et HCC70 après irradiation.	154
Figure 34. Etude de la capacité de reprogrammation des cellules exprimant ou non les récepteurs de chimiokines d'intérêt.	156
Figure 35. Protocole de tri des cellules SUM159PT WT et Stb+ pour l'évaluation du rôle des récepteurs de chimiokines dans la reprogrammation.	158
Figure 36. Etude de la capacité de reprogrammation des différents mix de populations selon l'expression des récepteurs de chimiokines CCR1, CXCR2 et CXCR3.	159
Figure 37. Suivi des cellules Stb+ et Stb- après irradiation dans les sphères, jusqu'à 3 générations.	161
Figure 38. Contrôle de la croissance en conditions adhérentes ou non des deux lignées SUM159PT.	162
Figure 39. Evolution de l'expression membranaire de CCR1, CXCR2 et CXCR3 dans les populations ALDH+ et ALDH-, dans les cellules triées CCR1- CXCR2- CXCR3- ALDH- après irradiation.	164
Figure 40. Evolution de l'expression membranaire de CCR1, CXCR2 et CXCR3 dans la population ALDH+, dans les cellules triées CCR1- CXCR2- CXCR3- ALDH- après irradiation.	166
Figure 41. Etude du récepteur CCR5 dans la reprogrammation.	169
Figure 42. Effet de l'inhibition des récepteurs de chimiokines CCR1, CCR5, CXCR2 et CXCR3 sur la reprogrammation radio-induite.	172
Figure 43. Contrôle des SUM159PT transfectées pGL4-Luciférase.	174
Figure 44. Evolution du volume tumoral dans les différents groupes de souris traitées.	177
Figure 45. Suivi de l'activité luciférase dans les xénogreffes avant et après traitements.	178

Figure 46. Effet de l'inhibition de CXCL1 et/ou CCL5 sur la survie des souris xénotransplantées.	180
Figure 47. Effet de l'inhibition de CXCL1 et/ou CCL5 sur le poids des souris xénotransplantées.	180
Figure 48. Proportion de CSC ALDH+ dans les xénotransplantées, 7 et 14 jours après le début des traitements.	182
Figure 49. Proportion de cellules OCT4+, SOX2+ et NANOG+ dans les xénotransplantées, 7 et 14 jours après le début des traitements.	185
Figure 50. Expression des gènes OCT4, SOX2, NANOG et ALDH1A1 dans les xénotransplantées, en fonction des différents traitements.	186
Figure 51. Classification hiérarchique d'échantillons de cancer du sein en fonction de l'expression de chimiokines et leurs récepteurs.	192
Figure 52. Matrice de corrélation de l'expression des chimiokines et de leurs récepteurs.	193
Figure 53. Classification hiérarchique d'échantillons de cancer du sein en fonction de l'expression génique des chimiokines et récepteurs d'intérêt.	195
Figure 54. Association entre le profil CD44+/CD24- et l'expression des chimiokines et récepteurs d'intérêt.	196
Figure 55. Association entre le profil CD44+/CD24- et la co-expression de couples chimiokine-récepteur d'intérêt.	198
Figure 56. Survie sans métastase selon l'expression de CXCL1 dans différents sous-types de cancer du sein.	201
Figure 57. Survie sans métastase selon l'expression de CXCR2 dans différents sous-types de cancer du sein.	201
Figure 58. Survie sans métastase selon l'expression de CCL5 dans différents sous-types de cancer du sein.	202
Figure 59. Survie sans métastase selon l'expression de CCR1 dans différents sous-types de cancer du sein.	202
Figure 60. Survie sans métastase selon l'expression de CCR5 dans différents sous-types de cancer du sein.	203
Figure 61. Survie sans métastase selon l'expression de couples de chimiokines et récepteurs.	204
Figure 62. Evolution de la population ALDH+ après le tri.	207
Figure 63. Etude du contenu du milieu conditionné de cellules ALDH+.	207
Figure 64. Etude du rôle des VEC dans la reprogrammation de non-CSC en CSC.	209
Figure 65. Etude préliminaire de l'absorption des VEC par les non-CSC traitées.	212

Figure 66. Mécanismes impliqués dans la reprogrammation radio-induite de non-CSC mammaires en CSC.233

TABLEAUX

Tableau 1. Evolution de l'incidence et de la mortalité par cancer du sein en France de 1980 à 2012.	31
Tableau 2. Principaux facteurs de risque du cancer du sein.	32
Tableau 3. Classification moléculaire des sous-types de cancers du sein.	44
Tableau 4. Expression de marqueurs de surface spécifiques de CSC dans différents cancers.	62
Tableau 5. Reprogrammation de non-CSC en CSC dans différents cancers.	80
Tableau 6. Liste des chimiokines et leurs récepteurs, chez l'Homme et rôle normal dans le système immunitaire.	88
Tableau 7. Les chimiokines et leurs récepteurs en tant que facteurs de mauvais pronostic dans le cancer.	101
Tableau 8. Liste des amorces utilisées en qPCR.	126
Tableau 9. Expression membranaire des récepteurs de chimiokines.	150
Tableau 10. Nombre de métastases détectées dans différents organes selon le groupe de traitement.	188
Tableau 11. Caractéristiques clinicopathologiques des échantillons de patientes atteintes de cancer du sein.	190

ABREVIATIONS ET ACRONYMES

A

ABC : ATP binding cassette
AC : Adénylate cyclase
ACKR : Atypical chemokine receptor
AhR : Aryl hydrocarbon receptor
ALDH : Aldéhyde déshydrogénase
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
ANOVA : Analysis of variance
AR : Résistance à l'anoïkis
ATM : Ataxia-telangectasia mutated
ATR : Ataxia-telangectasia and rad3 related

B

BAAA : BODIPY-aminoacetaldehyde
BCL-2 : B-cell lymphoma 2
BER : Base excision repair
Bq : Becquerel
BRCA1/2 : BReast CAncer 1/2
BSA : Bovine serum albumine

C

CAF : Cancer associated fibroblast
CCI : Carcinome canalaire invasif
CCIS : Carcinome canalaire in situ
CCL : C-C motif ligand
CCND1 : Cyclin D1
CCR : C-C motif receptor
CDKN2A : Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CHK1/2 : Checkpoint kinase 1/2
CK : Cytokératine
CLIS : Carcinome lobulaire in situ
CM : Milieu conditionné
cODC : extrémité c-terminale de l'ornithine décarboxylase
CSC : Cellule souche cancéreuse
CXCL : C-X-C motif ligand
CXCR : C-X-C motif receptor

D

DEAB : Diethylaminobenzaldehyde
Dil : Di-alkyl indocarbocyanine
DLL : Delta-like ligand
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DSF : Disulfirame
DZNep : 3-déazaneplanocine A

E

EDTA : Éthylène diamine tétra-acétique
EGF : Epidermal growth factor
EGFR : EGF receptor
ELISA : Enzyme-linked immunosorbant assay
ELR : motif Glu-Leu-Arg
EMT : Epithelio-mesenchymal transition
EpCAM : Epithelial cell adhesion molecule
EphA4 : Ephrin type-A receptor 4
ER : Estrogen receptor
ERB-B2 : Erythroblastosis oncogene B2
ERK : Extracellular signal-regulated kinase
ESA : Epithelial surface antigen
ESC : Embryonic stem cell
EZH2 : Enhancer of zeste homolog 2

F

FAC : Fluorouracil-adriamycin-cytoxan
FAK : Focal adhesion kinase
FGF : Fibroblast growth factor
FOXO3A : Forkhead box protein O3

G

GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GDP : Guanosine diphosphate
GLI : Glioma-associated oncogene
GPCR : G-protein coupled receptor

GRK : G protein receptor kinase
GSH : Glutathion
GSI : Gamma-secretase inhibitor
GTP : Guanosine triphosphate
Gy : Gray

H

HCA : Hyperplasie canalaire atypique
HDAC : Histone déacétylase
HER2 : Human epidermal growth factor receptor 2
HES : Hairy and enhancer of split
HEY : Hairy/enhancer of split related with YRPW motif protein 1
HGF : Hepatocyte growth factor
Hh : Hedgehog
HIF : Hypoxia inducible factor
HMG : High mobility group

I

iCSC : Induced cancer stem cell
IGF-1 : Insulin-like growth factor-1
IL : Interleukine
IP3 : Inositol triphosphate
iPSC : Induced pluripotent stem cell

J

JAK : Janus kinase

K

KLF4 : Krüppel-like factor 4
KO : Knock out

L

LAM : Leucémie aigüe myéloïde
LEF : Lymphoid enhancer factor
Lgr5 : Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5
LIF : Leukemia inhibitory factor
Lin : Lineage

LRP5/6 : Low-density lipoprotein-related receptor proteins 5/6

M

MAPK : Mitogen-activated protein kinases
MaSC : Mammary stem cells
MDGF-1 : Mammary-derived growth factor-1
MEC : Matrice extracellulaire
MEK :MAPK kinase
MET : Mesenchymo-epithelial transition
MFS : Metastasis free survival
miR : micro-ARN
mL : mature Luminal
MMP : Matrix metalloproteinase
MSC : Cellule souche mésenchymateuse
MYC : Myelocytomatosis oncogene

N

NFkB : Nuclear factor kappa B
NGF : Nerve growth factor
NHEJ : Non-homologous end joining
NKT : cellule T natural killer
non-CSC : Cellule non souche cancéreuse

O

OCT4 : Octamer-binding transcription factor 4

P

PARP : Poly-ADP ribose polymerase
PBS : Phosphate-buffered saline
PcG : Polycomb group
PDX : Patient Derived Xenograft
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
PKA : Protein kinase A
PKC : Protein kinase C
pL : progenitor Luminal
PLC : phospholipase C

POU5f1 : POU domain, class 5, transcription factor 1
PR : Progesteron receptor
PTC : Patched
PTEN : Phosphatase and TENsub homolog

R

Rb : Retinoblastoma protein
ROS : Reactive Oxygen Species

S

s-SHIP : SH2-containing inositol 5'-phosphatase
SASP : Senescence associated secretory phenotype
SBR : Scardd-Bloom-Richardson
SCID : Severe combined immuno deficiency
SFC : Sphere forming capacity
SMO : Smoothened
SOD : Superoxyde dismutase
SOX2 : Sex determining region Y-box 2
SSC : Somatic stem cell
STAT : Signal transducers and activators of transcription
Stb : Strawberry
Sv : Sievert
SVF : Sérum de veau foetal

T

TAM : Tumor associated macrophages
TCF : T-cell factor
TGF- α/β : Transforming growth factor- α/β
TNBC ou TN : Triple-negative breast cancer
TNM : Tumor / Nodes / Metastasis
TP53 : Tumor protein 53
Tspan8 : Tetraspanin-8

U

UTDL : Unité terminale ducto-lobulaire

V

VADS : Cancers des voies aérodigestives supérieures
VEC : Vésicule extracellulaire
VEGF : Vascular endothelial growth factor

W

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

Z

ZEB1 : Zinc-finger E-box binding homeobox-1

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I. Le cancer du sein

A. Généralités sur la glande mammaire

1. Anatomie et histologie

Le sein est une glande exocrine, de type tubulo-alvéolaire, retrouvée chez tous les mammifères et assurant la sécrétion de lait chez la femme suite à l'accouchement. Il est formé de peau, de tissu fibro-glandulaire et de tissu adipeux, et repose sur les muscles pectoraux. Son intégrité est assurée par la présence de crêtes fibro-glandulaires de Duret, reliées au derme par des ligaments suspenseurs de Cooper. Au niveau de la peau, on appelle aréole la zone entourant le mamelon, constitué d'un épiderme fin et pigmenté. Cette zone contient des glandes sébacées, appelées glandes de Morgagni, qui s'hypertrophient lors de la grossesse, et prennent alors le nom de tubercules de Montgomery.

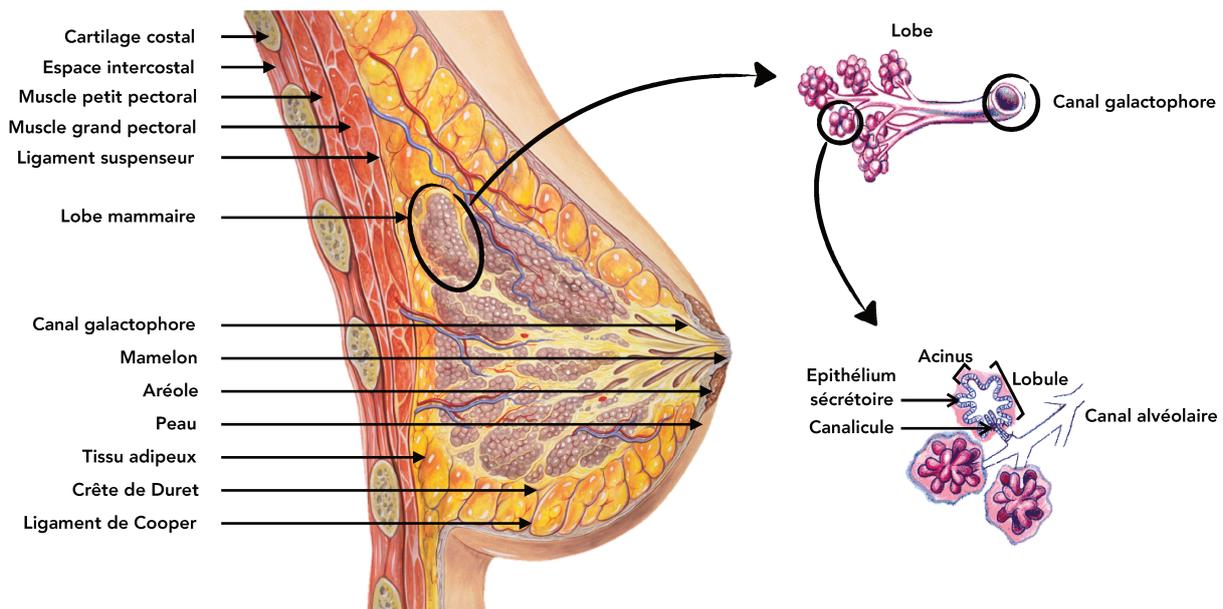


Figure 1. Anatomie de la glande mammaire.

Représentation schématique d'une coupe sagittale de sein et de la paroi thoracique antérieure. La glande mammaire est formée de tissu fibro-glandulaire et de tissu adipeux, reposant sur les muscles pectoraux. L'intégrité de la glande est préservée grâce aux crêtes de Duret liées au derme via les ligaments de Cooper. La glande est composée d'une vingtaine de lobes, divisés en 20 à 40 lobules, eux-mêmes sous-divisés en 10 à 100 acini. Le canal galactophore conduit le lait jusqu'au mamelon et se ramifie en canal alvéolaire puis en canalicule jusqu'aux acini. (Adapté de Medical Illustrations by Patrick J. Lynch et du centre de sénologie des coteaux www.centredescoteaux.be)

La glande mammaire est composée d'une vingtaine de lobes, séparés par des travées conjonctives interlobulaires et enfouis dans du tissu graisseux. Chaque lobe est sous-divisé en lobules, séparés également par du tissu conjonctif et divisés en alvéoles ou *acini*. L'acinus constitue l'unité de base fonctionnelle et consiste en une cavité arrondie qui forme la partie sécrétrice de la glande. Un canal galactophore part du mamelon et se ramifie progressivement en canaux lobulaires puis en canalicules (Figure 1). A la surface, le canal galactophore se dilate et forme un sinus lactifère. La structure formée par le canalicule suivi du lobule terminal est appelée unité terminale ducto-lobulaire (UTDL) et constitue l'unité de base de la glande qui produit le lait. L'UTDL est très sensible aux variations hormonales, la rendant ainsi propice au développement tumoral.

Au niveau histologique, l'UTDL est constituée de deux principaux types cellulaires : luminal et basal. La couche basale est formée de cellules myoépithéliales contractiles, qui permettent l'éjection du lait vers le canal galactophore et de cellules souches renouvelant les différents types cellulaires. L'assise luminale est composée de cellules épithéliales cubiques, sécrétrices de lait, et sensibles aux hormones. Cette structure se trouve au cœur d'un stroma composé de matrice extracellulaire, de cellules (adipocytes, fibroblastes, macrophages) et de vaisseaux sanguins (Figure 2).

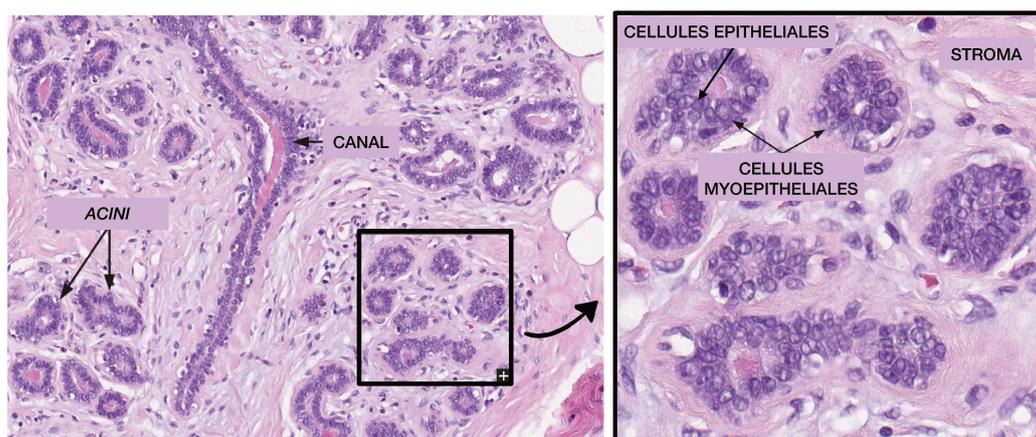


Figure 2. Histologie de la glande mammaire.

A gauche, coupe histologique de glande mammaire. On distingue la structure du canal galactophore au centre, ainsi que plusieurs lobules (encadré). Dans chaque lobule, on retrouve les acini. A droite, grossissement d'un lobule, dans lequel les cellules épithéliales glandulaires et les cellules myoépithéliales forment l'acinus baignant dans le stroma. (Adapté de The human protein atlas www.proteinatlas.org)

2. Développement de la glande mammaire

La glande mammaire se développe tout au long de la vie. Chez l'homme, elle demeure immature et non fonctionnelle. En effet, son développement et sa fonction sont conditionnés par divers événements de la vie, autour de trois grandes phases - le développement embryonnaire, la puberté et la reproduction. Le développement embryonnaire met en place une ébauche de glande mammaire, dérivée de l'ectoderme, qui présente des structures rudimentaires à la naissance. L'épithélium mammaire croît ensuite de manière allométrique pendant l'enfance. A la puberté, l'épithélium mammaire se développe, principalement sous l'effet d'hormones sexuelles (œstrogène et progestérone). La prolifération cellulaire est activée, les canaux se ramifient et envahissent le coussin adipeux mammaire. Les alvéoles restent peu développées. Ce n'est que lors de la gestation que se développent les structures lobulaires lactogènes. En effet, la grossesse entraîne une forte concentration de progestérone, d'œstrogène et d'hormone lactogène placentaire, sous l'effet desquelles les *acini* se différencient et les canaux se développent pour prendre la place du tissu adipeux. Les hormones agissent directement sur les cellules épithéliales, qui expriment les récepteurs aux hormones. L'action sur les cellules stromales est indirecte et entraîne la sécrétion de différents facteurs de croissance comme l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), le FGF (*Fibroblast Growth Factor*), l'IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*), le TGF- α et le TGF- β (*Transforming Growth Factor- α et β*), le MDGF-1 (*Mammary-Derived Growth Factor-1*), ainsi que de l'insuline et des glucocorticoïdes. Au niveau moléculaire, les protéines de type STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) sont particulièrement impliquées dans la régulation de la différenciation des *acini* (Haricharan et Li, 2014). Pendant la grossesse, la sécrétion de lait est inhibée, par la présence de progestérone bloquant la prolactine. Lors de l'accouchement, le placenta est éliminé, ce qui induit une modification dans la balance d'expression des différentes hormones, notamment progestérone/prolactine. La prolactine n'est alors plus inhibée et entraîne la production de lait. Enfin, après la période d'allaitement, la glande mammaire va

progressivement involuer et retourner à son état quiescent post-pubertaire. Les cellules épithéliales et myoépithéliales rentrent alors en apoptose (Figure 3).

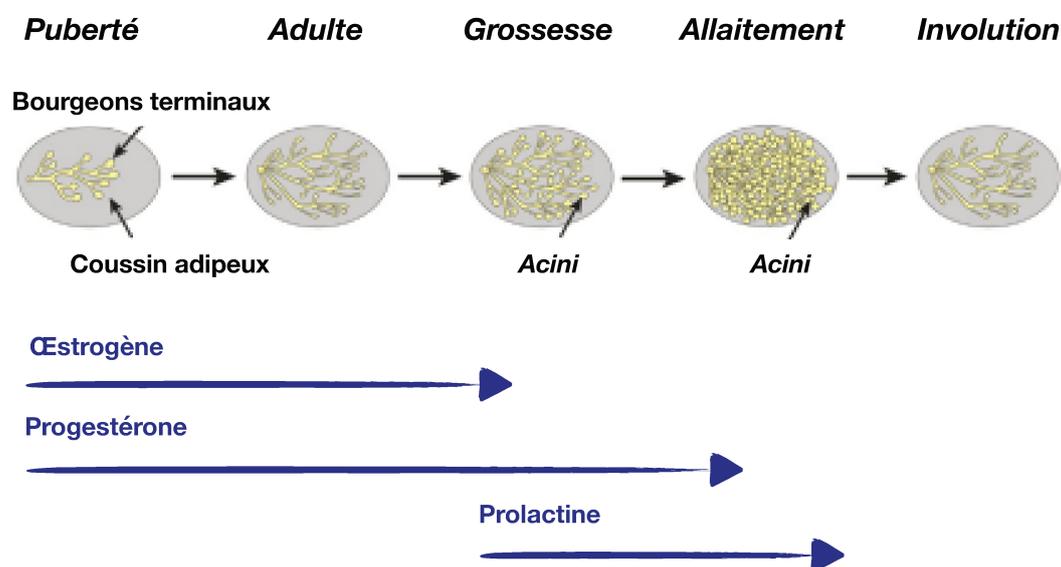


Figure 3. Evolution de la glande mammaire au cours de la vie.

A la puberté, les canaux se développent et se ramifient sous l'effet des cycles menstruels et de la sécrétion des hormones sexuelles. Lors de la grossesse, les acini se différencient et envahissent le coussin adipeux. Lors de l'allaitement, grâce à la prolactine, les acini produisent le lait qui est éjecté via le canal galactophore. Enfin, la glande mammaire retourne à son état basal par involution (Adapté de Fu et al., 2014, *The Mammary Stem Cell Hierarchy*).

3. Cellules souches mammaires

La capacité de l'épithélium mammaire à sans cesse se développer à chaque grossesse témoigne de la présence de cellules souches mammaires adultes multipotentes. Leur existence a été mise en évidence en 1968 par Daniel et collaborateurs, qui démontrent que la transplantation d'un fragment de tissu mammaire dans un coussin adipeux murin exempt de glande mammaire est suffisante pour reformer une structure glandulaire ramifiée. Cette régénération est maintenue jusqu'à 7 transplantations, après lesquelles le taux de croissance diminue drastiquement (Daniel et al., 1968). C'est seulement en 2006 qu'ont été identifiées et isolées pour la première fois les cellules souches mammaires chez la souris (MaSC, *Mammary Stem Cells*). Grâce au tri cellulaire, plusieurs études ont pu mettre en évidence des marqueurs de surface spécifiques des MaSC murines, à savoir CD24,

CD29 (intégrine $\beta 1$) et CD49f (intégrine $\alpha 6$) (Shackleton *et al.*, 2006 ; Stingl *et al.*, 2006). En particulier, une seule cellule Lin^- (*Lineage*⁻) CD29^{hi} CD24^+ est capable de régénérer une glande mammaire fonctionnelle (Shackleton *et al.*, 2006). Chez l'homme, les MaSC ont été identifiées grâce à différents marqueurs, communs ou non aux MaSC murines, tels que l'activité enzymatique ALDH (*Aldéhyde Déshydrogénase*), la combinaison de marqueurs de surface CD49f^{hi} EpCAM^- (*Epithelial Cell Adhesion Molecule*) et l'expression du promoteur s-SHIP (*SH2-containing inositol 5'-phosphatase*) (Ginestier *et al.*, 2007 ; Lim *et al.*, 2009 ; Bai et Rohrschneider, 2010) (Figure 4).

Une véritable hiérarchie cellulaire de la glande mammaire a été mise en évidence, avec la caractérisation de cellules progénitrices bipotentes, luminales ou myoépithéliales (Stingl *et al.*, 2001) (Figure 4). Cependant, une controverse demeure quant à la présence de ces cellules progénitrices bipotentes à l'âge adulte. Ainsi, l'équipe du Dr Blanpain suggère qu'après la naissance, seules subsistent des cellules souches unipotentes, capables de se différencier soit en cellules luminales, soit en cellules myoépithéliales. Ces données ont été démontrées par suivi du lignage cellulaire, grâce à l'expression des cytokératines spécifiques de chaque stade de différenciation (Keymeulen *et al.*, 2011). A l'inverse, l'équipe du Dr Visvader démontre la présence de MaSC bipotentes qui sont nécessaires au maintien de la glande mammaire à l'âge adulte, par l'utilisation de rapporteurs fluorescents inductibles permettant le suivi de clones au cours du développement mammaire (Rios *et al.*, 2014). L'équipe du Pr. Puisieux a montré également l'existence de MaSC bipotentes EpCAM^- CD10^- CD49f^+ ALDH^+ , en haut de la hiérarchie des cellules épithéliales mammaires. Ces cellules sont capables de se différencier et de générer les autres cellules progénitrices (Morel *et al.*, 2017).

Les MaSC peuvent répondre aux stimuli hormonaux, malgré leur faible expression des récepteurs à l'œstrogène et la progestérone (Asselin-Labat *et al.*, 2006). Ainsi, des études réalisées chez la souris montrent que la stimulation par les hormones sexuelles entraîne une augmentation de l'activité des MaSC alors que leur inhibition

diminue cette population (Asselin-Labat *et al.*, 2010 ; Joshi *et al.*, 2010). Plus récemment, l'équipe du Dr Visvader a identifié une population de MaSC quiescentes, capable de répondre à un stimulus hormonal et exprimant Lgr5 (*Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5*) et Tspan8 (*Tetraspanin-8*). Ces cellules dériveraient de l'embryon et resteraient quiescentes après la naissance, constituant ainsi un réservoir de MaSC (Fu *et al.*, 2017).

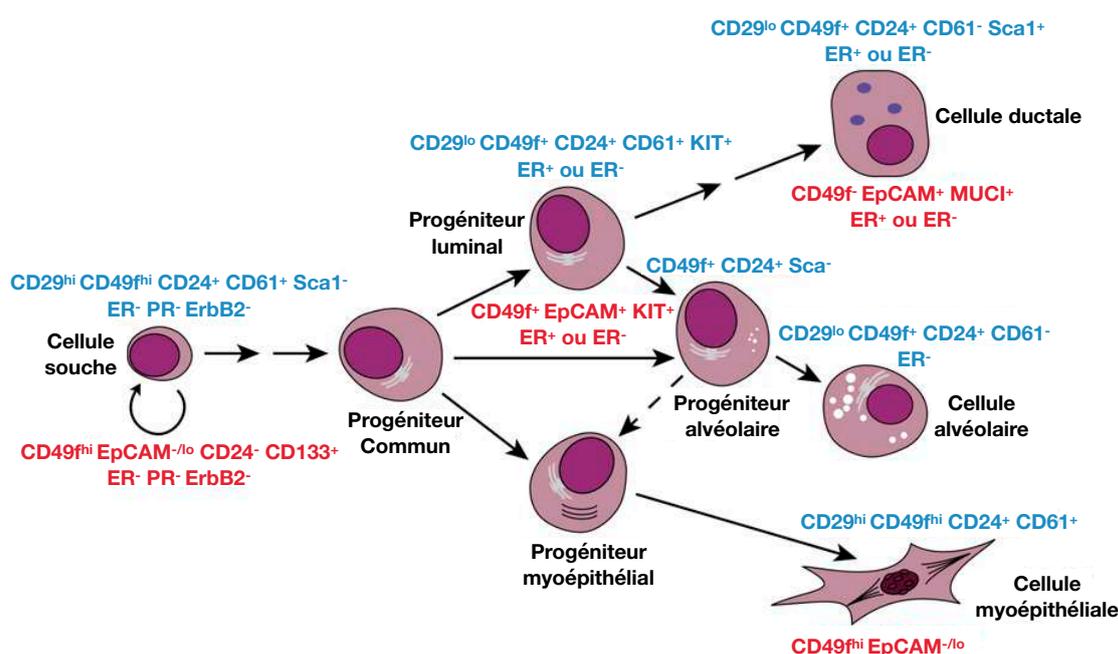


Figure 4. Modèle de la hiérarchie cellulaire de l'épithélium mammaire.

Les marqueurs de surface murins et humains sont indiqués en bleu et en rouge respectivement. Ce modèle présente l'hypothèse d'un progéniteur bipotent (Adapté de Visvader, 2009). ER, Estrogen Receptor ; PR, Progesterone Receptor.

B. Généralités sur le cancer du sein

1. Epidémiologie

Le cancer du sein est le premier cancer chez la femme dans le monde. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 1,67 million de nouveaux cas ont été diagnostiqués en 2012 à travers le monde. Il représente également la première cause de mortalité par cancer chez la femme, avec 522 000 décès en 2012 (Globocan, 2012). En France, le cancer du sein est également le premier cancer et la première cause de mortalité par cancer chez la femme, avec 48 763 nouveaux cas et 11 886

décès en 2012 selon les chiffres de l'INCa (Institut National du Cancer). L'incidence du cancer du sein a doublé entre 1980 et 2000, passant de 21 387 nouveaux cas à 42 696 nouveaux cas (Tableau 1, Figure 5). En revanche, cette incidence est en diminution depuis 2005 (-1,5% par an). Cette diminution est expliquée par le fait que les campagnes de mammographies préventives ont atteint les limites du dépistage. De plus, la diminution de l'utilisation de traitements hormonaux substitutifs contribue également à la baisse de l'incidence. Le nombre de décès reste relativement stable depuis 2000 (Tableau 1, Figure 5). Par rapport à d'autres types de cancer, le cancer du sein est généralement de bon pronostic, avec une survie nette à 5 ans de 89%, pour la période de 2001 à 2004. Le taux de survie est cependant variable en fonction du sous-type de cancer du sein, de son stade et de sa localisation (INCa).

Année	1980	1990	2000	2005	2010	2012
Incidence	21 387	30 822	42 696	49 087	48 980	48 763
Mortalité	8 596	10 171	11 000	11 306	11 704	11 886

Tableau 1. Evolution de l'incidence et de la mortalité par cancer du sein en France de 1980 à 2012.

(InVS, 2013)

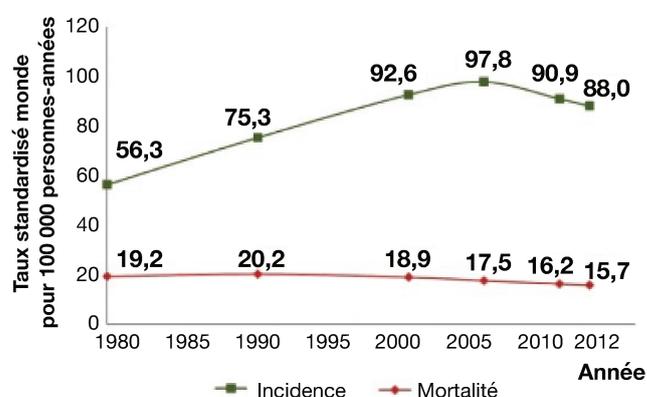


Figure 5. Evolution de l'incidence et de la mortalité par cancer du sein de 1980 à 2012 en France. L'incidence et la mortalité sont exprimées en taux standardisés sur la population mondiale pour 100000 personnes par année (InVS, 2013).

Le cancer du sein est une maladie multifactorielle (Lacey et al., 2009) (Tableau 2). Elle touche en majorité les femmes : on estime qu'une femme sur huit va développer un cancer du sein au cours de sa vie, alors que les hommes représentent 1% des cas de cancer du sein. Les facteurs de risque sont variés, mais le risque de cancer du sein augmente fortement avec l'âge. En effet, environ 80% des cancers du sein

concernent des femmes âgées de plus de 50 ans. Outre l'âge, il existe d'autres facteurs liés à l'exposition aux hormones sexuelles endogènes (puberté précoce, grossesse tardive, ménopause tardive, absence d'allaitement, etc) et des facteurs intrinsèques, notamment les antécédents familiaux et les prédispositions génétiques (mutation BRCA1/2, *BReast CAncer 1/2*). Des facteurs extrinsèques sont également à risque : d'une part, l'environnement (radiations ionisantes) et les conditions de vie (alcool, obésité) contribuent à augmenter le risque de cancer du sein, alors qu'une pratique sportive régulière intense contribue à le diminuer. D'autre part, les facteurs hormonaux exogènes augmentent le risque de cancer du sein, en particulier l'utilisation des traitements hormonaux substitutifs (Nkondjock et Ghadirian, 2005) (Tableau 2).

Risque	Facteurs	Mécanisme(s) biologique(s)
Augmentation du risque	Âge avancé	Exposition prolongée aux œstrogènes
	Âge précoce des premières règles (<12 ans)	Exposition précoce et prolongée aux hormones
	Ménopause tardive (>55 ans)	Production prolongée des hormones ovariennes
	Alcool (1/jour)	Augmentation du taux d'hormones sériques et de la production d'IGF
	Mutations génétiques (BRCA1/2)	Augmentation de l'instabilité génomique
	Radiations ionisantes (<40 ans)	Dommmages de l'ADN
	Densité mammographique (>50%)	Augmentation d'IGF avant la ménopause et de prolactine après la ménopause
	Utilisation de contraceptifs oraux	Augmentation de l'exposition aux œstrogènes et suppression de la production d'œstrogène et de progestérone
	Traitement hormonal substitutif	Report des effets de la ménopause
	Histoire familiale de cancer du sein	Environnement, style de vie et patrimoine génétique communs
	Maladies bénignes du sein	Augmentation de l'hyperplasie des cellules épithéliales
Réduction du risque	Obésité après la ménopause et prise de poids après 18 ans	Augmentation des concentrations sériques d'œstradiol libre
	Grossesse précoce & multiparité	Prolifération rapide de l'épithélium et différenciation accélérée des tissus mammaires
	Allaitement pendant au moins 25 mois	Changements hormonaux endogènes Décalage du rétablissement de l'ovulation
	Activité physique régulière	Réduction de la production d'œstrogènes et maintien de l'équilibre énergétique

Tableau 2. Principaux facteurs de risque du cancer du sein.
(Adapté de Nkondjock et Ghadirian, 2005)

2. Etapes du développement de la tumeur mammaire

Le développement d'un cancer du sein s'effectue selon plusieurs stades (Figure 6). L'UTDL normal est formé de lobules et de canaux, constitués d'un double épithélium luminal et myoépithélial. Le premier stade est le développement d'une hyperplasie canalaire atypique (HCA), avec l'apparition de couches cellulaires anormales, causées par la prolifération accrue des cellules épithéliales canalaire basales ou lumbinales. L'épithélium s'épaissit et le canal galactophore peut s'obstruer partiellement. Les cellules prolifératives acquièrent des altérations géniques, ainsi que des modifications structurales et fonctionnelles.

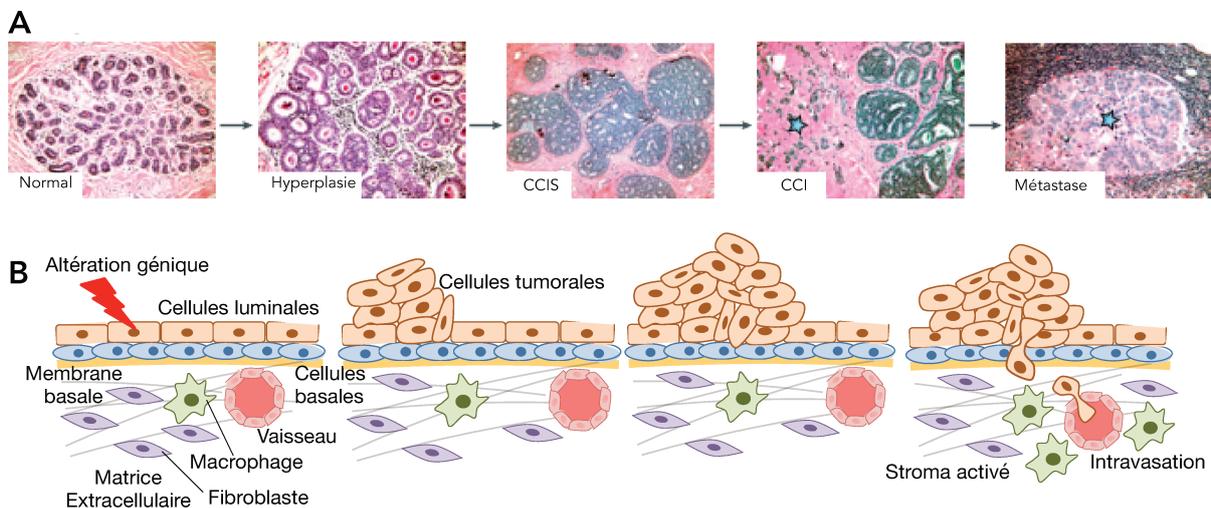


Figure 6. Etapes de la cancérisation d'un épithélium canalaire mammaire.

Les cellules d'un épithélium sain peuvent subir des altérations géniques, et prolifèrent alors de manière anarchique, jusqu'au stade d'hyperplasie atypique. Les cellules se différencient et prolifèrent localement pour donner un carcinome *in situ*. D'autres modifications phénotypiques vont permettre aux cellules de franchir la lame basale et former un carcinome invasif et métastatique. A, coupes histologiques d'un tissu mammaire normal, d'une hyperplasie, d'un carcinome canalaire *in situ* (CCIS), d'un carcinome canalaire invasif (CCI), et d'une métastase lymphatique. L'étoile bleue indique la présence d'une lésion cancéreuse invasive (CCI) et d'une métastase (MET). B, représentation schématique du développement d'une tumeur mammaire (Adapté de Vargo-Gogola et Rosen, 2007).

Un processus de différenciation se met également en place. Ce stade hyperplasique atypique est considéré comme le précurseur du carcinome canalaire *in situ* (CCIS) mais il s'agit bien de deux maladies distinctes. La tumeur est donc localisée, et la membrane basale intacte. Un CCIS peut évoluer en carcinome invasif : dans ce cas, la membrane basale est lésée et les cellules cancéreuses se répandent

dans le tissu conjonctif adjacent. Elles acquièrent en même temps un potentiel invasif, l'inhibition de contact, la perte d'adhérence et la sécrétion de protéases. A ce stade, les cellules cancéreuses peuvent atteindre les systèmes lymphatique et hématogène, et coloniser les ganglions, voire d'autres organes. Elles forment alors des tumeurs secondaires appelées métastases (Vargo-Gogola et Rosen, 2007).

3. Mécanismes de la tumorigenèse mammaire

Selon Hanahan et Weinberg, six modifications physiologiques sont nécessaires au développement cancéreux (Hanahan et Weinberg, 2000) :

- Insensibilité aux signaux anti-prolifératifs
- Invasion tissulaire et métastase
- Potentiel répliatif illimité
- Néo-angiogenèse
- Echappement à l'apoptose
- Indépendance vis-à-vis des signaux de croissance

Plus récemment, quatre autres caractéristiques pouvant intervenir dans le développement tumoral ont été proposées (Hanahan et Weinberg, 2011) :

- Dérégulations énergétiques
- Echappement immunitaire
- Instabilité génomique et mutations
- Inflammation pro-tumorale

Toutes ces modifications physiologiques sont directement liées à des altérations génétiques, et des modifications épigénétiques, qui seront détaillées par la suite. Le microenvironnement tumoral ainsi que le système immunitaire jouent également un rôle important dans la tumorigenèse mammaire.

a. Altérations génétiques

Les altérations génétiques provoquent l'activation d'oncogènes et/ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Ces mutations sont généralement aléatoires, puisque le cancer du sein est la plupart du temps une maladie sporadique, avec seulement 5% de cancers héréditaires. Dans le cancer du sein, les oncogènes codent généralement des protéines telles que les récepteurs de facteurs de croissance, des facteurs de transcription ou encore des protéines impliquées dans le cycle cellulaire (Lee et Muller, 2010).

- Inactivation de gènes suppresseurs de tumeur

Il s'agit des gènes dont la perte de fonction aboutit à promouvoir le développement tumoral. Ils sont subdivisés en plusieurs catégories selon leur fonction : premièrement, les gènes dits "caretaker" qui garantissent la stabilité du génome, tels que *TP53* (*Tumor Protein 53*) et *BRCA* impliqués dans la réparation de l'ADN ; deuxièmement, les "gatekeeper", inhibiteurs de la prolifération cellulaire, tels que la protéine Rb (*Retinoblastoma*), premier suppresseur de tumeur découvert, ou encore p27, inhibiteur du cycle cellulaire (Osborne et al., 2004).

La perte de fonction est effective si les deux allèles d'un même gène suppresseur de tumeur sont inactivés dans les cellules somatiques (Knudson, 1993). Cette inactivation peut également se produire dans la lignée germinale et contribue alors aux cancers du sein héréditaires (Knudson, 2001). C'est le cas des gènes de prédisposition *BRCA1* et *BRCA2*, dont les mutations sont associées à un risque élevé de développer un cancer du sein (60-70% pour *BRCA1* et 40-60% pour *BRCA2*).

- Activation d'oncogènes

Un oncogène est défini comme un gène dont l'activation favorise le développement tumoral. L'amplification génique, la perte de zones régulatrices, des mutations ponctuelles, des réarrangements structurels, une insertion virale ou encore la dérégulation de l'expression peuvent être à l'origine de cette activation. La plupart des oncogènes jouent un rôle dans l'angiogenèse ou dans la dissémination métastatique, et modulent la transduction de signaux de prolifération, l'activation du

cycle cellulaire, ou encore l'apoptose. Trois oncogènes sont retrouvés amplifiés dans plus de 15% des tumeurs mammaires : *MYC* (*Myelocytomatosis oncogene*), *ERB-B2* (*Erythroblastosis oncogene B2*), *CCND1* (*Cyclin D1*).

Le gène *CCND1* code la cycline D1, et est localisé sur le chromosome 11q13. Il s'agit d'un régulateur majeur du cycle cellulaire au niveau des transitions G1/S et G2/M. La cycline D1 est surexprimée dans 50% des cancers du sein ; son amplification génique est retrouvée dans 15% des cas (Arnold et Papanikolaou, 2005). En effet, la cycline D1 peut être régulée positivement par d'autres facteurs (œstrogènes, p53, etc). De plus, cette surexpression est associée à des résistances aux traitements (Stendahl *et al.*, 2004).

Le gène *MYC* est localisé sur le chromosome 8q24 et code la protéine nucléaire c-Myc. En tant que facteur de transcription, il participe à la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire (Dang, 2012). La protéine c-Myc est amplifiée dans environ 15% des cancers du sein, et son expression est particulièrement corrélée avec les tumeurs de type "basal-like", de mauvais pronostic (Xu *et al.*, 2010).

Enfin, le gène *ERB-B2* est localisé sur le chromosome 17q21-22 et code pour la protéine HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*), récepteur à activité tyrosine kinase. HER2 est surexprimé et son gène est amplifié dans 25% des cancers du sein : cela conduit à son homo- ou hétéro-dimérisation avec d'autres membres de la famille des récepteurs HER. HER2 est impliqué dans plusieurs processus cellulaires tels que la prolifération, l'angiogenèse, la résistance à l'apoptose et l'induction de métastases. Les tumeurs HER2⁺ surexprimant HER2 sont ainsi de mauvais pronostic et associées à un phénotype invasif (Lee et Muller, 2010).

b. Modifications épigénétiques

Les modifications épigénétiques sont définies comme des altérations de l'expression génique, sans mutation de la séquence nucléotidique. Le contrôle de l'expression des gènes peut se faire via l'ajout d'un groupement méthyle sur une

cytosine, au sein d'îlots CpG (méthylation de l'ADN). Ces îlots sont souvent trouvés au niveau des régions promotrices des gènes. Les modifications post-traductionnelles des extrémités N-terminales des histones peuvent également moduler l'expression génique. Il s'agit des deux principaux mécanismes d'altérations épigénétiques en cause dans la cancérisation, qui ont pour effet l'activation des oncogènes, et la mise sous silence des gènes suppresseurs de tumeur. En effet, ces modifications vont entraîner des changements de conformation de la chromatine, qui est alors plus ou moins accessible pour les facteurs de transcription. Dans le cancer du sein, certains promoteurs de gènes suppresseurs de tumeur deviennent hyperméthylés (*BRCA1* ; *PTEN*, *Phosphatase and TENsin homolog* ; *CDKN2A*, *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*), alors qu'ils ne sont pas méthylés dans des conditions normales (Stefansson et Esteller, 2013). Ces modifications épigénétiques pourraient d'ailleurs être à l'origine de l'induction de cellules souches cancéreuses (CSC) (Sarkar *et al.*, 2013) (cf. Chapitre III). La méthylation de l'ADN est intimement liée aux modifications des histones (acétylation, méthylation, ubiquitination, phosphorylation, etc). Par exemple, l'acétylation de résidus lysine sur les queues des histones entraîne une ouverture de la chromatine, la rendant ainsi accessible aux facteurs de transcription, alors que certaines méthylations induisent le passage de la chromatine dans un état réprimé (Basse et Arock, 2015). Ainsi, les modifications épigénétiques représentent de bonnes perspectives thérapeutiques dans le traitement du cancer du sein, car ils constituent des mécanismes réversibles.

c. Influence du microenvironnement tumoral et du système immunitaire

L'épithélium mammaire évolue au sein d'un microenvironnement complexe, qui comprend de nombreux types cellulaires (fibroblastes, macrophages, cellules endothéliales, lymphocytes et adipocytes) ainsi que la matrice extracellulaire (MEC). Ce microenvironnement est responsable du contrôle de l'homéostasie tissulaire, par des communications dynamiques entre les différents types cellulaires qui le composent. Elles s'effectuent le plus souvent *via* la sécrétion de facteurs solubles tels

que les chimiokines, les cytokines, les hormones et les facteurs de croissance. Le microenvironnement sain permet donc de réguler toute prolifération anarchique à l'origine de l'initiation tumorale (Bissell et Hines, 2011).

Cependant, l'existence d'un stroma réactif, fortement impliqué dans la tumorigenèse est largement décrit : en effet, les cellules tumorales sont capables de mobiliser les cellules stromales à leur avantage. Le stroma réactif est ainsi remodelé et présente des modifications de la MEC et de la membrane basale. Des infiltrations de cellules immunitaires sont observées, ainsi que l'augmentation de la vascularisation et l'accumulation de fibroblastes activés (Place *et al.*, 2011). La caractérisation moléculaire des différents types cellulaires de glande mammaire saine, de carcinome mammaire *in situ* et invasif a révélé de grandes différences d'expression génique dans tous les types cellulaires, et pas uniquement dans les cellules cancéreuses. De plus, les plus grandes différences d'expression génique concernent des gènes codant des récepteurs membranaires et des facteurs sécrétés, dont la chimiokine CXCL12 (*C-X-C motif Ligand 12*) et son récepteur CXCR4 (*C-X-C motif Receptor 4*) (Allinen *et al.*, 2004).

Les fibroblastes associés au cancer (CAF, *Cancer Associated Fibroblast*) vont promouvoir le développement tumoral et augmenter l'angiogenèse, par le biais de la sécrétion de plusieurs facteurs dont CXCL12 (cf Chapitre IV.B.2.a), l'HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) impliqué dans l'invasion des cellules cancéreuses mammaires (Jedezsko *et al.*, 2009) et le TGF- β (Stuelten *et al.*, 2010). Les CAF participent également à l'évolution du carcinome *in situ* en carcinome invasif par la production de MMP (*Matrix MetalloProteinases*) et en promouvant la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT, *Epithelio-Mesenchymal Transition*) qui facilite l'intravasation (Mao *et al.*, 2013).

Les cellules cancéreuses vont également mobiliser des cellules du système immunitaire, telles que les lymphocytes et les macrophages. Les macrophages en particulier (TAM, *Tumor Associated Macrophages*), sont généralement de type M2, promouvant l'angiogenèse, et sécrétant des facteurs inhibant la prolifération et

l'activité des lymphocytes T. Ils ont alors un rôle important d'immunosuppresseur, incapables d'activer une réponse anti-tumorale correcte (Lewis et Pollard, 2006). De plus, les chimiokines sont fortement impliquées dans toutes les communications intercellulaires stromales. Leurs fonctions pro-tumorales seront détaillées dans le chapitre IV. Enfin, les adipocytes peuvent également participer à la progression tumorale, notamment en induisant l'EMT dans des cellules cancéreuses mammaires (Lee *et al.*, 2015).

Les cellules stromales comme les cellules tumorales vont produire des facteurs de croissance impliqués dans les différentes étapes du développement tumoral, de l'initiation à l'acquisition des potentialités métastatiques. Les principaux facteurs impliqués sont le TGF- β , le FGF, le HGF, l'EGF, le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) et le NGF (*Nerve Growth Factor*). L'implication de ce dernier a été mise en évidence par notre laboratoire (Descamps *et al.*, 2001). Cependant, le microenvironnement ainsi que le système immunitaire sont à l'origine de communications complexes et dynamiques. Ainsi, de nombreuses études sont toujours en cours pour tenter de mieux appréhender ce dynamisme.

C. Hétérogénéité des tumeurs mammaires

Le cancer du sein est une maladie très hétérogène et il est important de pouvoir classer les tumeurs afin de former des groupes homogènes sur les plans pronostique et prédictif. Il existe en effet une hétérogénéité des cancers du sein, regroupés selon plusieurs entités histologiques différentes. Plusieurs classifications ont également été définies : la classification clinique repose sur les caractéristiques macroscopiques de la tumeur ; la classification anatomopathologique prend en compte plusieurs critères histologiques ; et enfin, la classification moléculaire tient compte des altérations génétiques au sein de la tumeur. Ces classifications déterminent le pronostic et le traitement approprié.

1. Différentes entités cliniques

L'OMS définit plusieurs types de cancers du sein, sur des critères majoritairement morphologiques. Les tumeurs mammaires sont considérées comme bénignes lorsqu'elles sont bien limitées et encapsulées à l'intérieur de la membrane basale. Les cellules sont différenciées et la croissance de la tumeur est lente. Son évolution n'entraîne généralement pas la mort du patient. L'adénofibrome est la tumeur mammaire bénigne la plus fréquente, et est retrouvée chez les femmes jeunes.

En revanche, les tumeurs malignes ont des contours moins bien définis et sont composées de cellules peu différenciées qui prolifèrent rapidement. Elles peuvent donner lieu à des métastases. La majorité des tumeurs malignes sont des adénocarcinomes issus de l'épithélium glandulaire au niveau des canaux (cancer canalaire) ou des lobules (cancer lobulaire). On distingue alors deux principaux types d'adénocarcinomes (Figure 7) :

- les carcinomes *in situ* (non infiltrants). Il s'agit du type de tumeurs mammaires non invasives le plus fréquent. Ce cancer se développe dans la lumière du canal, soit au niveau des lobules, on parle alors de carcinome lobulaire *in situ* (CLIS), soit au niveau des canaux et on parle alors de carcinome canalaire *in situ* (CCIS). Les carcinomes *in situ* représentent environ 20% des cas de cancer du sein, et 85 à 90% de ceux-ci sont des CCIS. Le pronostic des CCIS est généralement bon avec 95% de survie globale à 10 ans mais jusqu'à 13% de récurrence invasive en cas de chirurgie conservatrice sans radiothérapie, en France (INCa).

- les carcinomes invasifs (infiltrants). Ces carcinomes présentent un envahissement des tissus environnants par les cellules cancéreuses qui ont traversé la membrane basale. Ils constituent la grande majorité des cancers du sein. Comme pour les carcinomes *in situ*, on retrouve les carcinomes invasifs lobulaires (10%) et les carcinomes invasifs canaux (75%) (Ligue contre le Cancer). D'autres formes plus rares ont également été définies (tubuleux, mucineux, médullaires, papillaires, apocrines, neuroendocrines, adénoïdes kystiques).

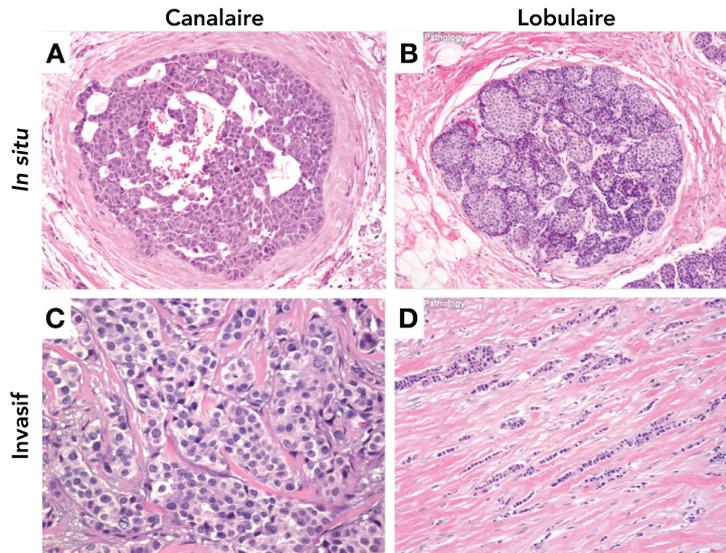


Figure 7. Histologie des principales formes cliniques de cancer du sein.

Coupes histologiques de carcinomes *in situ* canalaire (A) et lobulaire (B), invasif canalaire (C) et invasif lobulaire (D) (Adapté de www.webpathology.com).

2. Classifications

a. Classification clinique : stade TNM (Tumor / Nodes / Metastasis)

Cette classification a été conçue entre 1943 et 1952 par Pierre Denoix puis adoptée en 1953 par l'Union Internationale contre le Cancer et repose sur l'analyse de critères anatomiques. Dans un premier temps, le volume tumoral est mesuré et un score T est défini (entre 0 et 4). Une valeur plus élevée correspond à un volume plus important. Le score N est défini en fonction de l'envahissement ganglionnaire, entre 0 et 3, et dépend aussi de la proximité avec la tumeur, des dimensions des adénopathies, de leur nombre, et de leur éventuelle fixation aux tissus voisins. Enfin, l'invasion métastatique est mesurée (0 ou 1). La valeur M1 correspond à la présence de métastases, quelque soit leur localisation ou leur nombre. Selon ces trois différents scores, un stade est déterminé entre 0 et IV. La stade 0 correspond à une petite tumeur *in situ* alors que le stade IV définit une tumeur de taille importante, avec envahissement ganglionnaire et métastases. Le tableau correspondant aux différents stades est présenté en Annexe 1.

b. Classification anatomopathologique

La biopsie mammaire permet d'évaluer plusieurs critères d'un point de vue anatomopathologique. Parmi ces critères, la taille de la tumeur, le caractère unifocal ou multifocal de la tumeur, et la présence d'embolies vasculaires sont évalués. Le grade de la tumeur est également déterminé grâce au grade de Scarff-Bloom-Richardson (SBR), qui permet de définir l'état de différenciation de la tumeur. Trois critères sont analysés et un score de 1 à 3 leur est attribué. Le premier critère mesure l'architecture tumorale (différenciation) et la présence de structures bien définies. Plus la tumeur est formée de tubules, plus celle-ci est différenciée et plus le score donné est faible. Le deuxième critère repose sur le pléomorphisme nucléaire, c'est-à-dire l'observation d'atypies nucléaires telles que la taille du noyau (anisonucléose). Des atypies très marquées entraînent un score élevé. Enfin, le nombre de mitoses ou index mitotique, constitue le dernier critère dont le score augmente avec le nombre de mitoses mesuré (Elston et Ellis, 1991). Le score total est calculé : un score entre 3 et 5 correspond à une tumeur de bas grade (grade I) ; un score de 6 à 7 représente une tumeur de grade II ; un score de 8 à 9 est associé à une tumeur de haut grade peu différenciée (grade III).

Ensuite, plusieurs facteurs sont déterminés, à savoir l'indice Ki-67 qui détermine la prolifération cellulaire dans la tumeur ; le statut d'expression des récepteurs hormonaux aux œstrogènes et à la progestérone (Jensen, 1975) qui détermine la réponse de la tumeur à l'hormonothérapie ; le statut HER2 ; et l'atteinte ganglionnaire.

c. Classification moléculaire

La variabilité de la réponse aux traitements, basée sur la seule classification anatomopathologique suggère une complexité et une hétérogénéité plus importantes qu'initialement envisagées (Bertos et Park, 2011). Au début des années 2000, Perou et collaborateurs ont mené une analyse de l'expression de 8102 gènes dans 65 tumeurs mammaires. L'étude révèle que les tumeurs ER⁻ et ER⁺ (*Estrogen*

Receptor) peuvent être distinguées selon le profil d'expression de gènes particuliers et que cinq sous-groupes peuvent être définis : luminal-A, luminal-B, HER2+, "basal-like" et "normal-like" (Perou *et al.*, 2000). L'analyse de la survie de patientes atteintes de cancer du sein, classées selon les différents sous-types moléculaires, montre que les profils luminal-A et luminal-B présentent la meilleure survie. Les tumeurs HER2 et triples négatives possèdent au contraire une survie diminuée par rapport aux autres sous-types (Engstrøm *et al.*, 2013 ; Sørlie *et al.*, 2001) (Figure 8).

Récemment, deux autres sous-types ont été mis en évidence : les tumeurs "claudin-low" caractérisées par une faible expression de marqueurs de jonction cellulaire (Prat *et al.*, 2010) et les tumeurs "molecular apocrine" qui présentent une activation de la signalisation du récepteur aux androgènes (Farmer *et al.*, 2005) (Tableau 3). Sur la base de ces études génomiques, une signature de 50 gènes (PAM50) a été déterminée et permet de classifier une tumeur mammaire selon les différents sous-types moléculaires. Cette signature permettrait d'établir un pronostic (Wallden *et al.*, 2015).

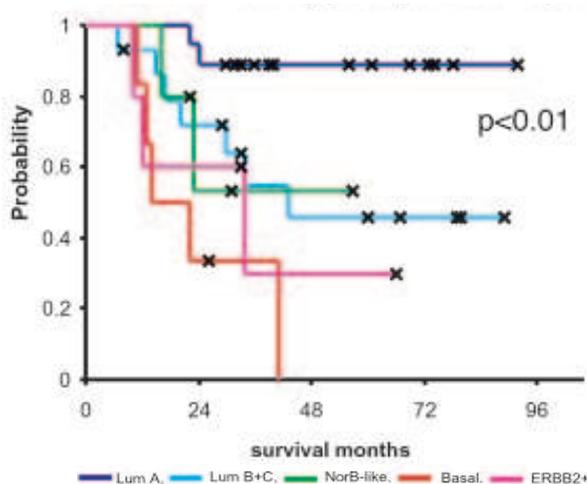


Figure 8. Courbes de survie associées aux différents sous-types moléculaires de cancer du sein.

Les cas de cancers du sein inclus dans l'étude ont été répartis selon 5 différents sous-types par l'analyse de différents critères. Lum A = luminal-A, Lum B+C = luminal-B/C, NorB-like = normal-like, Basal = basal-like (TNBC), ERBB2+ = HER2+ (D'après Sørlie *et al.*, 2001).

On peut regrouper les tumeurs "basal-like", "molecular apocrine", et "claudin-low" sous le nom de tumeurs triple négatives (TNBC, *Triple negative breast cancer*). D'autres sous-types de TNBC ont pu être distingués, selon des signatures géniques propres, et démontrent encore plus l'hétérogénéité des tumeurs mammaires ainsi que la complexité de trouver des traitements adaptés à chaque patiente ("basal-like 1", "basal-like 2", "mesenchymal-like", "mesenchymal stem-like", "immunomodulatory" et "luminal-androgen receptor") (Lehmann *et al.*, 2011).

Sous-types	ER/PR/HER	Fréquence	Marqueurs basales CK5/6, EGFR	Cluster de prolifération	Grade histologique	Pronostic
luminal-A	ER ⁺ PR ⁺ HER2 ⁻	50-60%	-	faible	I ou II	Bon
luminal-B	ER ^{+/-} PR ^{+/-} HER2 ^{-/+}	10-20%	-	élevé	II ou III	Intermédiaire
HER2 ⁺	ER ⁻ PR ⁻ HER2 ⁺	15-20%	+/-	élevé	III	Défavorable
basal-like	ER ⁻ PR ⁻ HER2 ⁻	10-20%	+	élevé	III	Très défavorable
normal-like	ER ^{+/-} PR [?] HER2 ⁻	5-10%	+	faible	I	Intermédiaire
molecular apocrine	ER ⁻ PR ⁻ HER2 ^{+/-}		+/- AR ⁻	élevé	II ou III	Intermédiaire
claudin low	ER ⁻ PR ⁻ HER2 ⁻	12-14%	+/- CDH1 ^{low/-} CLDN ^{low/-}	élevé	III	Défavorable

Tableau 3. Classification moléculaire des sous-types de cancers du sein.

(Adapté de Weigelt *et al.*, 2010 et Eroles *et al.*, 2012). CK, cytokératine ; EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor.

D. Thérapies anti-cancéreuses

1. Schéma thérapeutique classique

Nous avons vu dans la partie précédente qu'il existait plusieurs sous-types de cancers du sein, selon leurs caractéristiques moléculaires. Ces différents sous-types permettent d'orienter le choix thérapeutique. Cependant, la chirurgie est systématique, quelque soit le sous-type, en situation non métastatique. La chirurgie peut être mammaire ou axillaire. Concernant la chirurgie mammaire, la mastectomie peut être totale ou partielle selon le volume de la tumeur rapporté au volume du

sein. L'évaluation ganglionnaire dans le cancer du sein se fait soit par prélèvement du ganglion sentinelle soit par curage axillaire. Un curage axillaire est indiqué en cas d'examen anatomopathologique positif (macro-métastases) du ganglion sentinelle ou en cas de ganglion suspect (cliniquement ou en échographie axillaire) confirmé par une biopsie avant le geste chirurgical. Dans les autres cas, un prélèvement du ganglion sentinelle est réalisé. Ensuite, en cas de mastectomie partielle et/ou d'atteinte ganglionnaire, la plupart des patientes vont recevoir un traitement de radiothérapie. La radiothérapie peut également être prescrite en cas de mastectomie totale, selon le sous-type tumoral et le stade. La chimiothérapie peut être administrée avant la chirurgie, dans le but de réduire le volume tumoral avant l'opération (thérapie néo-adjuvante) ou après la chirurgie (thérapie adjuvante). Le traitement du cancer du sein suit un schéma défini par le stade et le sous-type tumoral (Figure 9).

Les chimiothérapies adjuvantes ou néo-adjuvantes utilisées chez les patientes non métastatiques sont les anthracyclines potentialisées par les cyclophosphamides et les taxanes, qui ont des modes d'action différents. Les anthracyclines modifient la structure de l'ADN, empêchent ainsi sa réplication et entraînent l'apoptose. La principale anthracycline pour le traitement du cancer du sein est l'épirubicine. Les taxanes (paclitaxel) inhibent la formation des microtubules, empêchant la bonne division cellulaire et entraînant ainsi la mort de la cellule en division. Il est à noter que les agents chimiothérapeutiques ne sont pas spécifiques des cellules cancéreuses et sont à l'origine de nombreux effets secondaires.

Les tumeurs hormono-dépendantes sont souvent traitées par hormonothérapie et représentent environ 60% des tumeurs mammaires. Elles sont caractérisées par l'expression des récepteurs hormonaux à l'œstrogène et à la progestérone (ER et PR), et sont traitées par des inhibiteurs de l'activation de récepteur aux œstrogènes (tamoxifène) ou par des inhibiteurs d'aromatase. L'aromatase est une enzyme qui convertit la testostérone en œstradiol, ensuite converti en œstrogène par d'autres enzymes. Avec des inhibiteurs d'aromatase, la production d'œstrogènes est donc inhibée, et leur absence limite la prolifération cellulaire.

Les tumeurs HER2⁺ présentent une surexpression du récepteur HER2. La principale thérapie utilisée est le trastuzumab (ou Herceptine), un anticorps monoclonal ciblant HER2. Sa fixation au niveau du domaine juxtamembranaire de HER2 empêche ainsi l'activation du récepteur et de ses signalisations sous-jacentes. Cependant, une résistance *de novo* au traitement est présente chez 50% des patientes, et une résistance acquise se développe également chez la plupart d'entre elles. Ces résistances peuvent être dues à des suractivations de voies de signalisation alternatives, l'expression d'une forme tronquée de HER2, et l'induction de l'autophagie (Callahan et Huvitz, 2011).

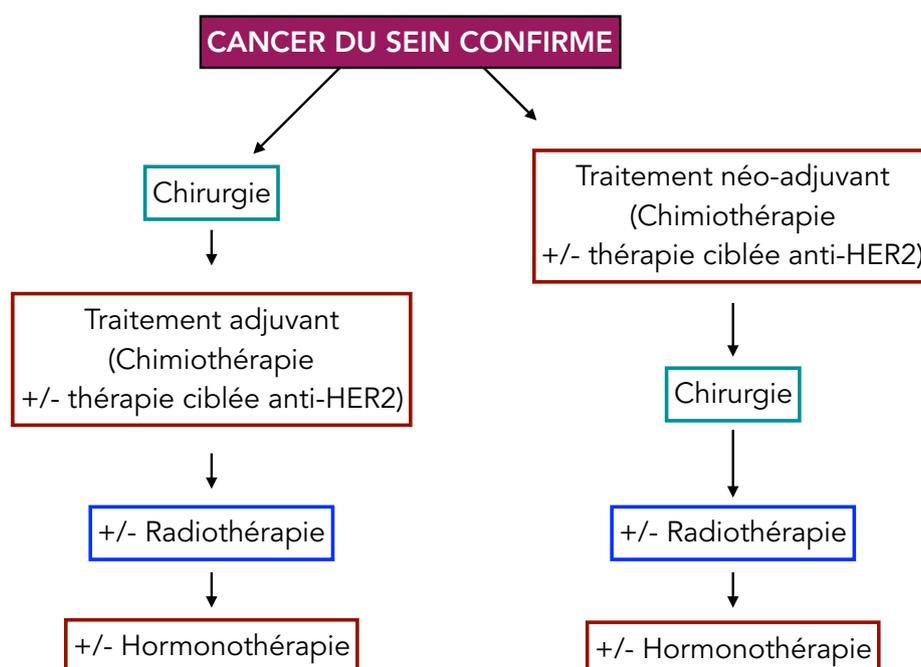


Figure 9. Schéma thérapeutique classique pour le traitement du cancer du sein non métastatique. Lorsque le cancer du sein est identifié et caractérisé, la patiente peut d'abord subir une mastectomie totale ou partielle, suivie d'un traitement adjuvant de chimiothérapie complété d'une thérapie ciblée anti-HER2 (trastuzumab) si la tumeur est HER2⁺. La patiente peut ensuite recevoir de la radiothérapie et de l'hormonothérapie si la tumeur est ER⁺ et/ou PR⁺. La chimiothérapie complétée ou non de la thérapie ciblée peuvent également être administrées en traitement néo-adjuvant, précédant la chirurgie de manière à réduire la taille de la tumeur.

Enfin, les tumeurs triple-négatives TNBC sont les plus agressives et représentent 10 à 15% des cancers du sein. Le principal traitement repose sur l'utilisation d'anthracyclines et de taxanes. Définir une thérapie efficace représente un challenge

important du fait de la vaste hétérogénéité des TNBC (cf. Chapitre I.C.) et de la variation des gènes surexprimés. Une partie des TNBC est associée à un statut *BRCA1/2* muté. L'inhibition de PARP (*Poly-ADP Ribose Polymerase*) constitue donc une piste thérapeutique intéressante. En effet, les cellules mutées pour *BRCA1/2* sont incapables de réparer l'ADN par recombinaison homologue, et reposent donc sur la réparation par jonction des extrémités non homologues (NHEJ, *Non-Homologous End Joining*) ou par excision de base (BER, *Base Excision Repair*) nécessitant la protéine PARP. L'inhibition de celle-ci entraîne donc instabilité et mort cellulaire. Plusieurs molécules ont été développées et des essais cliniques en cours évaluent leur efficacité (Tomao *et al.*, 2015).

Les différents sous-types moléculaires permettent aux médecins d'orienter les choix de traitements. Cependant, en cas de métastases, il est difficile de prédire la réponse à une ligne de traitement particulière, du fait de l'hétérogénéité tumorale inter-patiente pour un même sous-type, voire même intra-tumorale. En effet, des lignes de traitement sont administrés aux patients, qui voient leur maladie diminuer puis progresser de nouveau. Cette nouvelle progression est due à la mise en place de phénomènes de résistances. Une nouvelle ligne de traitement est donc proposée, jusqu'à une nouvelle résistance et ainsi de suite. Les études s'orientent ainsi vers des analyses complémentaires de "multi-omiques", à savoir protéomique, lipidomique et métabolomique, qui viendraient compléter les données connues de génomique et transcriptomique, afin de prédire la possibilité de récurrence, mieux adapter les traitements pour chaque patiente et enfin, comprendre les mécanismes de résistance mis en place. L'immunothérapie, ciblant le système immunitaire, représente une nouvelle opportunité de traitement, et plusieurs essais cliniques sont en cours dans le cancer du sein (Polk *et al.*, 2018).

2. Radiothérapie et radiobiologie

La radiothérapie est l'une des principales options thérapeutiques utilisées dans les cancers solides et dans le cancer du sein en particulier. Elle induit des arrêts de

croissance et la mort cellulaire dans les cellules ciblées, permettant ainsi d'éliminer les cellules cancéreuses caractérisées par une prolifération importante. Elle peut être externe ou interne selon la localisation de la source d'irradiation. Les rayons X et les rayons γ sont dits ionisants puisqu'ils sont capables de transformer les atomes traversés en ions. L'effet sur le corps varie selon la dose reçue. Plusieurs unités de mesure sont utilisées dans ce domaine : le becquerel (Bq) mesure l'activité de la matière radioactive ou l'intensité d'une source ; le gray (Gy) correspond à la quantité d'énergie absorbée par unité de poids d'un tissu ou organe, ou dose absorbée ; enfin, le sievert (Sv) détermine l'effet biologique des rayons ionisants.

a. Effets de la radiothérapie

Les conséquences biologiques des rayonnements ionisants sont directement liées aux dommages causés à l'ADN des cellules ciblées. Les lipides et les protéines sont également affectés. L'ADN peut être directement excité par les rayons ionisants : il s'agit de l'effet direct des radiations. Les rayonnements ionisants agissent également sur d'autres molécules dans la cellule, en particulier sur les molécules d'O₂, ce qui peut générer des radicaux libres, appelés espèces réactives de l'oxygène (ROS, *Reactive Oxygen Species*) et responsables des effets indirects des radiations. Parmi les ROS produites par les rayonnements ionisants, on retrouve l'anion superoxyde (O₂^{•-}), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le radical hydroxyle (•OH). Ces ROS sont à l'origine d'un stress oxydant. Un autre effet indirect de la radiothérapie est l'induction d'un effet *bystander* défini comme l'action de l'irradiation sur des cellules à distance qui n'ont pas été irradiées. Ces effets peuvent être médiés par la sécrétion de protéines particulières telles que des cytokines (Prise et O'Sullivan, 2009) ainsi que par la production de vésicules extracellulaires (VEC) induite par l'irradiation (Jella et al., 2014 ; Xu et al., 2015c ; Szatmari et al., 2017). En effet, les VEC pourraient participer aux effets *bystander* de l'irradiation (Al-Mayah et al., 2012). Les auteurs montrent ainsi que les VEC collectées à partir du milieu de cellules irradiées peuvent induire des dommages à l'ADN de cellules non irradiées et traitées avec ces VEC,

dans une lignée cancéreuse mammaire. De plus, les radiations ionisantes peuvent affecter fortement et spécifiquement la quantité de VEC produites ainsi que leur contenu (Jelonek *et al.*, 2016).

Au niveau de l'ADN, l'irradiation induit des dommages tels que des cassures simple ou double brin. Les lésions simple brin sont considérées comme des dommages sub-létaux, et leur accumulation peut induire la mort cellulaire. Les cassures double brin sont plus létales et des mécanismes complexes de réparation de l'ADN permettent de corriger ces lésions (Jackson, 2002). D'autres lésions sont observées dans la cellule, notamment des pontages inter- ou intra-chaines entre l'ADN ou avec des protéines proches, la peroxydation des lipides et l'oxydation des protéines (Reisz *et al.*, 2014).

Les cassures double brin peuvent être réparées par recombinaison homologue ou par NHEJ. Ces lésions entraînent l'activation des kinases ATM/ATR (*Ataxia-telangectasia mutated/Ataxia-telangectasia and Rad3 related*). L'histone H2AX est phosphorylée et constitue la marque de dommage à l'ADN γ -H2AX. Les kinases CHK1/2 (*Checkpoint kinase 1/2*) sont recrutées et régulent à leur tour de nombreux effecteurs, dont les suppresseurs de tumeur p53 et BRCA1/2, ainsi que des modulateurs du cycle cellulaire tels que les phosphatases de la famille Cdc25. Historiquement, il était admis que la voie ATM-CHK2 était principalement responsable de la réparation des cassures double brin alors que l'axe ATR-CHK1 répare plutôt les lésions simple brin. Cependant des études montrent une interrelation entre les deux voies (Smith *et al.*, 2010). L'activation des différents acteurs peut résulter en un arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et la sénescence ou la mort cellulaire (Tutt et Yarnold, 2006 ; Gladstone et Su, 2012). Parmi les mécanismes de mort cellulaire activés par la radiothérapie, on retrouve l'apoptose, la catastrophe mitotique, et la sénescence (Eriksson et Stigbrand, 2010).

b. Voies de résistance à la radiothérapie

La radiothérapie va principalement affecter les cellules en prolifération. Les cellules cancéreuses sont donc particulièrement ciblées. Comme on l'étudiera dans le chapitre II.C., les CSC sont résistantes à la radiothérapie.

Des systèmes antioxydants peuvent aussi être mis en place : des enzymes, telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase, et les glutathions peroxydases permettent d'éliminer les radicaux libres présents après irradiation. Ainsi, la surexpression de SOD1 dans des cellules de gliome entraîne la radiorésistance de ces cellules (Gao *et al.*, 2008).

Les radiations peuvent également entraîner l'activation de voies de signalisation impliquées dans la survie cellulaire. Les récepteurs de la famille HER (HER1-4) sont notamment activés par les radiations ionisantes (Yan *et al.*, 2015). De même, les voies ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*) et AKT sont activés par les rayons ionisants. Ces différentes signalisations vont promouvoir la résistance à l'apoptose ainsi que les mécanismes de réparation de l'ADN, favorisant la survie de la cellule (Hein *et al.*, 2014). Les ROS peuvent induire l'activation de voies de signalisation particulières, dont les voies NF- κ B (*Nuclear Factor kappa B*), MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*), PI3K/AKT (*Phosphoinositide 3-Kinase*). Ainsi, un excès de ROS, induit par exemple par les rayons ionisants, peut entraîner une dérégulation de ces voies de signalisation et leur suractivation (Hein *et al.*, 2014 ; Zhang *et al.*, 2016).

La résistance aux thérapies et les récives représentent un challenge de taille dans la prise en charge du cancer du sein, qui demeure la première cause de mortalité chez la femme. La survie globale diminue notamment dans le cas de rechutes et de métastases, dont l'origine peut être la présence de cellules souches cancéreuses (CSC). Comme nous allons le voir dans la partie suivante, les CSC sont résistantes aux chimiothérapies, aux thérapies ciblées, ainsi qu'à la radiothérapie, et représentent donc des cibles d'intérêt afin de diminuer le risque de rechute.

II. Les cellules souches cancéreuses

A. Propriétés des cellules souches normales

Le terme de cellule souche apparaît pour la première fois en 1868, quand Ernst Haeckel décrit l'œuf fertilisé comme une cellule souche à l'origine de l'ensemble de l'organisme. Au cours du XX^{ème} siècle, l'existence de la cellule souche hématopoïétique commune aux lignées lymphoïdes et myéloïdes a été mise en évidence par Till et McCulloch (Till et McCulloch, 1961 ; Till *et al.*, 1964). La cellule souche est décrite comme une cellule aux capacités prolifératives indéfinies, et qui peut donner naissance à de nouvelles cellules souches ainsi qu'à des cellules filles plus différenciées.

1. Potentialité des cellules souches

Lorsque les cellules se différencient, évoluant de l'état de cellules souches à l'état de cellules spécialisées, leur capacité à donner des types cellulaires différents, ou potentialité, diminue alors que le degré de différenciation augmente. Ainsi, on distingue les **cellules souches totipotentes**, issues des premières divisions de l'œuf fécondé, et capables de donner naissance à tous les types cellulaires qui constituent l'organisme. Ensuite, les **cellules souches pluripotentes** forment la masse cellulaire interne du blastocyste et correspondent aux cellules souches embryonnaires (ESC, *Embryonic Stem Cell*). Elles sont à l'origine des trois feuillets embryonnaires (mésoderme, endoderme et ectoderme). Les **cellules souches multipotentes** sont des cellules retrouvées chez le fœtus et l'adulte, capables de générer plusieurs types cellulaires, mais souvent au sein d'un même organe ou tissu. Elles sont ainsi déjà engagées dans une voie de différenciation. Elles correspondent aux cellules souches somatiques (SSC, *Somatic Stem Cells*). Enfin, les **cellules souches unipotentes** sont responsables de la (ré)génération d'un seul type cellulaire, et s'auto-renouvellent (Figure 10). L'expression de certains facteurs est associée à la pluripotence cellulaire : OCT4 (*Octamer-binding transcription factor 4*), SOX2 (*Sex determining region Y-*

box 2) et NANOG en font partie et sont particulièrement exprimés dans les cellules souches pluripotentes ainsi que dans l'embryon (De Los Angeles *et al.*, 2015).

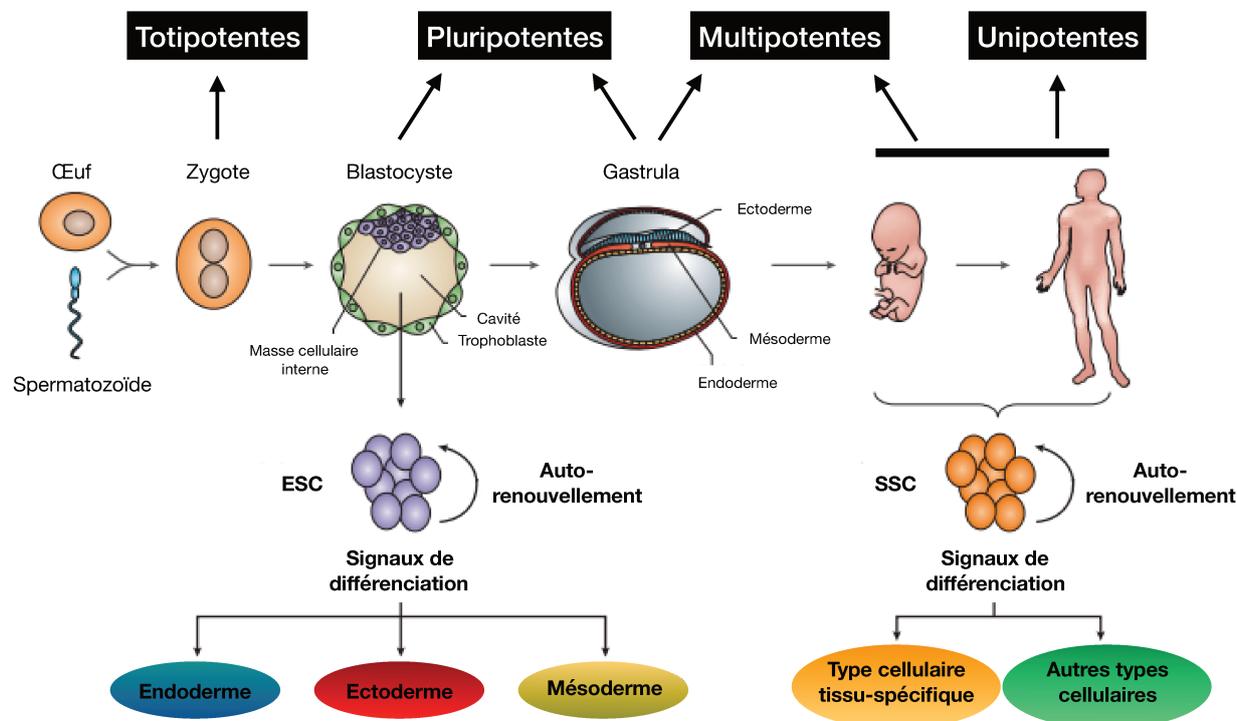


Figure 10. Origine et potentialité des cellules souches embryonnaires et adultes.

La fécondation de l'œuf par le spermatozoïde est à l'origine de la formation du zygote, totipotent. De nombreuses divisions permettent d'aboutir à l'embryon pluricellulaire. Les cellules souches embryonnaires (ESC) sont retrouvées dans la masse interne du blastocyste et peuvent régénérer les trois feuilletts embryonnaires. Les cellules souches somatiques (SSC) sont présentes chez le fœtus et l'adulte et peuvent se différencier en un ou plusieurs types cellulaires (Adapté de O'Connor et Crystal, 2006).

2. Auto-renouvellement

L'auto-renouvellement des cellules souches marque leur capacité à proliférer et à se maintenir dans un tissu donné, de manière indéfinie, ceci tout en conservant leur potentialité. Ainsi, la division d'une cellule souche est définie comme **symétrique**, si celle-ci produit deux cellules filles souches ; elle est dite **asymétrique** lorsqu'elle génère une cellule souche identique et une cellule plus différenciée. La cellule plus différenciée est appelée progénitrice et possède des potentialités restreintes.

L'auto-renouvellement des cellules souches est un processus finement régulé : la perte de capacité d'auto-renouvellement est délétère pour la régénération tissulaire

alors qu'un auto-renouvellement accru peut être à l'origine du développement tumoral. Ainsi, les cellules souches sont généralement quiescentes (Fuchs et Chen, 2013). La division asymétrique des cellules est déterminée par des facteurs extrinsèques, qui ségrègent les deux cellules filles dans deux environnements distincts. Elle peut aussi être définie par des facteurs intrinsèques exprimés différemment aux pôles de la cellule. La niche des cellules souches joue donc un rôle essentiel dans la différenciation. Enfin, une combinaison de facteurs intrinsèques et extrinsèques peut également réguler la division asymétrique (Chen *et al.*, 2016). L'étude des cellules souches adultes a été permise grâce aux expériences de suivi de lignage cellulaire. Celles-ci démontrent non seulement le maintien d'un pool de cellules souches à long terme dans un tissu, mais aussi la régénération de ce tissu à partir de la différenciation des cellules souches (Fuchs et Chen, 2013).

3. Facteurs et voies de signalisation associés aux cellules souches

La biologie des cellules souches est régulée par plusieurs facteurs et voies de signalisation. Ceux-ci sont impliqués dans le maintien de la pluripotence et l'auto-renouvellement des cellules souches. L'activation des différents effecteurs est dépendante du contexte cellulaire.

a. Facteurs associés à la pluripotence

Certains facteurs sont indispensables dans le maintien de la pluripotence des ESC : il s'agit de SOX2, OCT4 et NANOG (Boyer *et al.*, 2005).

SOX2 appartient à la famille de facteurs de transcription SOX, capables de lier spécifiquement l'ADN via un domaine HMG (*High mobility group*). L'expression de SOX2 est essentielle lors du développement embryonnaire et des mutants KO (*Knock out*) pour SOX2 ne sont pas viables (Avilion *et al.*, 2003). A l'âge adulte, la présence de SOX2 est également importante pour le maintien de l'homéostasie tissulaire. Enfin, SOX2 est retrouvée amplifiée dans un certain nombre de cancers. De manière

intéressante, les voies de signalisation telles que Wnt, Notch et Hedgehog peuvent être activées par SOX2 (Liu *et al.*, 2013b).

OCT4 est un facteur de transcription, codé par le gène *POU5F1* (*POU domain, class 5, transcription factor 1*) et principalement exprimé dans les ESC. Comme SOX2, OCT4 est capable de se lier à l'ADN au niveau de motifs octamériques localisés dans les régions promotrices et/ou régulatrices de ses gènes cibles. Plus de 1000 promoteurs cibles de OCT4 ont ainsi pu être identifiés (Jin *et al.*, 2007 ; Boyer *et al.*, 2005). OCT4 peut coopérer avec des protéines du groupe Polycomb (PcG) pour inhiber l'expression de certains gènes, impliqués notamment dans la différenciation et l'établissement du lignage cellulaire (Fouse *et al.*, 2008). Enfin, OCT4 peut s'associer avec SOX2 et former un hétérodimère qui régule l'expression du gène *NANOG* (Rodda *et al.*, 2005).

NANOG est un facteur de transcription à homéodomaine impliqué dans le développement précoce et l'identité cellulaire. Le facteur NANOG est capable de maintenir la pluripotence des ESC. De plus, dans un modèle murin déficient en NANOG, la masse interne du blastocyste se différencie et ne prolifère pas *in vitro* (Mitsui *et al.*, 2003 ; Chambers *et al.*, 2003). L'action de NANOG passe par son homodimérisation, requise pour son interaction avec d'autres facteurs associés à la pluripotence (Wang *et al.*, 2008). L'expression de NANOG est finement régulée par des mécanismes épigénétiques, en particulier par la protéine EZH2 (*Enhancer of Zeste Homolog 2*) et la marque répressive H3K27me3 (Villasante *et al.*, 2011).

D'autres facteurs comme **c-Myc** et **KLF4** sont également impliqués dans la régulation des cellules souches (Varlakhanova *et al.*, 2010 ; Kim *et al.*, 2012). L'importance de tous ces facteurs a été mise en évidence par l'équipe du professeur Yamanaka, qui a montré que la seule transfection des facteurs OCT4, SOX2, KLF4 et c-Myc était suffisante pour induire la dédifférenciation de fibroblastes murins et leur reprogrammation vers un état pluripotent (Takahashi et Yamanaka, 2006).

b. Voies de signalisation

Plusieurs voies de signalisation sont clairement associées au développement et à l'homéostasie tissulaire, et peuvent être activées par les différents facteurs de transcription pré-cités.

La **voie Wnt** (*Wingless-type MMTV Integration Site*) participe à la fois au contrôle de l'embryogenèse et au maintien de l'homéostasie tissulaire chez l'adulte. Dans la cellule, la signalisation est initiée par la liaison du ligand Wnt au niveau des récepteurs LRP5/6 (*Low-Density Lipoprotein-related receptor proteins*) et Frizzled. Elle aboutit à l'accumulation de la β -Caténine et à sa translocation dans le noyau. La β -Caténine régule l'activité transcriptionnelle de gènes impliqués dans la pluripotence en formant un complexe avec les facteurs LEF (*Lymphoid enhancer factor*) et TCF (*T-cell factor*) (Holland *et al.*, 2013). L'activation de la voie Wnt dans des cellules souches pluripotentes promeut l'auto-renouvellement de ces cellules mais n'est pas indispensable au maintien de la pluripotence. En effet, l'inhibition de cette voie n'induit pas la différenciation des cellules souches pluripotentes (Xu *et al.*, 2016). L'implication de Wnt dans l'auto-renouvellement des cellules souches a été montrée dans plusieurs niches, dont le follicule pileux, la glande mammaire et le système hématopoïétique (Clevers et Nusse, 2012).

La **voie Notch** est très conservée au travers de l'évolution et agit via des interactions intercellulaires. En effet, le récepteur Notch est activé par la liaison d'un ligand transmembranaire DLL (*Delta-like ligand*) ou Jagged d'une cellule voisine. Notch est alors clivé et la partie intracellulaire est transloquée dans le noyau où elle agit au sein d'un complexe comme facteur de transcription (Hori *et al.*, 2013). Les effets de l'activation de cette voie sont dépendants du contexte cellulaire, dans les conditions physiologiques comme pathologiques. Ainsi, la voie Notch module la différenciation cellulaire, la prolifération et la survie. En particulier dans le cancer, Notch peut jouer le rôle d'oncogène ou de suppresseur de tumeur (South *et al.*, 2012). Les familles de gènes *HES* (*Hairy and Enhancer of Split*) et *HEY* (*Hairy/Enhancer of Split related with YRPW motif protein 1*) sont des gènes cibles de la voie

Notch, codant pour des facteurs de transcription réprimant l'expression de facteurs tissu-spécifiques et maintenant ainsi les potentialités des cellules souches (Iso *et al.*, 2003). L'étude du développement de la glande mammaire montre une implication de la voie Notch, et particulièrement Notch4 qui module la différenciation cellulaire. Ainsi, des altérations de cette voie peuvent participer à la tumorigenèse mammaire (Guo *et al.*, 2011b).

Enfin, la **voie Hedgehog** est très active lors de l'embryogenèse et permet la mise en place de nombreux tissus. Son activation est également maintenue dans différents tissus adultes (Petrova et Joyner, 2014). Les protéines Hh (*Hedgehog*) sont des protéines sécrétées qui se lient sur le récepteur membranaire PTC (*Patched*), activant ainsi le co-récepteur SMO (*Smoothed*). Les facteurs de transcription GLI (*Glioma-associated oncogene*) sont ensuite mobilisés par la cascade de signalisation, et modulent alors l'expression de gènes particuliers (Robbins *et al.*, 2012). Le rôle de la voie Hh a été particulièrement établi dans la mise en place du système nerveux central et dans le maintien de la neurogenèse (Petrova et Joyner, 2014). Dans la glande mammaire, il semble que la signalisation Hh ne soit pas indispensable à son bon développement. En revanche, une activation constitutive des facteurs GLI entraîne des défauts de formation du bourgeon mammaire (Hatsell et Cowin, 2006).

De manière plus générale, d'autres voies moléculaires sont associées à la pluripotence et au maintien des cellules souches. La cytokine LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) permet de maintenir les ESC à l'état indifférencié. Cette fonction passe par l'activation de tyrosines kinases de la famille des kinases JAK (*Janus kinase*). Les protéines JAK phosphorylent ensuite le récepteur de LIF, ce qui permet le recrutement de **STAT3**, sa dimérisation et sa translocation dans le noyau (Niwa *et al.*, 1998). Des gènes impliqués dans le maintien de l'auto-renouvellement des ESC ainsi que des gènes régulés par Nanog sont retrouvés parmi les gènes cibles de STAT3, tels que *KLF4* (*Krüppel-Like Factor 4*) (Bourillot *et al.*, 2009). Des facteurs de croissance tels que le FGF peuvent également participer au maintien des potentialités des cellules souches. Ainsi, l'inhibition de la voie **MEK/ERK** (*MAPK*

Kinase), activée par le FGF, entraîne une perte des capacités d'auto-renouvellement dans des ESC humaines (Li *et al.*, 2007). Le FGF peut également stimuler la signalisation **PKC** (*Protein kinase C*), promouvant cette fois la différenciation cellulaire (Feng *et al.*, 2012). La multiplicité des voies de signalisation impliquées dans la pluripotence reflète bien l'existence de régulations fines entre maintien des cellules souches et différenciation.

B. Les cellules souches cancéreuses

1. Historique et définition

La première identification des cellules souches cancéreuses (CSC) date de 1997, quand Bonnet et Dick démontrent l'existence d'une hiérarchie cellulaire dans la leucémie myéloïde aiguë (LAM). En haut de cette hiérarchie résident les cellules initiatrices de leucémie, ou cellules souches leucémiques, capables de se différencier *in vivo* pour reproduire l'hétérogénéité leucémique observée chez le patient, tout en conservant d'importantes capacités d'auto-renouvellement. Ces cellules particulières sont caractérisées par des marqueurs de surface particuliers, à savoir CD34⁺⁺/CD38⁻, et d'autres phénotypes, tels que les cellules CD34⁺/CD38⁺, n'entraînent pas de développement tumoral (Bonnet et Dick, 1997). Les CSC ont ensuite été mises en évidence dans la plupart des tumeurs solides, et en particulier dans le cancer du sein en 2003. Al-Hajj et collaborateurs ont été les premiers à identifier des CSC mammaires, une fois encore grâce à l'expression de marqueurs de surface. Ainsi, les cellules CD44⁺/CD24^{-low}/lin⁻ sont seules capables de former des tumeurs en souris SCID (*Severe combined immunodeficiency*), en particulier lorsqu'un très faible nombre de cellules est injecté (Al-Hajj *et al.*, 2003).

Depuis, la présence de ces CSC a été démontrée dans de nombreuses tumeurs solides : gliomes (Singh *et al.*, 2003), mélanomes (Fang *et al.*, 2005), cancers de la prostate (Collins *et al.*, 2005), cancers des ovaires (Bapat *et al.*, 2005), cancers du colon (O'Brien *et al.*, 2006), cancers du pancréas (Hermann *et al.*, 2007), cancers hépatiques (Ishikawa *et al.*, 2007), cancers des voies aérodigestives supérieures

(VADS) (Prince *et al.*, 2007), cancers du poumon (Eramo *et al.*, 2008), cancers gastriques (Takaishi *et al.*, 2009). Dans toutes ces études, les CSC, ou cellules initiatrices de tumeurs, partagent des caractéristiques communes avec les cellules souches normales, et sont ainsi définies comme une sous-population cellulaire rare (Ishizawa *et al.*, 2010), multipotente, et capable de s'auto-renouveler. Ces cellules particulières possèdent la capacité intrinsèque de reformer une nouvelle tumeur, qui présente une hétérogénéité phénotypique. Elles sont à l'origine de l'émergence du modèle de développement tumoral hiérarchique (Reya *et al.*, 2001).

2. Modèles de développement et origines du cancer

Le cancer du sein, comme les autres tumeurs solides, est une maladie hétérogène. Cette hétérogénéité se retrouve à la fois au niveau inter-tumoral, comme étudié dans le chapitre I.C, mais également au niveau intra-tumoral. En effet, les cellules cancéreuses formant la masse tumorale sont très variables, et diffèrent par de nombreux aspects (taille, morphologie, expression d'antigènes, prolifération, interactions cellulaires, potentiel métastatique, chimio- et radio-résistance). Historiquement, il existait deux modèles expliquant d'une part le développement tumoral et d'autre part cette hétérogénéité (Figure 11) (Campbell et Polyak, 2007). Nous allons également voir comment ces deux modèles peuvent être unifiés en un troisième modèle.

a. *Modèle de développement stochastique*

Le modèle d'évolution clonale, ou stochastique, proposé en 1976, stipule que toutes les cellules de la tumeur sont capables de former une nouvelle tumeur et qu'elles participent toutes au développement tumoral (Nowel, 1976). Ces clones proviendraient de l'accumulation de différentes mutations génétiques et altérations épigénétiques qui entraînent l'émergence de sous-populations distinctes. Ainsi, les mutations apparaissent aléatoirement tout au long du développement tumoral et sont favorisées par l'instabilité chromosomique qui caractérise les cellules

cancéreuses (Lengauer *et al.*, 1998). De plus, elles peuvent apporter un gain de fonction à la cellule comme la résistance à l'apoptose. Dans le cancer du sein, plusieurs études ont montré l'existence d'une diversité clonale chez un même patient (Torres *et al.*, 2007; Nakada *et al.*, 2017).

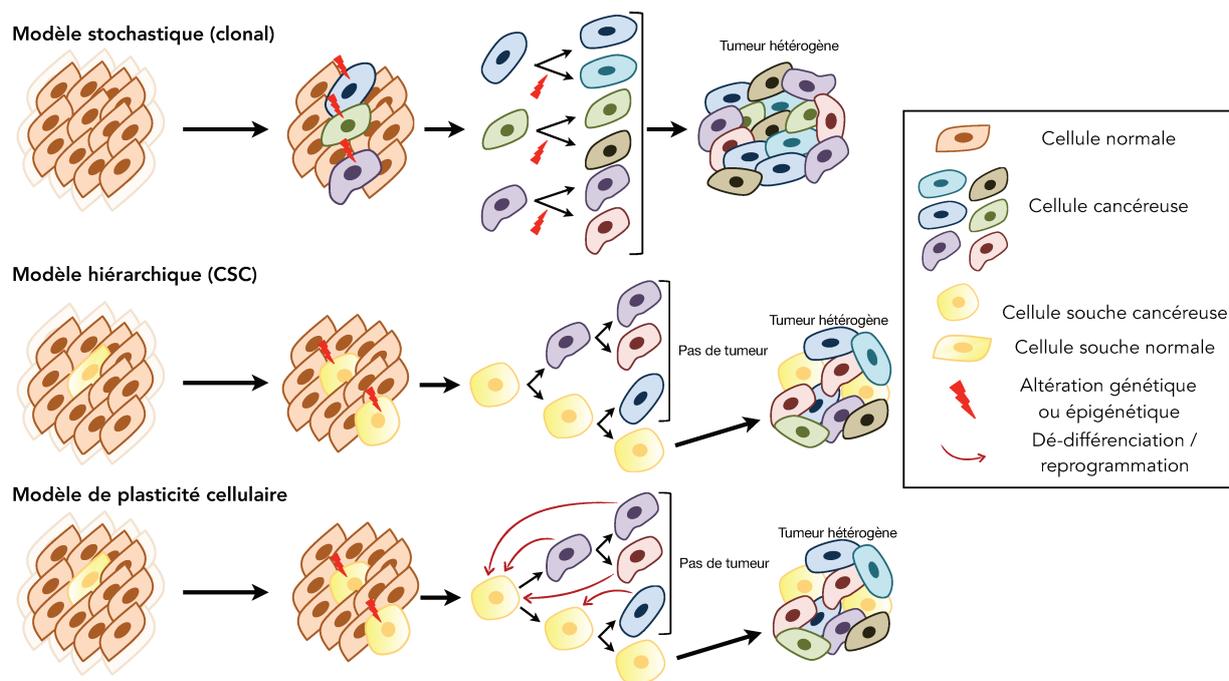


Figure 11. Modèles de développement tumoral.

Selon le modèle de développement stochastique, ou clonal, les cellules acquièrent des mutations au cours du développement tumoral, et toutes les cellules ont la capacité de former une tumeur. Le modèle hiérarchique repose sur l'existence de CSC, qui possèdent seules le potentiel tumorigène ; les cellules plus différenciées ne peuvent pas reformer de tumeur. Un troisième modèle, plus récent, stipule que les cellules cancéreuses présentent une grande plasticité leur permettant de se "dé-différencier" en CSC tumorigènes (Adapté de Rich, 2016).

b. Modèle de développement hiérarchique

A l'inverse, le modèle de développement hiérarchique propose que seule une sous-population cellulaire rare possède la capacité intrinsèque de former une tumeur. On parle alors de CSC, qui, comme les cellules souches normales, sont capables d'auto-renouvellement et de différenciation. Les CSC seraient donc responsables de l'initiation, du développement et de la progression tumorales. Ce modèle explique l'hétérogénéité tumorale par les capacités de différenciation des CSC. En effet, lorsque ces cellules sont transplantées en souris, elles régénèrent une tumeur

possédant la même hétérogénéité phénotypique que la tumeur d'origine (Al-Hajj et al., 2003). Ces cellules constituent également une population particulière capable de métastaser, et leur résistance aux thérapies entraîne les récurrences après traitement (Campbell et Polyak, 2007). L'activation des voies de signalisation associées à la pluripotence (cf. Chapitre II.A.3.a.) dans les CSC suggèrent qu'elles proviennent des cellules souches normales adultes et de cellules progénitrices, ayant subi des mutations aléatoires, ou de cellules spécialisées qui se différencient (Pardal et al., 2003).

Dans le cancer du sein, cette théorie expliquerait également l'hétérogénéité inter-tumorale, puisque la "cellule d'origine" ayant subi les premières mutations déterminerait le sous-type de cancer du sein (Figure 12) (Visvader, 2009; Morel et al., 2017).

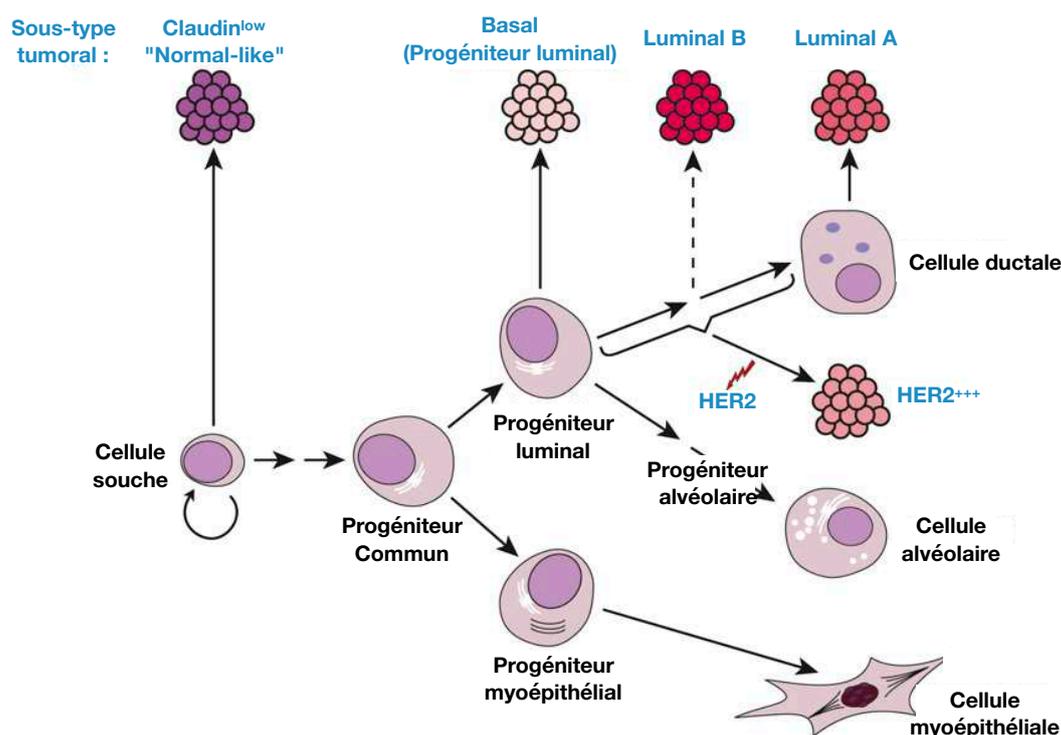


Figure 12. Hiérarchie épithéliale mammaire normale et cancéreuse.

La cellule d'origine diffère selon les différents sous-types de cancer du sein. La hiérarchie cellulaire mammaire explique ainsi l'existence d'une hétérogénéité inter-tumorale (Adapté de Visvader, 2009).

c. *Modèle de plasticité cellulaire*

Les deux modèles précédents ne sont pas mutuellement exclusifs et peuvent être réunis en un modèle impliquant la plasticité des cellules cancéreuses. Ce modèle, présenté en figure 11, stipule que les cellules cancéreuses non souches (non-CSC) peuvent se dé-différencier en CSC (Rich, 2016). De nombreux stimuli peuvent être à l'origine de cette dé-différenciation/reprogrammation et seront discutés dans le chapitre III. Cette théorie implique que l'état de CSC est transitoire, et qu'il peut être activé dans certaines conditions. Ainsi, l'EMT, phénomène transitoire et réversible, peut être à l'origine de cette reprogrammation (Mani *et al.*, 2008). Des études ont démontré l'existence de ces réversions, et d'un équilibre très dynamique qui maintient la proportion de CSC au sein de la population totale (Iliopoulos *et al.*, 2011; Chaffer *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2014a). En particulier, Gupta et collaborateurs ont mis en évidence un modèle mathématique permettant de quantifier l'inter-conversion spontanée entre les états basal, luminal ou souche, dans des lignées cancéreuses mammaires. Ils montrent d'ailleurs que chacun des états isolés tend à rétablir l'équilibre entre les différents états (Gupta *et al.*, 2011). D'autre part, plusieurs sous-clones de CSC pourraient co-exister et se différencier en progéniteurs, puis en cellules cancéreuses non tumorigènes, pouvant à leur tour se dé-différencier et maintenir l'hétérogénéité intra-tumorale (Kreso et Dick, 2014).

Mon projet de thèse ainsi que les résultats que j'ai pu obtenir constituent des arguments supplémentaires dans le sens de cette hypothèse de plasticité cellulaire des cellules cancéreuses et des CSC.

3. Marqueurs et isolement des CSC

a. *Marqueurs de surface*

Historiquement, c'est grâce à l'expression de marqueurs de surface que les premières CSC ont été identifiées (Bonnet et Dick, 1997). L'expression de ces protéines membranaires est généralement dépendante du tissu (Tableau 4).

Dans le cancer du sein en particulier, l'expression de la protéine de surface CD44, combinée à l'absence ou à la très faible expression de la protéine membranaire CD24, correspond à une population cellulaire tumorigène, capable de former des tumeurs hétérogènes *in vivo*.

Cependant, lorsque ce marqueur est étudié dans différentes lignées de cancer du sein, on s'aperçoit que la proportion de cellules CD44⁺/CD24^{-/low} est très variable selon la lignée étudiée (0% dans les MCF-7 luminales à 100% dans les SUM159PT ou MDA-MB-231 triple-négatives). Ces lignées diffèrent par leur sous-type : ceci suggère une variation de la population cellulaire souche selon le sous-type tumoral (Fillmore et Kuperwasser, 2008).

Cancer	Marqueurs de surface	Références
Sein	ESA ⁺ /CD44 ⁺ /CD24 ^{-/low}	Al-Hajj <i>et al.</i> , 2003
Gliome	CD133 ⁺	Singh <i>et al.</i> , 2003
Colon	CD133 ⁺	O'Brien <i>et al.</i> , 2006
Mélanome	CD20 ⁺ CD271 ⁺	Fang <i>et al.</i> , 2005 Boiko <i>et al.</i> , 2010
Pancréas	CD133 ⁺ CXCR4 ⁺	Hermann <i>et al.</i> , 2007
Prostate	CD44 ⁺ $\alpha_2\beta_1$ ^{hi} CD133 ⁺	Collins <i>et al.</i> , 2005
Ovaire	CD44 ⁺ /CD117 ⁺	Zhang <i>et al.</i> , 2008
Foie	EpCAM CD133 ⁺	Yamashita <i>et al.</i> , 2009 Suetsugu <i>et al.</i> , 2006
Poumon	CD133 ⁺	Eramo <i>et al.</i> , 2008
Gastrique	CD44 ⁺	Takaishi <i>et al.</i> , 2009
LAM	CD34 ⁺ /CD38 ⁻	Bonnet et Dick, 1997
VADS	CD44 ⁺	Prince <i>et al.</i> , 2007

Tableau 4. Expression de marqueurs de surface spécifiques de CSC dans différents cancers.

ESA = Epithelial surface antigen, EpCAM = Epithelial cell adhesion molecule, LAM = Leucémie myéloïde aiguë, VADS = cancers des voies aérodigestives supérieures (Adapté de Takahashi *et al.*, 2011).

b. Activité enzymatique de l'ALDH - test Aldefluor

L'ALDH (Aldéhyde Déshydrogénase) est une enzyme responsable de l'oxydation des aldéhydes en acides carboxyliques, impliquée notamment dans le métabolisme oxydatif du rétinol en acide rétinoïque. Le test Aldefluor est utilisé pour identifier les

cellules souches mammaires normales et cancéreuses et repose sur la détection de l'activité enzymatique de l'ALDH (Ginestier *et al.*, 2007). En effet, les cellules souches présentent une activité accrue de cette enzyme, et celle-ci peut être détectée par l'apport d'un substrat non fluorescent, qui le devient lorsqu'il est clivé par l'ALDH. Dans le cancer du sein en particulier, l'activité des isoformes ALDH1A1 et ALDH1A3 est caractéristique des CSC (Marcato *et al.*, 2011a; Marcato *et al.*, 2011b). Les CSC ALDH⁺ sont caractérisées par une tumorigénicité accrue, ainsi que des capacités d'auto-renouvellement et de différenciation. De plus, l'inhibition de l'ALDH sensibilise les CSC ALDH⁺/CD44⁺ à la chimiothérapie et à la radiothérapie (Crocker et Allan, 2012). Ce marqueur détecte également les CSC dans d'autres types de cancer comme les cancers de la vessie et du col de l'utérus (Xu *et al.*, 2015b).

c. Exclusion de colorants vitaux - Side population

La population exclue ou "*side population*" repose sur l'activité élevée de pompes d'efflux de la famille ABC (*ATP binding cassettes*), exprimées à la membrane des cellules souches normales et cancéreuses. Elle peut être identifiée en cytométrie de flux par un test d'exclusion de colorants vitaux fluorescents tels que le Hoechst 33342. Ces transporteurs membranaires sont notamment impliqués dans l'efflux de chimiothérapies par les CSC, et sont ainsi associés à la chimiorésistance (Zhou *et al.*, 2001; Wu et Alman, 2008).

d. Activité faible du protéasome

De nombreuses fonctions cellulaires sont régulées par le protéasome, telles que les mécanismes de réparation de l'ADN et le contrôle du cycle cellulaire. Il a été montré que les CSC ont une activité faible du protéasome dans le cancer du sein, de la prostate, des poumons, du colon et dans les gliomes (Vlashi *et al.*, 2009; Pan *et al.*, 2010; Della Donna *et al.*, 2012; Munakata *et al.*, 2016; Lenos et Vermeulen, 2016). L'utilisation d'un rapporteur de l'activité du protéasome permet d'isoler une population enrichie en CSC. Ainsi, si les cellules à faible activité protéasomale sont

spécifiquement éliminées, une régression tumorale est observée *in vivo* (Vlashi et al., 2009; Vlashi et al., 2013).

e. *Capacité de formation de sphères*

Outre l'expression de marqueurs particuliers, des tests fonctionnels ont également été mis au point et sont reconnus comme des tests essentiels afin de définir une population souche. Le premier test repose sur la capacité des cellules souches à croître en l'absence d'ancrage. Les cellules sont ainsiensemencées en faible quantité dans du milieu particulier, enrichi en facteurs de croissance et dépourvu de sérum, et dans des conditions de culture non adhérentes. Le nombre de sphères formées est ensuite compté, permettant de définir le pourcentage de formation de sphères ou capacité à former des sphères (SFC, *Sphere forming capacity*) (Lombardo et al., 2015). Cette technique a été mise au point en 1996 par Reynolds et Weiss dans le cadre de l'étude des cellules souches neuronales (Reynolds et Weiss, 1996). Il est important de noter que la culture de sphères permet dans un premier temps, de sélectionner les cellules souches et progénitrices, et dans un second temps d'éliminer toutes les cellules différenciées. Il est également possible de cultiver les sphères sur plusieurs générations, ce qui élimine les cellules progénitrices.

f. *Tumorigénicité in vivo*

Le second test fonctionnel est le test de tumorigénicité *in vivo*. Il repose sur les différentes caractéristiques des CSC, à savoir l'auto-renouvellement et la différenciation. Les CSC potentielles sont injectées en nombre limité chez la souris. La croissance de la tumeur est ensuite observée, et la présence ou l'absence de développement tumoral définit le caractère souche de la population testée, ou du moins son enrichissement en CSC. Un autre caractère important est la capacité de ces cellules à former des tumeurs en série, lorsqu'elles sont transplantées vers un organisme receveur, et à reproduire l'hétérogénéité de la tumeur initiale. Cette technique reste la meilleure méthode pour caractériser les cellules initiatrices de

tumeur et permet également d'étudier la capacité de différenciation des cellules, en étudiant l'hétérogénéité de la tumeur nouvellement formée (Visvader et Lindeman, 2008).

4. La niche des CSC

Les cellules souches normales ou cancéreuses résident au sein d'une niche, définie comme un microenvironnement spécialisé dans lequel elles résident, qui participe à leur survie et au maintien de leurs caractéristiques. La niche est constituée de protéines de la MEC qui structurent la niche, de cellules stromales de soutien qui interagissent avec les cellules souches, de vaisseaux sanguins permettant l'apport de signaux systémiques et le recrutement de cellules immunitaires, de fibres nerveuses et de réseaux de cytokines et facteurs de croissance (Jones et Wagers, 2008). Le développement d'une niche de CSC peut se faire par différents mécanismes comme décrits dans la figure 13.

a. Communication intercellulaire

Au sein de leur niche, les CSC vont interagir avec l'ensemble des cellules stromales qui la compose. Ces interactions se font par contact direct ou par la sécrétion de facteurs qui agissent de manière paracrine. Ainsi, les CAF (*Cancer Associated Fibroblast*) participent à la régulation des CSC, notamment par la sécrétion de HGF qui active la voie de signalisation Wnt (Vermeulen et al., 2010). A l'inverse, les CSC elles-mêmes peuvent se différencier en CAF dans la niche (Nair et al., 2017). De la même manière, les TAM (*Tumor Associated Macrophages*) et les CSC interagissent de manière juxtacrine, via le récepteur EphA4 (*Ephrin type-A receptor 4*). Cette interaction entraîne l'activation des voies Src et NF- κ B et ainsi la sécrétion de cytokines qui vont promouvoir les CSC (Lu et al., 2014). Les chimiokines ainsi que leurs récepteurs jouent également un rôle dans les communications au sein de la niche, qui seront étudiées dans le chapitre IV.C.

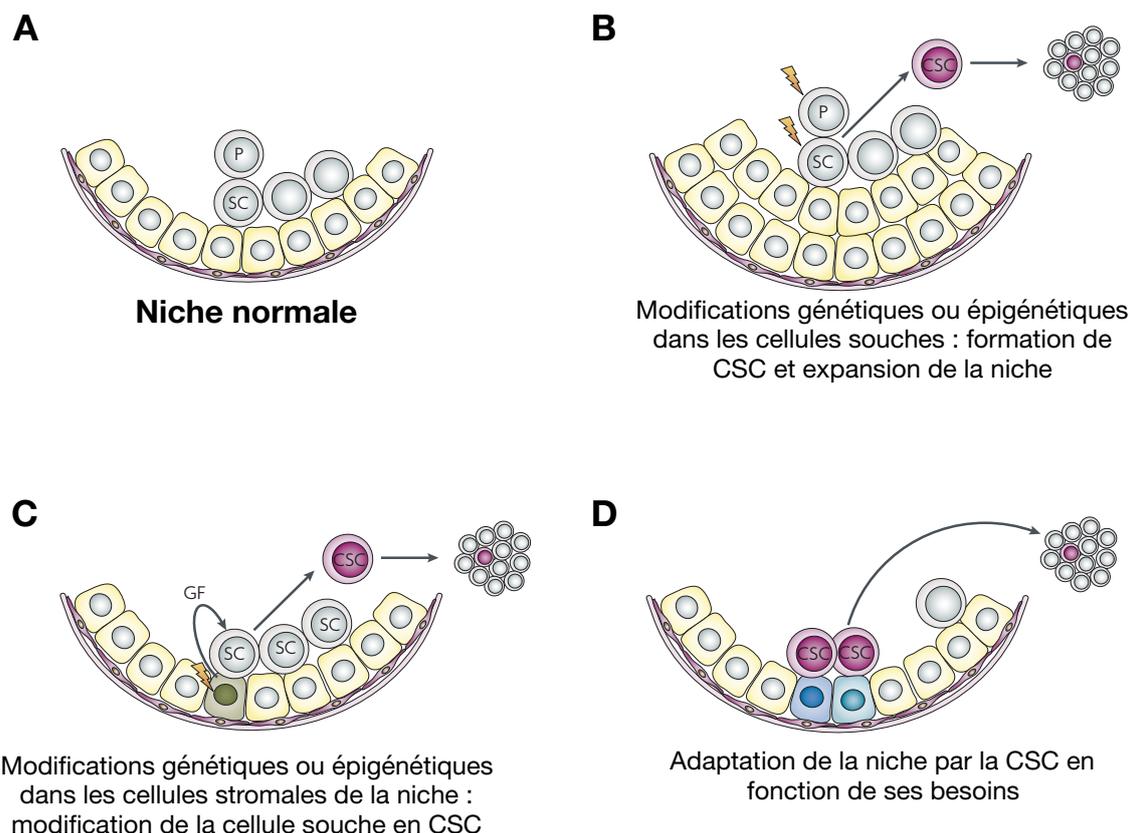


Figure 13. Interaction et adaptation de la niche pour les CSC.

A, la niche normale est composée de cellules stromales de support, de cellules souches normales (SC), de cellules progénitrices (P) ainsi que de cellules cancéreuses non souches. B, les CSC peuvent émerger suite à des modifications génétiques et/ou épigénétiques dans les cellules normales, souches ou progénitrices, entraînant une modification de la niche. C, les cellules stromales de la niche sont modifiées génétiquement ou épigénétiquement (en vert), entraînant par exemple une modification de leur sécrétome et ainsi une émergence de CSC. D, les CSC peuvent adapter la niche selon leurs besoins, les propriétés des cellules stromales sont alors modifiées pour y répondre (en bleu) (Adapté de Visvader et Lindeman, 2008).

b. Rôle de la MEC

La MEC est composée de molécules sécrétées dont des fibres de collagène, des glycoprotéines, et des protéoglycanes. Elle est essentielle au maintien de la niche. L'ancrage des cellules souches dans la matrice détermine également leur capacité à se diviser de façon symétrique ou asymétrique, entraînant soit le maintien des cellules souches, soit leur différenciation. L'organisation spatiale au sein de la niche est déterminante dans l'établissement de la destinée cellulaire (Rompolas *et al.*, 2013). Un déséquilibre entre ces deux mécanismes, causé par exemple par la perte de contact avec la MEC, pourrait donc entraîner une expansion anarchique des cellules souches, et être à l'origine de la niche de CSC (Lu *et al.*, 2012).

c. Hypoxie et angiogénèse

Lors du développement tumoral, des zones plus éloignées des vaisseaux sanguins se retrouvent en conditions d'hypoxie. Une réduction du niveau d'oxygène induit une stabilisation des facteurs HIF (*Hypoxia Inducible Factor*), qui à leur tour induisent la transcription de facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF (Liao et Johnson, 2007). La tumeur est donc composée de zones plus ou moins vascularisées. Les CSC résident dans deux niches, qui apparaissent distinctes au premier abord et qui peuvent coexister dans une même tumeur : la niche hypoxique et la niche périvasculaire (Zhao, 2016).

La niche hypoxique constitue un environnement protecteur pour les CSC, en les mettant notamment à l'abri du stress oxydant induit par les ROS. De plus, l'hypoxie permet de maintenir les CSC de glioblastome à l'état indifférencié, *in vitro* (Li et al., 2013) et d'induire la reprogrammation de non-CSC en CSC dans le glioblastome (Heddleston et al., 2009) (Chapitre III.C.2.d). Dans le cancer du sein, Schwab et collaborateurs ont montré que HIF-1 α est impliqué dans le maintien des CSC CD133+ *in vivo* via l'activation de l'expression de gènes de la voie Notch (Schwab et al., 2012). Des conditions hypoxiques entraînent également un enrichissement en CSC dans le gliome (Qiang et al., 2012).

L'idée de niche périvasculaire repose sur les observations faites par plusieurs équipes, montrant la proximité des CSC avec les vaisseaux sanguins dans la tumeur et l'influence des cellules endothéliales sur la biologie des CSC (Calabrese et al., 2007; Beck et al., 2011). Le VEGF entraîne en effet une expansion du pool de CSC CD34+ ainsi que l'expression de marqueurs de CSC dans un modèle de carcinome cutané (Beck et al., 2011). Enfin, la vascularisation de la tumeur permet également la dissémination de cellules cancéreuses, et de CSC en particulier, dans la circulation sanguine, favorisant ainsi la survenue de métastases. L'idée de thérapies anti-angiogéniques est donc apparue. Cependant, elles sont peu efficaces et l'une des raisons mise en évidence par l'équipe du Pr Wicha est que l'inhibition de

l'angiogenèse entraîne l'hypoxie et ainsi la génération de CSC, notamment dans le cancer du sein (Conley *et al.*, 2012).

C. CSC et thérapies anti-cancéreuses classiques

1. Résistance aux thérapies

Les CSC sont caractérisées par une résistance importante aux thérapies anti-cancéreuses conventionnelles. Alors que les CSC seraient à l'origine de l'initiation et du développement tumoral, cette résistance les rendrait également responsables des récurrences (Chuthapisith *et al.*, 2010). Ainsi, une proportion élevée de cellules exprimant des marqueurs de CSC est de mauvais pronostic et corrélée à la réponse aux traitements (Ginestier *et al.*, 2007; Lagadec *et al.*, 2014). De plus, dans de nombreux modèles, les radiations ionisantes ainsi que les chimiothérapies classiques entraînent un enrichissement de la population de CSC (Yu *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008; Hamilton et Olszewski, 2013; Cole *et al.*, 2014), et l'induction d'un phénotype de CSC dans des cellules initialement non-CSC (Lagadec *et al.*, 2012; Ghisolfi *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2012; Auffinger *et al.*, 2014) (cf. Chapitre III.C.).

a. Chimiorésistance

Des études récentes suggèrent que les CSC constitueraient la principale cause de la chimiorésistance à diverses drogues et dans différents types de cancers, observée cliniquement. Dans le cancer du sein et en particulier les tumeurs triple-négatives, le développement de résistances aux traitements classiques (anthracyclines et taxanes) est fréquent (Dent *et al.*, 2007). Dans un modèle murin de tumeurs mutées *BRCA1/TP53*, les souris présentent une réponse complète au cisplatine, suivie de récurrences deux à trois mois après le traitement, qui sont fortement enrichies en CSC CD29^{hi}/CD24^{med} (Shafee *et al.*, 2008). Un autre modèle murin de TNBC utilisant des PDX (*Patient derived xenograft*) permet de mettre en évidence la présence d'une population tumorigène CD49⁺ qui est enrichie avec l'acquisition de la

chimiorésistance ; en l'absence de cette population, la sensibilité aux taxanes est restaurée (Gomez-Miragaya *et al.*, 2017).

b. Radiorésistance

Les CSC sont également caractérisées par leur résistance à la radiothérapie. Cette résistance a été démontrée pour la première fois dans le gliome par l'équipe du Pr Rich. Après irradiation, la proportion de CSC CD133⁺ augmente et ce sont ces cellules en particulier qui sont responsables de la radiorésistance dans le gliome (Bao *et al.*, 2006). En parallèle, l'équipe du Pr Pajonk a également montré la radiorésistance des CSC CD44⁺/CD24^{-/low} dans le cancer du sein (Phillips *et al.*, 2006). L'implication des CSC dans le phénomène de radiorésistance a ensuite été mise en évidence dans de nombreuses tumeurs solides (Krause *et al.*, 2011). Dans un modèle de suivi du devenir des CSC, Vlashi *et al.* montrent que le nombre de CSC augmente 72h après irradiation, et que la déplétion spécifique de ces cellules entraîne une régression tumorale (Vlashi *et al.*, 2009). Dans le cadre de l'étude de la radiorésistance des CSC et de la reprogrammation, j'ai rédigé une revue de la littérature à ce sujet, présentée en annexe 2.

2. Mécanismes de résistance

De nombreux mécanismes peuvent être impliqués dans les résistances des CSC aux thérapies ; certains mécanismes sont communs entre chimio- et radiorésistance (Figure 14).

- **Expression des pompes d'efflux de type ABC** : les pompes d'efflux permettent l'élimination hors de la cellule des composés chimiques toxiques, comme abordé dans le chapitre II.B.3.c. L'activité de ces pompes est associée à la *side population*, méthode de caractérisation des CSC (Wang *et al.*, 2015a). Ainsi, les CSC qui possèdent une plus forte activité de ces pompes présentent également une chimiorésistance accrue (Chuthapisith *et al.*, 2010).

-**Détoxification et inactivation des drogues** : l'activité de l'enzyme ALDH est élevée dans les CSC (Chapitre II.B.3.b). L'ALDH catalyse notamment une des étapes dans la détoxification des cyclophosphamides et peut ainsi être impliquée dans la chimiorésistance. En effet, une expression élevée de l'ALDH1 est associée à une mauvaise réponse à la chimiothérapie (Tanei *et al.*, 2009). L'expression de l'ALDH protège aussi les CSC contre l'accumulation de ROS après chimiothérapie (Raha *et al.*, 2014).

-**Production de ROS diminuée** : dans le cancer du sein, les CSC CD44⁺/CD24^{-/low} présentent des niveaux plus faibles de ROS ainsi qu'une expression augmentée de gènes impliqués dans le métabolisme des ROS, par rapport aux non-CSC (Diehn *et al.*, 2009). Comme décrit dans le chapitre I.C.2, les effets de la radiothérapie sont en partie médiés par la production de ROS. En conséquence, les CSC dont les niveaux de ROS sont faibles présentent moins de dommages à l'ADN. Diehn et collègues ont également mis en évidence le rôle du GSH (Glutathion) aux fonctions antioxydantes : ainsi, des gènes contrôlant la biosynthèse du GSH sont surexprimés dans la population CSC. Une déplétion du GSH entraîne une radiosensibilisation des cellules. Le GSH est également impliqué dans les mécanismes de chimiorésistance (Traverso *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2015).

-**Altération de la voie de réponse aux dommages à l'ADN (DDR)** : certains agents chimiothérapeutiques ciblent l'ADN, comme le cisplatine, agent alkylant de l'ADN. Dans le colon, les CSC CD133⁺ sont résistantes au cisplatine, et l'inhibition de la signalisation ATR/CHK1 entraîne une chimiosensibilisation et diminue la population CD133⁺ (Gallmeier *et al.*, 2011). La voie DDR est également plus efficace dans les CSC et participe à la radiorésistance : en effet, l'activation de la réparation des dommages à l'ADN est accrue et plus efficace dans les CSC de gliome (Bao *et al.*, 2006) et en particulier, l'activation de la voie ATM est augmentée dans les CSC mammaires (Yin et Glass, 2011).

-**Mise en place d'une niche protectrice** : comme étudié dans le chapitre II.B. 4.c., les CSC sont regroupées au sein d'une niche qui permet leur survie et le maintien de leur pluripotente. La niche hypoxique en particulier peut participer à la résistance aux thérapies : en effet, une faible quantité d'oxygène dans la niche de CSC est associée à une production plus faible de ROS et ainsi moins d'effets des thérapies (Brown et Wilson, 2004). D'autres facteurs de la niche protègent également les CSC des thérapies. Les cellules stromales sécrètent notamment des facteurs comme le HGF ou le TGF- β , qui vont promouvoir la résistance des CSC en activant différentes voies de signalisation (Zhao, 2016).

-**Autres mécanismes** : des **voies de signalisation** particulières peuvent être activées en réponse aux thérapies, dans les CSC, en particulier les voies essentielles au maintien du phénotype souche. Les voies Notch, Hedgehog, Wnt participent au maintien des CSC (Woodward *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010; Steg *et al.*, 2012). La voie Wnt augmente l'expression des pompes d'efflux ABCG2 et peut ainsi promouvoir la chimiorésistance dans les CSC (Chau *et al.*, 2012). D'autres voies de signalisation sont impliquées dans la résistance aux thérapies, telles que NF- κ B, PI3K/AKT ou JAK/STAT (Zhao, 2016). Les CSC CD133⁺ de glioblastome surexpriment également des protéines **anti-apoptotiques**, comme BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*) (Liu *et al.*, 2006). Enfin, les CSC sont caractérisées par leur **quiescence** qui les rend résistantes aux thérapies ciblant les cellules en division (Moore *et al.*, 2012).

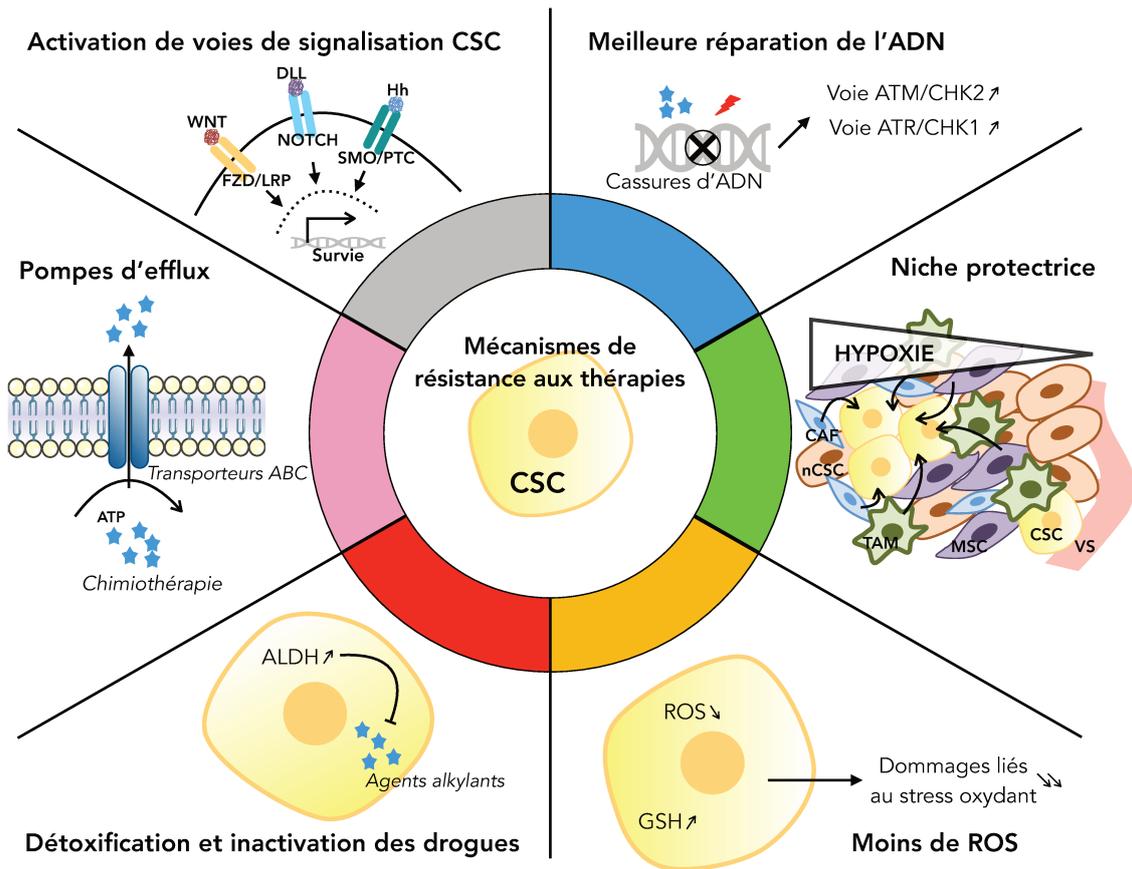


Figure 14. Mécanismes de résistance des CSC aux thérapies anti-cancéreuses conventionnelles.

Les CSC sont caractérisées par leur résistance aux thérapies et plusieurs mécanismes sont impliqués dans ces résistances : (i) une meilleure réparation de l'ADN avec l'activation accrue des voies de réponse aux dommages à l'ADN, ATM/CHK2 et ATR/CHK1 ; (ii) la mise en place d'une niche de CSC hypoxique, donc moins propice à la formation de ROS, et la sécrétion de facteurs de croissance et de cytokines par les cellules stromales, promouvant les voies de survie dans les CSC ; (iii) une production diminuée de ROS, associée à l'augmentation de l'expression de facteurs antioxydants, tels que le GSH, et entraînant moins de dommages liés aux ROS ; (iv) l'activité enzymatique de l'ALDH inactivant certaines chimiothérapies telles que les agents alkylants ; (v) l'expression à la membrane de pompes d'efflux de type ABC expulsant les molécules de chimiothérapie ; (vi) l'activation de voies de signalisation spécifiques des CSC, promouvant leur survie et le maintien de leurs caractéristiques souches. CSC, cellule souche cancéreuse ; nCSC, cellule cancéreuse non souche ; VS, vaisseau sanguin ; MSC, cellule souche mésenchymateuse ; TAM, macrophage associé aux tumeurs ; CAF, fibroblaste associé aux tumeurs.

2. Ciblage thérapeutique des CSC

Malgré l'identification des CSC dans les tumeurs, l'analyse de leur présence chez les patients reste complexe et la prise en compte clinique des CSC représente un enjeu thérapeutique. La plupart des thérapies envisagées contre les CSC vise à les sensibiliser à la radio- et la chimiothérapie, ce qui améliorerait l'efficacité des traitements actuels. Plusieurs cibles ont été envisagées, notamment parmi les voies de signalisation impliquées dans les CSC. L'inhibition des voies Wnt et Notch est étudiée et plusieurs molécules sont en cours d'essai clinique. De manière non exhaustive, le LGK974 cible PORCN (*Porcupine*), protéine membranaire essentielle à la sécrétion de Wnt (phase 1, NCT01351103) (Liu *et al.*, 2013a). La voie Notch peut être inhibée par les GSI (*Gamma-secretase inhibitor*), tels que le LY3039478, qui cible la γ -sécrétase, prévenant l'activation de Notch. Quelques études de phases 1b et 2 sont en cours avec des patients atteints de tumeurs solides (dont le cancer du sein), de leucémies et de lymphomes (NCT02784795, NCT01695005, NCT02836600, NCT02518113). Néanmoins, des résultats partiels montrent une efficacité modeste du traitement sur ces différents types de cancer¹. Les GSI (*Gamma-secretase inhibitor*) restent cependant prometteurs (Barat *et al.*, 2017).

La chimiosensibilisation des CSC peut également passer par l'inhibition des pompes d'efflux, dont l'activité est élevée dans les CSC (McIntosh *et al.*, 2016). La découverte de la salinomycine présente un grand intérêt, puisqu'elle agit non seulement sur les transporteurs de type ABC, mais aussi sur des voies de signalisation telles que AKT, Wnt, Hedgehog et Notch (Gupta *et al.*, 2009; Dewangan *et al.*, 2017). Gupta et collaborateurs montraient d'ailleurs une élimination spécifique des CSC mammaires par la salinomycine. D'autre part, l'inhibition de l'ALDH par le DSF (*Disulfiram*), couplée à la radiothérapie, permet la suppression de la croissance tumorale dans le cancer du sein. Le DSF inhibe aussi le protéasome et bloque ainsi l'activation de la voie NF- κ B (Wang *et al.*, 2014b). Enfin, l'inhibition de CXCR1, récepteur de CXCL8 (Interleukine-8), est responsable d'une déplétion des CSC *in*

¹ News in Brief, Cancer Discov. 2017 Feb;7(2):OF3. doi: 10.1158/2159-8290.CD-NB2016-159.

vitro et en xénogreffes (Ginestier *et al.*, 2010). D'autres cibles sont également à l'étude et résumées par Marcucci *et al.* (Marcucci *et al.*, 2016).

Le modèle de développement hiérarchique unidirectionnel offrait l'hypothèse selon laquelle le seul ciblage des CSC suffirait à la régression tumorale, du fait de l'incapacité des autres cellules cancéreuses non souches à maintenir la tumeur. Cependant, comme le montre le modèle de plasticité cellulaire, le problème est plus complexe et implique des mécanismes de dé-différenciation, ou reprogrammation, de non-CSC en CSC, comme nous allons le voir dans la partie suivante.

III. Plasticité des cellules cancéreuses et reprogrammation

A. Plasticité des cellules normales

Bien que la régénération et la réparation tissulaire soient un processus universel chez de nombreuses espèces, chez les mammifères, et l'Homme en particulier, le processus est incomplet et réservé à certains organes, et il résulte de la différenciation des cellules souches adultes aux potentialités restreintes. Les cellules présentent une certaine plasticité, et peuvent passer d'un état à un autre selon différentes conditions. La transdifférenciation est le passage d'un état cellulaire mature à un autre, en passant ou non par un état moins différencié. La dédifférenciation est la réversion d'un phénotype différencié à un phénotype aux potentialités plus élevées. Ces mécanismes sont beaucoup étudiés chez les espèces dotées de fortes capacités de régénération et présentent des perspectives très intéressantes pour la médecine régénérative. Au niveau expérimental, plusieurs méthodes ont été mises au point pour induire la pluripotence cellulaire :

- le transfert nucléaire somatique, qui correspond au transfert d'un noyau d'une cellule somatique adulte vers un oocyte énucléé (French *et al.*, 2008).

- la fusion cellulaire, induite par différents signaux, et impliquée dans la réparation de tissus (Ogle *et al.*, 2005).

- la reprogrammation nucléaire, décrite par l'équipe du Pr Yamanaka, qui repose sur la surexpression de facteurs spécifiques aboutissant à la génération de cellules souches pluripotentes (iPSC, *induced Pluripotent Stem Cells*), à partir de fibroblastes murins (Takahashi et Yamanaka, 2006). Les auteurs ont ainsi mis en évidence que la surexpression d'OCT4, SOX2, KLF4 et c-Myc était suffisante pour reprogrammer des cellules différenciées en cellules pluripotentes comparables aux cellules souches embryonnaires.

Des études montrent tout de même l'existence d'une dédifférenciation de cellules matures en cellules souches dans des conditions physiologiques (Chaffer *et al.*, 2011 ; Tata *et al.*, 2013). Dans la glande mammaire, l'équipe du Pr Weinberg a notamment observé que les cellules épithéliales mammaires étaient dotées d'une

forte plasticité et que celles-ci pouvaient spontanément se dédifférencier en cellules souches *in vitro*. En effet, la population de cellules épithéliales CD44^{-/low} isolées présente un enrichissement progressif en cellules CD44^{+ /high} au cours du temps, capables de former des mammosphères et de reconstituer le bourgeon mammaire en souris. Cette acquisition spontanée de propriétés de cellules souches est également retrouvée dans des cellules épithéliales mammaires transformées (Chaffer *et al.*, 2011).

B. EMT et CSC : plasticité des cellules cancéreuses

1. La transition épithélio-mésenchymateuse

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est un processus de transdifférenciation d'un phénotype épithélial vers un phénotype mésenchymateux, observé notamment durant la gastrulation et indispensable à la migration cellulaire lors de la morphogenèse. Les cellules perdent ainsi leurs caractéristiques épithéliales comme l'adhésion et la polarité cellulaires, et acquièrent des capacités migratoires et de résistance à l'apoptose, propres aux cellules mésenchymateuses. L'EMT est aussi fortement impliquée dans le cancer, permettant aux cellules cancéreuses de quitter le site de la tumeur primaire, de transmigrer vers un site secondaire et finalement de s'y établir par un processus inverse (MET, *Mesenchymo-Epithelial Transition*) (Scheel et Weinberg, 2012). Ainsi, l'EMT semble être essentielle au cours de la progression tumorale. Alors que les CSC sont décrites comme étant à l'origine de la formation de tumeur, il est intéressant de voir quel est le lien entre CSC et EMT dans le développement cancéreux.

2. Lien entre l'EMT et les CSC

Dans un premier temps, l'EMT a été associée à l'acquisition de caractéristiques de CSC, dans les cellules normales comme dans les cellules cancéreuses (Mani *et al.*, 2008 ; Morel *et al.*, 2008). En effet, l'induction de l'EMT par la surexpression des facteurs de transcription TWIST ou SNAIL dans des cellules épithéliales mammaires

immortalisées entraîne un enrichissement en cellules CD44⁺/CD24^{-/low} et une capacité de formation de sphères accrue ; les cellules induites sont également plus tumorigènes (Mani *et al.*, 2008). Selon Morel et collaborateurs, l'émergence de cellules tumorigènes CD44⁺/CD24^{-/low} à partir de cellules CD44^{low}/CD24⁺ est régulée par l'activation de la voie Ras, et associée à l'expression de marqueurs liés à l'EMT (Morel *et al.*, 2008). D'autres études montrent également l'acquisition de caractéristiques de CSC après induction de l'EMT dans des cellules cancéreuses (Xie *et al.*, 2012 ; Masui *et al.*, 2014 ; Shuang *et al.*, 2014 ; Talati *et al.*, 2015 ; Zhang *et al.*, 2014). De manière générale, les facteurs de transcription induisant l'EMT (ZEB1, *Zinc-finger E-box Binding homeobox-1*, TWIST1, SNAIL1) semblent contrôler l'expression de gènes associés aux CSC, tels que KLF4 et SOX2. L'EMT pourrait donc constituer un processus réversible impliqué dans la régulation dynamique de la balance entre CSC et non-CSC (Ansieau, 2013). Les CSC sont définies comme résistantes aux thérapies, et Creighton et collaborateurs ont montré que les cellules résiduelles après traitements présentent non seulement une signature génique de CSC mais expriment également des gènes associés à la EMT (Creighton *et al.*, 2009).

Toutefois, l'EMT ne semble pas directement responsable de l'acquisition des capacités tumorigènes des CSC. Xie *et al.* ont ainsi mis en évidence que l'induction de l'EMT par différents facteurs entraîne bien l'émergence de CSC CD44⁺/CD24^{-/low} mais n'augmente pas la tumorigénicité des cellules traitées, dans les lignées cancéreuses mammaires. A l'inverse, les auteurs montrent que l'induction de la MET par l'expression ectopique du miR-200c dans des cellules mésenchymateuses ne modifie pas non plus les capacités tumorigènes des cellules (Xie *et al.*, 2014).

D'autre part, l'équipe du Pr Wicha a mis en évidence l'existence de différentes sous-populations de CSC, différenciées par leur profil d'EMT. Les CSC épithéliales sont ainsi caractérisées par l'activité ALDH et par une prolifération accrue, et plutôt localisées au centre de la tumeur. En revanche, les CSC mésenchymateuses sont CD44⁺/CD24^{-/low}, quiescentes, et localisées au niveau du front invasif de la tumeur

(Liu *et al.*, 2014 ; Brooks et Wicha, 2015). Finalement, les CSC sont dotées d'une plasticité leur permettant de transiter d'un état à un autre (Figure 15). Cette plasticité pourrait être contrôlée par le microenvironnement tumoral, grâce à la sécrétion de cytokines et chimiokines par les cellules tumorales ou stromales, qui peuvent induire la transition d'un état à l'autre (Luo *et al.*, 2015). L'équipe du Dr Blanpain montre effectivement qu'il existe une hétérogénéité parmi les cellules tumorales ayant subi l'EMT, révélant différents stades intermédiaires entre la cellule tumorale épithéliale et la cellule tumorale mésenchymateuse. De manière intéressante, les auteurs montrent que ces différents stades coexistent dans la tumeur et qu'ils sont localisés dans des niches distinctes au sein de la tumeur. La présence de cellules stromales particulières est ainsi associée à des cellules tumorales de type mésenchymateux et corrèle avec la sécrétion de chimiokines et cytokines pro-inflammatoires par les cellules tumorales. En particulier, la déplétion de macrophages infiltrés entraîne une diminution de la proportion de cellules tumorales mésenchymateuses (Pastushenko *et al.*, 2018).

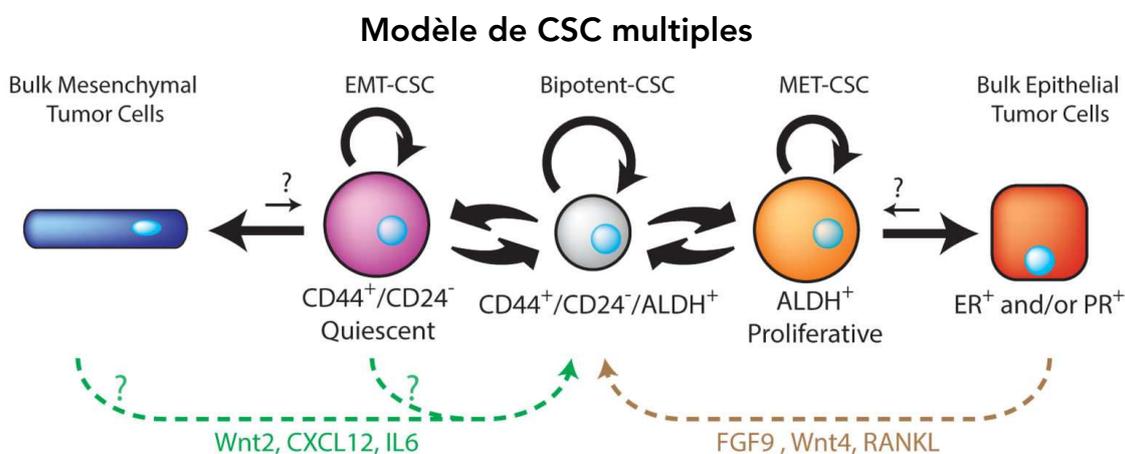


Figure 15. Modèle de plasticité des CSC.

Le modèle de CSC multiple décrit l'existence de plusieurs "états" de CSC : les EMT-CSC qui ont subi l'EMT et forment un pool de cellules mésenchymateuses, et les MET-CSC qui ont subi la MET et se différencient en cellules épithéliales. Il est à noter que chaque état est réversible grâce à l'expression de certains facteurs permettant la dédifférenciation cellulaire (adapté de Brooks et Wicha, 2015).

C. Reprogrammation et conversion de non-CSC en CSC

Nous avons vu dans le chapitre II.B.5. que les CSC étaient enrichies après radiothérapie et chimiothérapie. La simple résistance des CSC aux thérapies ne permet pas d'expliquer cet enrichissement, qui peut également être induit par d'autres facteurs. Comme le suggère l'EMT, les cellules cancéreuses possèdent une forte plasticité, et des études ont mis en évidence les capacités de reprogrammation des non-CSC en CSC. Cette reprogrammation, ou dédifférenciation, peut être induite par différents stimuli que nous allons détailler dans cette partie (Tableau 5). De manière générale, la reprogrammation de non-CSC en CSC est définie comme l'acquisition d'un phénotype de CSC dans une population non-CSC, préalablement déplétée des CSC. Ces cellules nouvellement induites présentent les mêmes marqueurs de CSC et peuvent former des tumeurs *in vivo*.

1. Conditions d'induction de la reprogrammation

a. Reprogrammation radio-induite

Comme évoqué précédemment, les radiations ionisantes entraînent un enrichissement de CSC parmi les cellules irradiées (Chapitre II.B.5.b.). Plusieurs hypothèses permettent d'expliquer cet enrichissement : la radiorésistance et la sélection de ces cellules, un auto-renouvellement accru grâce à l'augmentation de la division symétrique, ou la reprogrammation de non-CSC en CSC. Le modèle mathématique établi par Gao *et al.* indique la prévalence d'une reprogrammation et d'une division symétrique accrue après irradiation (Gao *et al.*, 2014).

Cependant, plusieurs études démontrent la reprogrammation de non-CSC en CSC après radiothérapie. Ainsi, l'équipe du Pr Pajonk a mis en évidence que les non-CSC pouvaient être reprogrammées en CSC après irradiation, dans le cancer du sein (Lagadec *et al.*, 2012). Dans cette étude, sur laquelle repose mon projet de thèse, des lignées cellulaires cancéreuses mammaires ainsi que des échantillons de tumeurs mammaires de patientes ont été triés grâce au marqueur de CSC ALDH⁺. L'irradiation des non-CSC ALDH⁻ induit la régénération de CSC ALDH⁺ dans les différentes

populations. L'utilisation des marqueurs de CSC CD44⁺/CD24⁻ et ZsGreen-cODC⁺ montre également la génération de CSC. Cette reprogrammation radio-induite est réduite en cas de CSC pré-existantes, suggérant un rétro-contrôle de la proportion de CSC dans la population totale. Ces CSC induites (iCSC, *induced Cancer Stem Cell*) sont caractérisées par la réexpression de facteurs associés à la pluripotence (OCT4, SOX2, NANOG et KLF4), une capacité de formation de sphères accrue ainsi qu'une tumorigénicité *in vivo* augmentée (Lagadec *et al.*, 2012).

Toujours dans le cancer du sein, Gao et collaborateurs font le parallèle entre l'induction de cellules sénescents après radiothérapie et la reprogrammation. En effet, ils mettent en évidence que les non-CSC pré-sénescents irradiés subissent une reprogrammation partielle en iCSC CD44⁺/CD24⁻ (Gao *et al.*, 2016). La même équipe avait précédemment montré l'implication des télomères dans l'enrichissement des CSC : l'inhibition de la télomérase entraîne un blocage de l'enrichissement en CSC suivant la radiothérapie (Sishc *et al.*, 2015).

Cette reprogrammation a été mise en évidence dans d'autres types de cancer, notamment dans des lignées cancéreuses hépatiques (Ghisolfi *et al.*, 2012), dans le glioblastome (Dahan *et al.*, 2014) et dans les tumeurs VADS (Vlashi *et al.*, 2016).

Cancer	Conditions d'induction	Références
Sein	Radiothérapie	Lagadec <i>et al.</i> , 2012 ; Gao <i>et al.</i> , 2016 ; Sishc <i>et al.</i> , 2015 Wang <i>et al.</i> , 2014b
Foie	Radiothérapie	Ghisolfi <i>et al.</i> , 2012
Glioblastome	Radiothérapie	Dahan <i>et al.</i> , 2014
VADS	Radiothérapie	Vlashi <i>et al.</i> , 2016
Foie	Chimiothérapie (carboplatine)	Hu <i>et al.</i> , 2012
Glioblastome	Chimiothérapie (temozolomide)	Auffinger <i>et al.</i> , 2014
Sein	Chimiothérapie (FAC)	Saha <i>et al.</i> , 2016
Sein	Inhibiteurs de HDAC	Debeb <i>et al.</i> , 2012
Glioblastome	Hypoxie	Heddleston <i>et al.</i> , 2009

Tableau 5. Reprogrammation de non-CSC en CSC dans différents cancers.

FAC, Fluorouracil-Adriamycin-Cytosan, HDAC, Histone Déacétylase

b. Reprogrammation chimio-induite

Outre la radiothérapie, la chimiothérapie peut également induire la reprogrammation de non-CSC en CSC. Ainsi, dans le cancer hépatocellulaire, des traitements au carboplatine induisent une augmentation de la formation de sphères, ainsi que l'expression de facteurs associés à la pluripotence, dans des non-CSC identifiées grâce au marqueur de CSC "Side population" (Hu *et al.*, 2012).

De la même manière, le traitement au temozolomide de lignées cellulaires de glioblastome ou de cellules issues d'échantillons tumoraux humains a pour effet l'induction de CSC, plus tumorigènes, qui réexpriment des marqueurs de CSC de glioblastome, tels que CD133⁺, ainsi que des facteurs associés à la pluripotence. Les iCSC présentent également une expression accrue des facteurs HIF associés à l'hypoxie. Le temozolomide est très utilisé dans le traitement du gliome, et la reprogrammation qu'il induit pourrait donc expliquer les résistances à ce traitement (Auffinger *et al.*, 2014 ; Deheeger *et al.*, 2014).

Dans les cancers du sein localement avancés, une diminution de la survie et le risque de récurrence sont corrélés à la chimiorésistance et à la présence de CSC dans la tumeur, alors que la fréquence de CSC chez un même patient est accrue après chimiothérapie (Saha *et al.*, 2016). Les auteurs retrouvent les mêmes effets du traitement 5-fluorouracil, doxorubicine et cyclophosphamide (FAC) dans différentes lignées cancéreuses mammaires. Le suivi du lignage cellulaire a été effectué par tri cellulaire et mélange des populations CSC et non-CSC, distinguées par l'expression d'un fluorophore. En l'absence de CSC pré-existantes, la reprogrammation est diminuée alors que la co-culture de CSC et de non-CSC GFP⁺ permet l'induction d'un pourcentage élevé de CSC GFP⁺. Ceci indique que le traitement FAC induit un phénotype de CSC dans des cellules cancéreuses différenciées et que cet effet est médié par les CSC pré-existantes (Saha *et al.*, 2016).

Enfin, des traitements ciblant des modulateurs de la chromatine, tels que des inhibiteurs de HDAC (*Histone Déacétylase*) induisent également la reprogrammation de non-CSC en CSC. L'équipe du Dr Woodward a en effet montré que l'inhibition des

HDAC dans des lignées cancéreuses mammaires préalablement déplétées des CSC entraîne l'apparition d'iCSC, caractérisées par le marqueur ALDH⁺, une capacité de formation de sphères accrue, ainsi qu'une tumorigénicité plus élevée *in vivo* (Debeb *et al.*, 2012).

2. Mécanismes à l'origine de la reprogrammation

Différents mécanismes ont pu être identifiés dans l'induction de la reprogrammation. Ces mécanismes seront étudiés ci-après et sont résumés dans la figure 16.

a. Facteurs et voies de signalisation propres aux cellules souches

Des études montrent que l'inhibition de SOX2 et OCT3/4 entraîne une diminution de l'induction des caractères souches après irradiation et après chimiothérapie, tels que la formation de sphères accrue (Ghisolfi *et al.*, 2012 ; Hu *et al.*, 2012). Dans le glioblastome, Dahan et collaborateurs suggèrent quant à eux une implication de la survivine dans la reprogrammation radio-induite, associée à la voie Hedgehog (Dahan *et al.*, 2014). Dans le cancer du sein, l'inhibition de l'ALDH par le DSF est responsable d'une diminution de l'induction de CSC après radiations ionisantes (Wang *et al.*, 2014b). De même, l'inhibition de la voie Notch diminue la génération d'iCSC mammaires, indiquant le rôle de cette voie de signalisation dans la reprogrammation ou dans le maintien des iCSC (Lagadec *et al.*, 2012). Dans le cancer du sein également, les inhibiteurs de HDAC activent la voie Wnt- β -caténine et l'inhibition de cette voie diminue l'induction de CSC après traitement (Debeb *et al.*, 2012). La reprogrammation peut être induite par la surexpression de facteurs particuliers, sur le même modèle que les iPSC (Harada *et al.*, 2016).

b. Mécanismes épigénétiques

D'autres pistes pourraient expliquer la reprogrammation radio-induite. D'une part, des modifications épigénétiques sont induites par la radiothérapie : dans le

cancer de la prostate, l'irradiation est responsable de la méthylation de lysines sur l'histone H3. La marque épigénétique H3K36me3 est notamment augmentée au niveau du promoteur du gène *ALDH1*, en particulier aux sites de fixation des facteurs β -caténine/TCF. La présence de cette marque est le signe de l'activation de la transcription de *ALDH1* et ainsi de caractéristiques de CSC. L'inhibition de la triméthylase EZH2 par le DZNep (3-déazaneplanocine A) diminue l'expression de *ALDH1* et radiosensibilise les cellules (Peitzsch *et al.*, 2016). Les niveaux de méthylation de promoteurs de gènes impliqués dans la pluripotence ont d'ailleurs été étudiés dans différentes lignées et échantillons tumoraux. Ainsi, le promoteur de *NANOG* est déméthylé dans les CSC CD133⁺ de cancer colorectal (Wang *et al.*, 2013b). La modulation des niveaux de méthylation pourrait donc être à l'origine de la reprogrammation (Stricker et Pollard, 2014).

c. Métabolisme cellulaire

Le métabolisme des cellules cancéreuses a également été étudié. Dans le cancer du sein et dans le gliome, les CSC présentent un métabolisme oxydatif, alors que le métabolisme des non-CSC est plutôt glycolytique (Vlashi *et al.*, 2011 ; Vlashi *et al.*, 2014). Ces CSC présentent des niveaux d'ATP et une consommation d'oxygène plus élevés. Les radiations ionisantes affectent le métabolisme de CSC en leur conférant un phénotype plus énergétique et en restaurant le potentiel membranaire mitochondrial (Vlashi *et al.*, 2014). Un switch métabolique pourrait donc entraîner la reprogrammation de non-CSC en CSC.

d. Rôle de l'hypoxie

L'hypoxie est également un inducteur de la reprogrammation. Comme montré par l'équipe du Pr Rich, des conditions hypoxiques entraînent l'acquisition de caractéristiques de CSC dans des non-CSC, accompagnée d'une expression accrue de HIF-2 α . La seule surexpression de HIF-2 α induit d'ailleurs l'apparition du phénotype souche (Heddleston *et al.*, 2009). Dans différentes lignées cancéreuses, la

culture en conditions hypoxiques est associée à une signature de cellules souches embryonnaires (SOX2, NANOG, OCT4, KLF4, c-Myc) (Mathieu *et al.*, 2011). L'expression de facteurs HIF est également retrouvée après reprogrammation par Auffinger et collègues, et appuie le rôle potentiel de l'hypoxie dans l'induction de la reprogrammation (Auffinger *et al.*, 2014). Ce rôle peut être expliqué par l'activation de voies de signalisation Notch, Hedgehog et Wnt par l'hypoxie (Qiu *et al.*, 2017).

e. Axe IL-6/NF- κ B

L'axe IL-6/NF- κ B participe à la mise en place de la reprogrammation, chimio-induite en particulier. D'une part, Iliopoulos *et al.* ont notamment montré que l'IL-6 entraînait la génération d'iCSC à partir de non-CSC dans des cellules cancéreuses mammaires et prostatiques (Iliopoulos *et al.*, 2011). D'autre part, le rôle de la voie NF- κ B dans l'initiation tumorale et l'apparition d'iCSC a été mis en évidence dans le cancer du colon. Ainsi, NF- κ B active la voie Wnt/ β -caténine et peut induire la dédifférenciation de cellules des villosités intestinales et l'acquisition de la capacité d'initiation tumorale (Schwitalla *et al.*, 2013). Enfin, Saha et collaborateurs font le lien entre NF- κ B et l'IL-6, en démontrant que la conversion de non-CSC en CSC est dépendante de l'IL-6, dont la sécrétion est induite par l'activation de la voie NF- κ B après traitements des cellules par chimiothérapie (FAC). Des traitements à l'IL-6 entraînent en effet l'émergence de CSC alors que l'inhibition de NF- κ B diminue la sécrétion de l'IL-6 (Saha *et al.*, 2016). D'autre part, l'IL-6 peut également induire la reprogrammation par l'induction de la voie JAK1/STAT3 (Kim *et al.*, 2013). De manière plus générale, les thérapies anti-cancéreuses induisent un environnement pro-inflammatoire qui peut être à l'origine de la reprogrammation.

La reprogrammation demeure un processus encore peu étudié et les mécanismes décrits sont directement ou indirectement impliqués dans des voies de signalisation connues pour leur rôle dans le maintien des CSC. Leur inhibition est logiquement associée à une perte de caractéristiques de CSC et pourrait donc ne pas affecter la reprogrammation en elle-même.

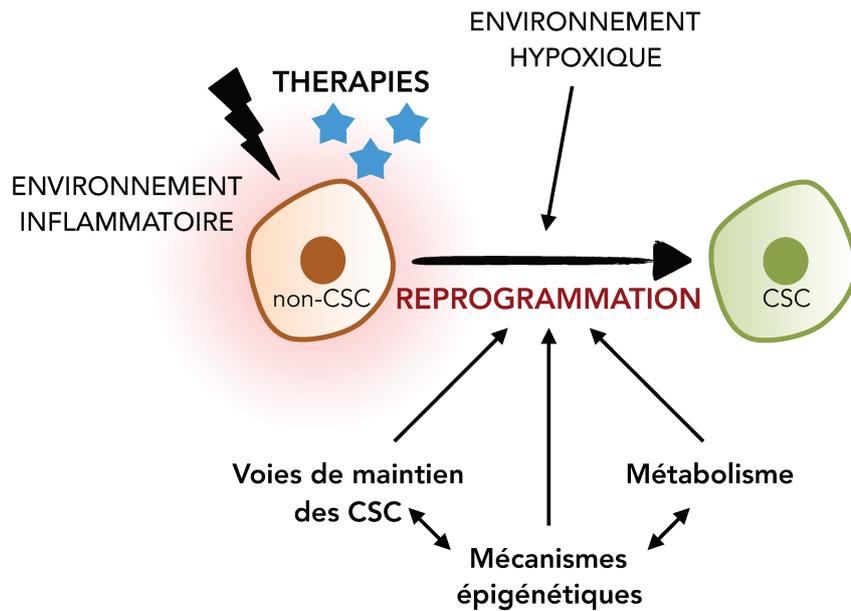


Figure 16. Mécanismes inducteurs de la reprogrammation.

Les thérapies (chimio et radiothérapies) induisent la reprogrammation de non-CSC en CSC. Cette reprogrammation met en jeu plusieurs mécanismes, dont l'activation de voies de signalisation impliquées dans le maintien des CSC et le métabolisme énergétique. Des modifications épigénétiques peuvent moduler ces mécanismes. Enfin, l'environnement hypoxique et inflammatoire de la tumeur pourrait également participer à l'émergence de CSC.

Il est probable que l'ensemble de ces mécanismes soit impliqué dans la mise en place de la reprogrammation qui nécessite de maintenir ces CSC. En effet, les différentes études menées jusqu'à présent ont mis en évidence l'existence d'une reprogrammation *in vitro* qui n'a pour le moment pas été démontrée *in vivo*. Les mécanismes mis en jeu *in vivo* sont sans doute bien plus complexes et impliquent certainement le microenvironnement tumoral. L'étude des processus inflammatoires, tels que la sécrétion de chimiokines dans l'environnement tumoral, pourrait ainsi apporter des explications sur la reprogrammation induite par les thérapies et en particulier la radiothérapie.

IV. Les chimiokines

A. Généralités sur les chimiokines et leurs récepteurs

1. Les chimiokines : structure et classification

Les chimiokines forment une famille de cytokines chimiotactiques et sécrétées, fortement impliquées dans la fonction immunitaire. Chez l'Homme, 49 chimiokines ont été identifiées, caractérisées par un petit poids moléculaire (8-14 kDa) et une structure particulière. Au niveau de leur structure primaire, les chimiokines possèdent généralement 4 résidus cystéines en des positions conservées, qui forment des ponts disulfures (Figure 17A). Structurellement, une chimiokine est composée d'une boucle N en N-terminal, suivie de 3 feuillets β anti-parallèles et d'une hélice α en C-terminal (Figure 17B). L'extrémité N-terminale qui précède la première cystéine est responsable de l'activation du récepteur. La boucle N est impliquée dans la spécificité de l'interaction ligand-récepteur (Lolis et Murphy, 2007).

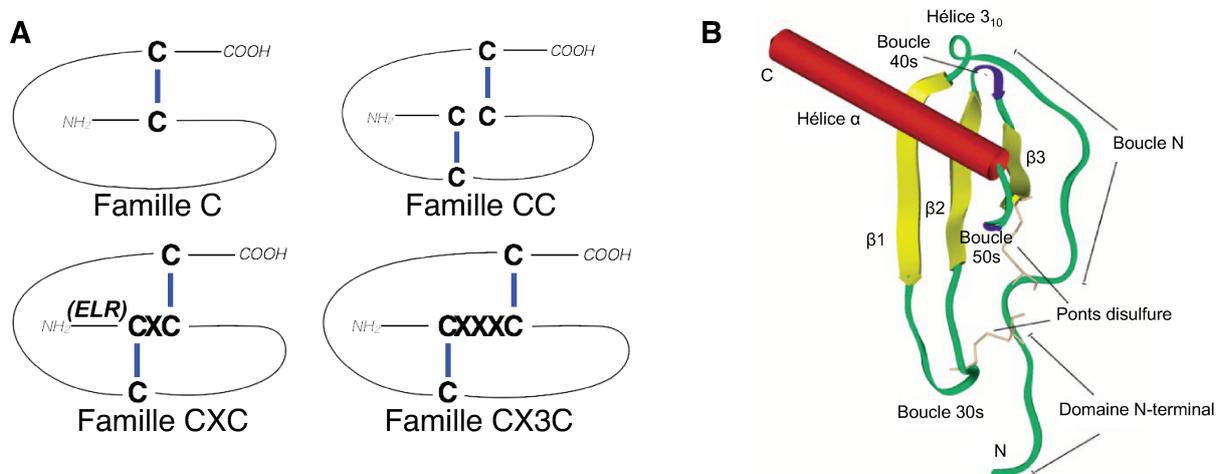


Figure 17. Représentation de la structure des chimiokines.

A, Structure primaire des différentes familles de chimiokines. Le C représente la position des cystéines, liées par des ponts disulfures en bleu. Le X représente le ou les acides aminés supplémentaires, présents dans les familles de chimiokines CXC et CX3C. (ELR) représente la position potentielle du motif ELR dans la famille des chimiokines CXC. B, Structure secondaire d'une chimiokine. L'extrémité N-terminale est composée d'une boucle N, puis d'une hélice 3₁₀. Les 3 feuillets β alternent ensuite avec les boucles 30s, 40s et 50s, suivies de l'hélice α à l'extrémité C-terminale. La position potentielle des 2 ponts disulfures est indiquée (Adapté de Fernandez et Lolis, 2002).

Il y a plusieurs sous-familles de chimiokines définies selon l'espacement entre les cystéines (Figure 17B). La première famille des chimiokines CC est composée des chimiokines qui ne présentent pas d'acide aminé supplémentaire entre les deux premières cystéines. Lorsque les deux premières cystéines sont séparées d'un acide aminé, il s'agit de chimiokines CXC. Ces deux premières sous-familles constituent la majorité des chimiokines, auxquelles s'ajoutent deux autres groupes. L'unique chimiokine CX3C possède trois acides aminés entre les deux résidus cystéines ; les chimiokines C ne possèdent qu'un seul résidu cystéine (Fernandez et Lolis, 2002) (Tableau 6).

La famille des chimiokines CXC peut être divisée en deux sous-familles selon la présence ou l'absence d'un motif particulier d'acides aminés (Glu-Leu-Arg), appelé motif ELR. Ce motif est retrouvé dans la partie N-terminale, juste avant la première cystéine (Baggiolini, 2001) (Figure 17A). La présence de ce motif ELR est caractéristique de chimiokines aux propriétés angiogéniques, alors que les chimiokines ELR⁻ sont angiostatiques, à l'exception de CXCL12 qui est ELR⁻ tout en étant angiogénique (Strieter *et al.*, 1995) (Tableau 6). Le motif ELR est également hautement conservé dans les chimiokines impliquées dans l'activation des neutrophiles et est ainsi impliqué dans l'interaction ligand-récepteur au niveau des neutrophiles (Clark-Lewis *et al.*, 1993).

Tableau 6. Liste des chimiokines et leurs récepteurs, chez l'Homme et rôle normal dans le système immunitaire.

Ci-après. D'après Bachelierie et al., 2014 et Kiefer et Siekmann, 2011. Ag, antigène ; LB, lymphocyte B ; CD, cellule dendritique ; Eo, eosinophile ; GALT, tissu lymphoïde associé au tube digestif ; GL, ganglion lymphatique ; Mc, macrophage ; Mo, monocyte ; MO, moelle osseuse ; Neu, neutrophile ; NKT, cellule T natural killer ; LT, lymphocyte T ; TD, tube digestif ; Th1, lymphocyte T helper de type 1.

Chimiokine	Autres noms	Sous-famille	Récepteurs	Rôle(s) / Effet
CCL1	I-309	CC	CCR8	Réponse Th2
CCL2	MCP-1, MCAF, TDCF	CC	CCR2,4, ACKR1,2	Réponse Th2, Immunité innée Angiogénique
CCL3	MIP-1 α , LD78 α	CC	CCR1,4,5, ACKR2	Traffic LT et Mo/Mc
CCL4	MIP-1 β	CC	CCR5, CCR8, ACKR2	Interaction LT/CD
CCL5	RANTES	CC	CCR1,3,4,5, ACKR1,2	Immunités innée et adaptative Angiogénique
CCL7	MCP-3	CC	CCR1,2,3,5,8, ACKR1,2	Réponse Th2
CCL8	MCP-2	CC	CCR3,5, ACKR2	Réponse Th2
CCL11	Eotaxin	CC	CCR2,3,5, ACKR1,2	Réponse Th2
CCL13	MCP-4	CC	CCR2,3,5, ACKR1,2	Attraction Mo, LT/LB, Eo
CCL14	HCC-1	CC	CCR5, ACKR1,2	Homing Mc vers MO
CCL15	HCC-2, Lkn-1, MIP-1 δ	CC	CCR1,3	Attraction Mo, LT
CCL16	HCC-4, LEC, LCC-1	CC	CCR5,8	Maturation CD
CCL17	TARC	CC	CCR4,8, ACKR1,2	Réponse Th2
CCL18	PARC, DC-CK1, AMAC-1	CC	CCR8	Hématopoïèse, attraction LT et LB par CD
CCL19	MIP-3 β , ELC, Exodus-3	CC	CCR7, ACKR4,5	Homing CD et LT/LB vers GL
CCL20	MIP-3 α , LARC, Exodus-1	CC	CCR6	Développement GALT, homing CD et LB vers GALT, réponse Th17
CCL21	SLC, 6Ckine, Exodus-2	CC	CCR7, ACKR4	Homing CD et LT vers GL
CCL22	MDC, STCP-1	CC	CCR4, ACKR2	Réponse Th2
CCL23	MPIF-1, Ck β 8, MIP-3	CC	CCR1	Attraction et activation Mo et CD
CCL24	Eotaxin 2, MPIF-2	CC	CCR3	Migration Eo

Chimiokine	Autres noms	Sous-famille	Récepteurs	Rôle(s) / Effet	
CCL25	TECK	CC	CCR9, ACKR4	Migration thymocytes, homing LT vers TD	
CCL26	Eotaxin 3	CC	CCR3	Réponse Th2	
CCL27	CTACK, ILC	CC	CCR10	Homing LT vers peau	
CCL28	MEC	CC	CCR3,10	Homing LT vers muqueuses	
CXCL1	Gro α , MGSA- α	CXC, ELR+	CXCR2	Traffic Neu	Angiogénique
CXCL2	Gro β , MGSA- β	CXC, ELR+	CXCR2	Traffic Neu	Angiogénique
CXCL3	Gro γ , MGSA- γ	CXC, ELR+	CXCR2	Traffic Neu	Angiogénique
CXCL4	PF4	CXC, ELR-	CXCR3B	Angiostatique	
CXCL5	ENA-78	CXC, ELR+	CXCR2, ACKR1	Traffic Neu	Angiogénique
CXCL6	GCP-2	CXC, ELR+	CXCR1,2, ACKR1	Traffic Neu	Angiogénique
CXCL7	NAP-2	CXC, ELR+	CXCR1,2	Traffic Neu	Angiogénique
CXCL8	IL-8	CXC, ELR+	CXCR1,2, ACKR1	Traffic Neu	Angiogénique
CXCL9	MIG	CXC, ELR-	CXCR3	Réponse Th1	Angiostatique
CXCL10	IP-10	CXC, ELR-	CXCR3	Réponse Th1	Angiostatique
CXCL11	I-TAC	CXC, ELR-	CXCR3, ACKR1,3	Réponse Th1	Angiostatique
CXCL12	SDF-1 α/β	CXC, ELR-	CXCR4, ACKR3	Myélopoïèse, Lymphopoïèse LB, Homing Neu vers MO	Angiogénique
CXCL13	BLC, BCA-1	CXC	CXCR5	Traffic LT et LB	
CXCL14	BRAK, Bolekine	CXC, ELR-	Non connu	Migration Mc	Angiostatique
CXCL16	SR-PSOX	CXC	CXCR6	Traffic et survie NKT	
CXCL17	DMC	CXC	Non connu	Migration Mo et CD	
XCL1	Lymphotactin α , SCM-1 α , ATAC	C	XCR1	Ag cross-presentation par CD CD8+	
XCL2	SCM-1 β	C	XCR1	Ag cross-presentation par CD CD8+	
CX3CL1	Fractalkine	CX3C	CX3CR1	Migration NK, Mo, Mc, Th1	

2. Les récepteurs de chimiokines

a. Structure et classification

La famille des récepteurs de chimiokines est composée de 18 récepteurs fonctionnels, ainsi que de 5 récepteurs atypiques, ou récepteurs "decoy" (ACKR1-5, *Atypical Chemokine Receptor*) (Zlotnik *et al.*, 2006, Bachelier *et al.*, 2014). Comme pour les chimiokines, leurs récepteurs peuvent être répartis en plusieurs catégories selon la famille de chimiokines fixées (CXCR, CCR, XCR et CX3CR). A ce jour, 6 récepteurs CXCR ont été identifiés (CXCR1-6), ainsi que 10 récepteurs CCR (CCR1-10), 1 récepteur XCR (XCR1) et 1 récepteur CX3CR (CX3CR1). Les récepteurs peuvent être spécifiques d'une chimiokine, ou partagés entre plusieurs chimiokines. De plus, certaines chimiokines sont les ligands de plusieurs récepteurs. Les chimiokines et leurs récepteurs forment donc un réseau complexe (Balkwill, 2004) (Figure 18).

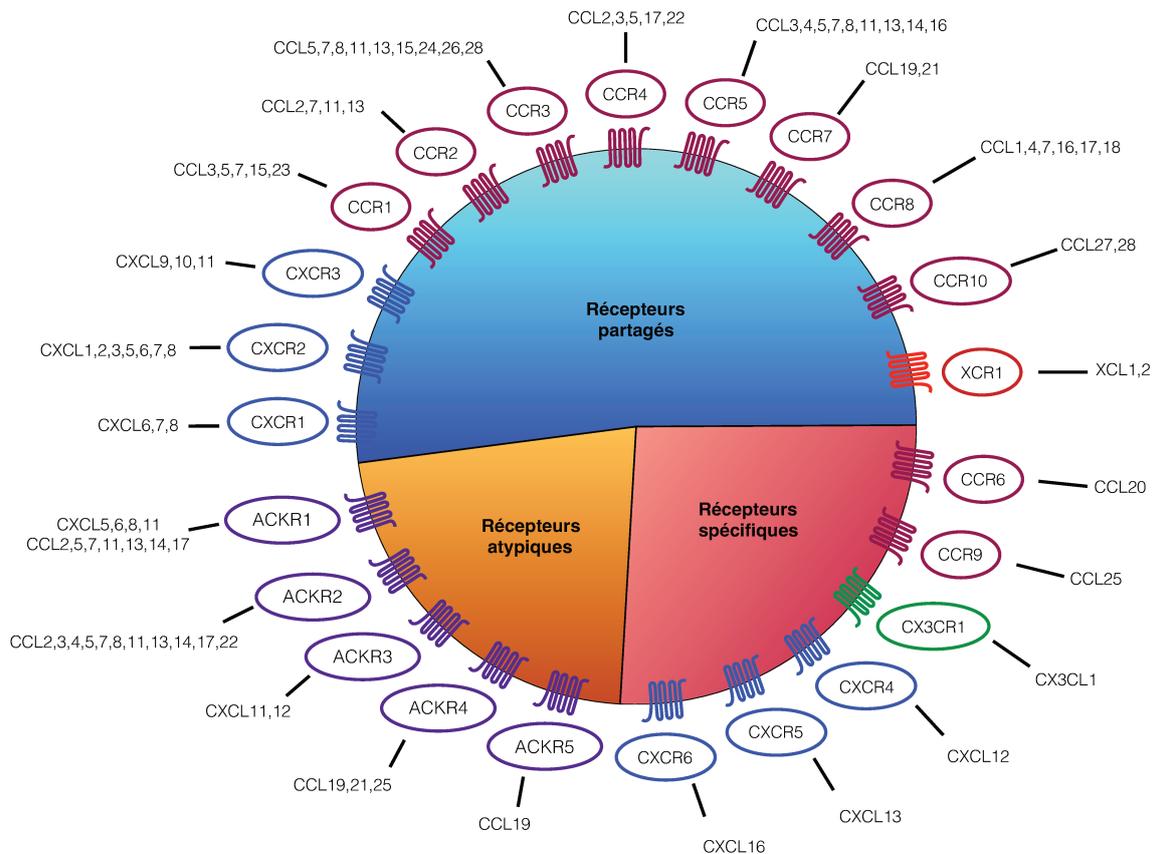


Figure 18. Réseau des chimiokines et de leur(s) récepteur(s).

Les récepteurs ont été classés selon leur capacité à lier une ou plusieurs chimiokines (récepteurs partagés / récepteurs spécifiques). Les récepteurs atypiques regroupent les récepteurs de chimiokines dont la signalisation n'est pas connue. (Adapté de Balkwill, 2004 et Bachelier *et al.*, 2014).

Les récepteurs de chimiokines sont des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR, *G-Protein Coupled Receptor*). Les récepteurs atypiques partagent une homologie importante avec les récepteurs « classiques ». Leur particularité réside dans leur capacité à lier des chimiokines sans toutefois présenter de signalisation *via* les protéines G (Bachelier *et al.*, 2014).

Contrairement aux chimiokines dont la structure a été clairement identifiée, celle des récepteurs de chimiokines a été moins étudiée. La rhodopsine est le seul GPCR dont la structure a été résolue (Palczewski *et al.*, 2000). Selon la structure de la rhodopsine et les analyses de séquences, les GPCR sont formés de 7 domaines transmembranaires (hélices α), une extrémité N-terminale extracellulaire et une extrémité C-terminale cytoplasmique. Les domaines transmembranaires forment 3 boucles extracellulaires, impliquées dans la liaison du ligand, et 3 boucles intracellulaires, impliquées dans la transduction du signal (Lu et Wu, 2016) (Figure 19).

La liaison du ligand implique deux sites d'interaction : d'une part, l'interaction entre la boucle N de la chimiokine et le domaine N-terminal du récepteur, et d'autre part l'interaction entre l'extrémité N-terminale de la chimiokine et une ou plusieurs boucles extracellulaires du récepteur (Figures 17 et 19). La spécificité du récepteur pour son ou ses ligands et son activation sont ainsi définies par le domaine N-terminal et par les boucles extracellulaires. De plus, les comparaisons de séquence révèlent que ces régions sont les moins conservées, expliquant ainsi la diversité et la complexité des interactions ligand-récepteur (Rajagopalan et Rajarathnam, 2006).

b. Activation et mode d'action des récepteurs

La signalisation induite par les chimiokines a pour objectif la mise en place de la polarisation de la cellule, nécessaire à la migration. Les récepteurs de chimiokines sont activés par la liaison de leur(s) ligand(s) spécifique(s). En tant que GPCR, ils sont associés à une protéine G hétérotrimérique de type G_i , formée des sous-unités $G\alpha_i$ et $G\beta\gamma_i$. La signalisation du récepteur va donc passer par la voie des protéines G. L'interaction de la chimiokine avec le récepteur enclenche une série d'évènements dont le changement de conformation du récepteur et sa dimérisation (Figure 19).

Cette dimérisation conduit à l'activation de protéines tyrosine-kinases JAK (Rodríguez-Frade *et al.*, 1999), promouvant la liaison du facteur de transcription STAT au niveau du récepteur. L'activation de JAK et STAT est dépendante de petites GTPases Rho et Rac et est essentielle pour l'induction des protéines G et la mise en place du phénotype migratoire (Pelletier *et al.*, 2003; Soriano *et al.*, 2003). La dimérisation du récepteur a été pour la première fois décrite par Mellado *et al.* avec l'interaction de CCL2 sur le récepteur CCR2. Dans cet exemple, CCR2 est phosphorylé par JAK2 au niveau de la tyrosine Y139. Elle se trouve dans le motif DRY, fortement conservé parmi les récepteurs de chimiokines, et situé dans la 2^{ème} boucle intracellulaire du récepteur. Sans l'activation de JAK2 et la phosphorylation du récepteur, la protéine G_i n'est pas activée et n'induit pas de signalisation sous-jacente (Mellado *et al.*, 1998). Au vu de la grande similarité qui existe au sein des familles de chimiokines, ce mode d'activation pourrait être étendu aux autres récepteurs.

Suite à l'activation du récepteur, les deux sous-unités $G\alpha_i$ et $G\beta\gamma_i$ vont ensuite se dissocier. Le récepteur constitue un facteur d'échange de nucléotide guanylique et catalyse l'échange du GDP (*Guanosine diphosphate*) par un GTP (*Guanosine triphosphate*) au niveau de la sous-unité $G\alpha_i$.

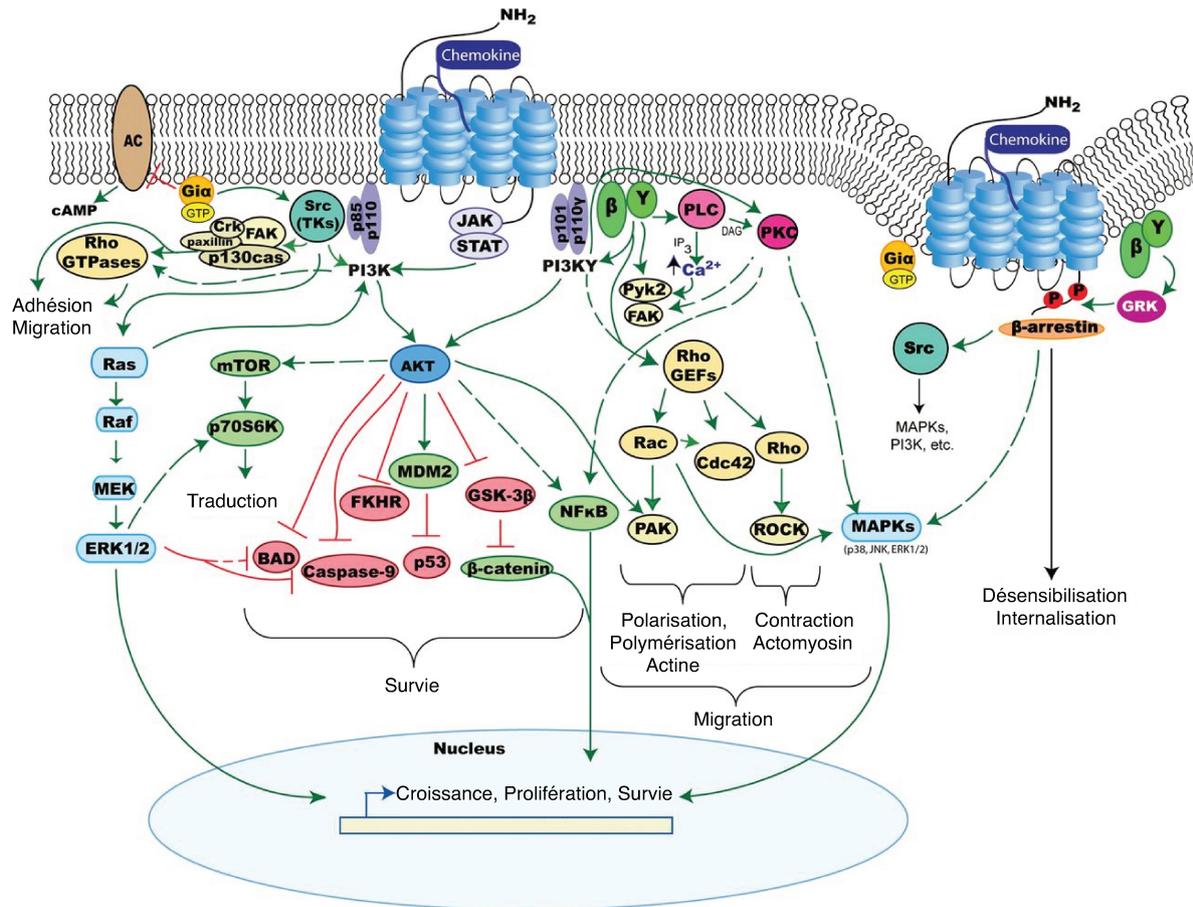


Figure 19. Structure d'un récepteur de chimiokines et signalisation induite par la fixation du ligand.

L'extrémité N-terminale extracellulaire est suivie de 7 segments transmembranaires, enchassés dans la membrane. Ces segments forment 3 boucles extracellulaires et 3 boucles intracellulaires. Enfin, l'extrémité C-terminale forme la queue cytoplasmique. L'extrémité N-terminale ainsi que les boucles extracellulaires sont responsables de l'interaction spécifique avec le ligand. L'extrémité C-terminale et les boucles intracellulaires sont impliquées dans la transduction du signal et l'interaction avec les protéines G et les effecteurs secondaires. Les chimiokines activent de nombreuses voies de signalisation impliquées dans divers processus cellulaires (Adapté de O'Hayre et al., 2008).

L'action de Gα_i passe par l'inhibition de l'AC (Adénylate cyclase), diminuant ainsi la formation d'AMPc (Adénosine monophosphate cyclique). L'AMPc active la PKA (Protéine kinase A), qui peut phosphoryler le GPCR au niveau de résidus Ser/Thr et entraîner ainsi son internalisation (Kelly et al., 2008). La sous-unité Gα_i va également activer les kinases Src et Hck (Ma et al., 2000), expliquant ainsi l'activation de Ras et de FAK (Focal adhesion kinase) par les récepteurs de chimiokines (Thelen, 2001).

La sous-unité $G\beta\gamma_i$ joue aussi un rôle important dans la signalisation induite par les chimiokines, notamment dans la migration cellulaire. D'une part, la sous-unité $G\beta\gamma_i$ va rapidement activer la phospholipase C (PLC), entraînant la formation d'IP3 (*Inositol triphosphate*), ainsi qu'une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} , nécessaire dans le processus de migration cellulaire (Mandeville et Maxfield, 1997). D'autre part, la sous-unité $G\beta\gamma_i$ agit *via* la PI3K et active ainsi des effecteurs des voies de survie dont AKT. La protéine PI3K va également stimuler la voie des MAPK (Bondeva *et al.*, 1998), dont l'activation suggère la possible régulation génique induite par les chimiokines. Cette voie pourrait également participer aux changements de cytosquelette nécessaires à la migration (Mellado *et al.*, 2001).

Le rôle de chimioattraction des chimiokines nécessite un système précis, capable de désensibiliser le récepteur. Ainsi, l'activation de la PLC est également responsable de l'activation de la PKC qui va promouvoir l'arrêt de la signalisation activée par le récepteur et son inhibition (Thelen, 2001). Comme PKA et PKC, les kinases GRK (*G protein receptor kinase*) sont capables de phosphoryler le récepteur au niveau de l'extrémité C-terminale cytoplasmique sur des résidus Ser/Thr. Cette phosphorylation entraîne la dissociation de la protéine G du récepteur, et augmente l'affinité des segments intracellulaires du récepteur pour les β -arrestines. Le couple récepteur- β -arrestines est ainsi internalisé, pour recyclage ou dégradation du récepteur (Bennett *et al.*, 2011). Du fait de leur absence de signalisation connue, les récepteurs atypiques ACKR auraient pour rôle d'atténuer l'inflammation induite par l'activation des récepteurs, en captant les chimiokines sécrétées.

Malgré la redondance apparente du réseau de chimiokines, il existe tout de même une spécificité des réponses induites par la liaison de la chimiokine sur son récepteur. Si l'on prend l'exemple de CXCR2, Katancik et collaborateurs ont montré que ses ligands CXCL1, CXCL7 et CXCL8 se lient à CXCR2 au niveau d'acides aminés différents, de manière spécifique (Katancik *et al.*, 2000). De plus, la liaison à un même récepteur peut entraîner une réponse intracellulaire différente dans un même type cellulaire : CXCL1 active notamment un flux calcique dans des neutrophiles, en se

liant à CXCR2, alors qu'aucun flux n'est observé à la liaison de CXCL8 (Damaj *et al.*, 1996). Enfin, CXCL8 peut se lier à CXCR1 et CXCR2, et malgré la forte homologie entre ces deux récepteurs, la réponse induite par la fixation de CXCL8 n'est pas la même. Prado et collaborateurs suggèrent l'importance de l'interaction entre la boucle N de la chimiokine et l'extrémité N-terminal du récepteur, dans la spécificité de la réponse induite (Prado *et al.*, 2007).

c. Rôles physiologiques des chimiokines

Les chimiokines jouent un rôle fondamental dans le développement, l'homéostasie et la fonction du système immunitaire. Leur fonction principale demeure leur capacité de chimioattraction des leucocytes (Baggiolini, 1998). On distingue d'ailleurs les chimiokines homéostatiques qui sont exprimées de manière constitutive, et contrôlent la migration des leucocytes dans le cadre de la surveillance immunitaire, des chimiokines inflammatoires inductibles et qui dirigent le recrutement de cellules immunitaires aux sites d'inflammation (Baggiolini et Loetscher, 2000) (Tableau 6). Outre la chimiotaxie, les chimiokines participent à l'embryogenèse (Raman *et al.*, 2011), l'hématopoïèse (Broxmeyer, 2008), ou encore l'angiogenèse (Kiefer et Siekmann, 2011).

B. Rôles des chimiokines et leurs récepteurs dans la biologie du cancer

L'inflammation a été récemment définie comme l'un des "*Hallmarks*" du cancer définis par Weinberg (Hanahan et Weinberg, 2011). L'invasion de la tumeur par des cellules immunitaires peut corrélérer avec un bon ou un mauvais pronostic. L'effet pro- ou anti-tumoral dépend de la présence et de l'activation des différents sous-types de cellules immunitaires, ainsi que de l'expression de facteurs inflammatoires. En effet, les cellules immunitaires aux propriétés cytotoxiques (telles que les cellules NK et les lymphocytes T cytotoxiques) ont tendance à induire une réponse immunitaire anti-tumorale au début de la tumorigenèse. A l'inverse, l'invasion de la tumeur par les macrophages crée un contexte pro-inflammatoire et pro-tumoral, et promeut

l'angiogenèse, l'invasion et la métastase (Grivennikov *et al.*, 2010). De manière intéressante, les cytokines, en particulier les chimiokines et leurs récepteurs, constituent des effecteurs importants du système immunitaire au sein de la tumeur. Les chimiokines jouent différents rôles tels que le recrutement des cellules du microenvironnement tumoral, la progression tumorale, l'angiogenèse et la métastase (Balkwill, 2004). Ces différents aspects seront abordés dans cette partie.

1. Les chimiokines : des facteurs pronostiques du cancer

Le rôle des chimiokines dans le cancer a été beaucoup étudié, et de nombreuses recherches ont été menées sur le caractère pronostique des chimiokines dans différents types de cancer. Le tableau 7 établit une liste non exhaustive des chimiokines et leurs récepteurs en tant que facteurs de mauvais pronostic ; nous nous sommes concentrés sur les chimiokines qui jouent un rôle dans la biologie des CSC, comme décrit dans la prochaine partie.

Dans le cancer du sein en particulier, CXCR4, récepteur de CXCL12, est fortement impliqué dans la progression tumorale, et son expression est de mauvais pronostic. Une étude clinique réalisée sur 77 patientes atteintes d'un cancer du sein localement avancé a montré une forte expression de CXCR4 dans 29% des cas. Cette forte expression est associée à un risque plus élevé de récurrences, ainsi qu'à une survie globale diminuée, en comparaison des patientes présentant des tumeurs à faible expression de CXCR4 (Hiller *et al.*, 2011). Cette diminution de survie globale est retrouvée dans d'autres études (Kang *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2010; Chu *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2015). L'expression élevée de CXCR4 dans des carcinomes canauxiaux invasifs a également été corrélée à la présence de métastases au niveau des ganglions lymphatiques, et plus généralement à la progression tumorale et l'agressivité de la tumeur (Kato *et al.*, 2003; Salvucci *et al.*, 2006). De plus, Parker et collaborateurs ont montré que l'expression de CXCR4 chez les patientes présentant une invasion des ganglions lymphatiques est associée à un mauvais pronostic (Parker *et al.*, 2012). Le ligand de CXCR4, CXCL12, constitue également un facteur de

mauvais pronostic : l'expression de CXCL12 est généralement retrouvée au niveau des sites métastatiques, comme les ganglions lymphatiques par exemple, et est associée à une survie globale diminuée (Kang *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2015).

D'autres chimiokines sont également considérées comme facteurs de mauvais pronostic. Ainsi, l'expression de CXCL1 dans le stroma de carcinomes canaux est corrélée à une diminution de la survie globale, à une fréquence plus élevée de récurrences ainsi qu'à des tumeurs de haut grade (Zou *et al.*, 2014). De même, l'expression de CCL5 dans la tumeur est corrélée à des tumeurs mammaires plus avancées (stades II, III, IV) (Luboshits *et al.*, 1999; Niwa *et al.*, 2001 ; Zhang *et al.*, 2009). Pour les patientes atteintes de tumeurs au stade II, la détection de CCL5 constitue un facteur prédictif de récurrence, avec une survie sans maladie augmentée pour les tumeurs négatives pour CCL5 (Yaal-Hahoshen *et al.*, 2006). Enfin, CXCL8 est également décrite dans de nombreux cancers comme facteur de mauvais pronostic. Dans le cancer du sein, l'expression de CXCL8 est retrouvée dans les tumeurs de haut grade, et associée à une forte angiogenèse (grade III) (Chavey *et al.*, 2007). De plus, le taux de CXCL8 dans le sérum des patientes corréle avec la présence de métastases, et diminue la survie post-récurrence de ces patientes (Benoy *et al.*, 2004). Dans une étude plus récente, Zuccari et collègues n'ont cependant pas trouvé de corrélation avec la survie globale (Zuccari *et al.*, 2012). D'autres chimiokines ont également été démontrées comme facteurs prédictifs dans le cancer du sein, et sont décrites dans le tableau 7.

Chimiokine Récepteur	Expression associée à	Type de cancer	Références
CXCL1 CXCR2	stades avancés, SG diminuée, métastases	- gastrique	Cheng <i>et al.</i> , 2011 ; Wang <i>et al.</i> , 2015b Wang <i>et al.</i> , 2016a ; Xiang <i>et al.</i> , 2015
	SG diminuée	- hépatocellulaire - colorectal	Li <i>et al.</i> , 2015a Le Rolle <i>et al.</i> , 2015; Oladipo <i>et al.</i> , 2011
	présence de métastases	- pancréas	Lian <i>et al.</i> , 2016
	récidives, SG et SSR diminuées	- sein	Zou <i>et al.</i> , 2014
	métastases, SG diminuée	- oesophage	Sui <i>et al.</i> , 2014
CXCL7 CXCR1 CXCR2	SG diminuée	- rénal	Grepin <i>et al.</i> , 2014
	SG et SSM diminuées	- colorectal	Desurmont <i>et al.</i> , 2015
CXCL8 CXCR1 CXCR2	stades avancés, SG et SSM diminuées, métastases, récidives	- colorectal	Bălășoiu <i>et al.</i> , 2004 ; Caro <i>et al.</i> , 2016 Nastase <i>et al.</i> , 2014 ; Xiao <i>et al.</i> , 2015
	stades avancés, SPR diminuée, métastases, récidives	- sein	Benoy <i>et al.</i> , 2004 ; Chavey <i>et al.</i> , 2007 Zuccari <i>et al.</i> , 2012
	métastases, SG diminuée	- pancréas	Chen <i>et al.</i> , 2014
	SG et SSM diminuées	- nasopharynx - hépatocellulaire - gastrique	Cheng <i>et al.</i> , 2014 Li <i>et al.</i> , 2015b Raja <i>et al.</i> , 2017
	SSM diminuée	- endomètre	Ewington <i>et al.</i> , 2012
	hauts grades, récidives	- vessie	Reis <i>et al.</i> , 2012
	progression tumorale, métastases, SSR diminuée	- oesophage	Ogura <i>et al.</i> , 2013
CXCL10 CXCR3	SG, SSM et SSP diminuées, récidives, stades avancés	- LDGCB	Ansell <i>et al.</i> , 2012 ; Hong <i>et al.</i> , 2016
	SG diminuée, récidives, métastases	- colorectal	Bai <i>et al.</i> , 2016 ; Kawada <i>et al.</i> , 2007 Wu <i>et al.</i> , 2012
	SG diminuée	- ostéosarcome - sein - langue - gastrique	Flores <i>et al.</i> , 2017 Ma <i>et al.</i> , 2009 Rentoft <i>et al.</i> , 2014 Zhou <i>et al.</i> , 2016b
	stades avancés	- mélanome	Jiang <i>et al.</i> , 2015
	récidives	- hépatocellulaire	Ouyang <i>et al.</i> , 2016
	SG et SSP diminuées	- glioblastome	Pu <i>et al.</i> , 2015
	CXCL12 CXCR4 CXCR7	SG et SSR diminuées, récidives	- colorectal
métastases, SG diminuée		- sarcome d'Ewing	Bennani-Baiti <i>et al.</i> , 2010

Chimiokine Récepteur	Expression associée à	Type de cancer	Références
CXCL12 CXCR4 CXCR7	récidives, métastases, SG et SSM diminuées	- sein	Chu et al., 2010 ; Hiller et al., 2011 Kang et al., 2005 ; Kato et al., 2003 Liu et al., 2010 ; Parker et al., 2012 Salvucci et al., 2006 ; Wu et al., 2015
	SG diminuée, progression rapide	- CLL	Ganghammer et al., 2016
	progression tumorale	- endomètre - vessie	Gelmini et al., 2009 Yang et al., 2015
	SG et SSM diminuées	- pancréas - poumon	Guo et al., 2016 ; Marechal et al., 2009 Sterlacci et al., 2015 ; Suzuki et al., 2008 Tu et al., 2016 ; Wang et al., 2011
	métastases, SG diminuée	- ovaire	Guo et al., 2011a ; Popple et al., 2012
	métastases, SG diminuée, stades avancés	- gastrique	Ishigami et al., 2007 ; Masuda et al., 2014 Ying et al., 2012
	récidives, métastases, SG diminuée	- prostate	Jung et al., 2011
	métastases, SG et SSM diminuées	- utérus	Kodama et al., 2007
	hauts grades, stades avancés	- rénal	Rasti et al., 2017
	métastases	- VADS	Rave-Frank et al., 2016
	SG et SSR diminuées	- oesophage	Uchi et al., 2016 ; Zhang et al., 2013
CCL2 CCR2	hauts grades, métastases	- vessie	Amann et al., 1998
	hauts grades, récidives, progression tumorale, SSR diminuée	- sein	Chavey et al., 2007 ; Ueno et al., 2000 Valkovic et al., 1998 ; Yao et al., 2016
	progression tumorale	- ovaire	Hefler et al., 1999
	SG diminuée	- colorectal - prostate - VADS - nasopharynx - gastrique	Yoshidome et al., 2009 Izumi et al., 2015b Ji et al., 2014 Lu et al., 2011 Li et al., 2016 ; Liu et al., 2015 Zhang et al., 2017b
	SG et SSR diminuées, récidives	- rénal	Wang et al., 2016c ; Yang et al., 2016
CCL3 CCR1 CCR5	SG diminuée, métastases	- myélome multiple	Botta et al., 2016 ; Terpos et al., 2003
	SG et SSP diminuées	- LDGCB	Takahashi et al., 2015

Chimiokine Récepteur	Expression associée à	Type de cancer	Références
CCL5 CCR1 CCR3 CCR5	stades avancés	- sein - sein & utérus	Luboshits <i>et al.</i> , 1999; Zhang <i>et al.</i> , 2009 Yaal-Hahoshen <i>et al.</i> , 2006 Niwa <i>et al.</i> , 2001
CCL5 CCR1 CCR3 CCR5	stades avancés, SG diminuée, métastases	- gastrique	Sima <i>et al.</i> , 2014 ; Sugasawa <i>et al.</i> , 2008 Wang <i>et al.</i> , 2016b
CCL18 CCR8	SG diminuée	- glioblastome	Cheng <i>et al.</i> , 2016
	progression tumorale, métastases, SG diminuée	- sein	Gao <i>et al.</i> , 2015 ; Narita <i>et al.</i> , 2011 Sun <i>et al.</i> , 2016
	progression tumorale	- endomètre	Sakane <i>et al.</i> , 2014
CCL19 CCL21 CCR7	SG et SSR diminuées, métastases	- sein	Cassier <i>et al.</i> , 2011 ; Liu <i>et al.</i> , 2010
	SG diminuée, stades avancés, métastases	- gastrique	Deguchi <i>et al.</i> , 2010 ; Du <i>et al.</i> , 2016 Hwang <i>et al.</i> , 2012 ; Zhou <i>et al.</i> , 2013
	SG diminuée, métastases	- rénal	Xia <i>et al.</i> , 2017
	métastases	- poumon - thyroïde	Maekawa <i>et al.</i> , 2008 Wagner <i>et al.</i> , 2008
	métastases, récurrences	- VADS	Tsuzuki <i>et al.</i> , 2006 ; Xia <i>et al.</i> , 2015
	SG et SSM diminuées, métastases	- utérus - colorectal - mélanome	Kodama <i>et al.</i> , 2007 Gunther <i>et al.</i> , 2005; Malietzis <i>et al.</i> , 2015 Kuhnelt-Leddihn <i>et al.</i> , 2012 Bosch <i>et al.</i> , 2013

Tableau 7. Les chimiokines et leurs récepteurs en tant que facteurs de mauvais pronostic dans le cancer.

(liste non exhaustive) CLL, leucémie lymphoïde chronique ; LAL, leucémie aiguë lymphoblastique ; LDGCB, lymphoma B diffus à grandes cellules ; SG, survie globale ; SPR, survie post-récidive ; SSM, survie sans maladie ; SSP, survie sans progression ; SSR, survie sans récurrence ; VADS, cancer des voies aérodigestives supérieures.

2. Rôles dans la tumorigenèse

Outre les cellules cancéreuses, la tumeur est composée de plusieurs types cellulaires formant le microenvironnement tumoral. Des cellules immunitaires, endothéliales et des fibroblastes sont ainsi retrouvés infiltrés dans la tumeur et vont influencer son développement. De par leur capacité de chimioattraction, les chimiokines, sécrétées par les cellules cancéreuses, sont capables d'attirer des cellules normales exprimant les récepteurs, dans la tumeur, ou d'activer les cellules stromales déjà présentes. Ces cellules stromales infiltrées sécrètent des chimiokines ainsi que des facteurs de croissance qui stimulent la progression tumorale, l'angiogenèse et la résistance aux thérapies. Les cellules cancéreuses expriment également divers récepteurs de chimiokines et seront ainsi attirées aux sites métastatiques par les gradients de chimiokines exprimées dans les organes cibles (Mao *et al.*, 2013). Les différents rôles des chimiokines seront décrits dans cette partie et illustrés dans la figure 20.

a. Microenvironnement tumoral

Les chimiokines participent à la mise en place du microenvironnement de la tumeur. Les fibroblastes activés, ou CAF, composent une partie importante du stroma tumoral. Ils jouent un rôle dans le développement tumoral et plusieurs études ont démontré l'importance des chimiokines dans la présence des fibroblastes activés au sein de la tumeur. L'un des principaux acteurs de l'activation des CAF, avec le TGF- β , est CXCL12 qui agit de manière autocrine *via* CXCR4 pour induire la différenciation des fibroblastes normaux dans le cancer du sein (Kojima *et al.*, 2010). D'autres chimiokines sont également impliquées dans l'attraction et l'activation des fibroblastes, comme CCL3 dans le cancer colorectal. Cette étude montre que l'inhibition de CCL3 entraîne une diminution de la survenue des tumeurs, associée à une baisse de l'accumulation des CAF dans la tumeur, dans un modèle murin de tumorigenèse colorectale (Sasaki *et al.*, 2014). L'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de CCR5, le Maraviroc, induit également une diminution des CAF,

et pourrait ainsi être utilisé dans le traitement du cancer colorectal (Tanabe *et al.*, 2016).

D'autres types cellulaires normaux peuvent être recrutés au niveau de la tumeur grâce au(x) gradient(s) de chimiokines et sont détournés au profit de la tumeur. Dans une expérience de migration cellulaire, la co-culture de CAF avec des cellules progénitrices endothéliales entraîne la migration des cellules endothéliales vers les CAF. La sécrétion de CXCL12 par les CAF induit ainsi le recrutement de cellules progénitrices endothéliales, qui entraîne l'angiogenèse et l'irrigation de la tumeur. A l'inverse, l'inhibition de CXCL12 par anticorps neutralisant est responsable d'une diminution de la migration des cellules endothéliales (Orimo *et al.*, 2005).

Enfin, les cellules immunitaires infiltrées dans la tumeur sont également modulées par l'expression de chimiokines. CCL2 est particulièrement liée à la présence de TAM (*Tumor associated macrophages*) dans la tumeur. En effet, des niveaux élevés de CCL2 dans la tumeur sont associés à une forte accumulation de TAM ainsi qu'à un risque plus élevé de récurrences, notamment dans le cancer du sein, et le cancer colorectal (Ueno *et al.*, 2000 ; Bailey *et al.*, 2007). Au niveau expérimental, un traitement *in vitro* par CCL2 entraîne la migration de macrophages vers les cellules tumorales mammaires. *In vivo*, les xénogreffes de souris traitées avec l'anticorps ciblant CCL2 présentent une infiltration de macrophages diminuée (Fujimoto *et al.*, 2009). D'autres chimiokines sont aussi impliquées dans le recrutement de macrophages : on retrouve entre autres CXCL12 (Wang *et al.*, 2013a), CCL5 (Frankenberger *et al.*, 2015), et CXCL10 (Lunardi *et al.*, 2014).

De manière générale, les interactions entre les cellules stromales et les cellules tumorales sont essentielles au développement de la tumeur, et cette communication est en partie assurée *via* les chimiokines.

b. Progression tumorale et angiogenèse

Les chimiokines peuvent promouvoir le développement de la tumeur en favorisant l'initiation et la progression tumorale. Elles sont produites par les cellules

stromales, les CAF en particulier, ou par les cellules cancéreuses elles-mêmes. L'implication du couple CXCL12/CXCR4 dans la progression tumorale a été particulièrement étudiée et démontrée dans différents cancers. Dans le cancer du sein notamment, la sécrétion de CXCL12 par les CAF induit l'angiogenèse ainsi que la croissance tumorale. Ainsi, les souris xéno greffées traitées avec un anticorps ciblant CXCL12 présentent une diminution du volume tumoral, par rapport au contrôle isotypique (Orimo *et al.*, 2005). De la même manière, dans le cancer du poumon, les CAF expriment CXCL12 qui agit sur les cellules cancéreuses pulmonaires en augmentant leur prolifération, leur tumorigénicité et leurs capacités d'invasion et de migration. Les auteurs ont ici montré que l'expression du miR-101 est diminuée dans les CAF par rapport aux fibroblastes normaux. Ce miR a pour cible CXCL12 et sa surexpression dans les CAF diminue la croissance des cellules cancéreuses (Zhang *et al.*, 2015a). CXCL12 est également impliquée dans l'angiogenèse tumorale (Wang *et al.*, 2013a). Outre CXCL12, les chimiokines CCL2, CCL18 et CXCL1 sont également impliquées dans la progression tumorale et l'angiogenèse. La co-culture de CAF avec des cellules de cancer hépatocellulaire entraîne la surexpression de CCL2 dans les cellules cancéreuses (Lin *et al.*, 2012). Li et collaborateurs ont d'ailleurs montré que la sécrétion de CCL2 par les CAF en co-culture avec les cellules tumorales de cancer VADS entraîne une production de ROS qui résulte en l'augmentation de la croissance tumorale de cancers de la bouche. De plus, l'inhibition de CCL2 permet une diminution de la croissance tumorale (Li *et al.*, 2014b). La chimiokine CCL18 est quant à elle exprimée par les TAM et l'infiltration de TAM exprimant CCL18 dans le cancer du sein est corrélée à des marqueurs d'angiogenèse comme la densité microvasculaire. De plus, le traitement de xéno greffes par CCL18 augmente l'angiogenèse *in vivo* (Lin *et al.*, 2015). L'expression de la chimiokine CXCL1 dans les TAM et les CAF est associée à une croissance tumorale accrue dans des modèles de xéno greffes de tumeurs de la vessie (Miyake *et al.*, 2016).

c. Métastases

Le rôle des chimiokines dans le processus métastatique a été beaucoup étudié : en effet, les cellules cancéreuses expriment les récepteurs de chimiokines, et peuvent ainsi être attirées au niveau des sites d'expression de chimiokines. Les récepteurs les plus exprimés par les cellules cancéreuses sont CXCR4 et CCR7 (Zlotnik *et al.*, 2011).

CXCR4 est retrouvé dans des lignées de cellules cancéreuses mammaires alors que CXCL12, son ligand, est détecté dans différents organes tels que les poumons, le foie, la moelle osseuse, ainsi que dans les ganglions lymphatiques (Müller *et al.*, 2001). Ainsi, CXCL12 attire spécifiquement les cellules cancéreuses exprimant CXCR4, qui migrent alors vers des organes particuliers. Dans un modèle murin de xénogreffes mammaires qui métastasent classiquement aux poumons, Müller et collaborateurs ont ainsi montré que les souris traitées avec un anticorps ciblant CXCR4 présentent une diminution des métastases pulmonaires (Müller *et al.*, 2001). Le rôle du couple CXCR4/CXCL12 dans le processus métastatique a également été démontré dans d'autres types de cancer (Murakami *et al.*, 2002 ; Darash-Yahana *et al.*, 2004 ; Su *et al.*, 2005 ; Zhao *et al.*, 2011 ; Izumi *et al.*, 2015a). De la même manière, CCR7, présent à la membrane des cellules cancéreuses, est impliqué dans l'établissement de métastases. Ses ligands, CCL19 et CCL21, sont exprimés dans les ganglions lymphatiques. Dans des cellules cancéreuses mammaires, l'induction de l'expression de CCR7 entraîne des métastases aux ganglions lymphatiques, via la régulation des intégrines- β 1 nécessaires pour les étapes précoces du processus métastatique. Ces cellules induisaient initialement des métastases pulmonaires, démontrant ainsi l'importance de CCR7 dans l'envahissement ganglionnaire (Cunningham *et al.*, 2010). D'autres études confirment ce rôle, dans différents types de cancer (Wiley *et al.*, 2001 ; Mashino *et al.*, 2002 ; Ding *et al.*, 2003), selon le même processus (Sarvaiya *et al.*, 2013).

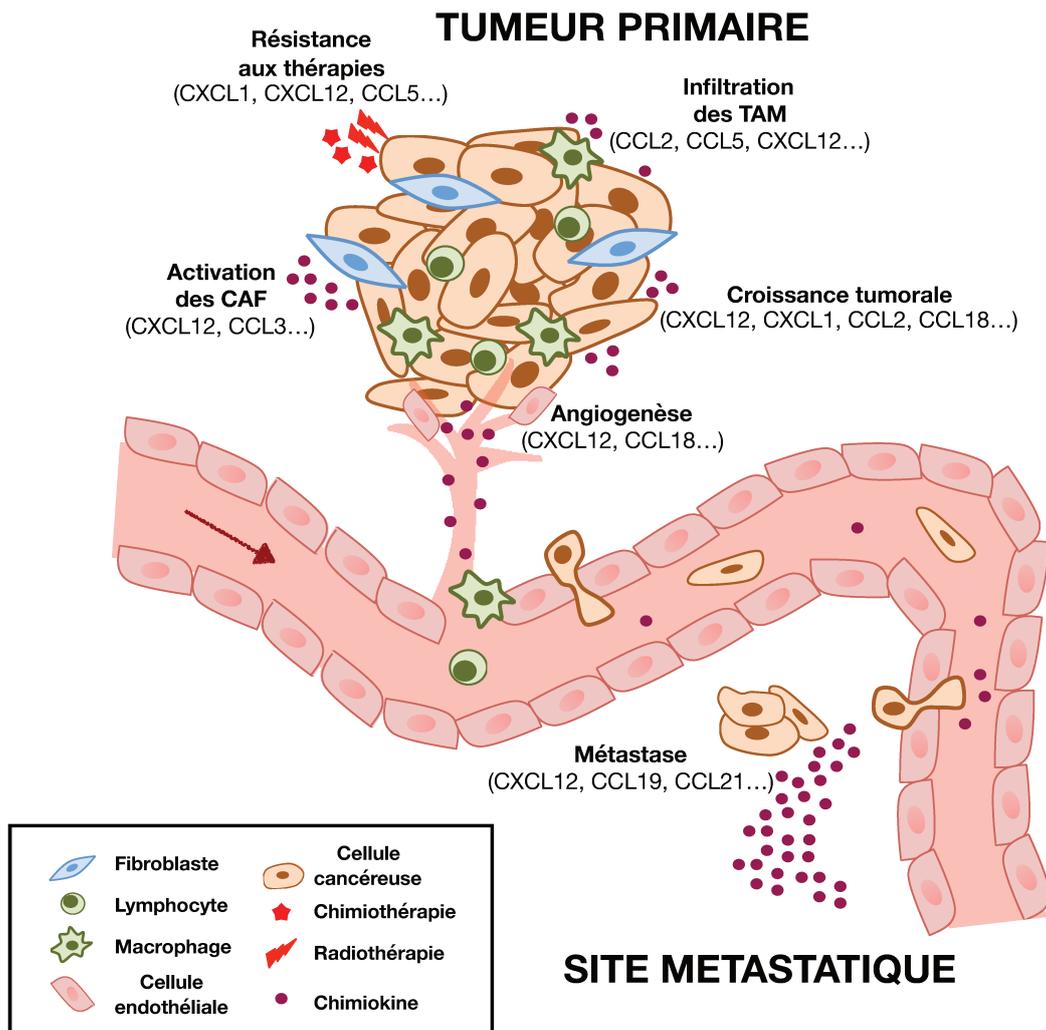


Figure 20. Rôle des chimiokines dans la progression tumorale.

Les chimiokines sont impliquées à différents niveaux de la cancérogenèse. Elles participent à la mise en place du microenvironnement tumoral, propice à la croissance de la tumeur. De plus, elles peuvent attirer les cellules endothéliales et entraîner ainsi l'angiogenèse et l'irrigation de la tumeur. Elles sont également impliquées dans le processus métastatique, de l'intravasation à l'extravasation au site secondaire. La résistance aux thérapies (chimiothérapie, radiothérapie) peut également être induite par des chimiokines.

d. Résistances

Comme déjà abordé dans le chapitre II.C.1., les CSC sont résistantes aux thérapies anti-cancéreuses grâce à différents mécanismes. De manière intéressante, les chimiokines peuvent jouer un rôle dans certains de ces mécanismes.

Plusieurs cas ont été illustrés dans la littérature. Dans le cancer de l'œsophage, la sécrétion de CXCL1 dans la tumeur par les CAF est responsable de l'augmentation de la réparation des dommages à l'ADN après irradiation.

L'effet de CXCL1 sur la réparation est médié par l'augmentation de la production de ROS et la diminution de l'expression d'enzymes de détoxification telles que SOD. L'expression de CXCL1 confère ainsi une radiorésistance aux cellules cancéreuses de l'œsophage, et l'inhibition de CXCL1 *in vivo* sensibilise la xénogreffe à la radiothérapie (Zhang *et al.*, 2017a). CXCL1 et son récepteur CXCR2 sont également impliqués dans des mécanismes de chimiorésistance dans le cancer du sein. Ainsi, la surexpression de CXCR2 promeut une diminution de l'apoptose induite par le taxol (Xu *et al.*, 2017) alors que l'inhibition de CXCR2 augmente la sensibilité à la doxorubicine (Acharyya *et al.*, 2012). De même, un traitement au ciplastine entraîne la production de chimiokines par les CAF, dont CCL5, dans le cancer de l'ovaire. Cette sécrétion est associée à une diminution de l'apoptose et une augmentation de la formation de colonies dans les cellules co-traitées à CCL5 et au cisplatine ; ces résultats sont également retrouvés *in vivo* et suggèrent une résistance accrue au cisplatine induite par CCL5 (Zhou *et al.*, 2016a).

Dans le cancer de l'ovaire, l'expression de CXCR4 est également associée à la résistance au cisplatine (Li *et al.*, 2014a). De manière générale, l'expression de CXCR4 ou de son ligand CXCL12 est fortement impliquée dans la résistance aux thérapies. Ainsi, dans la leucémie myéloïde aiguë, l'activation de CXCR4 par son ligand CXCL12 induit une diminution de l'expression du miR let-7a, et l'inhibition de CXCR4 entraîne l'augmentation de l'apoptose dans les cellules traitées par la cytarabine (Chen *et al.*, 2013). Dans le glioblastome, CXCL12 est sécrétée dans la zone subventriculaire et protège ainsi les cellules cancéreuses de la radiothérapie, en leur conférant un phénotype mésenchymateux (Goffart *et al.*, 2016).

La résistance aux thérapies est une caractéristique importante des CSC, et comme le suggèrent Trautmann et collaborateurs, les chimiokines pourraient constituer des marqueurs de CSC, voire de nouvelles cibles thérapeutiques complémentaires afin de cibler ces CSC résistantes aux traitements (Trautmann *et al.*, 2014).

C. Implication des chimiokines dans la régulation des CSC mammaires

Beaucoup de chimiokines sont impliquées dans le maintien et la régulation des fonctions de cellules souches, ainsi que dans l'enrichissement en CSC. De manière intéressante, plusieurs voies de signalisation induites par les chimiokines sont également impliquées dans la régulation des CSC. En effet, l'activation de la voie JAK/STAT, activée par les chimiokines, est augmentée dans les CSC mammaires (Hernandez-Vargas *et al.*, 2011). Marotta et collaborateurs a montré que le couple JAK2/STAT3 en particulier était nécessaire au maintien et à la fonction des CSC mammaires CD44⁺/CD24⁻ (Marotta *et al.*, 2011). La voie PI3K/AKT, également activée par les chimiokines, est responsable de l'enrichissement en cellules souches, dans des lignées mammaires normales et cancéreuses (Korkaya *et al.*, 2009). Enfin, la modulation de la signalisation Ras/MAPK/ERK par le miR suppresseur de tumeur let-7a peut aussi réguler l'activité des cellules souches. Let-7a est ainsi responsable d'une diminution de la formation de mammosphères et de tumeurs *in vivo* (Xu *et al.*, 2015a).

Dans ce contexte, de nombreuses études ont été menées dans le but de définir le rôle des chimiokines dans la biologie des CSC, et nous nous intéresserons plus particulièrement aux études effectuées dans le cancer du sein (Figure 21).

1. CXCR4, marqueur de CSC potentiel

L'existence de marqueurs spécifiques et robustes est nécessaire à l'étude des CSC, depuis leur première identification. Cependant, aucun marqueur universel n'a été mis en évidence, même si plusieurs marqueurs ont été décrits, basés sur des tests fonctionnels et sur les caractéristiques des CSC.

L'implication des chimiokines dans la biologie des CSC est une idée récente dans l'étude du cancer du sein. Ainsi, Ablett et collaborateurs ont étudié le rôle de CXCR4 dans des cellules cancéreuses mammaires, résistantes à l'anoïkis (AR). Ces cellules AR sont particulièrement enrichies en CSC et montrent en plus une expression plus élevée de CXCR4, par rapport aux cellules en monocouche. Après tri, les cellules AR

CXCR4⁺ ont une capacité de formation de sphères accrue, qui est diminuée lorsque CXCR4 est inhibé par AMD3100. A l'inverse, un traitement par CXCL12 augmente l'auto-renouvellement des cellules AR. Dans cette étude, CXCR4 constitue un marqueur potentiel de CSC mammaires, mais la tumorigénicité *in vivo* des cellules mammaires CXCR4⁺ devra être confirmée (Ablett *et al.*, 2013). CXCL12 et ses récepteurs ont également été décrits comme marqueurs de CSC dans d'autres types de cancer. Dans le cancer de l'ovaire, les cellules triées CD133⁺ CXCR4⁺ ont des capacités tumorigènes accrues *in vivo* et expriment des facteurs associés à la pluripotence, tels que SOX2, OCT4, NANOG et KLF4, par rapport aux cellules CD133⁺ CXCR4⁻ (Cioffi *et al.*, 2015). Enfin, dans les cancers du rein et du poumon non à petites cellules, les cellules CXCR4⁺ sont plus tumorigènes *in vivo* que les cellules CXCR4⁻ (Jung *et al.*, 2012 ; Gassenmaier *et al.*, 2013).

2. Soutien et enrichissement des CSC

a. CXCL12/CXCR4/CXCR7

Comme montré précédemment, le rôle de CXCL12 et ses récepteurs CXCR4 et CXCR7 dans la biologie des CSC a été beaucoup étudié. Dans le cancer du sein, CXCL12 promeut la prolifération et la migration de lignées cancéreuses mammaires d'une part ; et d'autre part entraîne un enrichissement en cellules CD44⁺/CD24⁻, associé à une augmentation de l'activité ALDH et de l'expression de facteurs de pluripotence comme OCT4, SOX2 et NANOG (Kong *et al.*, 2016). L'enrichissement en CSC peut ainsi être induit par une coculture de CAF, qui sécrètent CXCL12 (Huang *et al.*, 2010). De plus, une expression élevée de CXCL12 est retrouvée associée aux phénotypes de CSC (Zhang *et al.*, 2015b), tout comme l'expression de ses récepteurs CXCR4 et CXCR7 (Krohn *et al.*, 2009 ; Lee *et al.*, 2016 ; Tang *et al.*, 2016b). L'enrichissement en CSC induit par CXCL12 est lié à une augmentation de marqueurs de l'EMT (Kong *et al.*, 2016). L'inhibition de CXCR4 entraîne la diminution de marqueurs de CSC, tels que la "side population" (Dubrovskaya *et al.*, 2012), la formation de sphères (Krohn *et al.*, 2009) et la tumorigénèse *in vivo* (Dubrovskaya *et al.*,

2012 ; Tang *et al.*, 2016b). Au niveau moléculaire, la surexpression de CXCL12 entraîne une augmentation de p65 nucléaire ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation d'I κ B. Les effets de CXCL12 seraient alors médiés par la voie NF- κ B, promouvant les CSC (Kong *et al.*, 2016). En particulier dans des cellules cancéreuses mammaires résistantes au tamoxifène, la fixation de CXCL12 sur CXCR4 induit l'activation du récepteur AhR (*Aryl hydrocarbon Receptor*) entraînant la transcription de gènes cibles impliqués dans le maintien des CSC et la croissance tumorale. L'inhibition de CXCR4 dans ce modèle cible spécifiquement la population de CSC, et constitue donc une option thérapeutique dans le traitement des tumeurs mammaires résistantes au tamoxifène (Dubrovskaya *et al.*, 2012).

b. CXCL10/CXCR3

Le rôle de la chimiokine CXCL10 dans la biologie des CSC mammaires a été beaucoup moins étudié. Néanmoins CXCL10 exerce également une activité pro-CSC via son récepteur CXCR3. Le récepteur CXCR3 présente plusieurs isoformes qui n'exercent pas la même fonction dans le cancer du sein. Selon Li et collaborateurs, l'isoforme CXCR3-B est augmentée dans les mammosphères, et sa surexpression augmente la capacité des cellules à former des sphères (Li *et al.*, 2015c).

c. CXCL7/CXCR1/CXCR2

Dans le cancer du sein, les MSC (*Mesenchymal stem cells*) et les CSC interagissent par l'intermédiaire de cytokines, dont CXCL7. Une boucle de rétrocontrôle positive se met en place et entraîne d'une part un enrichissement en CSC ALDH⁺ et d'autre part la sécrétion d'autres chimiokines, maintenant ainsi le phénomène (Liu *et al.*, 2011).

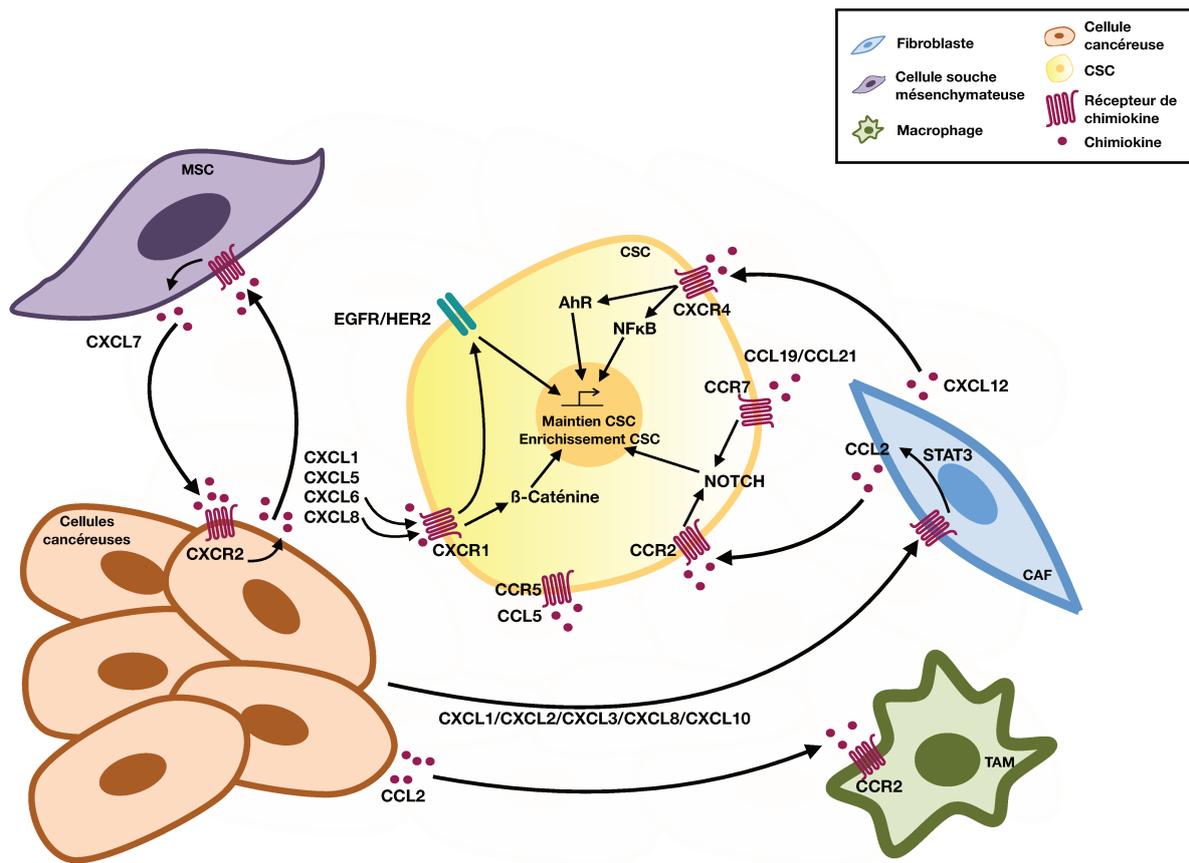


Figure 21. Rôle des chimiokines dans le maintien et l'enrichissement des CSC mammaires au sein du microenvironnement tumoral.

Les chimiokines sont impliquées dans de nombreuses interactions entre le microenvironnement et la tumeur et favorisent ainsi le maintien des CSC de manière directe ou indirecte. Différentes voies de signalisation peuvent être activées par les chimiokines.

d. CXCL8/CXCR1/CXCR2

Diverses études démontrent l'importance de CXCL8 et ses récepteurs dans la régulation des CSC. Une première étude comparative des CSC mammaires ALDH⁺ vs non-CSC ALDH⁻ a montré une expression plus élevée de CXCR1 dans le compartiment des CSC (Charafe-Jauffret *et al.*, 2009). De plus, le traitement de différentes lignées cancéreuses mammaires avec CXCL8 induit une augmentation de la formation de sphères, ainsi qu'un enrichissement en cellules ALDH⁺. En revanche, un traitement au CXCL8 de cellules ALDH⁻ n'augmente pas leur potentiel invasif en test d'invasion au Matrigel, contrairement au traitement de cellules ALDH⁺. CXCL8 semble donc agir directement sur les cellules ALDH⁺ (Charafe-Jauffret *et al.*, 2009). Ginestier et collaborateurs ont proposé un mode d'action de CXCL8/CXCR1. En

effet, les cellules CXCR1⁺ sont presque exclusivement ALDH⁺, et les cellules CXCR1⁻ALDH⁺ forment autant de tumeurs que les cellules CXCR1⁺ ALDH⁺ mais seules ces dernières sont capables de reproduire l'hétérogénéité tumorale (Ginestier *et al.*, 2010). L'inhibition de CXCR1 entraîne d'ailleurs une diminution de la proportion de cellules ALDH⁺ et de la formation de sphères. Cet effet est médié par l'activation de la voie FAK/AKT/FOXO3A (*Forkhead box protein O3*), qui module le phénotype souche. L'augmentation de CSC est suivie d'une apoptose massive dans toute la population. Cette apoptose suggère un effet *bystander* de l'inhibiteur de CXCR1, avec une action indirecte sur les cellules ALDH⁻. L'inhibition de CXCR1 est responsable de la sécrétion de FASL par les cellules CXCR1⁺ qui agit sur les cellules CXCR1⁻ en induisant la mort cellulaire. De manière intéressante, les auteurs montrent que la sécrétion de CXCL8 peut être induite par la chimiothérapie (docetaxel) ; il en est de même pour la production de FASL. Ainsi, la combinaison *in vivo* de docetaxel et de l'inhibiteur de CXCR1 diminue d'autant plus la croissance tumorale, en comparaison aux simples traitements (Ginestier *et al.*, 2010). CXCR1 pourrait donc constituer une cible thérapeutique en complément des thérapies pré-existantes, et permettrait de cibler spécifiquement les CSC responsables de récurrences. En particulier, le potentiel thérapeutique de l'inhibition de CXCR1/CXCR2 a été évalué dans les tumeurs mammaires de type HER2⁺. En effet, outre la voie FAK/AKT/FOXO3A, CXCL8 induit l'activation de EGFR/HER2 et leur inhibition réduit l'enrichissement en CSC entraîné par CXCL8. L'utilisation combinée de lapatinib ciblant EGFR et HER2 et d'un inhibiteur de CXCR1/CXCR2 diminue ainsi la formation de sphères des cellules traitées issues de tumeurs HER2⁺ (Singh *et al.*, 2013a).

e. CCL2/CCR2

Parmi les chimiokines de type -CC, la chimiokine CCL2 a également son importance dans la régulation des CSC. En particulier, dans les tumeurs mammaires triple négatives, très agressives, Fang et collaborateurs ont mis en évidence le rôle de CCL2 dont l'inhibition entraîne une diminution de la croissance tumorale *in vivo* et de

l'invasion. Cette inhibition est aussi responsable de la diminution de marqueurs de CSC, dont la proportion de cellules CD44⁺/CD24⁻ et l'expression de ALDH1 dans des xénogreffes, ainsi que la formation de mammosphères. De plus, la perte de CCL2 diminue l'envahissement de la tumeur par les macrophages, importants dans le microenvironnement tumoral et l'établissement de la niche (Fang *et al.*, 2016). Une étude a d'ailleurs montré que le ciblage des TAM par inhibition de CCR2 entraîne une diminution des CSC dans la tumeur (Mitchem *et al.*, 2013). L'importance de CCL2 démontre bien ici l'importance de la niche dans la régulation des CSC. Une autre étude confirme ce rôle et en particulier celui des CAF. Tsuyada et collaborateurs montrent ainsi que la coculture de CAF avec des cellules cancéreuses mammaires induit la sécrétion de cytokines et chimiokines par les cellules cancéreuses qui active ensuite la sécrétion de CCL2 par les CAF, via l'activation de STAT3. CCL2 agit sur les cellules cancéreuses et entraîne une augmentation de l'activité des CSC, avec une formation de sphères et une capacité d'auto-renouvellement accrues. L'action de CCL2 passe par l'activation de la voie Notch (Tsuyada *et al.*, 2012).

f. *CCL5/CCR1/CCR3/CCR5*

Alors que plusieurs études ont été menées sur le rôle de CCL5 dans la régulation des CSC dans le cancer de l'ovaire (Long *et al.*, 2012 ; Long *et al.*, 2015 ; Tang *et al.*, 2016a), peu d'études ont été menées dans le cancer du sein. Une étude montre l'enrichissement en CSC CD44⁺/CD24⁻ dans des lignées traitées avec CCL5 (Zhang *et al.*, 2009). Récemment, Jiao et collaborateurs ont montré que CCR5 pourrait définir une population de CSC dans des lignées cancéreuses mammaires : les cellules CCR5⁺ forment plus de sphères et de tumeurs *in vivo*. CCR5 agit en activant les voies de réparation de l'ADN (Jiao *et al.*, 2018).

g. *CCL19/CCL21/CCR7*

Nous avons vu précédemment que CCR7 joue un rôle important dans l'établissement de la métastase. Dans deux études récentes, Boyle et collègues

mettent en évidence le rôle de CCR7 et ses ligands dans la tumorigenèse mammaire. En effet, lorsque CCR7 est inhibé, un retard de tumorigenèse est constaté *in vivo* ainsi qu'une diminution des métastases. De plus, les cellules KO pour CCR7 forment moins de sphères et la proportion de cellules CD44⁺/CD24⁻ est réduite. A l'inverse, les traitements aux CCL19 et CCL21 stimulent la formation de sphères (Boyle *et al.*, 2016). Comme pour CCL2, l'action de CCL19/CCL21/CCR7 sur le phénotype souche est médiée par l'intermédiaire de la voie Notch (Boyle *et al.*, 2017).

En conclusion, le contexte inflammatoire mis en place par les chimiokines est très favorable aux différentes étapes du développement tumoral. De plus, leur implication dans la régulation des CSC fait de leurs récepteurs des cibles thérapeutiques potentielles, en complément des thérapies pré-existantes.

CONTEXTE ET OBJECTIFS DE LA THESE

CONTEXTE ET OBJECTIFS DE LA THESE

L'identification de CSC au sein des tumeurs solides a ouvert la voie à de nombreuses études fondamentales et translationnelles. En effet, il est désormais assez bien établi que l'organisation tumorale répond à un modèle de développement hiérarchique, où les CSC sont seules responsables de la tumorigenèse et participent à la résistance aux thérapies. Cependant, de nouvelles études ont montré l'existence d'une certaine plasticité des cellules cancéreuses. En effet, comme il a été présenté dans l'introduction, certaines non-CSC sont capables de régénérer des CSC notamment après radiothérapie (Lagadec *et al.*, 2012). Les CSC nouvellement induites présentent les mêmes marqueurs de CSC, ainsi que la réexpression de facteurs impliqués dans le maintien de la pluripotence (OCT4, SOX2, NANOG).

Cette reprogrammation des non-CSC en CSC résistantes par les thérapies conventionnelles représente donc un processus dynamique qui pourrait être impliqué entre autres dans l'échec thérapeutique et les récurrences après traitements. Dans ce contexte de reprogrammation, très peu de mécanismes ont été décrits. En effet, seules des voies de signalisation nécessaires au maintien des CSC, telles que Notch et Wnt, ont pour le moment été identifiées. Néanmoins, ces voies de signalisation pourraient n'être impliquées que dans le maintien d'un pool de CSC pré-existants, généré par un tout autre mécanisme. Il est donc essentiel d'étudier les mécanismes à l'origine de la reprogrammation, afin de la prévenir et ainsi améliorer la survie des patientes.

Mon projet de thèse a donc consisté à :

- ***étudier les mécanismes responsables de la reprogrammation de non-CSC en CSC, après traitements anti-tumoraux,***
- ***identifier des cibles potentielles permettant une diminution des récurrences et résistance.***

Pour répondre à ces objectifs, j'ai dans un premier temps étudié si la reprogrammation faisait intervenir des facteurs extrinsèques, *via* la production de facteurs solubles capables d'induire la reprogrammation. J'ai ensuite cherché à identifier ces facteurs dans le phénomène de reprogrammation. Plusieurs chimiokines, sécrétées par les cellules après irradiation, ont été ainsi identifiées (CCL5, CXCL1) dans le milieu conditionné et leur rôle a été validé dans une lignée cancéreuse mammaire. Par la suite, je me suis intéressée aux récepteurs de ces chimiokines et à leur rôle dans la reprogrammation. De plus, une étude *in vivo* a permis de valider l'implication des chimiokines et d'étudier l'effet de l'inhibition des chimiokines sur la survie.

Enfin, en collaboration avec le Pr François Bertucci et le Dr Pascal Finetti de l'Institut Paoli-Calmettes de Marseille, l'implication clinique de CXCL1, CCL5 ainsi que leurs récepteurs a pu être étudiée dans une banque d'analyse d'expression génique d'échantillons de tumeurs mammaires humaines.

En complément de l'étude des chimiokines, j'ai débuté puis participé à l'étude du rôle des vésicules extracellulaires dans la reprogrammation, qui peuvent également être produites après irradiation et dont le contenu spécifique pourrait induire la reprogrammation.

**MATERIEL
& METHODES**

MATERIEL & METHODES

Culture cellulaire

La lignée cancéreuse mammaire humaine SUM159PT native est fournie par Asterand. Elle est cultivée dans du milieu F12 (Invitrogen), complétée de 5% de SVF (*Serum de Veau Fœtal*) (Lonza), de streptomycine (100 µg/ml) (Gibco), de pénicilline (100 unités/ml) (Gibco), d'insuline (5 µg/ml) (Sigma), d'hydrocortisone (1 µg/ml) (Sigma) et de Zell Shield (Clinisciences). Nous avons également utilisé d'autres lignées dérivées des SUM159PT natives : les SUM159PT-Stb exprimant la protéine fluorescente Strawberry (Lagadec *et al.*, 2012) ; les SUM159PT ZsGreen-cODC (Lagadec *et al.*, 2012) ; et les SUM159PT pGL4-LUC.

La lignée cancéreuse mammaire MDA-MB-231 (ATCC) est cultivée dans du milieu MEM (Invitrogen), complété de 10% de SVF, de pénicilline (100 unités/ml) (Gibco), d'insuline (5 µg/ml) (Sigma), de Zell Shield (Clinisciences), et d'acides aminés non essentiels (Gibco).

La lignée cancéreuse mammaire HCC70 (ATCC) est cultivée dans du milieu RPMI-1640 (Gibco), complétée de 10% de SFV, de streptomycine (100 µg/ml) (Gibco) et de pénicilline (100 unités/ml) (Gibco).

Chaque lignée est maintenue sous atmosphère humide, à 37°C et 5% de CO₂. Elles sont toutes de type triple négatif, *basal-like* et issues de tumeur primaire (SUM159PT et HCC70) ou d'effusion pleurale (MDA-MB-231). Les 3 lignées sont mutées pour TP53. Les SUM159PT présentent des mutations de HRas et PI3CA, les MDA-MB-231 sont mutées pour KRas alors que les HCC70 sont mutées pour pTEN.

Irradiation

Les cellules sont irradiées en monocouche, à température ambiante. Elles sontensemencées la veille de l'irradiation à une densité d'environ 5500 cellules/cm². Toutes les irradiations ont été effectuées au Centre Oscar Lambret de Lille à l'aide d'un accélérateur de basse énergie (DARPAC 2000), par des photons de 80 kV, un

collimateur de 150 mm, et un débit de dose de 0,95 Gy/min. Des doses de 0, 4 et 8 Gy sont délivrées en une seule fraction.

Préparation des milieux conditionnés et traitements

Les milieux conditionnés sont récupérés 5 jours après irradiation dans les boîtes de cellulesensemencées en monocouche. Ils sont centrifugés à 300 g pendant 10 min pour éliminer les cellules mortes et les débris. Le traitement au milieu conditionné consiste à remplacer 50% du milieu cellulaire par le milieu conditionné fraîchement collecté des cellules irradiées (Figure 22). Le milieu conditionné utilisé pour l'ELISA CCL19 est concentré à l'aide d'Amicon Ultra 15 Ultracel 10k (Millipore). Le filtre est d'abord pré-rincé à l'eau. Le milieu conditionné est ensuite appliqué sur le filtre et centrifugé à 4000 g pendant 15 min.

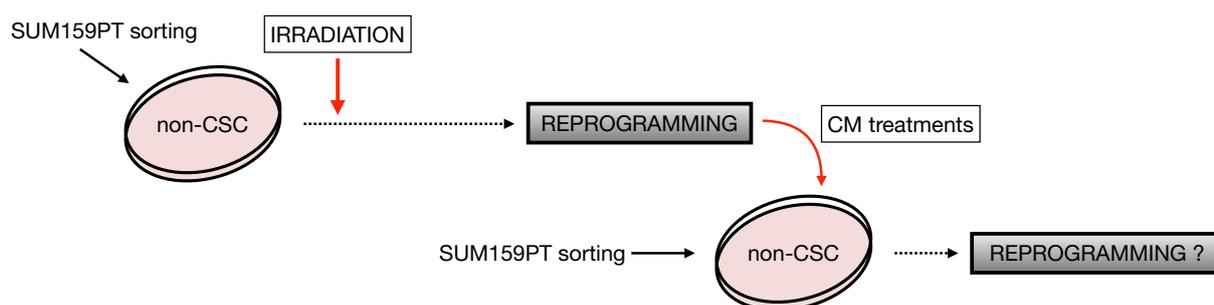


Figure 22. Protocole de traitement au milieu conditionné (CM).

Les cellules SUM159PT sont triées, et les non-CSC ALDH⁻ sont triées etensemencées. Les cellules sont ensuite irradiées 24 heures après le tri. L'analyse de la reprogrammation est effectuée 5 jours après irradiation. Le milieu conditionné est collecté 5 jours après irradiation, et appliqué en traitement le même jour sur des non-CSC triés etensemencées la veille. L'analyse de la reprogrammation induite par le CM est effectuée 5 jours après les traitements.

Collecte des vésicules extracellulaires et traitements

Le milieu conditionné (CM) des cellules (environ 16 mL de milieu pour chaque expérience) a été collecté cinq jours après traitements et immédiatement centrifugé à 800 g pendant 10 minutes de manière à éliminer les cellules mortes ainsi que les débris cellulaires. Les milieux ont ensuite été ultra-centrifugés à 130 000 g pendant 3 heures à 4°C (Ultracentrifugeuse L8-55, rotor 50Ti, Beckman). Le culot est ensuite

récupéré dans 200 μL de PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) et 25 μL de cette suspension sont utilisés pour traiter des SUM159PT triées ALDH.

Test d'absorption des VEC

Afin de montrer une absorption des VEC provenant de cellules irradiées par les cellules non-irradiées, les non-CSC sont marquées au Dil grâce au kit Vybrant Cell- Labelling solutions (Molecular Probes). Le Dil est une carbocyanine dialkyl lipophile possédant une fluorescence importante après intégration membranaire. Les cellules marquées sont ensuite irradiées et le CM est recueilli cinq jours après irradiation. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation (10 min, 800 g, à 4°C). Les non-CSC préalablement triées sont traitées par ce CM. La présence de cellules Dil⁺ est analysée par microscopie et cytométrie en flux 24 heures après traitement. Le milieu conditionné de non-CSC non marquées au Dil est utilisé comme contrôle négatif.

Marquage Aldefluor

Les CSC mammaires sont identifiées grâce à leur forte activité de l'enzyme ALDH1 (Ginestier *et al.*, 2007), en utilisant le kit Aldefluor (Stem Cell Technologies). Le kit est utilisé selon les recommandations du fabricant, comme suit : les cellules cultivées en monocouche sont détachées et suspendues dans le tampon du kit Aldefluor. Le substrat BAAA (*BODIPY-aminoacetaldehyde*) de l'enzyme ALDH est ajouté (1,5 $\mu\text{mol/l}$ pour 10^6 cellules). Deux contrôles sont effectués en parallèle : des cellules non marquées, dans le tampon seul, permettent de définir l'auto-fluorescence des cellules. Des cellules marquées, en présence de DEAB (*diethylaminobenzaldehyde*), un inhibiteur de l'ALDH, à 50 mmol/l, permettent de définir le seuil de positivité. Toutes les conditions sont incubées à 37°C à l'obscurité pendant 30 minutes. Ce test est utilisé pour évaluer l'effet d'un traitement sur la proportion de CSC et la reprogrammation. Pour cela, les cellules sont analysées sur

un cytomètre de flux Cyan™_{ADP} (Beckman Coulter). Ce test est aussi utilisé pour trier les cellules ALDH^{+/high} des cellules ALDH⁻. Trente pourcents des cellules les plus négatives sont isolées. Le tri est réalisé sur un trieur BD FACS ARIA III, au plateau de cytométrie de la plateforme BICeL (*Bio Imaging Center Lille*), à l'IRCL (*Institut pour la recherche sur le cancer de Lille*). Toutes les analyses de cytométrie sont réalisées avec le logiciel FlowJo 10.

Immunomarquage pour cytométrie de flux

Pour l'étude des récepteurs de chimiokines, ceux-ci sont marqués à l'aide d'anticorps couplés fournis par Miltenyi, ciblant CXCL1 (130100371, PE-Vio770), CCR3 (130097068, VioBlue), CCR4 (13010395, Biotine et anti-Biotine, 130097022, VioGreen), CCR5 (130106224, APC), CCR6 (130100375, PE), CCR7 (130099153, Biotine), CXCR2 (130100908, APC-Vio770), et CXCR3 (130101377, APC ou 130107463, PE-Vio615). Les anticorps sont incubés 10 minutes, sur glace, à une concentration de 1/50, à l'obscurité, dans du tampon de marquage (PBS, 0,5% de BSA, *Bovine Serum Albumine* et 2 mM EDTA, *Éthylène Diamine Tétra-Acétique*). Les cellules sont ensuite centrifugées puis rincées dans le tampon de marquage. Si nécessaire, les cellules sont préalablement marquées avec le kit Aldefluor selon le protocole habituel, puis immunomarquées dans un tampon de marquage auquel 50 µM de Verapamil sont ajoutés pour limiter la perte de marquage ALDH. Les contrôles isotypiques (REA control) sont réalisés à la même concentration. Des billes de calibration sont utilisées pour définir les seuils de positivité et les compensations nécessaires. Toutes les analyses de cytométrie sont réalisées avec le logiciel FlowJo 10.

Pour l'analyse des tumeurs, les cellules cancéreuses dissociées préalablement fixées ont été perméabilisées 15 minutes à température ambiante dans du PBS 0,1% Triton X100, puis rincées au PBS. Les cellules sont marquées à l'aide des anticorps couplés fournis par Biolegend, ciblant NANOG (BLE674010, AF647), SOX2 (BLE656112, Pacific Blue) et OCT4 (BLE653706, AF488), à 2,5 µg/mL, 10 µg/mL et

1,25 µg/mL respectivement, ainsi que les isotypes associés. Le marquage est effectué sur 1 million de cellules pendant 30 minutes à température ambiante à l'obscurité. Les cellules sont ensuite centrifugées puis rincées.

Toutes les analyses de cytométrie sont réalisées avec le logiciel FlowJo 10.

Test de capacité des cellules à former des sphères

De manière à évaluer le pourcentage de cellules souches, un test fonctionnel est utilisé. Le test de capacité à former des sphères est réalisé 5 jours après traitement. Les cellules traitées sont détachées, et mises en culture dans du milieu de sphère, constitué de DMEM-F12 phenol red-free (Invitrogen), complété de 0,4% de BSA (*Bovine serum albumine*) (Sigma), d'additif B27 (10 ml pour 500 ml de milieu) (Invitrogen), de FGF (20 ng/ml) (Sigma), de EGF (20 ng/ml) (Sigma), et d'insuline (5 µg/ml). Les cellules sontensemencées dans des plaques 96 puits à faible adhérence, dans 200 µl de milieu par puits, en dilution de 1024 cellules à 1 cellule. Le nombre de sphères est compté 8 jours plus tard à l'aide d'un microscope inversé à contraste de phase. Les cellules ont également été maintenues sous forme de sphères pendant plusieurs générations. Dans ce cas, elles sont cultivées dans le milieu de sphères, dans des flasques à faible adhérence, à une concentration de 10 000 cellules/ml, pendant 10 jours. Les sphères sont ensuite dissociées mécaniquement et avec de l'acutase (Invitrogen), puis le nombre de cellules est évalué. Elles sont ensuite remises en culture dans du milieu de sphères pour une seconde génération de 10 jours. A chaque génération, un test de capacité à former des sphères est effectué en plaque 96 puits.

Extraction d'ARN, rétro-transcription (RT) et RT-PCR en temps réel (qPCR)

ARN totaux issus de lignées cellulaires : les ARN provenant des cellules de lignées sont extraits à l'aide du kit RNeasy (Qiagen). Un traitement à la DNase incluse dans le kit permet l'élimination de l'ADN génomique. La synthèse de cDNA est

effectuée par la SuperScript III (Invitrogen) à partir de 1 µg d'ARN. Après 5 min d'hybridation des amorces aléatoires à 65°C, la rétro-transcription est effectuée selon un cycle de 10 min à 25°C, 50 min à 50°C puis 5 min à 85°C. En parallèle, des contrôles négatifs de chaque condition sont effectués (RT-), sans l'enzyme. Enfin, la qPCR (PCR quantitative) est effectuée à l'aide du thermocycleur CFX96 Real Time System (Biorad) et à partir du kit Quantification SyBR Green master mix (Qiagen). Chaque condition est réalisée en triplicat.

Toutes les amorces utilisées sont synthétisées par Eurogentech (Tableau 8). Le Ct de chaque condition est obtenu par régression linéaire à l'aide du logiciel CFX Manager de Biorad. Le ΔCt de chaque gène est déterminé après normalisation par un gène de référence (GAPDH, *glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase* ou β 2-Microglobuline). Le $\Delta\Delta Ct$ est ensuite calculé en soustrayant le ΔCt de chaque échantillon au ΔCt de la condition contrôle. Enfin, la différence d'expression (*Fold change*) correspond à $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Nom	Séquence
human β 2-MICROGLOBULINE 5'-3'	TCGCGCTACTCTCTCTTT
human β 2-MICROGLOBULINE 3'-5'	CAAGTCTGAATGCTCCACTT
human GAPDH 5'-3'	AGCCACATCGCTCAGACAC
human GAPDH 3'-5'	GCCCAATACGACCAAATCC
human ALDH1A1 5'-3'	GTTGAGCGGGCTAAGAAGTAT
human ALDH1A1 3'-5'	CCCACTCTCAATGAGGTCAAG
human NANOG 5'-3'	GTGATTTGTGGCCTGAAGA
human NANOG 3'-5'	ACACAGCTGGGTGGAAGAGA
human SOX2 5'-3'	AACCCCAAGATGCACAATC
human SOX2 3'-5'	CGGGGCCGGTATTTATAATC
human OCT3/4 5'-3'	GAAGGATGTGGTCCGAGTGT
human OCT3/4 3'-5'	GTGAAGTGAGGGCTCCATA
mouse β 2-MICROGLOBULINE 5'-3'	GTCTTTCTGGTGCTTGTCTC
mouse β 2-MICROGLOBULINE 3'-5'	TCAGTGTGAGCCAGGATATAG

Tableau 8. Liste des amorces utilisées en qPCR.

ARN totaux issus de l'expérience *in vivo* : concernant l'expérience *in vivo*, les organes (foie, poumons, cerveau et moelle osseuse) ainsi que les xénogreffes sont prélevés dans chaque souris puis broyés dans des tubes Precellys CK14, en présence de TRIzol (Invitrogen). Le broyage des tissus est effectué dans le Precellys, réfrigéré à l'azote liquide (Cryolys) selon le protocole suivant : 2 cycles de 45 secondes à 6500 rpm, avec une pause de 25 secondes entre les deux cycles. Les ARN totaux sont ensuite extraits à partir du broyat en suivant le protocole du TRIzol. Après ajout de chloroforme et centrifugation, la phase aqueuse est récupérée. Le kit RNA Clean-Up Nucleospin (Macherey-Nagel) est ensuite utilisé. Les étapes suivantes de RT et qPCR sont réalisées de la même manière que pour les ARN de lignées cellulaires.

Transfection cellulaire

Les SUM159PT ont été transfectées par nucléofection à l'aide du kit V Amaxa (Lonza) et du protocole X-013. Un million de cellules sont transfectées par condition. Pour établir la lignée SUM159PT-LUC exprimant de manière stable la luciférase, nous avons utilisé le vecteur pGL4-Luc (Firefly), disponible au laboratoire. Les cellules ayant reçu le vecteur ont été sélectionnées grâce à l'hygromycine B (600 µg/ml).

Cytokines et Chimiokines Arrays

Les arrays protéiques sont réalisés selon les consignes du fabricant, sur le milieu conditionné des cellules irradiées, récupéré 5 jours après irradiation (Cytokine array panel A ARY005, Chemokine array ARY017, Biotechne). Le signal est détecté à l'aide de la caméra LAS-4000 (Fujifilm). Les spots sont quantifiés grâce à ImageJ et normalisés par rapport aux contrôles positifs internes. Des échantillons contrôles sont réalisés en incubant du milieu frais, sans cellules, pendant 6 jours, à 37°C et 5% de CO₂ et sont utilisés pour normaliser et comparer les différentes conditions.

Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA)

Les tests ELISA pour CXCL1 (Duoset CXCL1, DY275, Biotechne), CCL5 (Duoset CCL5, DY278, Biotechne) et CCL19 (DuoSet CCL19, DY361, Biotechne) sont effectués sur le milieu conditionné non dilué suivant les instructions du fabricant. Tous les échantillons sont testés en duplicat, et une courbe étalon est faite à chaque expérience. Les plaques sont lues avec un lecteur Multiskan FC (Thermo Scientific) à 450 nm et 540 nm pour la correction. La moyenne de chaque duplicat est calculée après soustraction du blanc. Chaque densité optique moyenne est rapportée à la courbe étalon pour définir la concentration de la chimiokine dans chaque condition.

Traitements aux chimiokines et inhibitions

Pour évaluer le rôle des chimiokines dans la reprogrammation, les cellules ALDH⁻ préalablement triées sont traitées avec des chimiokines recombinantes (Biotechne). Les concentrations choisies correspondent à 10 fois la dose médiane effective (ED50) : CXCL12 (2 ng/ml), CCL19, CCL20 (5 ng/ml), CXCL1, CCL4, CCL5, MIF (10 ng/ml), CCL3 (30 ng/ml) and CXCL9 (1 µg/ml). Toutes les chimiokines sont reconstituées dans du PBS, contenant 0,1% de BSA. Pour les tests d'effets dose, les concentrations choisies correspondent à 1, 10 ou 100 fois l'ED50.

Les chimiokines sont inhibées par anticorps neutralisants (Biotechne). Plusieurs concentrations ont été testées et la plus efficace a été utilisée : anti-CXCL1 (MAB275, 2 µg/ml), anti-CCL5 (MAB278, 0,1 µg/ml). Les isotypes contrôles correspondants (MAB004 et MAB002) sont utilisés à la même concentration. Les traitements aux anticorps sont réalisés sur les cellules ALDH⁻ avant radiothérapie. Les chimiokines sont aussi inhibées dans le milieu conditionné : pour cela, les milieux conditionnés sont incubés en présence des anticorps neutralisants, aux mêmes concentrations, pendant 1 heure. Comme précédemment, 50% du milieu est remplacé par le milieu conditionné.

Inhibition des récepteurs de chimiokines

Pour étudier le rôle des récepteurs de chimiokines dans la reprogrammation, les cellules ALDH⁻ sont traitées 1h avant radiothérapie avec des inhibiteurs pharmacologiques de CXCR3 (AMG487), CCR1 (BX471), CCR5 (Maraviroc) and CXCR2 (SB225002) (Biotechne). Plusieurs concentrations ont été testées et la moins toxique a été choisie (100 nM). Les inhibiteurs ont été reconstitués dans du DMSO (*Diméthylsulfoxyde*), et le traitement contrôle est réalisé avec du DMSO seul (dilution 1/1000).

Etude *in vivo*

Injections : Les souris SCID (*Severe combined immunodeficient*) sont issues de l'Institut Pasteur de Lille et conservées dans des conditions stériles. Les SUM159PT-LUC sont suspendues dans du PBS à une concentration de 10⁶ cellules/100 µl et injectées en sous-cutané dans chaque flanc de la souris. Les volumes tumoraux sont suivis chaque semaine en mesurant la longueur (*l*) et la largeur (*w*), la largeur étant définie comme la plus petite mesure. Le volume est ensuite calculé avec la formule suivante : $(\pi \times l \times w^2)/6$. La progression tumorale est ensuite évaluée par détection de l'activité luciférase. Les souris sont injectées au niveau intra-péritonéal avec de la D-Luciférine *Firefly* (Perkin Elmer, 122799) diluée dans du PBS à une dose de 150 mg/kg (soit environ 200 µl par souris), 10 min avant d'imager à l'IVIS Lumina LT (Perkin Elmer). Les souris sont anesthésiées à l'isoflurane. Toutes les images sont analysées avec le logiciel Living Image 4.5.

Traitements : lorsque les volumes tumoraux ont atteint environ 200 mm³, les souris ont été traitées par radiothérapie (Oncovet) et/ou anticorps neutralisants (Biotechne). Les souris sont divisées en 4 groupes selon les traitements reçus : "isotype contrôles" (IgG2B, 80 µg/souris, MAB004 ; IgG1, 32 µg/souris, MAB002), "antiCXCL1" (antiCXCL1, 80 µg/souris, MAB275 ; IgG1), "antiCCL5" (antiCCL5, 32 µg/souris, MAB278 ; IgG2B), et "antiCXCL1 + antiCCL5" (antiCXCL1 ; antiCCL5). Chaque groupe est divisé en 2 sous-groupes : un sous-groupe non irradié "0 Gy", et un sous-groupe irradié "5*3 Gy". Chaque sous-groupe est constitué de 6 souris. Le

protocole de traitement est le suivant : 6 injections d'anticorps, au niveau intra-péritonéal, à raison de 3 injections par semaine tous les 2 jours, pendant 2 semaines ; et 5 sessions de 3 Gy, tous les jours pendant 5 jours, au cours de la première semaine de traitement. Le protocole de traitement est récapitulé dans la figure 23. Les souris ont été sacrifiées à différents temps : 7 jours après le premier traitement, 15 jours après le premier traitement et à long terme, lorsque la taille de la tumeur a atteint une valeur limite ou lorsque le score de bien-être était trop faible.

Protocole d'irradiation : les irradiations ont été effectuées à l'aide d'un accélérateur linéaire Precise (Elekta), avec un faisceau de photons (rayons X) de 6 MV, pour traiter un large champ à une distance de 100 cm. Le faisceau est délivré à un taux de 200 cGy/min. Les souris ont été irradiées 6 par 6 dans une cage stérile, anesthésiées (3% isoflurane/O₂, 0,9 L/min). Les cages ont été placées sur des plaques de PMMA (Polyméthacrylate de méthyle) de 5 cm permettant la diffusion du rayonnement. Un champ de 20 cm x 3 cm a été défini pour avoir les pattes des 6 souris alignées sous le faisceau. La zone à traiter était située à 0,5 cm de profondeur sous la peau, et un gaze stérile de 1 cm a été positionné au dessus de la zone à traiter.

Analyses : lors de l'euthanasie, les tumeurs, foie, poumons, cerveau, et fémurs ont été collectés. Le fémur a été récupéré afin de recueillir la moelle osseuse. Pour cela, les extrémités de l'os ont été coupées. La moelle osseuse a été récupérée en faisant passer du PBS dans le canal médullaire. La moelle osseuse a ensuite été centrifugée pour éliminer le PBS et conservée à -80°C avant extraction d'ARN.

Une partie de chaque tumeur et organe a été congelée dans l'azote liquide dès la dissection avant broyage et extraction d'ARN comme décrit plus haut. Des qPCR mesurant l'expression de *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* et *ALDH1A1* ont été effectuées sur les tumeurs. Pour détecter les métastases, les ARN des organes ont été extraits puis des qPCR ont été réalisées afin de détecter et quantifier la β 2-Microglobuline humaine et la rapporter à l'expression de la β 2-Microglobuline murine.

Une autre partie de chaque tumeur a été d'abord coupée un petit fragment de 1 mm puis dissociée à l'aide du kit de dissociation de tumeurs de Miltenyi (130-095-929) et du gentle MACS Dissociator, selon le protocole de dissociation de tumeurs moyennes. Les cellules tumorales dissociées ont ensuite été en partie marquées à l'aide du kit Aldefluor, selon le protocole précédemment décrit. Le reste des cellules a été fixé puis immunomarké comme décrit plus haut, pour analyse en cytométrie de l'expression d'OCT4, SOX2 et NANOG.

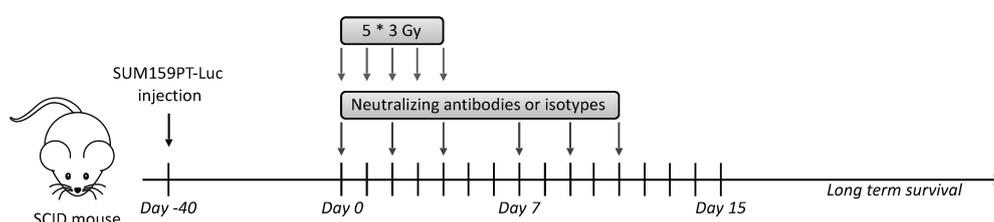


Figure 23. Protocole de traitement des souris SCID.

Les cellules SUM159PT-Luc sont injectées dans les souris SCID en sous-cutané, au niveau de chaque flanc. Lorsque la tumeur a atteint une taille d'environ 200 mm³, les traitements sont effectués. Les souris sont traitées par anticorps neutralisants une fois tous les 2 jours, à raison de 3 traitements par semaine, pendant 2 semaines. En parallèle, lors de la première semaine de traitement, les souris sont irradiées, en 5 séances de 3 Gy chacune.

Analyses cliniques

Ces analyses ont été effectuées en collaboration avec le Pr Bertucci et le Dr Finetti de l'Institut Paoli-Calmettes de Marseille, qui dispose d'une banque de données d'échantillons de cancers du sein humains. Cette banque de données est composée de 38 bases de données publiques (Annexe 3). Chaque banque a été normalisée séparément, dans le logiciel R (Bioconductor). Les sondes ont été cartographiées selon leur identifiant EntrezGeneID, et lorsque 2 sondes étaient liées au même identifiant, celle avec la variance la plus élevée a été retenue. Plusieurs signatures moléculaires ont été étudiées : la signature PAM50 (Prat et al., 2013), la signature claudin-low (Prat et al., 2010), la signature CD44⁺/CD24⁻ (Creighton et al.,

2009), la signature de transition de population (Prat *et al.*, 2013), la signature de sous-populations mammaires (Lim *et al.*, 2010), et la signature ALDH1 pos-like (Ginestier *et al.*, 2007). La MFS a été calculée à partir de la date de diagnostic jusqu'à la date de récurrence lointaine. La survie a été calculée selon la méthode Kaplan-Meier, et les courbes comparées à l'aide du test log-rank. Tous les tests statistiques sont bilatéraux, avec un niveau de significativité de 5%.

Analyses statistiques

Les résultats présentés sont les moyennes des répétitions. Toutes les expériences *in vitro* ont été réalisées au minimum en triplicats biologiques. Le nombre de répétitions est indiqué dans la légende de chaque figure, ainsi que les tests statistiques (t test bilatéral, et ANOVA, *Analysis of Variance*). Le résultat est considéré comme significatif si la valeur p est inférieure à 0,05. Les barres d'erreur présentées correspondent à la SEM (*Standard error mean*). Concernant les analyses *in vivo* de survie, la méthode Kaplan-Meier a été utilisée et les courbes ont été comparées grâce au test log-rank (Mantel-Cox).

RESULTATS

RESULTATS

I. Etude du milieu conditionné : effets et analyse du contenu

A. Effets du milieu conditionné sur la reprogrammation

Afin d'étudier les mécanismes impliqués dans la reprogrammation radio-induite, j'ai d'abord tenté d'établir les conditions expérimentales nécessaires pour visualiser cette reprogrammation, et pour reproduire les résultats précédemment publiés (Lagadec *et al.*, 2012).

J'ai donc utilisé la lignée SUM159PT dans ce but. Les SUM159PT sont marquées avec le kit Aldefluor détectant l'activité enzymatique de l'ALDH, puis triées. Elles sont ensuite irradiées 24 heures après tri, au Centre Oscar Lambret, à des doses de 4 et 8 Gy. Un contrôle non irradié est également effectué. Cinq jours après irradiation, la reprogrammation est analysée de plusieurs manières : un test Aldefluor est réalisé (Figures 24A et 24B) ; les cellules sontensemencées en conditions non adhérentes pour étudier la capacité de formation de sphères, et le nombre de sphères formées est compté 8 jours plus tard (Figures 24C, 24D, 24E) ; enfin, les ARN sont extraits et l'expression de gènes associés à la pluripotence, tels que *OCT4*, *SOX2* et *NANOG*, est analysée par qPCR (Figure 24F). Comme le montrent les figures 24A et 24B, l'irradiation des non-CSC induit l'émergence de cellules ALDH⁺. Cette reprogrammation par rapport à la condition non irradiée est plus importante à 8 Gy (3,172% \pm 0,62%, $p=0,0002$) qu'à 4 Gy (0,625% \pm 0,22%, $p=0,0448$). Ainsi, la plupart des expériences suivantes seront effectuées uniquement à 8 Gy.

J'ai ensuite validé cette reprogrammation par test fonctionnel de formation de sphères. Celui-ci révèle que l'irradiation est trop létale pour les cellules : la formation de sphères est inférieure après irradiation, par rapport à la condition non irradiée, à la première génération de sphères (Figures 24C et 24D). L'augmentation de la capacité de formation de sphères à 8 Gy est observée à partir de la 3^{ème} génération et

significative à la 4^{ème} génération (4,461% \pm 0,283%, $p=0,0176$) par rapport à la condition non irradiée (2,93% \pm 0,272%).

Enfin, l'étude de l'expression de gènes associés à la pluripotence révèle une augmentation de l'expression de *SOX2* et *NANOG* après irradiation. L'absence d'augmentation de *OCT4* après irradiation peut être expliquée par un niveau d'expression basal élevé de *OCT4*. J'ai également pu mettre en évidence la reprogrammation radio-induite avec un autre marqueur de CSC, l'activité faible du protéasome, comme précédemment montré par Lagadec *et al.* (2012) en utilisant les SUM159PT ZsGreen-cODC (*Ornithine Décarboxylase*) (Figure 25).

Ainsi, à l'aide de plusieurs marqueurs de CSC, j'ai pu mettre en place les conditions nous permettant l'étude de la reprogrammation radio-induite de non-CSC en CSC au laboratoire.

Nous avons ensuite émis l'hypothèse que la reprogrammation nécessite l'activation de certaines non-CSC par des agents solubles libérés lors du traitement. Je me suis ensuite intéressée aux facteurs solubles sécrétés après irradiation. Pour tester leur éventuelle implication, j'ai récolté le milieu conditionné (CM) issu de non-CSC irradiées, selon le protocole décrit en figure 22. Les non-CSC fraîchement triées ont donc été traitées avec ce CM. Plusieurs concentrations ont été testées (25%, 50% ou 100%) et la plus efficace a été choisie : 50% du milieu de culture ont été remplacés par le CM. Les figures 24A et 24B montrent ainsi que le traitement au CM est capable d'induire l'émergence de cellules ALDH⁺ dans une population initialement dépourvue de CSC. Cette reprogrammation induite par le CM est plus faible que la reprogrammation radio-induite, mais est significative par rapport à un traitement contrôle au CM provenant de cellules non irradiées ("CM 0 Gy" : 0,319% \pm 0,07% et "CM 8 Gy" : 1,494% \pm 0,305%, $p=0,0065$).

En revanche, l'effet du traitement au CM est plus marqué sur le test de capacité à former des sphères (Figures 24D et 24E), où l'on peut observer une augmentation du nombre de sphères formées après traitement au CM issu de cellules irradiées (4,621% +/- 0,533%, $p=0,0294$), par rapport à la condition contrôle non irradiée (3,208% +/- 0,272%). Enfin, le traitement au CM 8 Gy entraîne une augmentation de l'expression du facteur de pluripotence SOX2 (Figure 24F).

Ces différentes expériences montrent que le milieu conditionné issu de cellules irradiées est capable d'induire l'émergence de iCSC dans une population purgée des CSC présentes avant le tri. Ainsi, **des facteurs solubles présents dans le milieu et sécrétés après irradiation, pourraient être impliqués dans la reprogrammation de non-CSC en CSC.**

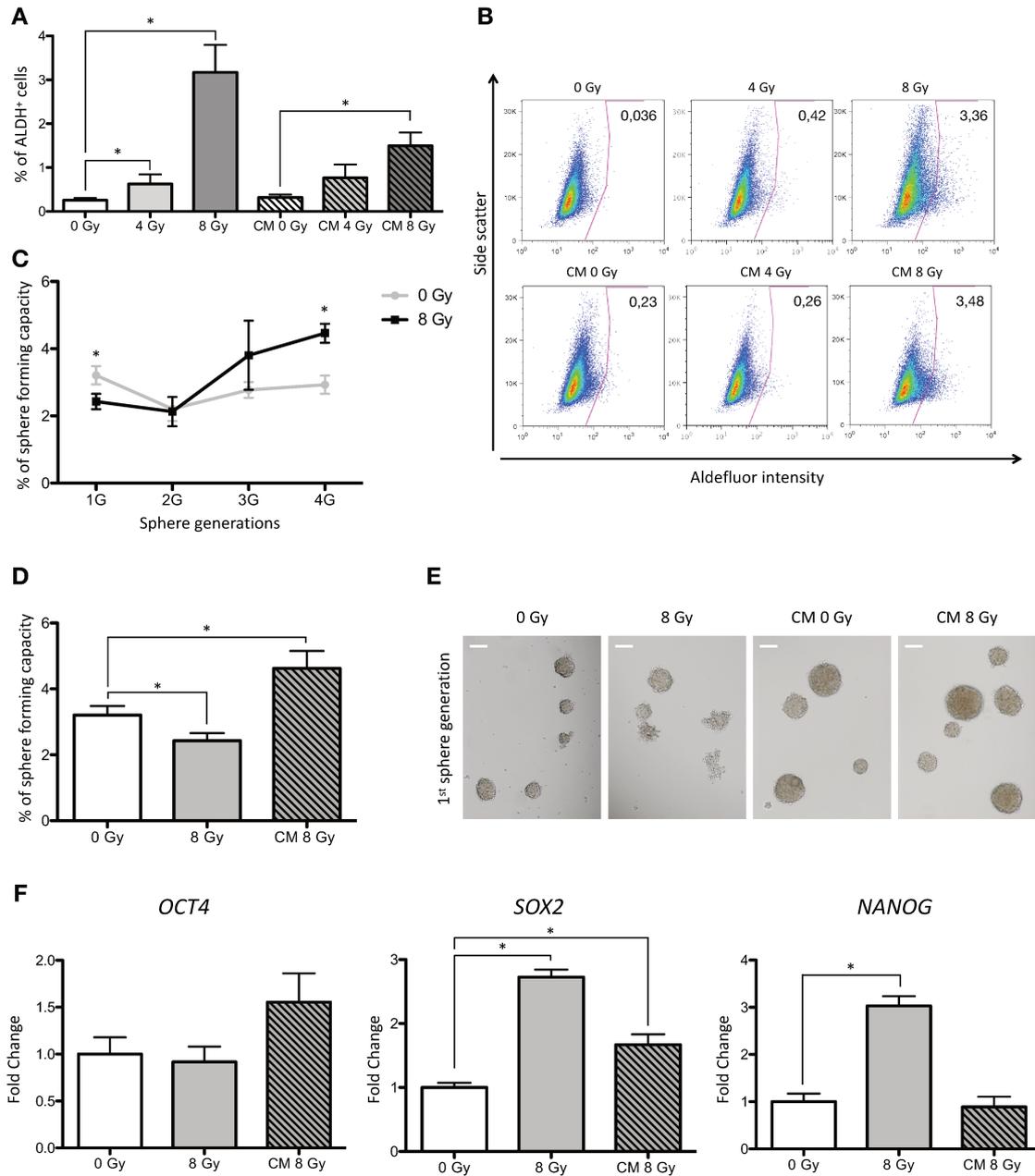


Figure 24. Induction de CSC après radiothérapie et traitements au milieu conditionné.

(A) Analyse de la reprogrammation par marquage de l'activité ALDH sur des cellules triées ALDH⁻ cinq jours après irradiation ou traitements au CM. $n=7$, t test, *, $p<0,05$. (B) Dot plots de cytométrie de flux représentatifs du marquage de l'activité ALDH après irradiation et traitements au CM. (C) Cinq jours après irradiation, les non-CSC traitées sont ensemencées en conditions non adhérentes en plaques 96 puits. Le nombre de sphères primaires est compté 8 jours plus tard. En parallèle, des générations de sphères sont entretenues en flasque T25 jusqu'à 4 générations, et passées tous les 10 jours. A chaque génération (ou passage), un test de formation de sphères est effectué. $n=3$, t test, *, $p<0,05$. (D) Capacité des non-CSC irradiées ou traitées au CM à former des sphères, à la première génération. $n=3$, t test, *, $p<0,05$. (E) Photos de sphères à la première génération, à 8 jours. Les photos ont été prises avec un microscope Nikon Eclipse Ti, objectif 10x. L'échelle correspond à 100 μ m. (F) Expression en qRT-PCR de OCT4, SOX2 et NANOG, dans les non-CSC irradiées ou traitées au CM, 5 jours après traitement. Le gène de référence est la GAPDH. $n\geq 3$, t test, *, $p<0,05$.

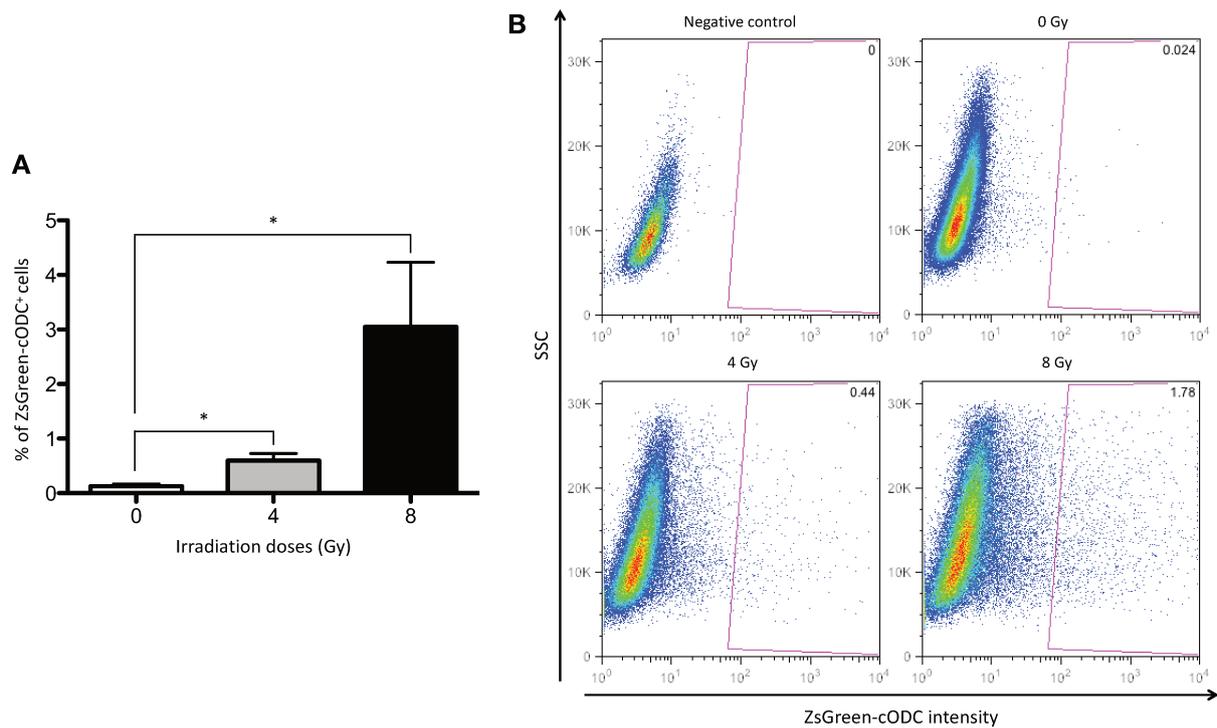


Figure 25. Induction de CSC ZsGreen-cODC⁺ après radiothérapie.

(A) Analyse de la reprogrammation grâce à l'expression de la protéine de fusion ZsGreen-cODC, qui marque l'activité faible du protéasome caractéristique des CSC, détectée en cytométrie de flux. Les cellules exprimant stablement la protéine ZsGreen-cODC sont préalablement triées, les cellules ZsGreen-cODC⁻ sontensemencées, puis irradiées 24 heures après tri. L'analyse de la reprogrammation est effectuée 5 jours après irradiation. $n=4$, t test, *, $p<0,05$. (B) Dot plots de cytométrie de flux représentatifs de l'activité du protéasome après irradiation.

B. Analyse du contenu du milieu conditionné

Je me suis donc intéressée à la composition du milieu conditionné. Il peut contenir, entre autres, des protéines sécrétées par les cellules, ainsi que des vésicules extracellulaires (VEC), qui peuvent être des microvésicules, des exosomes ou des corps apoptotiques. Des protéines, telles que des facteurs de croissance, des cytokines et des chimiokines, produites après irradiation, pourraient agir sur des cellules cibles *via* des récepteurs particuliers et activer ainsi des voies de signalisation entraînant la reprogrammation. Nous allons aborder dans cette partie l'étude du contenu en protéines, et particulièrement en cytokines et chimiokines. Le rôle des VEC sera présenté dans la partie VI.

J'ai donc réalisé des puces à protéines (*protein arrays*) ciblant des facteurs de croissance, des cytokines et des chimiokines. Il n'y avait pas de différence significative dans la sécrétion de facteurs de croissance après irradiation (données non montrées). En revanche, l'étude des chimiokines (Figures 26A et 26B) et des cytokines arrays (Figures 26C et 26D) a montré une augmentation de la sécrétion de certains facteurs après irradiation. En effet, la sécrétion de plusieurs chimiokines est augmentée après irradiation, notamment des chimiokines de type CXC telles que CXCL1, CXCL9 et CXCL12 et de type CC telles que CCL3/4, CCL5, CCL15, CCL19 et CCL20 (Figure 26). Une sécrétion accrue de la cytokine MIF (*Macrophage migration inhibitory factor*) est également détectée. J'ai choisi de ne garder dans l'analyse que les protéines dont les profils de sécrétion étaient similaires entre les différentes répétitions. Ainsi, des cytokines telles que l'interleukine-6 ou l'interleukine-8 (CXCL8) ont été éliminées puisque leur détection présentait une très grande variabilité selon les répétitions malgré la présence de reprogrammation. De plus, il est à noter qu'aucune diminution de sécrétion n'a été mesurée.

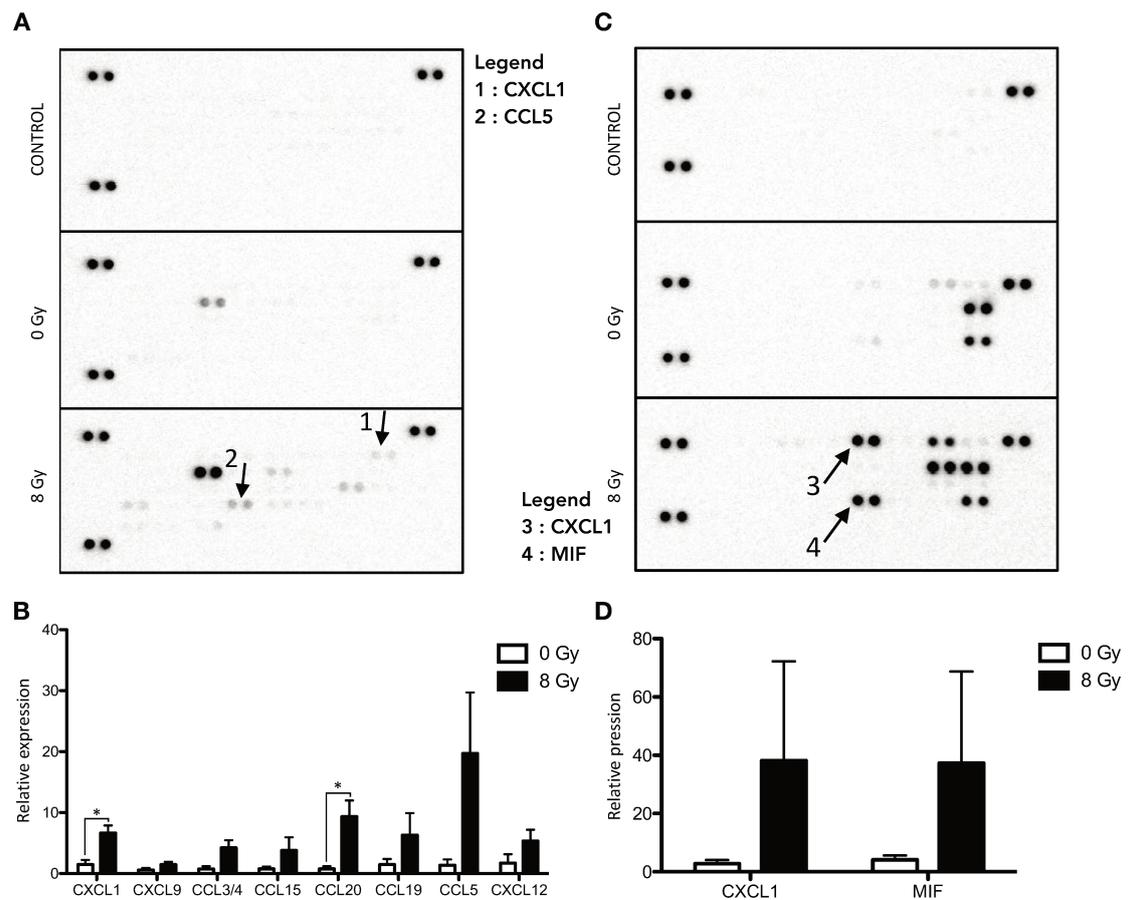


Figure 26. Sécrétion de chimiokines et de cytokines induite par la radiothérapie.

Les cellules ALDH⁺ ont été ensemencées en monocouche, puis irradiées 24 heures après le tri. Cinq jours après irradiation, le CM est collecté et analysé par puce à chimiokines (A, B) et par puce à cytokines (C, D). La condition contrôle correspond à du milieu de culture, incubé 6 jours sans cellules, à 37°C, 5% de CO₂. Les flèches noires représentent CXCL1 (1 et 3), CCL5 (2) et MIF (4). (A, B) Puce à chimiokines et quantification relative de la sécrétion des chimiokines détectées. (C, D) Puce à cytokines array et quantification relative de la sécrétion des chimiokines détectées. La normalisation est faite à partir des contrôles positifs internes. n=3, t test, *, p<0,05.

De manière à valider la sécrétion radio-induite de ces chimiokines, j'ai réalisé des tests ELISA sur le CM après irradiation (Figure 27). J'ai ainsi validé l'augmentation de la concentration de CXCL1 et CCL5 dans le milieu des cellules irradiées, par rapport aux cellules non irradiées (Figures 27A et 27B). De manière intéressante, on observe un pic de sécrétion de ces chimiokines 5 jours après irradiation, qui coïncide avec le pic de reprogrammation observé dans les SUM159PT. D'autres chimiokines comme CCL4, n'ont pas été détectées par test ELISA (données non montrées), et CCL19 n'a pu être détectée qu'en concentrant le CM et ne montre qu'une faible augmentation après irradiation (Figure 27C).

La radiothérapie induit donc la sécrétion spécifique *in vitro* de chimiokines telles que CXCL1 et CCL5.

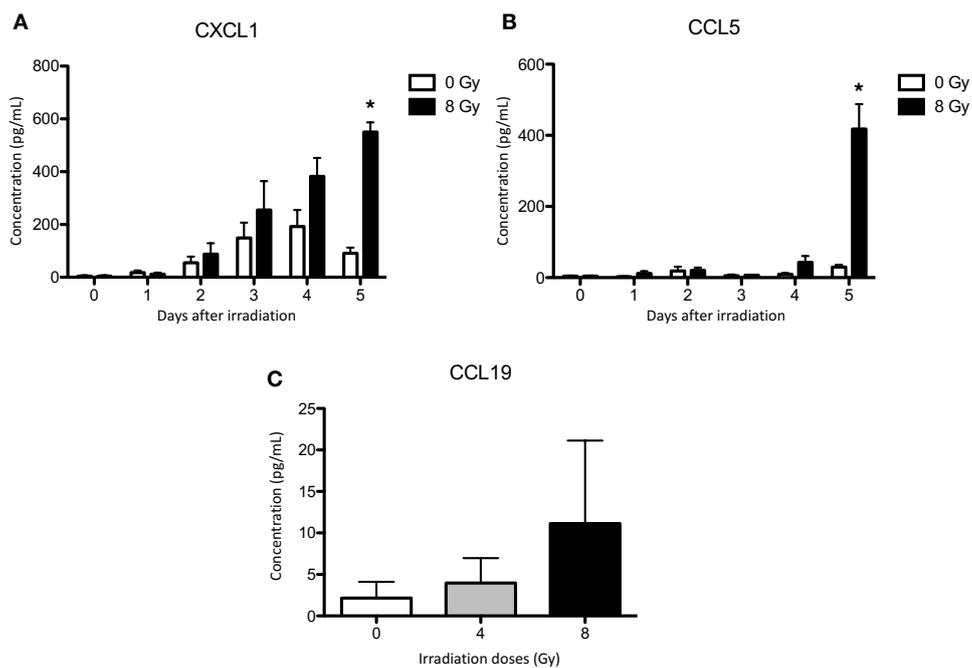


Figure 27. Validation de la sécrétion de chimiokines après irradiation.

Quantification relative de CXCL1 (A), CCL5 (B) et CCL19 (C) par test ELISA sur le milieu conditionné après irradiation. Le milieu a été collecté tous les jours après irradiation (A et B), et à J5 après irradiation (C). $n \geq 3$, t test, *, $p < 0,05$.

II. Etude du rôle des chimiokines

A. Etude de l'effet du traitement aux chimiokines recombinantes

De manière à étudier le rôle des chimiokines dans la reprogrammation, j'ai traité les non-CSC triées avec différentes chimiokines, ainsi qu'un mix contenant toutes les différentes chimiokines identifiées (Figure 28). Ces traitements n'induisent pas d'augmentation de CSC ALDH⁺ (Figure 28A).

En revanche, on peut observer une capacité accrue de formation de sphères, variable selon la chimiokine stimulatrice (Figure 28B). Le traitement par le mix des différentes chimiokines n'induit pas un effet plus important, ce qui pourrait être expliqué par la redondance du réseau de chimiokines et de leurs récepteurs, ou par le contrôle fin de la proportion de CSC dans la population totale. Il est à noter que le traitement de la population totale non triée par les chimiokines n'induit pas d'augmentation de la formation de sphères (Figure 28C), ce qui suggère aussi un rétro-contrôle de la population de CSC.

J'ai également testé plusieurs concentrations de traitements pour CXCL1, CCL5 et CCL19. La figure 29 montre qu'une dose plus élevée de CXCL1 (100 ng/mL) augmente le pourcentage de iCSC ALDH⁺ de manière significative ($p=0,0366$), par rapport au contrôle. De même, une dose plus faible de CCL19 (0,5 ng/mL) augmente le pourcentage de cellules ALDH⁺ ($p=0,0213$) (Figure 29A). L'induction de CSC ALDH⁺ reste cependant faible. En revanche, on observe un effet dépendant de la dose sur la capacité de formation de sphères, pour CXCL1 et CCL5 (Figure 29B). CCL19 n'induit pas une augmentation de la capacité de formation de sphères dépendante de la dose (Figure 29B).

CXCL1 et CCL5 semblent donc être impliquées dans la reprogrammation de non-CSC en CSC.

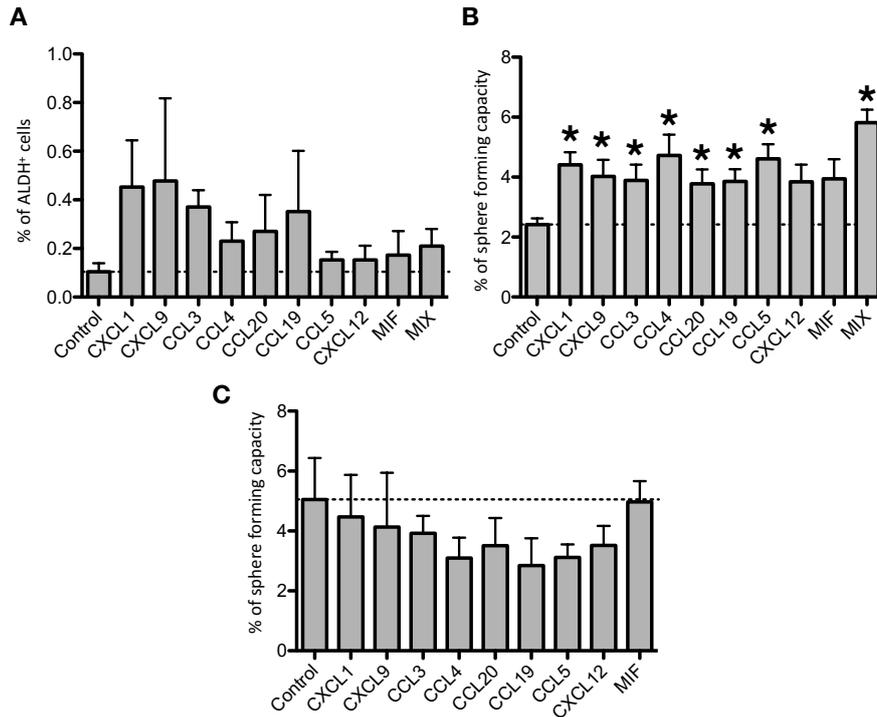


Figure 28. Effets de traitements aux chimiokines sur l'induction de CSC.

(A et B) Les non-CSC préalablement triées ont étéensemencées, et traitées aux chimiokines 24 heures après le tri. Chaque chimiokine est ajoutée en une fois, à la concentration indiquée dans la partie Matériel & Méthodes. Le MIX correspond à un traitement avec toutes les chimiokines étudiées. Cinq jours après les traitements, un marquage Aldefluor est réalisé (A) et les cellules sontensemencées en conditions non adhérentes pour évaluer la capacité à former des sphères (B). (C) La même expérience a été réalisée sur la population totale de SUM159PT, sans tri préalable. Les traitements ont été réalisés de la même manière et la capacité à former des sphères a été évaluée. $n \geq 3$, t test, *, $p < 0,05$.

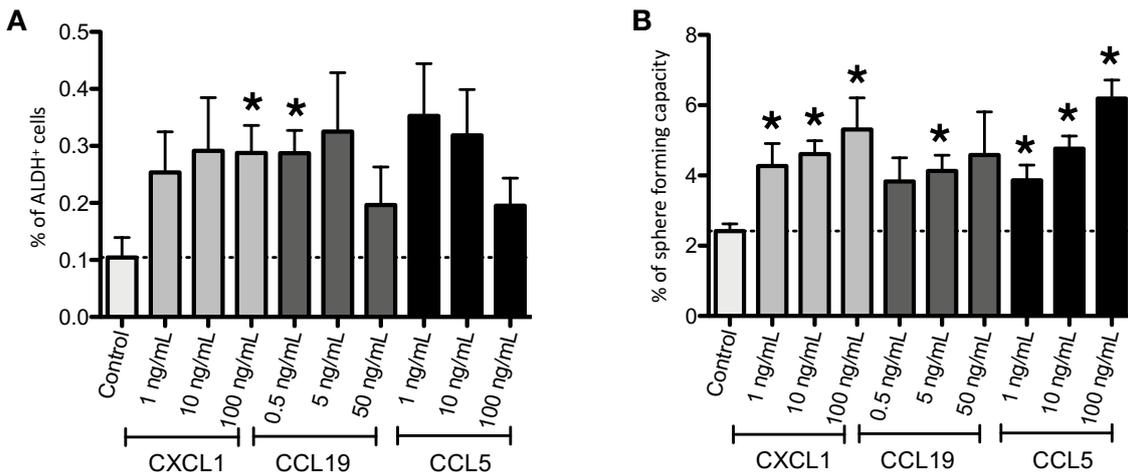


Figure 29. Effets doses de CXCL1, CCL19 et CCL5 sur l'induction de CSC.

(A et B) Les non-CSC préalablement triées ont étéensemencées, et traitées à différentes concentrations de CXCL1, CCL19 et CCL5 24 heures après le tri. Cinq jours après les traitements, un marquage Aldefluor est réalisé (A) et les cellules sontensemencées en conditions non adhérentes pour évaluer la capacité à former des sphères (B). $n \geq 3$, t test, *, $p < 0,05$.

B. Etude de l'effet de l'inhibition de CXCL1 et CCL5

J'ai ensuite évalué l'effet de l'inhibition de CXCL1 et CCL5 sur la reprogrammation. Plusieurs approches ont été testées. L'utilisation de siARN ciblant CXCL1 et CCL5 a été envisagée, mais la transfection ajoutait un stress supplémentaire aux cellules subissant le tri et l'irradiation. Je me suis donc tournée vers l'utilisation d'anticorps neutralisants (Figure 30). Plusieurs concentrations ont été testées et la plus efficace a été retenue.

Les non-CSC traitées aux anticorps neutralisants (CXCL1, CCL5 ou les deux) et irradiées présentent une induction diminuée de CSC ALDH⁺ (Figure 30A), par rapport à la condition contrôle traitée avec les anticorps isotypiques (isotype 8 Gy : 2,160% \pm 0,3801% ; anti-CXCL1 8 Gy : 1,155% \pm 0,1875%, $p=0,0224$; anti-CCL5 8 Gy : 1,018% \pm 0,157%, $p=0,0075$; pool 8 Gy : 0,995% \pm 0,186%, $p=0,0105$).

L'effet des anticorps neutralisants sur le potentiel de formation de sphères est moins marqué. A la première génération de sphères, on n'observe que l'effet délétère de l'irradiation sur les cellules (Figure 30B), comme précédemment montré dans les figures 24C et 24D, et les anticorps neutralisants ne semblent pas induire de variations. Cependant, j'ai analysé la formation de sphères sur plusieurs générations. La 3^{ème} génération de sphères montre une tendance à la diminution de la capacité à former des sphères lors du co-traitement anti-CXCL1 et anti-CCL5 (Isotype 8 Gy : 2,87% \pm 0,298% ; pool 8 Gy : 1,83% \pm 0,2491%, $p=0,0553$).

J'ai également traité les non-CSC avec du CM issu de cellules irradiées et complémenté d'anticorps neutralisants (Figures 30D et 30E). Ainsi, l'inhibition de CCL5 dans le CM induit une diminution significative de l'induction de CSC. On observe en effet une diminution de la proportion de cellules ALDH⁺ par rapport à la condition isotype (isotype : 0,827% \pm 0,0384% ; anti-CCL5 : 0,59% \pm 0,07%, $p=0,0414$) (Figure 30D) ainsi qu'une diminution de la formation de sphères (isotype :

4,393% \pm 0,393% ; anti-CCL5 : 2,62% \pm 0,265%, $p=0,0201$) (Figure 30E). L'inhibition de CXCL1 et la double inhibition des deux chimiokines induisent également une diminution de l'induction de CSC mais de manière non significative.

J'ai donc pu mettre évidence, pour la première fois, l'implication des chimiokines CXCL1 et CCL5 dans l'induction de la reprogrammation de non-CSC en CSC après radiothérapie, à la fois par traitement et par inhibition de ces chimiokines.

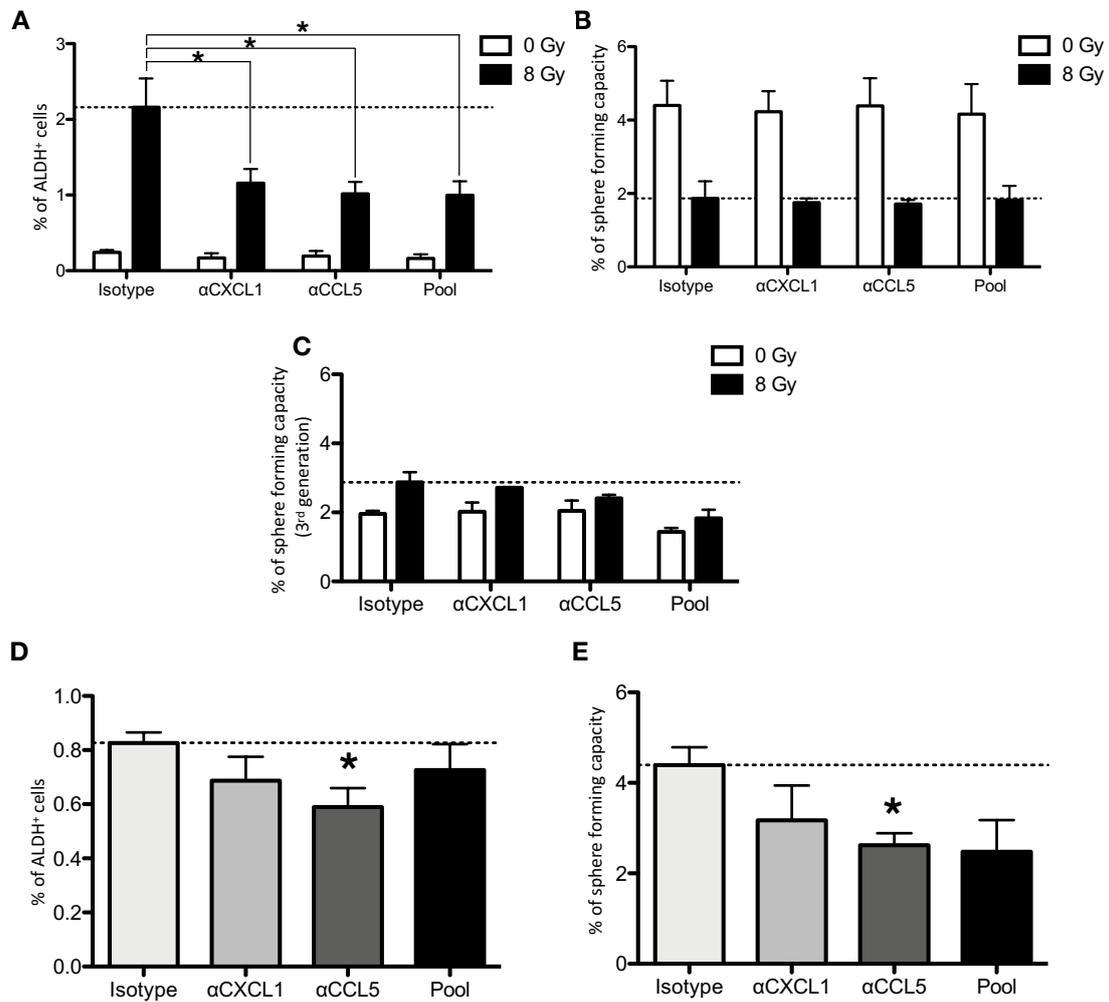


Figure 30. Effet de l'inhibition de CXCL1 et CCL5 sur l'induction de CSC.

(A, B, C) Les non-CSC préalablement triées ont étéensemencées, et traitées à l'aide d'anticorps neutralisants ciblant CXCL1 et CCL5 24 heures après le tri et 1 heure avant irradiation. Cinq jours après les traitements, un marquage Aldefluor est réalisé (A) et les cellules sontensemencées en conditions non adhérentes pour évaluer la capacité à former des sphères (B). (C) Les non-CSC traitées ont été maintenues en conditions non adhérentes jusqu'à 3 générations. Le test de capacité à former des sphères est réalisé à chaque génération. L'histogramme représente le potentiel de formation de sphères à la 3^{ème} génération. (D et E) Les non-CSC préalablement triées ont étéensemencées puis traitées avec le CM frais de cellules irradiées (collecté comme précédemment décrit), auquel sont ajoutés les anticorps neutralisants (isotype, anti-CXCL1, anti-CCL5, ou le pool des deux). Cinq jours après les traitements, un marquage Aldefluor est réalisé (D) et les cellules sontensemencées en conditions non adhérentes pour évaluer la capacité à former des sphères (E). Les concentrations utilisées sont indiquées dans la partie Matériel & Méthodes. $n=3$, t test, *, $p<0,05$.

III. Etude du rôle des récepteurs de chimiokines

A. Analyse de l'expression des récepteurs de chimiokines

Le pourcentage de reprogrammation, qu'elle soit induite par les irradiations ou le milieu conditionné reste faible (2 à 5% de la population totale). J'ai donc émis l'hypothèse que seule une petite sous-population a la capacité de reprogrammer. Comme j'ai montré le rôle des chimiokines dans l'induction de la reprogrammation, je me suis intéressée à l'expression et au rôle des récepteurs de chimiokines dans la reprogrammation.

Pour cela, l'expression membranaire de plusieurs récepteurs de chimiokines a été analysée par cytométrie de flux dans les SUM159PT (Tableau 9). Ainsi, les récepteurs CCR3, CCR4, CCR6 et CCR7 sont faiblement exprimés à la membrane alors que CCR1, CXCR2 et CXCR3 présentent des profils d'expression plus élevés et pouvant correspondre au taux de reprogrammation. Le récepteur CCR5 est plus fortement exprimé à la membrane que les autres récepteurs (10 à 12% de cellules positives). Je me suis donc intéressée à ces 4 récepteurs et plus particulièrement à CCR1, CXCR2 et CXCR3, dans le but d'identifier une éventuelle population reprogrammable.

J'ai évalué l'expression membranaire des récepteurs avec ou sans irradiation, dans les SUM159PT (Figure 31), ainsi que dans d'autres lignées cancéreuses mammaires (Figures 32 et 33). Globalement, on observe une expression membranaire plus élevée des récepteurs dans les cellules ALDH⁻ par rapport aux cellules ALDH⁺ et à la population totale (Figure 31). De plus, l'expression apparaît accrue après irradiation, et cette augmentation est significative dans la population totale pour le récepteur CXCR3 ($p=0,0073$) (Figure 31B), ainsi que dans la population ALDH⁻ pour le récepteur CCR1 ($p=0,0077$) (Figure 31C). L'augmentation de l'expression membranaire reste non significative pour les récepteurs CXCR2 et CCR5 (Figures 31A et 31D). La figure 31E permet de visualiser ces variations.

Receptors	Ligands	Expression
CCR1	CCL3,4,5,7,14,15,16,23	0.5-1%
CCR3	CCL5,7,11,13,15,24,26,28	<0.1%
CCR4	CCL2,3,5,17,22	0.1%
CCR5	CCL3,4,5,8	10-12%
CCR6	CCL20	<0.5%
CCR7	CCL19,21	<0.5%
CXCR2	CXCL1,2,3,5,6,7,8	1-2%
CXCR3	CXCL9,10,11	2-5%

Tableau 9. Expression membranaire des récepteurs de chimiokines.

L'expression de plusieurs récepteurs a été évaluée par cytométrie de flux dans les SUM159PT et est représentée en pourcentage de cellules positives parmi la population totale.

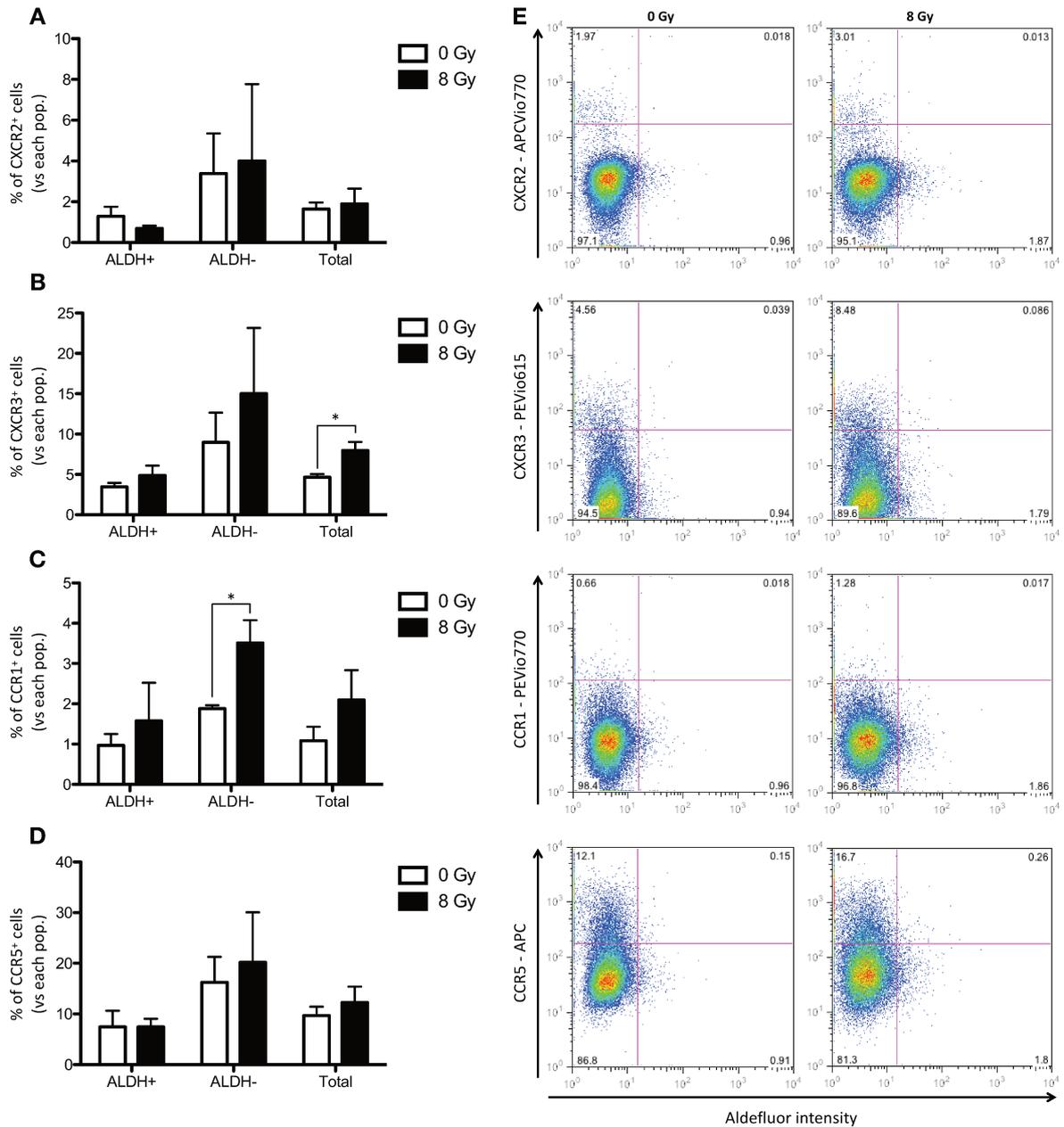


Figure 31. Expression membranaire des récepteurs de chimiokines en fonction du marqueur ALDH après irradiation dans les SUM159PT.

(A, B, C, D) Analyse de l'expression membranaire des récepteurs CXCR2 (A), CXCR3 (B), CCR1 (C), CCR5 (D) dans les cellules marquées au test Aldefluor, par cytométrie de flux. Les marquages ont été effectués sur des SUM159PT non triées, irradiées ou non, 5 jours après traitement. La population ALDH⁻ est définie comme les 30% de cellules les plus négatives. n=3, t test, *, p<0,05. (E) Dot plots représentatifs du marquage Aldefluor et l'expression membranaire des récepteurs étudiés.

J'ai également étudié l'expression à la membrane de ces quatre récepteurs dans les MDA-MB-231 et les HCC70, deux autres lignées cancéreuses mammaires triples-négatives. De manière intéressante, les MDA-MB-231 présentent une expression augmentée de CCR1 (Figure 32A), de CXCR3 (Figure 32C) et de CCR5 (Figure 32D) dans les cellules ALDH⁺ par rapport aux cellules ALDH⁻ et à la population totale. Cette augmentation reste cependant non significative. Les HCC70 présentent un profil d'expression similaire aux SUM159PT : on observe une expression plus faible de CCR1 (Figure 32A), CXCR2 (Figure 32B) et CXCR3 (Figure 32C) dans la population ALDH⁺. La proportion de cellules CCR5⁺ est très élevée dans les HCC70 et ne varie pas dans les différentes sous-populations (Figure 32D).

La figure 33 montre les premiers résultats de l'analyse de l'expression membranaire des récepteurs dans les MDA-MB-231 et HCC70. L'expérience n'a été effectuée qu'une seule fois, mais montre que l'irradiation induit peu de changements dans l'expression de CCR1 (Figure 33A) et CXCR2 (Figure 33B) et augmente l'expression de CXCR3 (Figure 33C) et CCR5 (Figure 33D) dans les MDA-MB-231. Dans les HCC70, l'expression de CCR1, CXCR2 et CXCR3 est augmentée après irradiation (Figures 33E à 33G), tandis que l'expression de CCR5 est très élevée et n'est pas modulée par l'irradiation (Figure 33H).

Cependant, ces expériences n'ont pas été répétées, notamment à cause de la forte sensibilité des HCC70 à l'irradiation et du faible pourcentage de cellules ALDH⁺ en conditions de base dans les MDA-MB-231, inférieur à 0,5%.

Ainsi, j'ai pu montrer que les radiations ionisantes modulent l'expression membranaire de certains récepteurs de chimiokines, dans les SUM159PT. L'expression de ces récepteurs reste relativement faible, excepté pour CCR5, et pourrait donc correspondre à la population capable de reprogrammation.

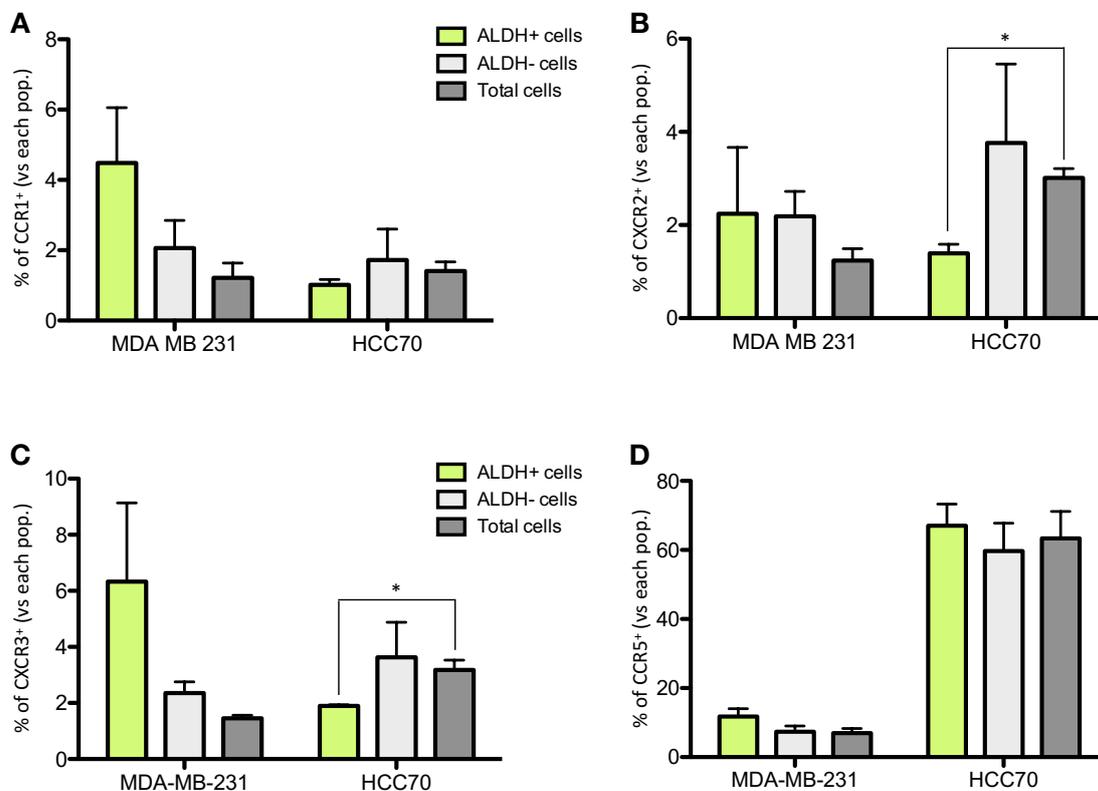


Figure 32. Expression membranaire des récepteurs de chimiokines en fonction du marqueur ALDH dans les MDA-MB-231 et HCC70.

Analyse de l'expression membranaire des récepteurs CCR1 (A), CXCR2 (B), CXCR3 (C) et CCR5 (D) dans les MDA-MB-231 et HCC70 marquées au test Aldefluor, par cytométrie de flux. Les marquages ont été effectués sur cellules non triées. La population ALDH⁻ est définie comme les 30% de cellules les plus négatives. n=3, t test, *, p<0,05.

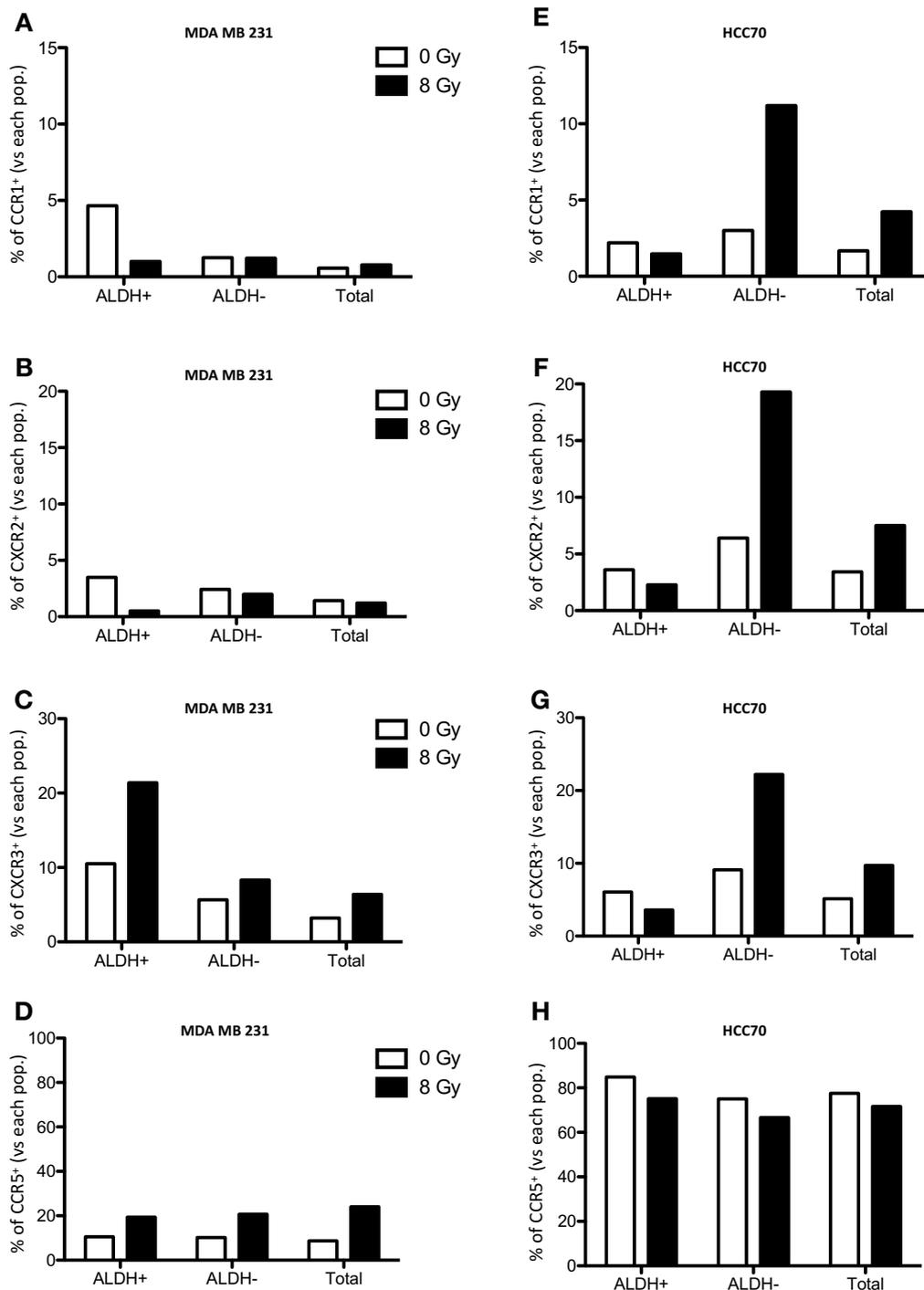


Figure 33. Expression membranaire des récepteurs de chimiokines en fonction du marqueur ALDH dans les MDA-MB-231 et HCC70 après irradiation.

Analyse de l'expression membranaire des récepteurs CCR1 (A, E), CXCR2 (B, F), CXCR3 (C, G) et CCR5 (D, H) dans les MDA-MB-231 (A à D) et HCC70 (E à H) marquées au test Aldefluor, par cytométrie de flux. Les marquages ont été effectués sur cellules non triées, irradiées (noir) ou non (blanc). La population ALDH⁻ est définie comme les 30% de cellules les plus négatives. n=1.

B. Etude de la capacité de reprogrammation selon l'expression des récepteurs CCR1, CXCR2 et CXCR3

Pour étudier l'hypothèse d'une population reprogrammable sensible aux chimiokines, j'ai vérifié la capacité de reprogrammation radio-induite dans les cellules triées ALDH⁻ CCR1⁻ CXCR2⁻ CXCR3⁻ d'une part, et dans les cellules triées ALDH⁻ CXCR2⁺ et/ou CXCR3⁺ d'autre part. Le récepteur CCR5 n'a pas été retenu pour le tri du fait de son expression élevée de base et sera étudié séparément.

L'induction de cellules ALDH⁺ est observée après irradiation, quelle que soit la population étudiée (Figure 34A). Cependant, seule la population CXCR2⁺ et/ou CXCR3⁺ présente une induction significative à 8 Gy, par rapport à la condition non irradiée (0 Gy : 0,377% \pm 0,114% ; 8 Gy : 1,667% \pm 0,108%, $p=0,0012$). La population CCR1⁻ CXCR2⁻ CXCR3⁻ présente une reprogrammation à 8 Gy (1,157% \pm 0,44%) par rapport à la condition non irradiée (0,237% \pm 0,082%), de manière non significative ($p=0,108$).

La capacité de formation de sphères des deux populations a également été analysée dans la population CCR1⁻ CXCR2⁻ CXCR3⁻ (Figure 34B) et dans la population CXCR2⁺ et/ou CXCR3⁺ (Figure 34C). On peut ainsi noter que la capacité de formation de sphères demeure assez variable. La formation de sphères est plus élevée dans les cellules non irradiées au cours des quatre générations, dans les deux populations, excepté pour la formation de sphères de la population CXCR2⁺ et/ou CXCR3⁺ en 3^{ème} génération, plus élevée à 8 Gy, mais de manière non significative (Figure 34C). Le test de formation de sphères ne permet pas de conclure quant à l'éventuelle existence d'une population reprogrammable.

Le résultat de ces analyses suggère ainsi une **tendance à l'augmentation de la reprogrammation dans la population de non-CSC exprimant les récepteurs CXCR2 et/ou CXCR3 par rapport aux non-CSC négatives pour CCR1, CXCR2 et CXCR3.**

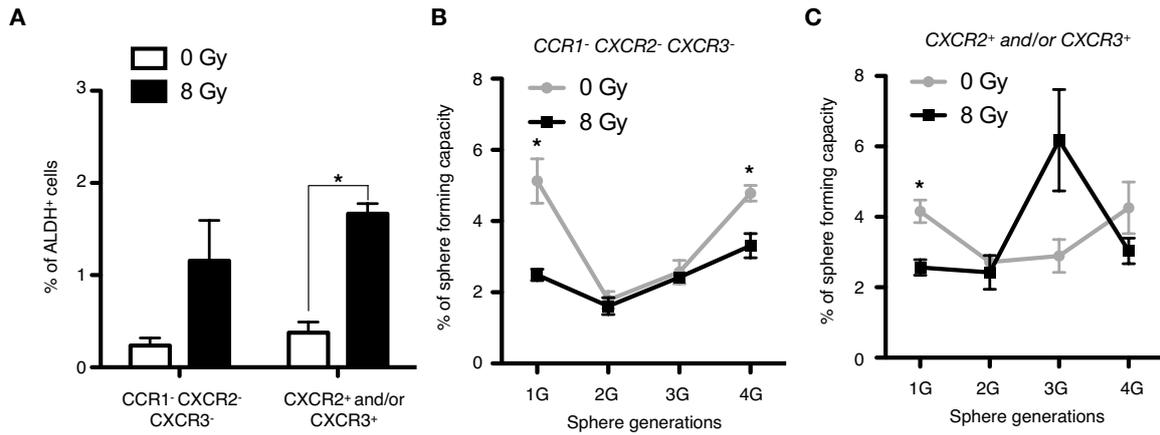


Figure 34. Etude de la capacité de reprogrammation des cellules exprimant ou non les récepteurs de chimiokines d'intérêt.

Analyse de la reprogrammation de cellules ALDH⁺ "CCR1⁻ CXCR2⁻ CXCR3⁻" ou "CXCR2⁺ et/ou CXCR3⁺" après irradiation. Après le tri, les cellules sont ensemencées, puis irradiées ou non 24 heures après ensemencement. Cinq jours plus tard, la reprogrammation est analysée par un marquage Aldefluor (A), ainsi que par un test de capacité à former des sphères (B, C). (A) Le pourcentage de cellules ALDH⁺ est représenté. $n=3$, t test, *, $p<0,05$. (B) La capacité à former des sphères de la population initialement "CCR1⁻ CXCR2⁻ CXCR3⁻" est analysée sur 4 générations. $n=4$, t test, *, $p<0,05$. (C) La capacité à former des sphères de la population initialement "CXCR2⁺ et/ou CXCR3⁺" est analysée sur 4 générations. $n=4$, t test, *, $p<0,05$.

J'ai utilisé également deux lignées SUM159PT : des cellules natives (SUM159PT WT) et des cellules surexprimant la protéine fluorescente Strawberry (SUM159PT-Stb), dans le but de pouvoir identifier deux populations distinctes. Ainsi, comme décrit en figure 35, les non-CSC ont été triées à l'aide d'un marquage Aldefluor, ainsi qu'un immunomarquage de CCR1, CXCR2 et CXCR3. J'ai collecté d'une part les SUM159PT WT ALDH⁻ CXCR2⁺ et/ou CXCR3⁺ (R⁺) et d'autre part, les SUM159PT Stb⁺ ALDH⁻ CCR1⁻ CXCR2⁻ CXCR3⁻ (R⁻).

L'expression de la protéine fluorescente Strawberry me permet ainsi de suivre les deux populations initialement différentes. Celles-ci sont mélangées à plusieurs concentrations à l'issue du tri etensemencées. Les cellules sont irradiées 24 heures après ensemencement comme précédemment décrit. La capacité de reprogrammation est ensuite étudiée, ainsi que la capacité à former des sphères sur plusieurs générations. A chaque génération, j'ai également pu suivre la proportion de cellules Stb⁺ et Stb⁻ dans les sphères formées, par cytométrie de flux. Deux mix cellulaires sont étudiés : un premier mélange est constitué de 2% des cellules Stb⁻ ALDH⁻ CXCR2⁺ et/ou CXCR3⁺ et de 98% de cellules Stb⁺ ALDH⁻ CCR1⁻ CXCR2⁻ CXCR3⁻ et représente la population initiale, avant tri. Le second mélange est formé de 50% de chacune des populations cellulaires.

La figure 36 montre l'étude de la reprogrammation dans les différents mélanges de SUM159PT. On peut ainsi observer qu'il n'y a pas de différence dans l'induction de CSC ALDH⁺, quelle que soit la proportion initiale de cellules exprimant ou non au moins un récepteur (Figure 36A). Les différentes populations tendent globalement vers une augmentation de leur capacité de formation de sphères au cours des générations, en particulier après irradiation. En l'absence d'irradiation, on observe une diminution du nombre de sphères formées après la première génération, suivie d'une augmentation (Figures 36B et 36C).

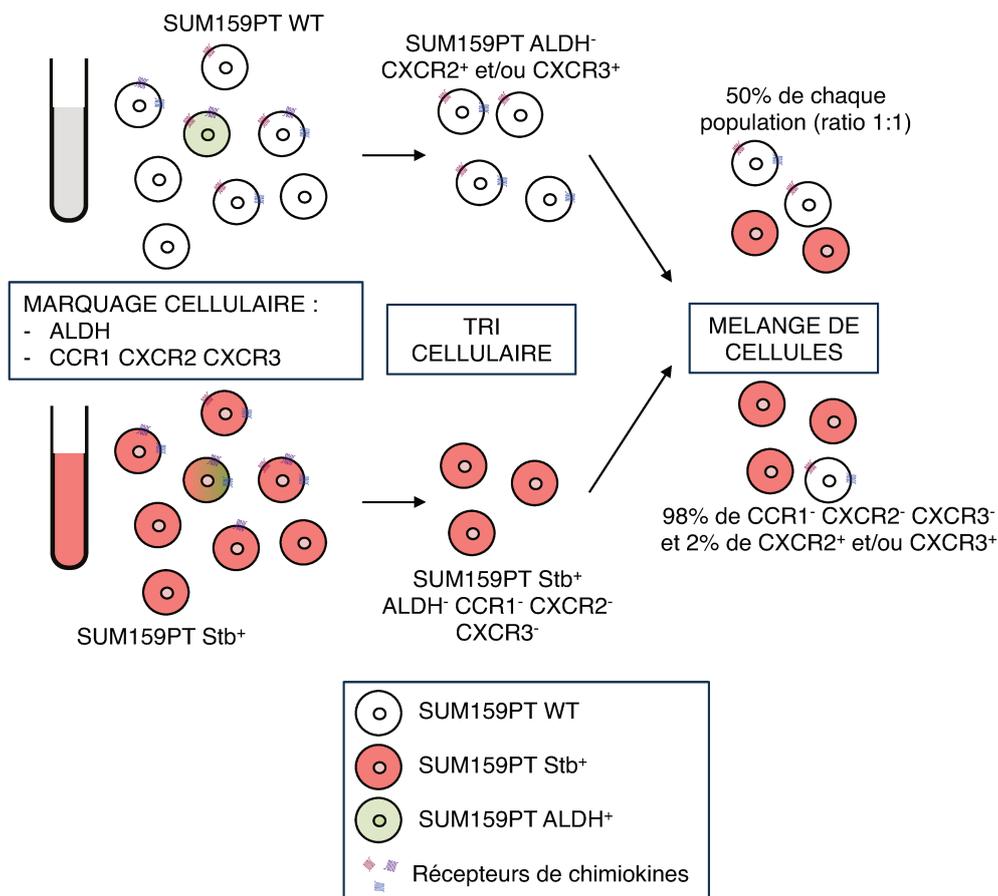


Figure 35. Protocole de tri des cellules SUM159PT WT et Stb⁺ pour l'évaluation du rôle des récepteurs de chimiokines dans la reprogrammation.

Les deux lignées ont été marquées par test Aldefluor ainsi que par immunomarquage des récepteurs CCR1, CXCR2 et CXCR3. Les SUM159PT WT ALDH⁻ CXCR2⁺ et/ou CXCR3⁺ d'une part, et les SUM159PT-Stb Stb⁺ ALDH⁻ CCR1⁻ CXCR2⁻ CXCR3⁻ d'autre part ont été récupérées après tri. Les différentes populations ont ensuite été ensemencées à différentes proportions (100%, 1 : 1 ou 98% de SUM159PT-Stb Stb⁺ ALDH⁻ CCR1⁻ CXCR2⁻ CXCR3⁻ pour 2% de SUM159PT WT ALDH⁻ CXCR2⁺ et/ou CXCR3⁺), puis irradiées 24 heures après ensemencement.

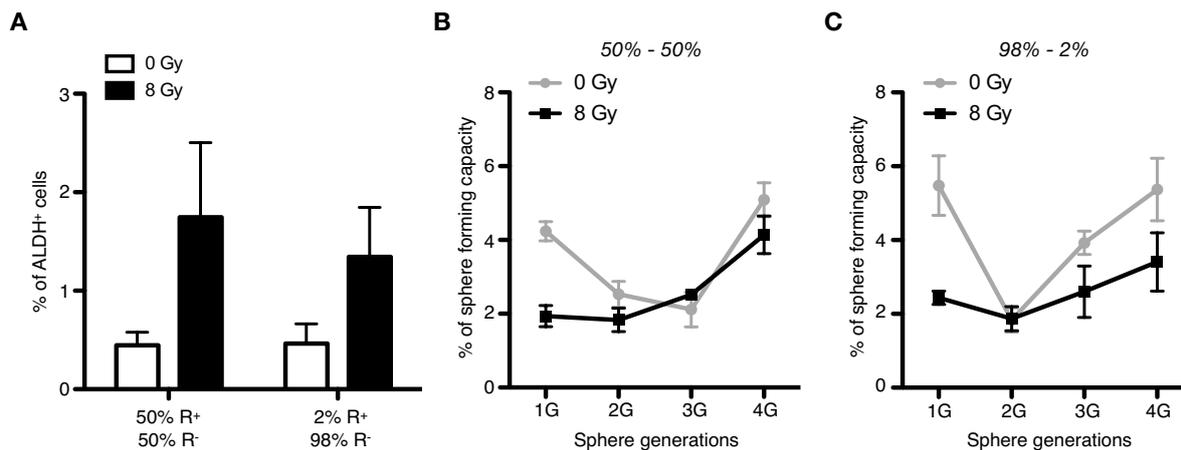


Figure 36. Etude de la capacité de reprogrammation des différents mix de populations selon l'expression des récepteurs de chimiokines CCR1, CXCR2 et CXCR3.

Analyse de la reprogrammation en fonction des différents mélanges de populations cellulaires exprimant ou non les récepteurs (R⁺ ou R⁻), après irradiation. Après le tri, les cellules sont mélangées (50% de chaque population ou 2% R⁺ et 98% R⁻),ensemencées, puis irradiées ou non 24 heures après ensemencement. Cinq jours plus tard, la reprogrammation est analysée par un marquage Aldefluor (A), ainsi que par un test de capacité à former des sphères (B, C). (A) Le pourcentage de cellules ALDH⁺ est représenté. n=3, t test. (B) La capacité à former des sphères de la population initialement "50% R⁺ - 50% R⁻" est analysée sur 4 générations. La moyenne de 4 expériences indépendantes est représentée. (C) La capacité à former des sphères de la population initialement "2% R⁺ - 98% R⁻" est analysée sur 4 générations. n=4, t test.

J'ai aussi analysé les cellules dissociées à chaque génération de sphères par cytométrie de flux. J'ai pu ainsi connaître la proportion de cellules Stb⁺ et WT dans les sphères formées (Figure 37). Dans la population constituée initialement de 50% de SUM159PT WT ALDH⁻ CXCR2⁺ et/ou CXCR3⁺ et de 50% de SUM159PT Stb⁺ ALDH⁻ CCR1⁻ CXCR2⁻ CXCR3⁻, on observe bien à la première génération de sphères environ 50% de cellules Stb⁺ et 50% de cellules WT (Figures 37A et 37B). En revanche, au cours des générations suivantes, les cellules WT (Stb⁻) deviennent majoritaires, indépendamment de l'irradiation, alors que la population de cellules Stb⁺ est progressivement diminuée (Figure 37A).

La même expérience a été réalisée à partir du mélange de 98% de SUM159PT Stb⁺ ALDH⁻ CCR1⁻ CXCR2⁻ CXCR3⁻ et de 2% de SUM159PT WT ALDH⁻ CXCR2⁺ et/ou CXCR3⁺. De la même manière, l'augmentation de la population initialement CXCR2⁺ et/ou CXCR3⁺ est observée au cours des générations de sphères, indépendamment de l'irradiation (Figure 37C). De manière intéressante, les sphères sont formées d'un mélange de cellules Stb⁺ et WT (Figures 37B et 37D). Une sphère ne résulte donc pas d'une cellule unique.

Enfin, pour contrôler que ces observations ne sont pas dues à des différences de croissance entre les lignées SUM159PT WT et SUM159PT-Stb, la croissance des cellules a été évaluée par comptage (Figure 38A). Aucune différence n'est observée quant à la croissance des deux lignées. Le mélange de 50% de chaque lignée en conditions non adhérentes a révélé qu'au bout de 3 générations, les sphères restent formées de 50% de chaque population (Figure 38B). Les différences observées ne sont pas dues à une variation entre les lignées.

Les cellules qui exprimaient au moins un récepteur au début de l'expérience semblent donc plus aptes à croître sous forme de sphères, en l'absence d'ancrage. Les récepteurs de chimiokines pourraient donc être impliqués dans le maintien des CSC.

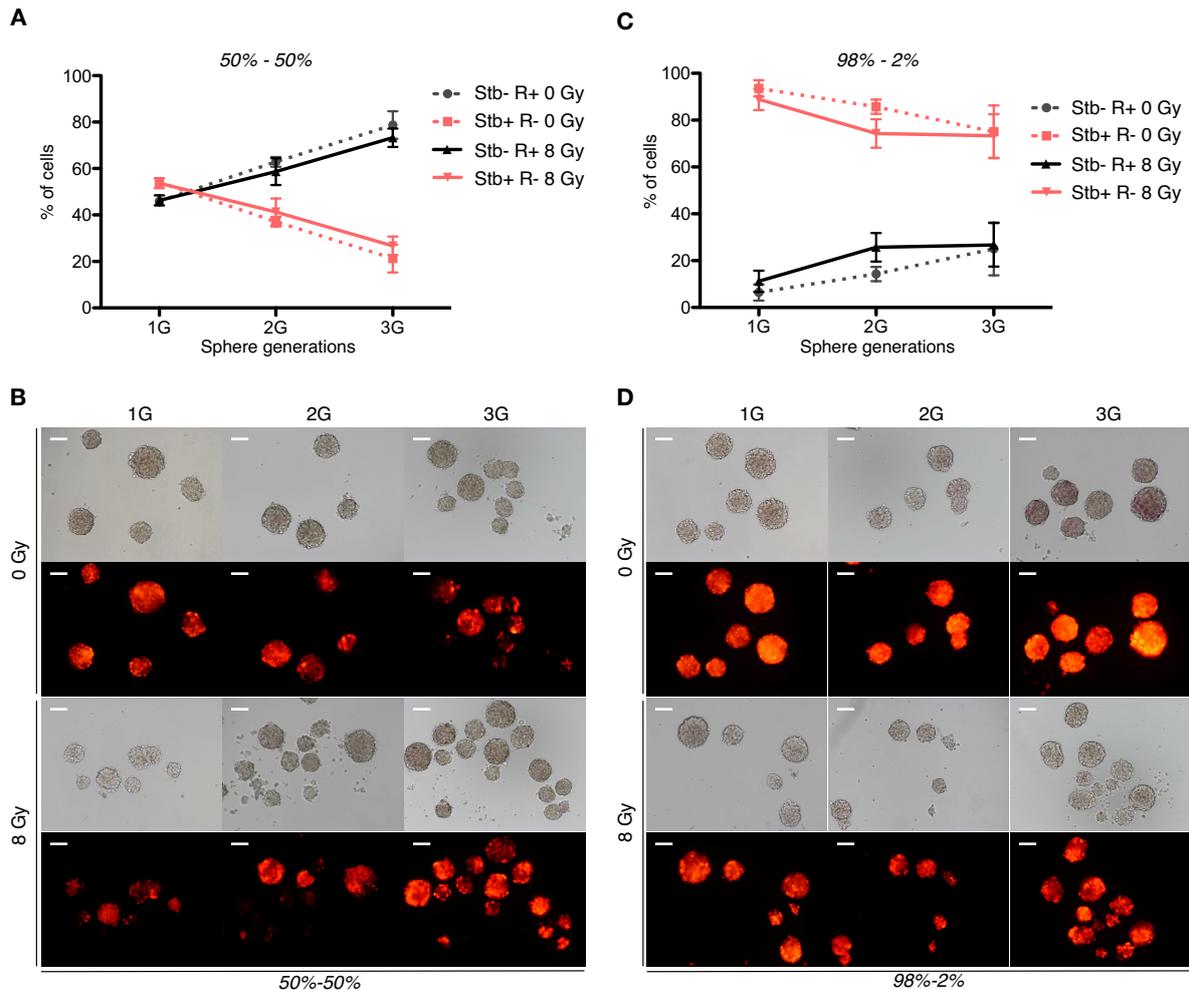


Figure 37. Suivi des cellules Stb^+ et Stb^- après irradiation dans les sphères, jusqu'à 3 générations. Cinq jours après irradiation, les deux mélanges de population Stb^+ et Stb^- sont ensemencés en conditions de sphères. La capacité de formation de sphère a été évaluée sur 3 générations. A chaque génération, les sphères ont été dissociées et analysées en cytométrie de flux afin de mesurer les proportions de chaque population (A et C). La proportion de cellules Stb^+ (initialement R^-) est représentée en rose et la proportion de cellules Stb^- (initialement R^+) est représentée en noir. Les sphères ont été également prises en photo avant dissociation, à chaque génération, à l'aide d'un microscope Nikon Eclipse Ti, grossissement 10x (B et D). La barre d'échelle représente 100 μm . $n=4$, two-way ANOVA, *, $p<0,05$.

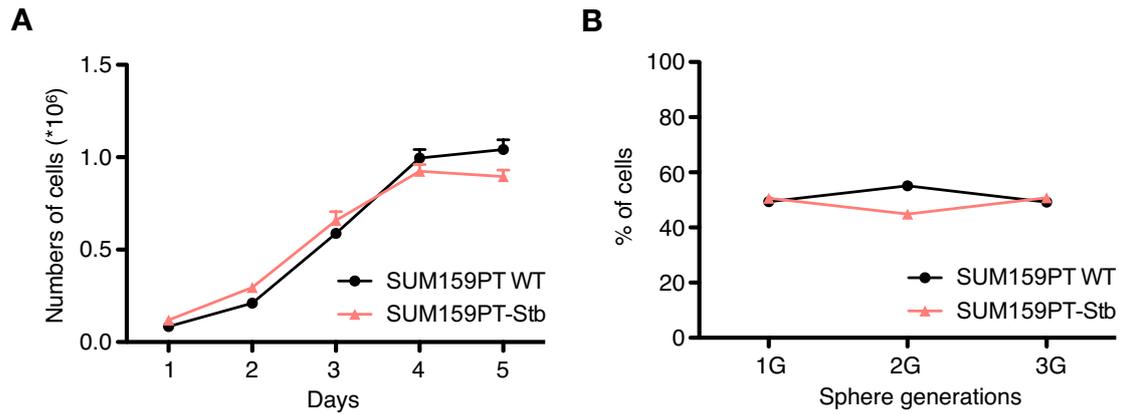


Figure 38. Contrôle de la croissance en conditions adhérentes ou non des deux lignées SUM159PT.

(A) Les deux lignées SUM159PT ont étéensemencées à la même densité en monocouche, et le nombre de cellules a été évalué chaque jour pendant 5 jours par comptage. $n=2$. (B) Les deux lignées SUM159PT ont étéensemencées en conditions non adhérentes en mélangeant 50% de chaque population. A chaque génération, les sphères ont été dissociées et le pourcentage de chaque population a été évalué par cytométrie de flux. $n=1$.

C. Etude de la cinétique d'expression des récepteurs CCR1, CXCR2 et CXCR3

Comme le montraient les figures 34 et 36, nous avons quand même observé une capacité de reprogrammation dans les cellules triées qui étaient négatives pour l'expression de CCR1, CXCR2 et CXCR3. J'ai donc analysé les effets des radiations ionisantes sur l'expression des récepteurs dans le temps, dans la population de non-CSC CCR1⁻ CXCR2⁻ CXCR3⁻ ALDH⁻.

Les SUM159PT sont triées à partir du marqueur Aldefluor et de l'expression membranaire des récepteurs CCR1, CXCR2 et CXCR3, puisensemencées pour être irradiées ou non 24 heures plus tard. L'expression des récepteurs et la reprogrammation ont ensuite été analysées tous les jours après irradiation par cytométrie de flux. J'ai ainsi pu déterminer l'évolution de l'expression des récepteurs dans les différentes populations (cellules ALDH⁻ et iCSC ALDH⁺). Seules les cellules qui n'expriment pas CCR1, CXCR2 et CXCR3 sont collectées après tri : ainsi, l'expression d'un récepteur détectée après le tri indique soit sa réexpression, soit sa relocalisation membranaire.

Les trois récepteurs sont détectables deux jours après le tri, indépendamment de l'irradiation (Figure 39). De manière intéressante, un pic d'expression de chaque récepteur, en particulier dans les iCSC ALDH⁺, se produit dès le jour suivant l'irradiation (Figures 39B, 39D, 39F). L'expression membranaire de CCR1 semble maintenue de manière prolongée après irradiation (Figure 39B), en comparaison à la condition non irradiée (Figure 39A). A l'inverse, les récepteurs CXCR2 et CXCR3 présentent une expression stable en l'absence d'irradiation, plus élevée dans la population ALDH⁺ (Figures 39C et 39E). Après irradiation, l'expression de CXCR2 diminue rapidement après le pic observé à J1 (Figure 39D). L'expression de CXCR3 diminue plus lentement après irradiation (Figure 39F).

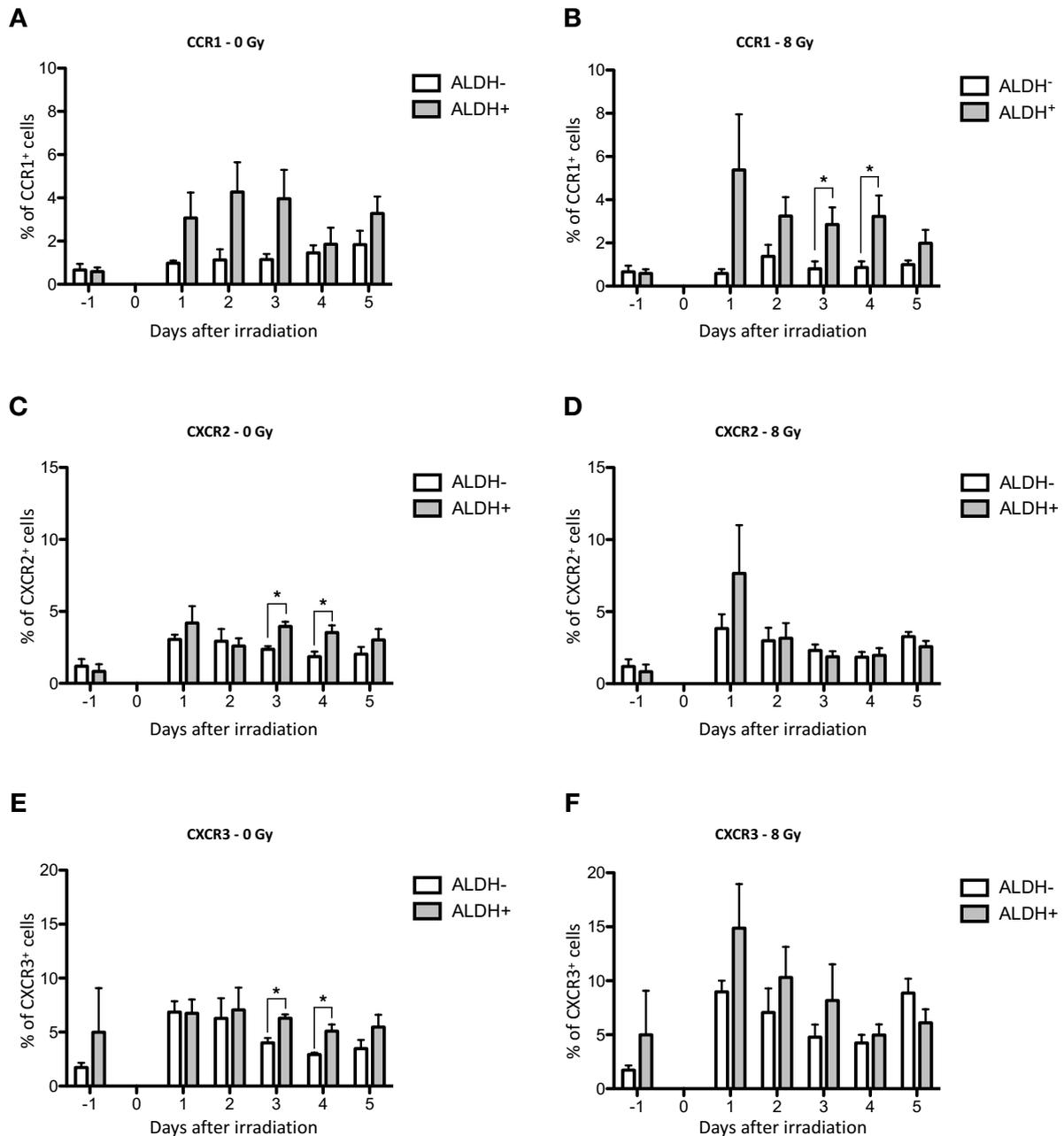


Figure 39. Evolution de l'expression membranaire de CCR1, CXCR2 et CXCR3 dans les populations ALDH⁺ et ALDH⁻, dans les cellules triées CCR1⁻ CXCR2⁻ CXCR3⁻ ALDH⁻ après irradiation.

Analyse de l'expression membranaire des récepteurs CCR1 (A, B), CXCR2 (C, D) et CXCR3 (E, F) dans les SUM159PT non-CSC triées (ALDH⁻ CCR1⁻ CXCR2⁻ CXCR3⁻) non traitées (A, C, E) ou irradiées (B, D, F). L'activité de l'ALDH ainsi que l'expression membranaire de CCR1, CXCR2 et CXCR3 sont analysées tous les jours après irradiations, par cytométrie de flux. Les cellules positives pour chaque récepteur sont représentées, soit dans la population ALDH⁻ (définie comme les 30% de cellules les plus négatives), soit dans la population ALDH⁺. n≥3, t test, *, p<0,05.

Une analyse plus détaillée des données de cette expérience m'a permis d'observer que les cellules CCR1⁻ CXCR2⁻ CXCR3⁻ conservent leur capacité de reprogrammation, comme le montre la figure 40. En l'absence d'irradiation, on observe une faible induction de CSC (courbe verte, figures 40A, 40C et 40E) autour de 0,5% de la population totale. Après irradiation, l'induction de CSC est augmentée, atteignant en moyenne 1,5% cinq jours après irradiation (Figures 40B, 40D et 40F). Alors qu'un enrichissement en cellules positives pour les récepteurs était observé principalement dans les cellules ALDH⁺ (Figure 39), on s'aperçoit que les iCSC restent majoritairement négatives pour l'expression membranaire de ces récepteurs. Ainsi, la proportion de cellules réexprimant ces récepteurs reste faible dans la population totale.

La relocalisation rapide des récepteurs à la membrane après le tri témoigne d'une plasticité importante des cellules analysées, qui pourrait expliquer que les cellules triées, initialement dépourvues de récepteurs à la membrane, conservent leur capacité de reprogrammation. De plus, le pic d'expression induit par l'irradiation pourrait constituer le premier évènement conduisant à la reprogrammation en iCSC. L'hypothèse de population reprogrammable reste valable. Cependant, la forte plasticité d'expression membranaire des récepteurs rend compliquée son identification.

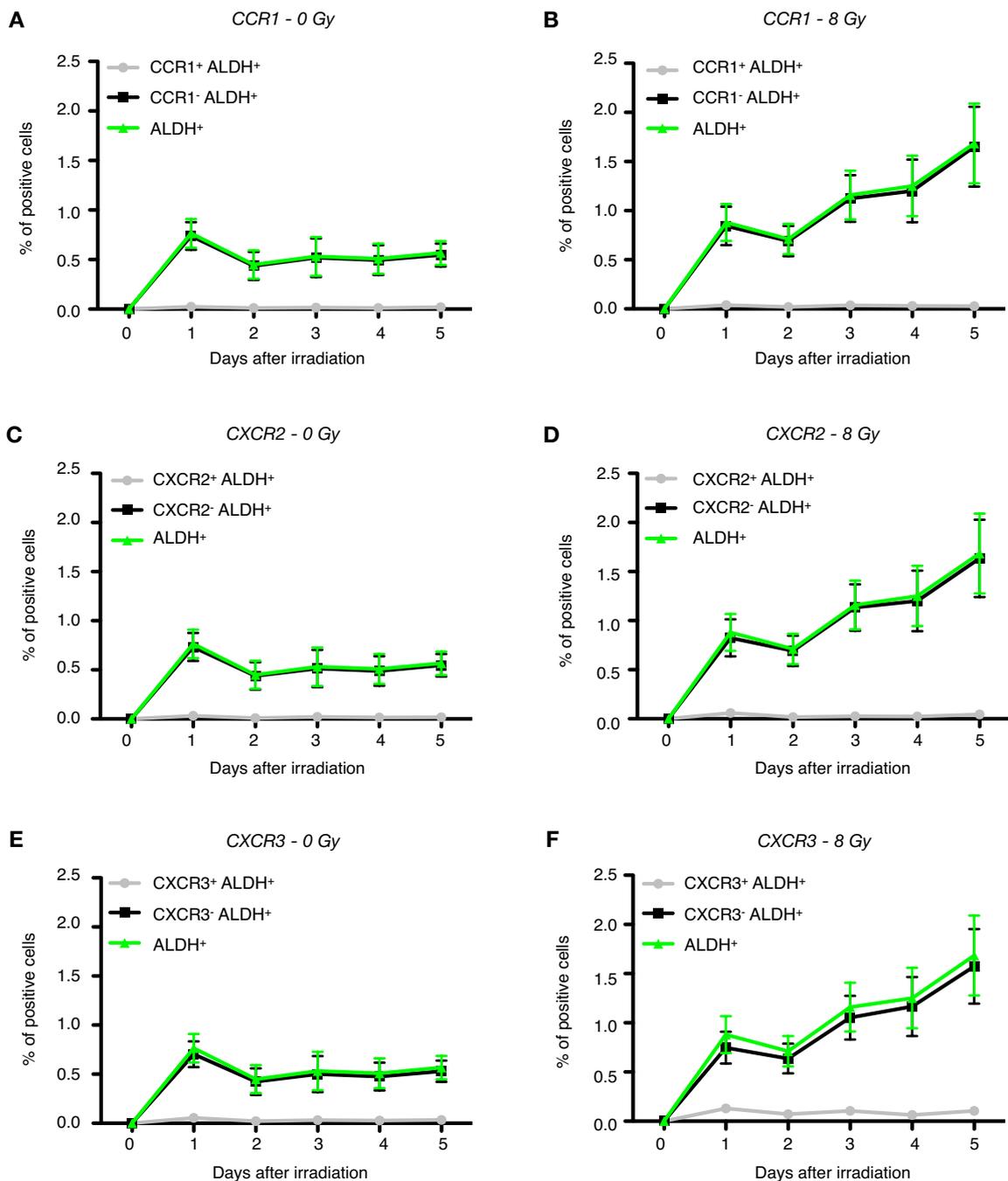


Figure 40. Evolution de l'expression membranaire de CCR1, CXCR2 et CXCR3 dans la population ALDH⁺, dans les cellules triées CCR1⁻ CXCR2⁻ CXCR3⁻ ALDH⁻ après irradiation.

Analyse de l'expression membranaire des récepteurs CCR1 (A, B), CXCR2 (C, D) et CXCR3 dans les SUM159PT non-CSC triées (ALDH⁻ CCR1⁻ CXCR2⁻ CXCR3⁻) non traitées (A, C, E) ou irradiées (B, D, F). L'activité de l'ALDH ainsi que l'expression membranaire de CCR1, CXCR2 et CXCR3 sont analysées tous les jours après irradiations, par cytométrie de flux. Les cellules positives pour chaque récepteur sont représentées, soit dans la population ALDH⁻ (définie comme les 30% de cellules les plus négatives), soit dans la population ALDH⁺. La courbe verte représente le pourcentage de cellules ALDH⁺ nouvellement induites. $n \geq 3$

D. Etude de la capacité de reprogrammation en fonction de l'expression du récepteur CCR5

Dans un second temps, je me suis tournée vers le possible rôle du récepteur CCR5 sur la reprogrammation. La proportion de cellules CCR5⁺ est plus élevée que pour les autres récepteurs et j'ai souhaité comparer la capacité de reprogrammation des cellules en fonction de l'expression du récepteur CCR5.

J'ai donc trié les SUM159PT en fonction de l'activité ALDH et de l'expression du récepteur CCR5. Ainsi, les SUM159PT ALDH⁻ CCR5⁺ et les SUM159PT ALDH⁻ CCR5⁻ ont été collectées (Figure 41A). Immédiatement après le tri, une partie des cellules a étéensemencée en conditions non adhérentes, de manière à étudier la capacité de chaque population à former des sphères. La figure 41B montre ainsi qu'il n'y a pas de variation dans la capacité à former des sphères entre les deux populations.

Les SUM159PT ALDH⁻ CCR5⁺ et les SUM159PT ALDH⁻ CCR5⁻ ont également été irradiées. L'analyse de la reprogrammation a été effectuée cinq jours plus tard. On observe ainsi une induction de cellules ALDH⁺ à 8 Gy par rapport à la condition non irradiée, dans les deux populations (Figures 41C et 41E). En revanche, l'induction de CSC est significativement plus élevée dans la population triée CCR5⁺ par rapport à la population triée CCR5⁻ (3,857% \pm 0,797% et 1,410% \pm 0,194% respectivement, $p=0,0407$).

J'ai aussi étudié l'expression de CCR5 cinq jours après l'irradiation. Les figures 41D et 41E montrent ainsi une augmentation similaire de l'expression de CCR5 après irradiation, dans les deux populations. Comme précédemment, il semble y avoir une importante plasticité dans l'expression membranaire de CCR5 : alors que deux populations distinctes ont été triées et ensemencées (CCR5⁺ et CCR5⁻), nous retrouvons un pourcentage proche du niveau de base de la population totale, indépendamment des deux conditions de départ. De plus, la figure 41E montre que la majorité des cellules ALDH⁺ sont CCR5⁻.

Enfin, j'ai étudié la capacité des cellules triées et irradiées à former des sphères (Figure 41F). A la première génération, aucune différence n'est observée quant à la capacité de formation de sphères entre les différentes populations. La diminution après irradiation est observée comme précédemment, et est due à la mortalité des cellules après irradiation.

Ces résultats confirment les résultats déjà présentés sur l'implication des récepteurs dans la reprogrammation, avec une augmentation significative de l'induction de CSC ALDH⁺ dans les cellules ALDH⁻ CCR5⁺ par rapport aux cellules ALDH⁻ CCR5⁻. CCR5 pourrait jouer un rôle plus important que les autres récepteurs et définir une population plus à même de reprogrammer.

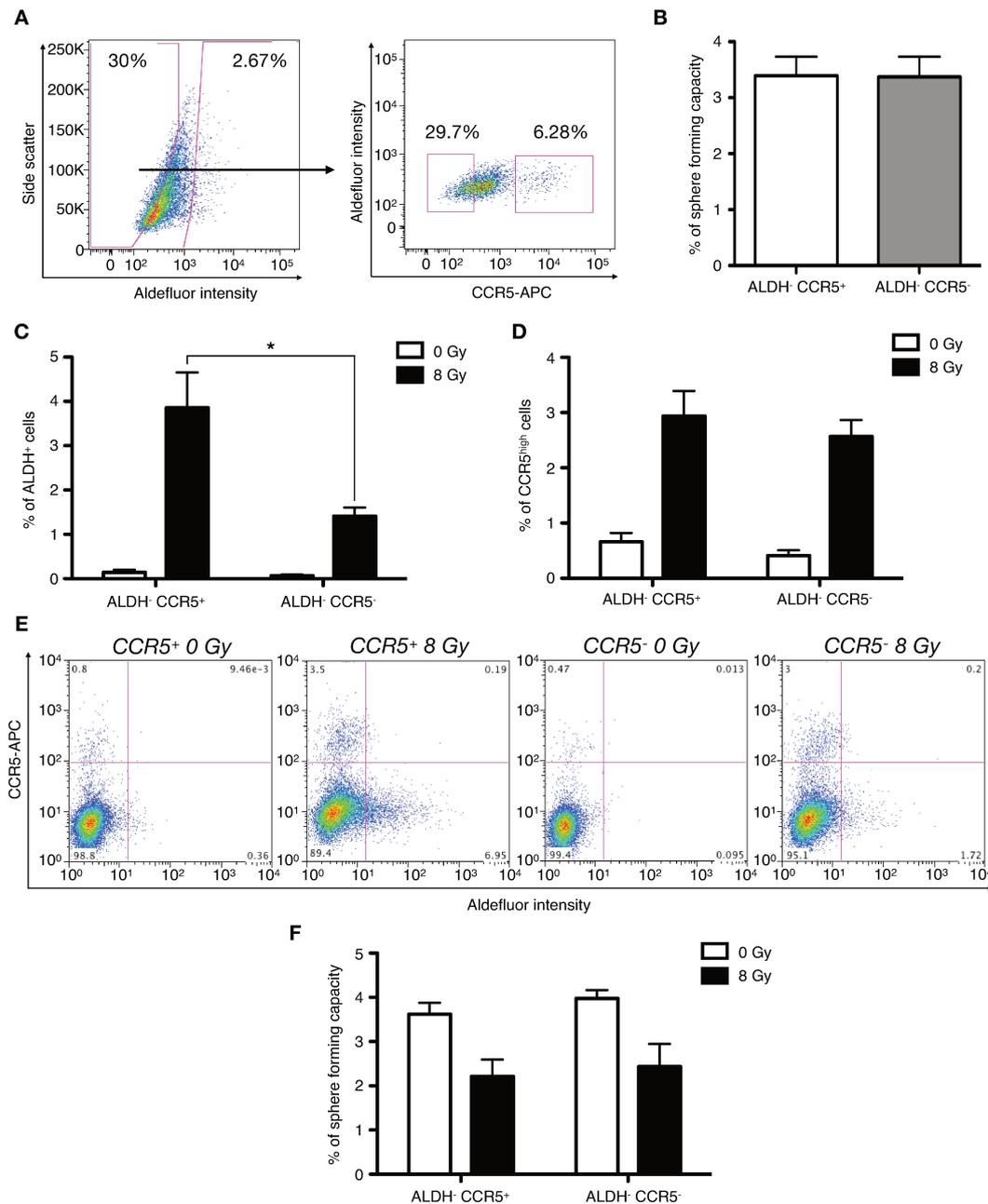


Figure 41. Etude du récepteur CCR5 dans la reprogrammation.

Les SUM159PT ont été triées selon un marquage ALDH et CCR5. Les cellules ALDH⁻ CCR5⁺ d'une part, et les cellules ALDH⁻ CCR5⁻ d'autre part ont été ensemencées, puis irradiées 24 heures plus tard. (A) Le tri est réalisé sur 30% des cellules ALDH⁻ les plus négatives parmi lesquelles sont récupérées les cellules CCR5⁻ les plus négatives (20-30%) et les cellules CCR5⁺ les plus positives (5-6%). (B) Un test de formation de sphères a été effectué sur les cellules triées, directement après le tri. n=3. (C, D, E, F) Cinq jours après irradiation, les cellules sont analysées pour leur activité ALDH en cytométrie (C, E), leur expression de CCR5 en cytométrie (D, E) et leur capacité de formation de sphères (F). (E) Les dot plots de cytométrie représentent l'expression de CCR5 (APC) en fonction de l'activité de l'ALDH (FITC). n=3, t test.

E. Etude de l'inhibition pharmacologique des récepteurs CCR1, CCR5, CXCR2 et CXCR3

Les récepteurs d'intérêt ont été inhibés à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques antagonistes de CCR1 (BX471), CCR5 (Maraviroc), CXCR2 (SB225002) et CXCR3 (AMG487), séparément ou en co-traitement (Figure 42).

Dans un premier temps, j'ai pu observer que les inhibitions seules ou conjointes n'avaient que très peu d'effet sur la reprogrammation radio-induite, en particulier sur l'induction de cellules ALDH⁺ (Figure 42A). Les inhibiteurs AMG487 et Maraviroc diminuent légèrement l'induction de cellules ALDH⁺ après irradiation, mais de manière non significative ($p=0,0978$ et $p=0,1642$ respectivement).

En revanche, on peut noter une augmentation faible mais significative de cellules ALDH⁺ en l'absence d'irradiation, après le co-traitement aux quatre inhibiteurs (DMSO 0 Gy : 0,36% \pm 0,028% ; Mix 0 Gy : 0,677% \pm 0,152%, $p=0,0097$). L'analyse de la capacité de formation de sphères sur plusieurs générations montre une tendance à la diminution de sphères formées à la quatrième génération, comme attendu, dans la condition ayant reçu le co-traitement par rapport à la condition contrôle DMSO (DMSO 0 Gy : 4,123% \pm 0,388% et Mix 0 Gy : 2,807% \pm 0,398%, $p=0,0733$; DMSO 8 Gy : 4,320% \pm 0,543% ; Mix 8 Gy : 2,752% \pm 0,325%, $p=0,054$) (Figure 42B).

En détail, les différents traitements n'ont pas d'effet à la première génération (Figure 42C), où l'on retrouve une diminution de capacité de formation de sphères après irradiation (Figures 42C et 24C). Lors des deuxième et troisième générations, peu de différences apparaissent entre les traitements, hormis une légère augmentation de la capacité de formation de sphères de troisième génération dans les conditions traitées au BX471 et au Maraviroc (Figures 42D et 42E).

Enfin, la condition traitée à l'AMG487 et la condition Mix présentent une diminution non significative de la formation de sphères, en quatrième génération, par rapport à la condition contrôle, et indépendamment de l'irradiation (Figure 42F).

L'inhibition des quatre récepteurs indique une tendance à la diminution de la capacité de reprogrammation. Cet effet reste faible et doit être confirmé.

L'ensemble de ces résultats indiquent une implication des récepteurs de chimiokines dans le maintien des caractéristiques de CSC et dans la reprogrammation de non-CSC en CSC.

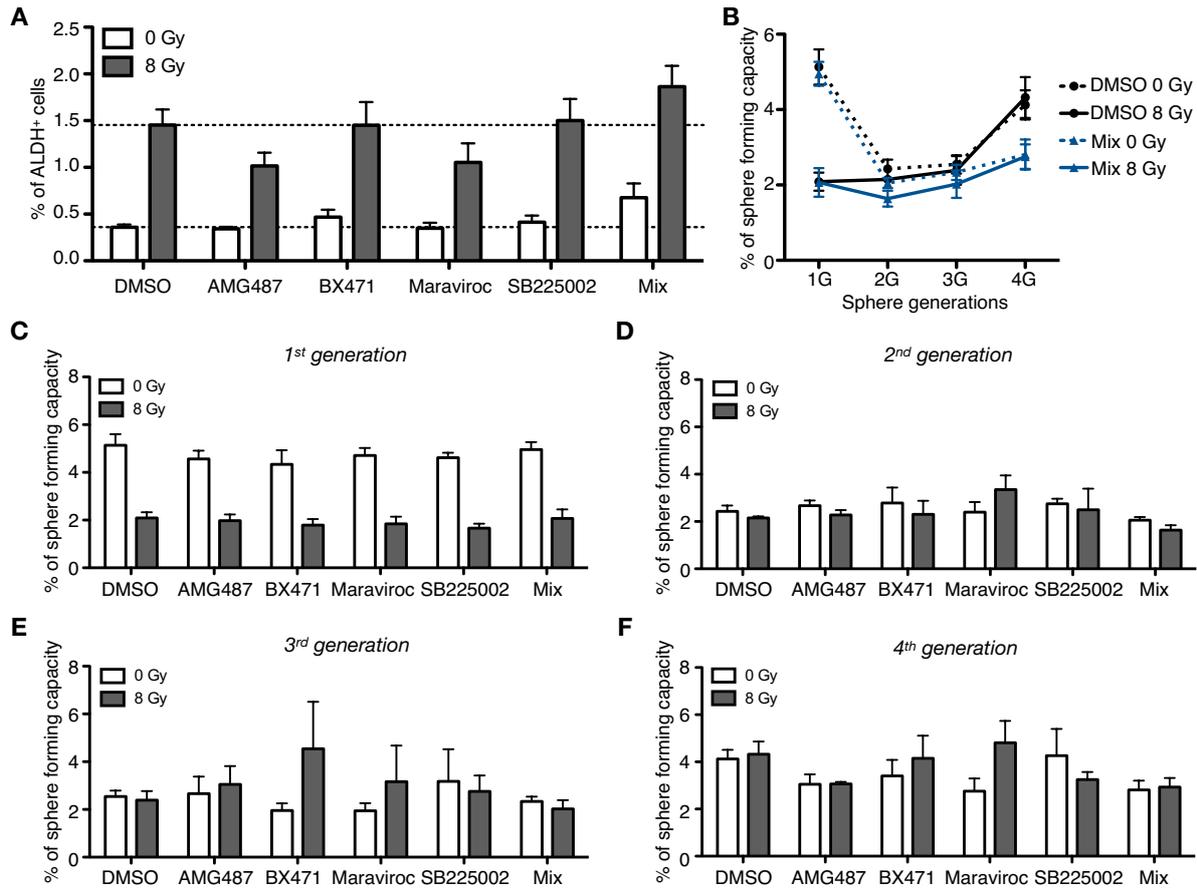


Figure 42. Effet de l'inhibition des récepteurs de chimiokines CCR1, CCR5, CXCR2 et CXCR3 sur la reprogrammation radio-induite.

Les SUM159PT ALDH⁻ triées sontensemencées, puis irradiées 24 heures plus tard. Les cellules sont aussi traitées par différents inhibiteurs pharmacologiques de CCR1 (BX471), CCR5 (Maraviroc), CXCR2 (SB225002) et CXCR3 (AMG487), à 100 nM, séparément ou en co-traitement (Mix). Un contrôle DMSO est effectué en parallèle. Cinq jours après traitements, un marquage Aldefluor est réalisé pour évaluer l'induction de CSC ALDH⁺ (A). Les cellules traitées sont égalementensemencées en condition de sphères, cinq jours après irradiation, et la capacité de formation de sphère est suivie sur 4 générations (B). En détail, un test de formation de sphère est réalisé à la première (C), à la deuxième (D), à la troisième (E) et à la quatrième génération (F). n=3, t test.

IV. Etude *in vivo* de l'effet de l'inhibition de CXCL1 et CCL5

Après avoir validé le rôle des chimiokines dans la reprogrammation *in vitro*, j'ai ensuite étudié leur implication *in vivo*. Le but était d'observer l'effet de l'inhibition de CXCL1 et CCL5 par anticorps neutralisants sur la croissance tumorale et la fréquence de CSC dans la tumeur. Afin d'établir des xénogreffes, un million de SUM159PT exprimant la luciférase ont été injectées en sous-cutané, dans les deux flancs de souris SCID, comme décrit dans la partie Matériel et Méthodes. Les souris ont ensuite été traitées aux anticorps neutralisants et/ou irradiées, comme présenté en figure 23. Les souris ont été sacrifiées à différents temps (7 jours et 14 jours après le premier traitement), et une dernière série a été conservée à long terme, et sacrifiée lorsque le score de bien-être était trop faible, en prenant également en compte le volume de la tumeur.

A. Etablissement de la lignée SUM159PT-LUC et injections en souris

J'ai dans un premier temps établi une lignée de SUM159PT exprimant de manière stable la luciférase (SUM-LUC). La lignée SUM159PT-LUC a ensuite été contrôlée et comparée à la lignée native (Figure 43). J'ai vérifié l'activité Luciférase (Figure 43A) dont j'ai pu détecter la forte activité dans les SUM159PT-LUC. De plus, celle-ci reste stable entre les différents réplicats biologiques. Les deux lignées présentent une croissance similaire (Figure 43B), de même qu'un enrichissement en cellules ALDH⁺ semblable après irradiation (Figure 43C). Ces cellules ont donc été injectées dans les souris SCID, puis la croissance tumorale a été suivie une fois par semaine, par mesure du volume tumoral et détection de la luminescence, jusqu'au début des traitements. Lorsque les tumeurs ont atteint environ 200 mm³, les souris ont reçu les premiers traitements. Ceux-ci ont été effectués en collaboration avec les équipes de vétérinaires d'OCR (*Oncovet Research*), entité rattachée à la clinique vétérinaire *Oncovet* spécialisée en oncologie animale, qui dispose d'un accélérateur linéaire de particules.

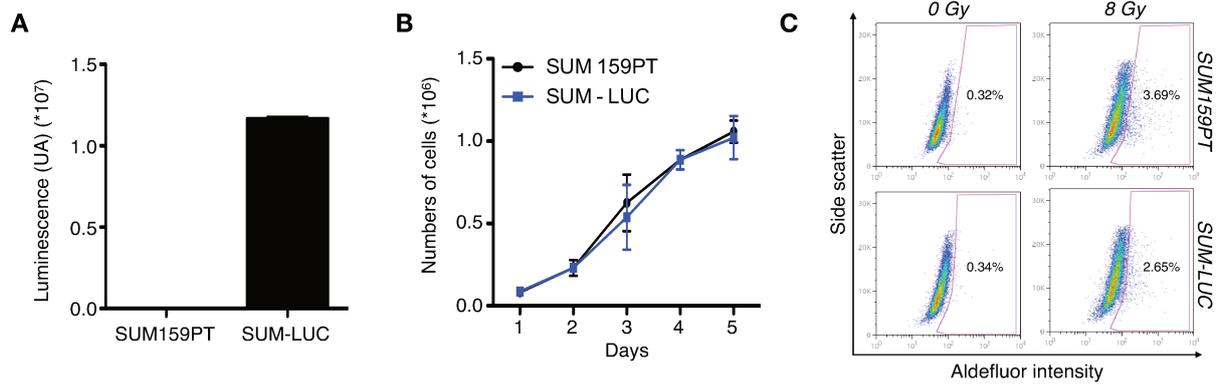


Figure 43. Contrôle des SUM159PT transfectées pGL4-Luciférase.

Les caractéristiques des cellules SUM-LUC exprimant de manière stable la luciférase sont vérifiées et comparées à celles de la lignée native. (A) La luminescence des cellules SUM159PT par rapport aux cellules SUM159PT-LUC est mesurée après ajout de Luciférine. $n=3$ (B) La croissance des cellules est estimée par comptage du nombre de cellules pendant 5 jours dans les deux lignées. $n=2$ (C) Les deux lignées ont été irradiées 24 heures après ensemencement, puis marquées à l'aide d'un test Aldefluor 5 jours plus tard. Les dot plots sont représentés et montrent l'enrichissement en cellules ALDH⁺ après irradiation.

B. Suivi du volume tumoral

Un suivi du volume tumoral a été effectué pendant et après les traitements (Figure 44). Nous avons observé peu de différences en terme de croissance tumorale entre la condition contrôle (Figure 44A), et les conditions simple-traitement antiCXCL1 et antiCCL5 (Figures 44B et 44C). Comme nous le verrons par la suite, le suivi est plus court et le volume tumoral baisse fortement après 55 jours dans la condition isotype contrôle. Ce changement brutal de volume tumoral moyen pourrait s'expliquer par une mortalité précoce des souris ayant une plus large tumeur. Il est intéressant de noter que le traitement antiCXCL1, combiné à la radiothérapie, semble empêcher la reprise tumorale, jusqu'à la fin du suivi (Figure 44B). Enfin, la figure 44D représente l'effet du co-traitement antiCXCL1 et antiCCL5. Le volume tumoral est fortement augmenté par rapport aux autres conditions, puis diminue dans la condition irradiée, dès la fin du traitement aux anticorps neutralisants. Alors que dans la condition contrôle, la régression tumorale observée était due à la mortalité des souris, ici les souris ont survécu plus longtemps, avec des tumeurs initialement plus grosses. De plus, le co-traitement antiCXCL1 et antiCCL5 combiné à la radiothérapie semble également empêcher la reprise de la tumeur jusqu'à la fin du suivi (Figure 44D).

J'ai également réalisé le suivi des tumeurs grâce à la détection de l'activité luciférase chaque semaine. Ainsi, la figure 45A montre une photo d'une souris par groupe avant traitement, et la dernière photo de cette même souris après traitement, avant sacrifice. Ces photos sont représentatives de chaque groupe. On peut noter une diminution du signal détectable à 0 Gy, lorsque les souris sont traitées avec l'anticorps antiCCL5 ou la combinaison des deux anticorps neutralisants (Figure 45B). On peut observer que le signal diminue également dans la condition Isotypes (Figure 45B).

Après irradiation, une perte d'activité luciférase est observée, et plus particulièrement dans les tumeurs traitées avec les deux anticorps, ainsi que dans la condition Isotypes (Figure 45C). Les photos montrent cependant qu'il reste une activité luciférase dans les souris contrôles, par comparaison aux souris du groupe antiCXCL1 + antiCCL5 (Figure 45A). La diminution ou la perte du signal malgré la présence d'une tumeur pourrait être due à l'apparition de zones nécrotiques dans la tumeur.

L'effet de l'inhibition de CXCL1 et CCL5 sur la croissance tumorale reste peu concluant, mais la reprise tumorale semble tout de même limitée en cas d'inhibition de CXCL1 combinée à la radiothérapie.

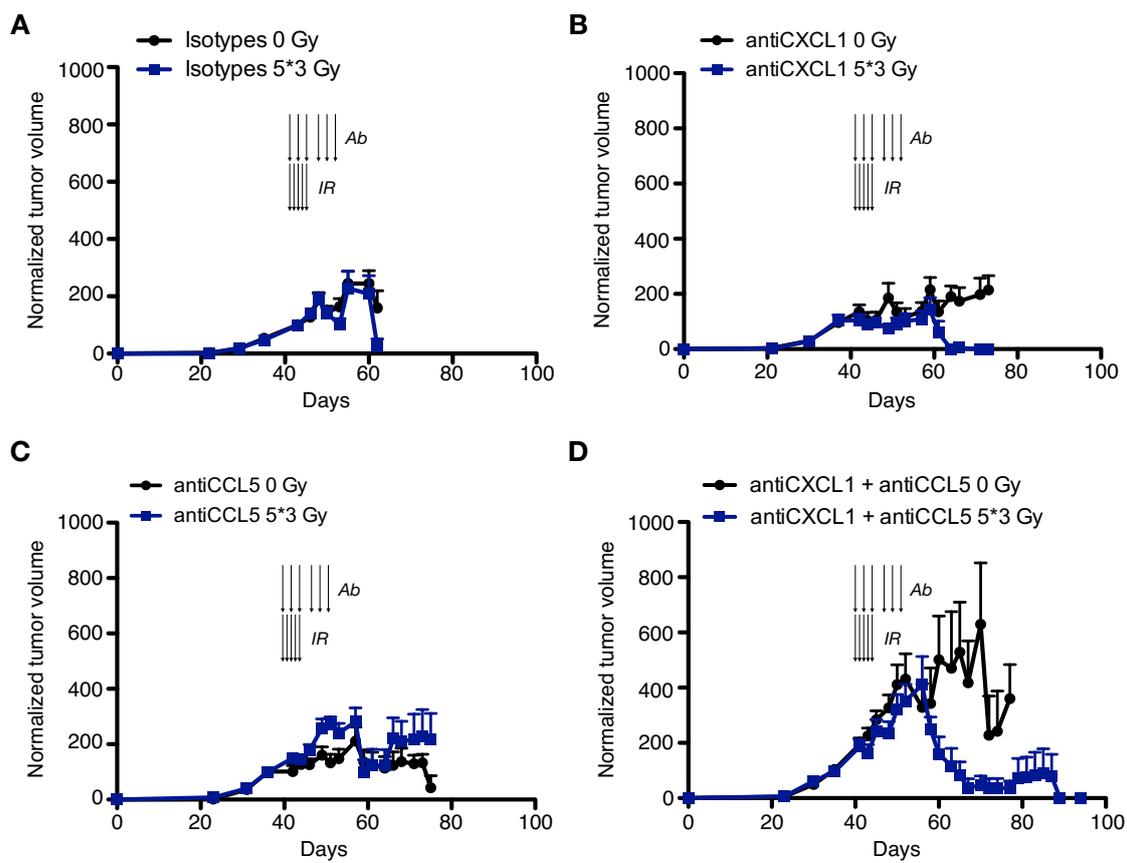


Figure 44. Evolution du volume tumoral dans les différents groupes de souris traitées.

Le volume tumoral a été déterminé une fois par semaine pour chaque souris. La moyenne a été calculée et normalisée par rapport au premier jour de traitement (J40, 100%) pour chaque groupe de traitement : isotypes (A), antiCXCL1 (B), antiCCL5 (C) et antiCXCL1 + antiCCL5 (D). $n=6$ souris par groupe.

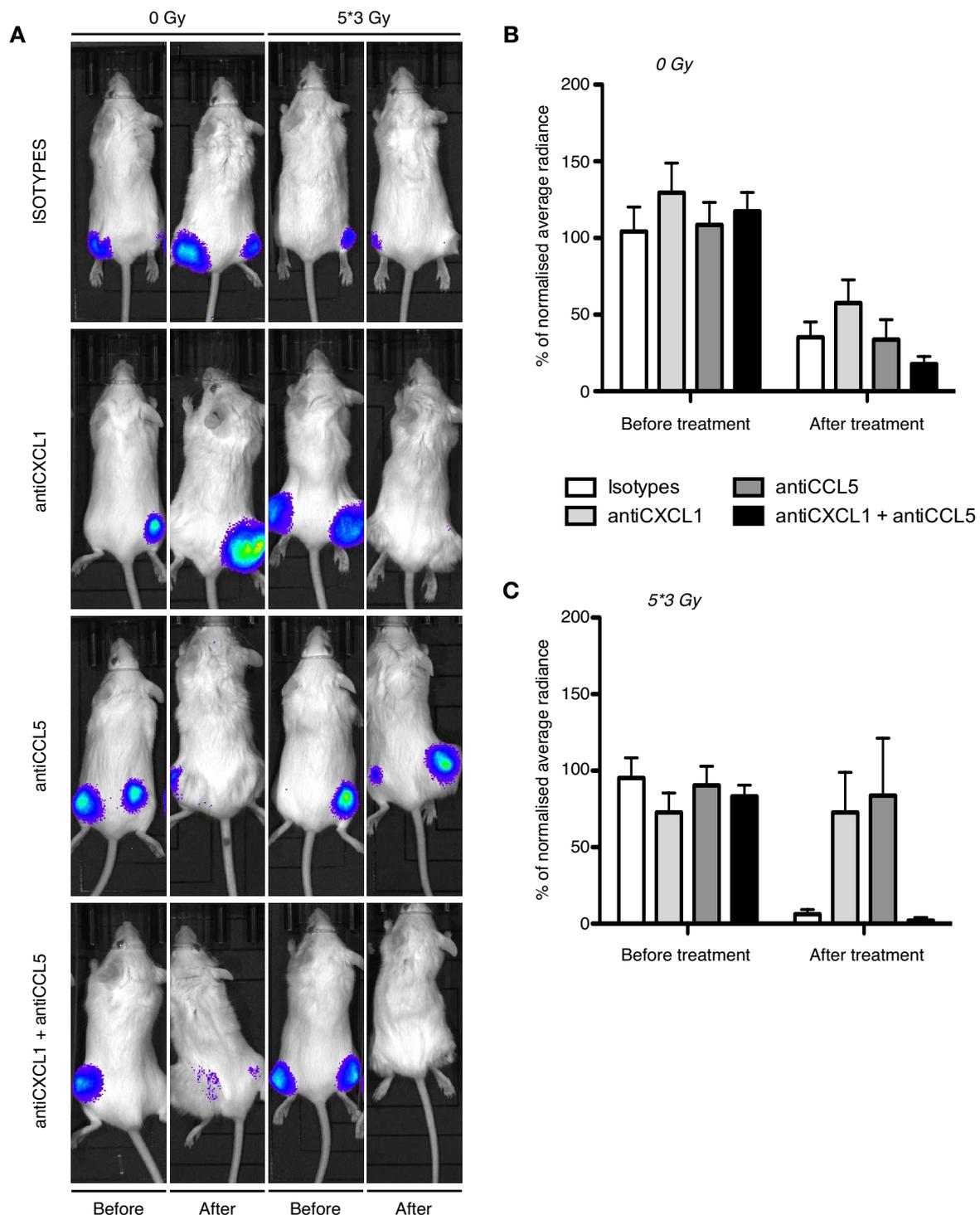


Figure 45. Suivi de l'activité luciférase dans les xénogreffes avant et après traitements.

Chaque semaine à partir de l'injection, une photo des souris a été prise à l'aide de l'IVIS Lumina LT, 10 minutes après l'injection de D-Luciférine dans les souris. (A) Des photos des souris prises avant traitement ("Before", photos de gauche dans chaque colonne) et après traitement, avant le sacrifice ("After", photos de droite dans chaque colonne) sont présentées, pour chaque groupe de traitement (un groupe par ligne) et à chaque dose d'irradiation (présentées en deux colonnes). (B, C) L'activité de la luciférase a été mesurée à l'aide du logiciel Living Image, avant traitement (J-3) et après traitement (J+17), à 0 Gy (B) et à 5*3 Gy (C). La radiance moyenne a été normalisée par rapport au premier jour de traitement, rapporté à 100%. n=6 souris par groupe.

C. Evaluation de la survie et du bien-être des souris

La survie des souris en fonction des différents traitements a été évaluée (Figure 46). En l'absence d'irradiation, la survie des souris est significativement augmentée dans les conditions traitées aux anticorps neutralisants par rapport à la condition Isotypes, avec une médiane de survie à 17 jours pour les souris ayant reçu les isotypes, 29 jours pour le groupe "antiCXCL1", 35 jours pour le groupe "antiCCL5" et 32,5 jours pour les souris traitées aux deux anticorps (log-rank (Mantel-Cox), $p=0,0031$) (Figure 46A).

Le même effet est observé chez les souris irradiées, dont les médianes de survie sont de 19,5 jours, 31,5 jours, 35 jours et 36 jours pour les groupes "isotypes", "antiCXCL1", "antiCCL5" et "antiCXCL1+antiCCL5" respectivement (log-rank (Mantel-Cox), $p=0,0028$) (Figure 46B). De manière intéressante, on peut observer une augmentation de la survie lorsque les souris reçoivent à la fois la radiothérapie et le co-traitement antiCXCL1 et antiCCL5.

Certains paramètres relatifs au bien-être des souris ont également été suivis, tels que leur poids et l'activité de la souris. On peut ainsi noter une baisse de poids (jusque 4 g en 20 jours), qui semble plus rapide avec les traitements antiCCL5 seul et antiCXCL1 + antiCCL5 (Figure 47). En revanche, le poids des souris augmente de nouveau après la fin des traitements dans ces deux conditions, alors qu'il reste faible avec les traitements isotypes et antiCXCL1 seul (Figure 47A). Dans les conditions irradiées, la perte de poids est nettement plus rapide (perte de 4 g en moins de 10 jours) pour toutes les conditions, sauf le traitement antiCCL5, qui diminue plus tardivement. En revanche, seules les conditions de traitement antiCXCL1 et antiCXCL1 + antiCCL5 entraînent une stabilisation voire une augmentation du poids (Figure 47B).

Le co-traitement antiCXCL1 et antiCCL5 combiné à la radiothérapie entraîne un réel gain de survie par rapport au traitement aux anticorps isotypiques contrôles.

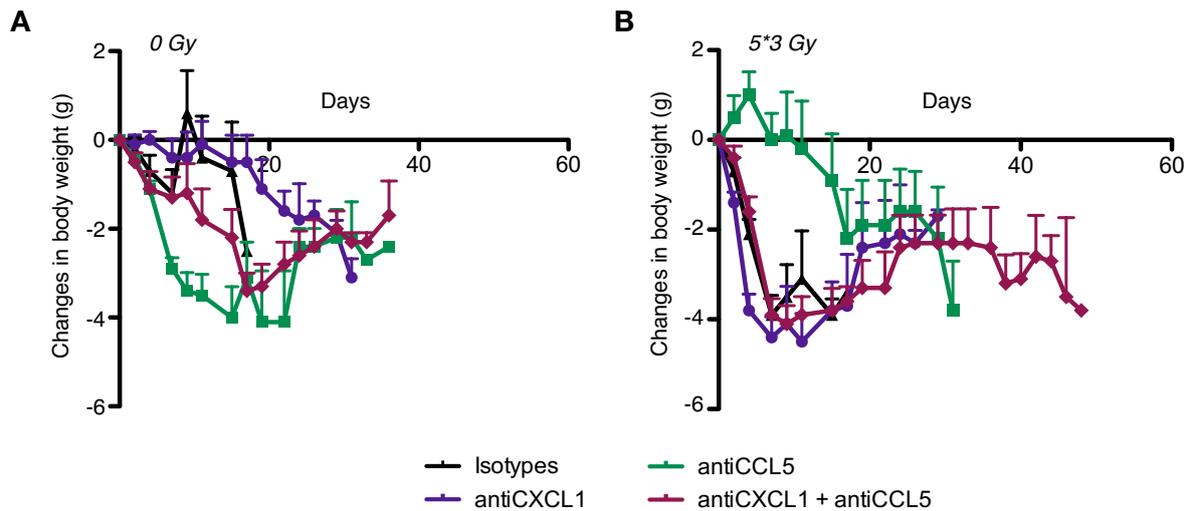


Figure 46. Effet de l'inhibition de CXCL1 et/ou CCL5 sur la survie des souris xéno greffées.

La survie des souris a été évaluée à long terme après les différents traitements. Le jour 0 correspond au premier jour de traitement. $n = 6$ souris. Les médianes de survie sont de 17 jours, 29 jours, 35 jours et 32,5 jours à 0 Gy (Log-rank (Mantel-Cox), $p=0,0031$) (A), et de 19,5 jours, 31,5 jours, 35 jours et 36 jours à 5*3 Gy (Log-rank (Mantel-Cox), $p=0,0028$) (B), dans les groupes "isotypes", "antiCXCL1", "antiCCL5" et antiCXCL1+antiCCL5" respectivement.

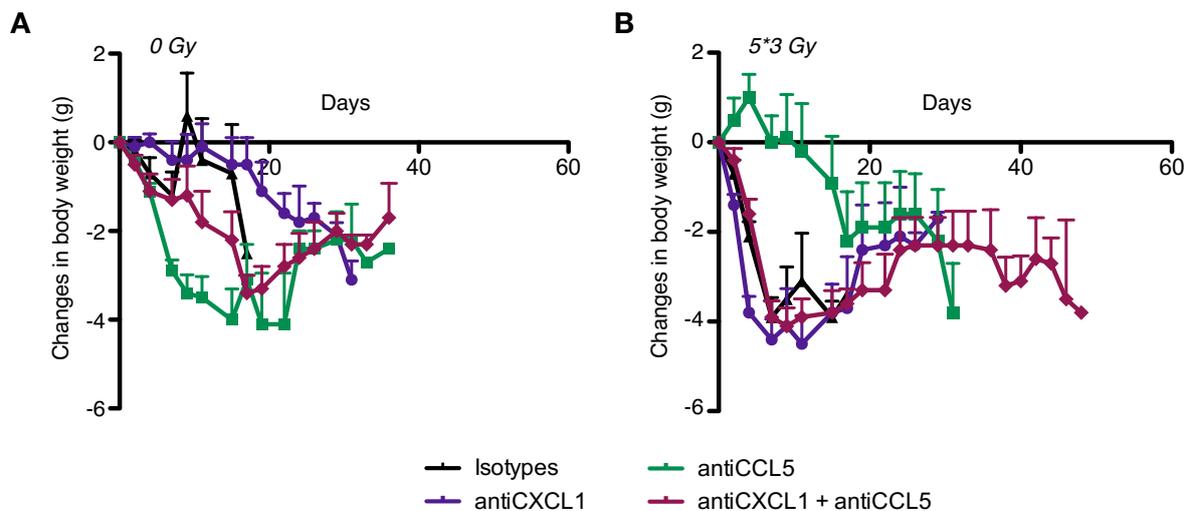


Figure 47. Effet de l'inhibition de CXCL1 et/ou CCL5 sur le poids des souris xéno greffées.

Les souris ont été pesées de manière hebdomadaire, dès le début du traitement (jour 0). Le poids de départ (au début du traitement) est soustrait à chaque nouvelle mesure, ce qui permet de représenter l'évolution du poids pendant et après les traitements, à 0 Gy (A) et à 5*3 Gy (B).

D. Etude de l'enrichissement en CSC dans les xénogreffes

J'ai aussi étudié l'impact de l'inhibition de CXCL1 et CCL5 sur la proportion de CSC dans les tumeurs, en fonction des différents traitements. Cette analyse a été effectuée 7 jours après le premier traitement : les souris avaient donc reçu la totalité du traitement de radiothérapie, et la moitié des injections d'anticorps ; et 14 jours après le premier traitement, soit dans des souris ayant reçu la totalité des traitements.

La figure 48 montre tout d'abord que l'enrichissement en CSC attendu après irradiation n'est pas détecté à J7, hormis dans la condition antiCXCL1 + antiCCL5 dont l'augmentation n'est cependant pas significative (0 Gy : 2,273% \pm 1,135% ; 5*3 Gy : 3,292% \pm 1,336%, $p=0,568$) (Figure 48D). En effet, la proportion de CSC ALDH⁺ reste stable entre 0 et 5*3 Gy, dans les conditions isotypes (Figure 48A), antiCXCL1 (Figure 48B) et antiCCL5 (Figure 48C). De manière intéressante, à 14 jours, on observe une diminution significative de la proportion de CSC ALDH⁺ dans les conditions isotypes (0 Gy : 1,218% \pm 0,312% ; 5*3 Gy : 0,223% \pm 0,091%, $p=0,025$) (Figure 48E) et antiCXCL1 + antiCCL5 (0 Gy : 1,328% \pm 0,214% ; 5*3 Gy : 0,28% \pm 0,074%, $p<0,0001$) (Figure 48H), alors qu'il n'y a pas de différence observée dans les simples traitements (Figures 48F et 48G). Cette diminution observée dans la condition traitée aux anticorps isotypiques est étonnante. Néanmoins, seul le co-traitement antiCXCL1 + antiCCL5 induit une diminution importante et significative de la proportion de CSC ALDH⁺ après irradiation entre le temps J7 et le temps J14 (Figures 48D et 48H).

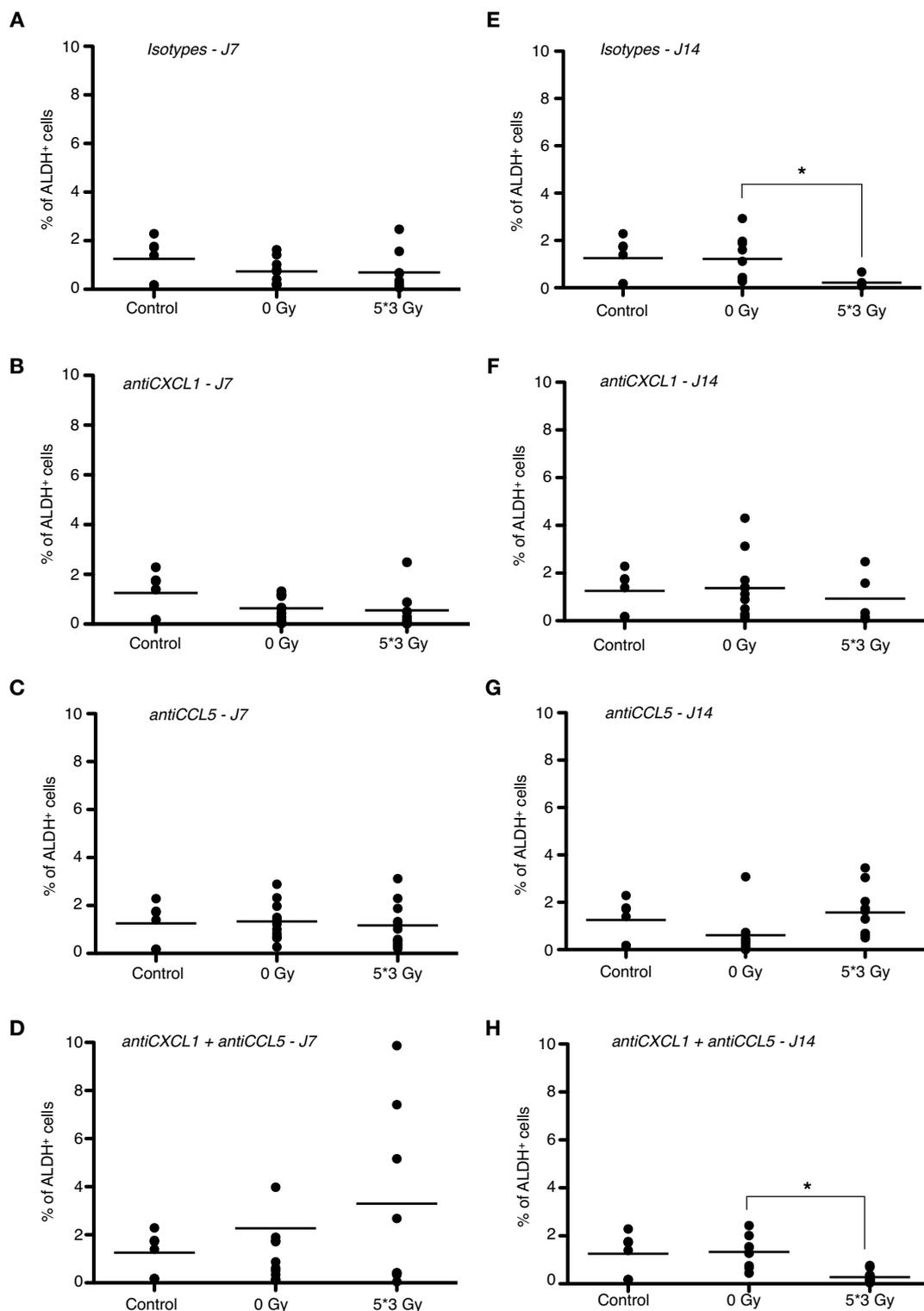


Figure 48. Proportion de CSC ALDH⁺ dans les xénogreffes, 7 et 14 jours après le début des traitements.

Une partie des souris xénogreffées a été sacrifiée soit à 7 jours (A, B, C, D), soit à 14 jours (E, F, G, H) après le premier traitement, et les tumeurs ont été récupérées puis dissociées. Les cellules ont été marquées à l'aide du kit Aldefluor et la proportion de cellules ALDH⁺ a été évaluée par cytométrie de flux dans les 4 groupes de traitements : isotypes (A, E), antiCXCL1 (B, F), antiCCL5 (C, G) et antiCXCL1 + antiCCL5 (D, H). Les souris contrôles (control) constituent un groupe sacrifié avant tout traitement. n=6 souris par groupe, t test, *p<0,03.

Je me suis également intéressée à l'expression d'autres marqueurs de CSC, tels que les facteurs associés à la pluripotence OCT4, SOX2 et NANOG. J'ai d'abord réalisé une analyse par cytométrie de flux. Après sacrifices des souris, les xénogreffes ont été dissociées puis les cellules isolées ont été fixées. Après perméabilisation, les cellules ont été marquées à l'aide d'anticorps couplés ciblant OCT4, SOX2 et NANOG (Figure 49). De manière à visualiser facilement les résultats, j'ai calculé les ratios de cellules positives entre 5*3 Gy et 0 Gy. Ces ratios ont ensuite été centrés autour de 0. Ainsi, une valeur inférieure à 0 correspond à une diminution du pourcentage de cellules positives à 5*3 Gy, et inversement, une valeur supérieure à 0 correspond à une augmentation du pourcentage de cellules positives à 5*3 Gy. Les analyses ont été effectuées 7 jours et 14 jours après le premier traitement. La significativité indiquée ci-après correspond pour chaque condition à la comparaison entre 0 Gy et 5*3 Gy.

Ainsi, la figure 49 montre une augmentation du pourcentage de cellules OCT4⁺, SOX2⁺ et NANOG⁺ dans la condition contrôle (Isotypes) après irradiation, à J7, avec un ratio positif pour les OCT4, SOX2 et NANOG (Figures 49A, 49C et 49E). De manière intéressante, les traitements simples antiCXCL1 et antiCCL5 ainsi que le co-traitement sont responsables d'une diminution du pourcentage de cellules OCT4⁺, SOX2⁺ et NANOG⁺ à 5*3 Gy, avec des ratios négatifs pour chaque condition. Mais ces diminutions sont non significatives (Figures 49A, 49C et 49E).

A 14 jours, les résultats diffèrent et montrent une augmentation de cellules OCT4⁺ et SOX2⁺ dans la condition contrôle (isotypes) après irradiation, de manière significative ($p=0,0115$) (Figures 49B et 49D), et une diminution non significative de cellules NANOG⁺ à 5*3 Gy ($p=0,456$) (Figure 49F). Concernant la proportion de cellules OCT4⁺, les traitements semblent avoir peu d'effet, puisque l'on observe toujours un ratio supérieur à 1 après irradiation, à l'exception du traitement antiCCL5 seul (Figure 49B). Les traitements antiCCL5 et antiCXCL1 + antiCCL5 entraînent une

diminution non significative du pourcentage de cellules SOX2⁺ après irradiation ($p=0.649$ et $p=0,207$ respectivement) (Figure 49D). Enfin, le co-traitement semble induire une augmentation non significative de la proportion de cellules NANOG⁺ après irradiation ($p=0,26$), alors que l'antiCCL5 seul induit une diminution non significative ($p=0,303$) (Figure 49F).

J'ai enfin analysé l'expression de *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* et *ALDH1A1* dans les xénogreffes, par qPCR (Figure 50). Parmi les quatre gènes étudiés, seul *ALDH1A1* présente une augmentation après irradiation, dans la condition Isotypes, 14 jours après le premier traitement, soit 7 jours après la fin de la radiothérapie (Figure 50H) alors qu'il n'y a pas d'augmentation à 7 jours (Figure 50G). Concernant les autres gènes, il n'y a pas ou peu de différence dans la condition contrôle (Figures 50A, 50C, 50D et 50E), et l'expression de *NANOG* et *OCT4* diminue après irradiation, 14 jours après le début du traitement (*OCT4* : $p=0,0308$; *NANOG* : $p=0,1164$) (Figures 50B et 50F). Il n'est donc pas possible de voir un éventuel effet des traitements sur l'expression de ces gènes associés aux CSC, hormis *ALDH1A1*. Ainsi, les traitements antiCCL5 et antiCXCL1 + antiCCL5 entraînent une diminution de l'expression du gène *ALDH1A1* par rapport à la condition contrôle Isotypes, après irradiation ($p=0,0155$ et $p=0,0003$ respectivement) (Figure 50H).

Ces résultats suggère que les traitements simples mais surtout le traitement combiné induisent une diminution de l'enrichissement en CSC après irradiation. Cependant, ces tendances devront être validées par une augmentation de la cohorte de souris dans les différents groupes.

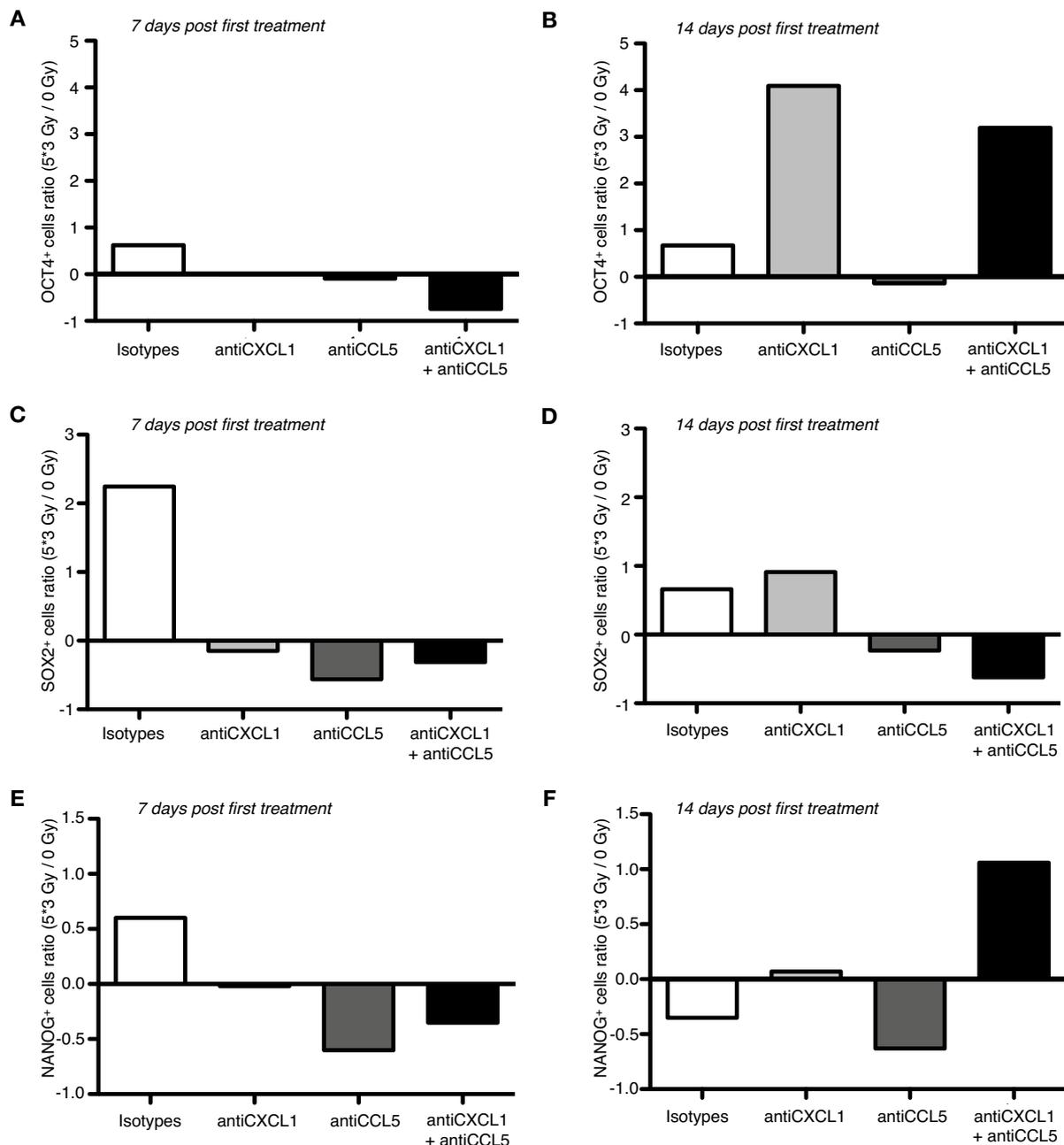


Figure 49. Proportion de cellules OCT4+, SOX2+ et NANOG+ dans les xénogreffes, 7 et 14 jours après le début des traitements.

Une partie des souris xénogreffées a été sacrifiée soit à 7 jours (A, C, E), soit à 14 jours (B, D, F) après le premier traitement, et les tumeurs ont été récupérées puis dissociées. Les cellules ont été fixées, perméabilisées puis immunomarquées avec des anticorps couplés ciblant OCT4 (A, B), SOX2 (C, D) et NANOG (E, F). Les cellules ont été analysées par cytométrie de flux dans les 4 groupes de traitements : isotypes, antiCXCL1, antiCCL5 et antiCXCL1 + antiCCL5. Les histogrammes représentent les ratios de la moyenne de cellules positives à 5*3 Gy sur la moyenne de cellules positives à 0 Gy, pour chaque groupe de traitement. Les valeurs ont été ensuite centrées sur 0. Une valeur inférieure à 0 correspond ainsi à une diminution du pourcentage de cellules positives dans un groupe de traitement donné. n=6 souris par groupe, t test.

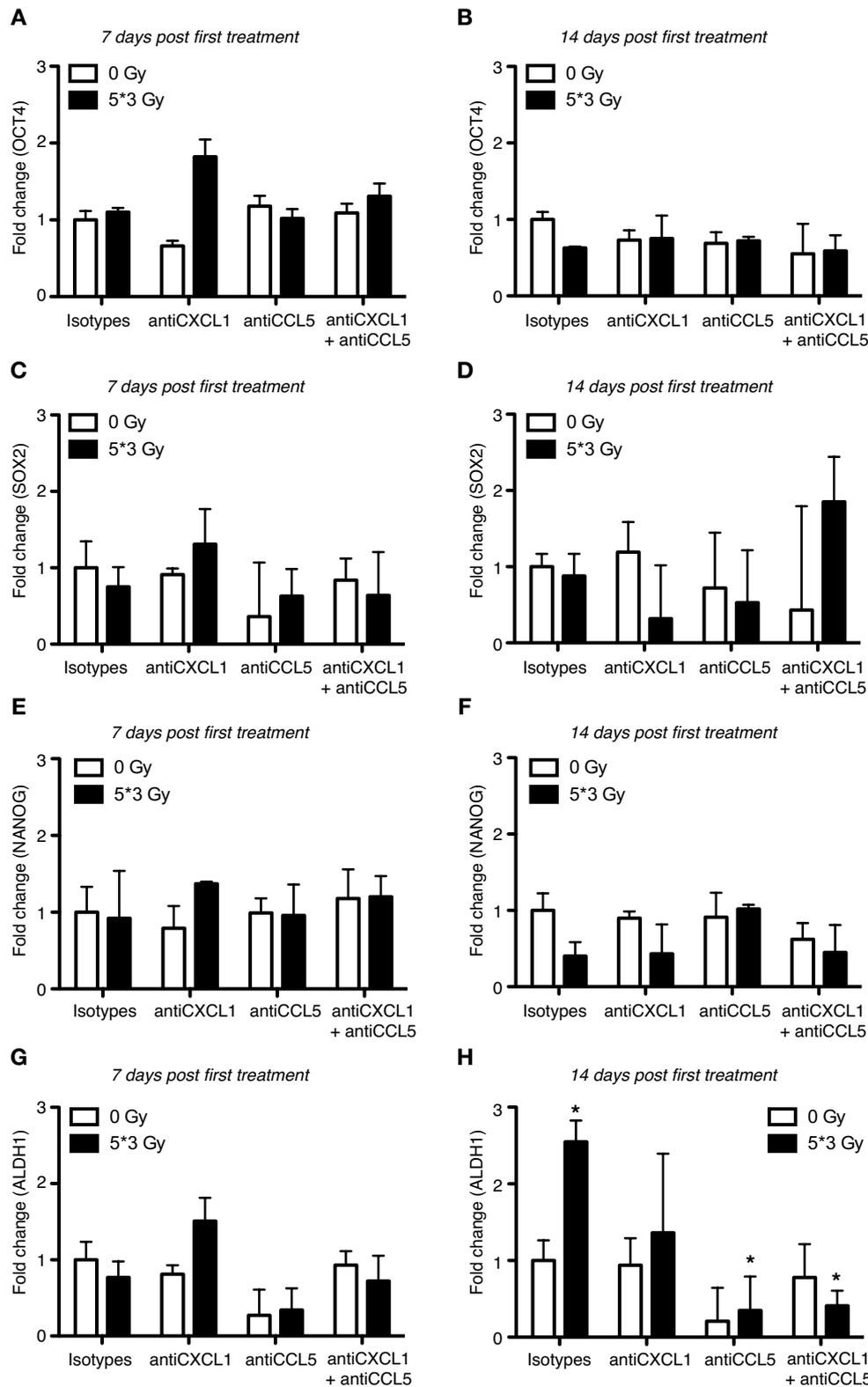


Figure 50. Expression des gènes *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* et *ALDH1A1* dans les xénogreffes, en fonction des différents traitements.

L'ARN des tumeurs a été extrait puis rétro-transcrit afin d'effectuer des PCR quantitatives sur les gènes *OCT4* (A, B), *SOX2* (C, D), *NANOG* (E, F) et *ALDH1A1* (G, H), 7 jours (A, C, E, G) ou 14 jours (B, D, F, H) après le premier traitement. Le gène de référence est la $\beta 2$ -Microglobuline humaine. Les histogrammes représentent la différence d'expression des gènes en fonction de la condition contrôle Isotypes, à 0 Gy. n=6 souris par groupe, t test, *p<0,02.

E. Etude de la survenue de métastases dans les souris xéno greffées

Enfin, j'ai analysé la présence de métastases dans plusieurs organes. Ainsi, les poumons, foie, moelle osseuse et cerveau de chaque souris ont été récupérés. L'ARN a été extrait puis rétro-transcrit. Des PCR quantitatives ont été réalisées pour étudier l'expression de la β 2-Microglobuline humaine par rapport à la β 2-Microglobuline murine. L'expression de β 2-Microglobuline humaine témoigne de la présence de cellules cancéreuses humaines dans l'organe étudié. Cependant, peu de métastases ont été détectées. En effet, parmi les 458 échantillons analysés, tout organe confondu et tout groupe de traitement confondus, je n'ai pu détecter que 17 métastases (Tableau 10). Aucune métastase n'a été détectée dans le cerveau. Par groupe de traitement, le pourcentage de métastases détectées reste faible dans toutes les conditions.

De ce fait, **il n'est pas possible de conclure quant à un effet des traitements sur la survenue de métastases.**

	Isotypes		antiCXCL1		antiCCL5		antiCXCL1 + antiCCL5	
	0 Gy	5*3 Gy	0 Gy	5*3 Gy	0 Gy	5*3 Gy	0 Gy	5*3 Gy
Moelle osseuse	0/16	0/7	0/18	1/9	0/11	0/14	0/13	2/14
Foie	1/17	1/11	1/18	3/13	1/12	1/14	3/15	0/17
Poumons	1/17	0/11	1/18	0/14	0/13	1/15	0/15	0/17
Cerveau	0/17	0/11	0/18	0/14	0/13	0/14	0/15	0/17
Total des métastases détectées (%)	2,98%	2,5%	2,78%	8%	2%	3,5%	5,17%	3,08%

Tableau 10. Nombre de métastases détectées dans différents organes selon le groupe de traitement.

La dernière ligne du tableau correspond au pourcentage de métastases détectées par groupe de traitement, tout organe confondu.

V. Corrélations cliniques des chimiokines et leurs récepteurs dans le cancer du sein

A. Etude de la corrélation entre l'expression de chimiokines et leurs récepteurs et des signatures géniques dans le cancer du sein

Dans le cadre d'une collaboration avec le Pr Bertucci et le Dr Finetti de l'Institut Paoli-Calmettes, nous avons analysé l'expression de chimiokines ainsi que leurs récepteurs dans un ensemble de 38 bases de données publiques normalisées (Annexe 3) regroupant 9236 échantillons caractérisés de cancers du sein primaires (Tableau 11).

La figure 51 représente la classification hiérarchique de tous les échantillons selon l'expression de 14 gènes (chimiokines et récepteurs de chimiokines). Il y a une corrélation positive entre l'expression de tous les gènes étudiés (Pearson, $r=0,10$). La partie droite (cases rouges) regroupe les échantillons présentant une expression élevée des chimiokines et récepteurs alors que la partie gauche correspond aux échantillons dont l'expression de ces gènes est plus faible (cases vertes) (Figure 51).

L'expression des chimiokines et récepteurs a été corrélée à différentes signatures géniques : les sous-types moléculaires selon la signature PAM50 (Prat *et al.*, 2013), la signature claudin-low (Prat *et al.*, 2010), la signature CD44⁺/CD24⁻ (Creighton *et al.*, 2009), la signature de transition de population (Prat *et al.*, 2013 ; noir : MaSC (*Mammary Stem Cell*) en pL (*progenitor Luminal*), blanc : pL en mL (*mature Luminal*)), la signature de sous-populations mammaires (Lim *et al.*, 2010), et la signature ALDH1 pos-like (Ginestier *et al.*, 2007) (Figures 51 et 52).

Characteristics		N (%)
Age at diagnosis (years)	≤50	2650 (36%)
	>50	4630 (64%)
AJCC Stage	1	1006 (36%)
	2	1130 (40%)
	3	599 (21%)
	4	82 (3%)
Pathological type	ductal	4184 (79%)
	lobular	514 (10%)
	other	580 (11%)
Pathological grade	1	739 (11%)
	2	2633 (40%)
	3	3151 (48%)
Pathological lymph node status (pN)	negative	3667 (57%)
	positive	2789 (43%)
Pathological tumor size (pT)	pT1	2117 (37%)
	pT2	2926 (52%)
	pT3	605 (11%)
ER status (mRNA)	negative	2867 (31%)
	positive	6369 (69%)
PR status (mRNA)	negative	4818 (52%)
	positive	4361 (48%)
HER2 status (mRNA)	negative	8087 (88%)
	positive	1149 (12%)
Molecular subtypes	HR+/HER2-	6061 (66%)
	HER2+	1149 (12%)
	TN	2007 (22%)
Follow-up, median (months)		57.2 (0-299.24)
Metastatic relapse		899 (24%)
5-year MFS [95%CI]		74% [72-75]

Tableau 11. Caractéristiques clinicopathologiques des échantillons de patientes atteintes de cancer du sein.

Il existe ainsi une corrélation positive entre l'expression des chimiokines et récepteurs étudiés et les signatures de cellules progénitrices (pL), de cellules CD44+/CD24-, et de tumeurs claudin-low (Figure 52). Les signatures ALDH1+ et MaSC présentent également une corrélation positive avec l'expression des chimiokines et récepteurs, mais cette corrélation est plus faible. Enfin, la corrélation entre la signature génique de cellules luminales matures (mL) et l'expression des chimiokines et récepteurs est négative (Figure 52).

Ces résultats suggèrent que l'expression élevée de chimiokines et/ou récepteurs de chimiokines est globalement associée à une signature de cellules souches mammaires, cancéreuses ou normales, ainsi qu'à des tumeurs de type plus agressif.

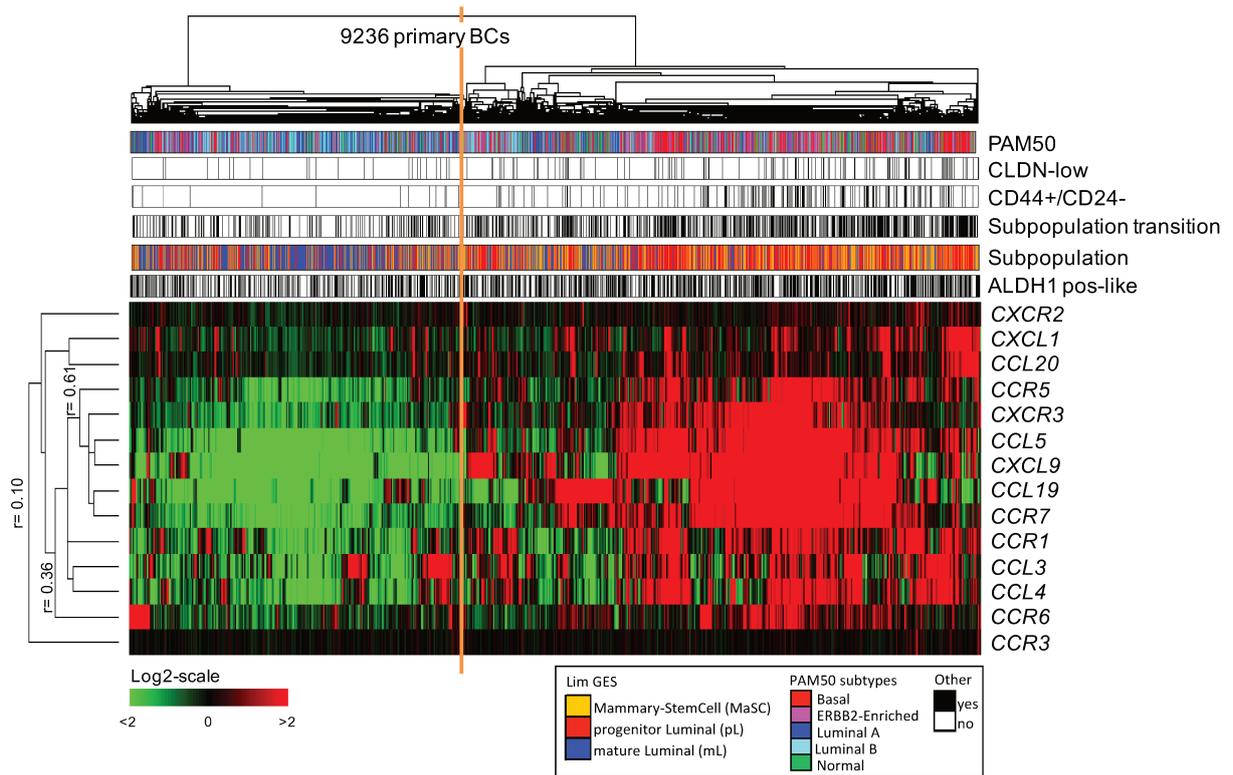


Figure 51. Classification hiérarchique d'échantillons de cancer du sein en fonction de l'expression de chimiokines et leurs récepteurs.

Dendrogramme représentant la classification hiérarchique de 9236 échantillons de patientes atteintes de cancer du sein primaire, en fonction de l'expression de 7 chimiokines et 7 récepteurs de chimiokines (Pearson). De haut en bas sous le dendrogramme sont représentés par des barres : les sous-types moléculaires selon la signature PAM50 (Prat et al., 2013), la signature claudin-low (Prat et al., 2010), la signature CD44+/CD24- (Creighton et al., 2009), la signature de transition de population (Prat et al., 2013 ; noir : MaSC en pL, blanc : pL en mL), la signature de sous-populations mammaires (Lim et al., 2010), et la signature ALDH1 pos-like (Ginestier et al., 2007).

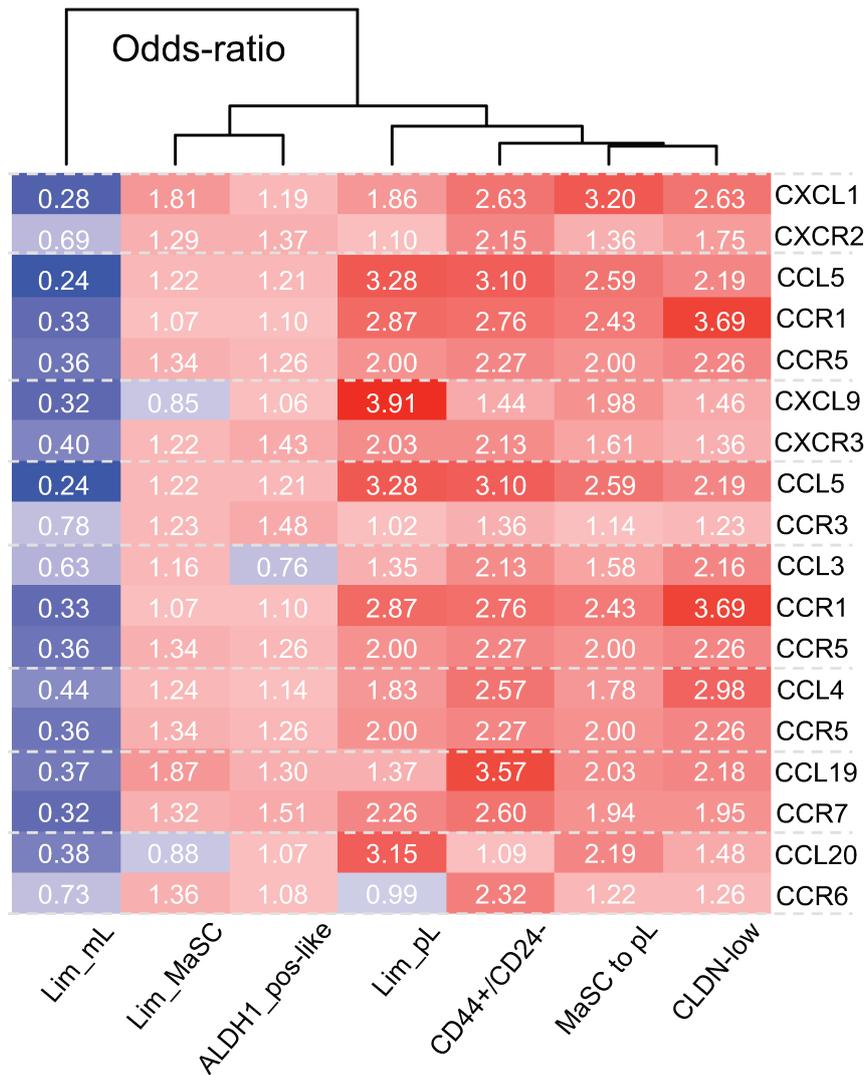


Figure 52. Matrice de corrélation de l'expression des chimiokines et de leurs récepteurs.

La matrice de corrélation indique les odds ratio ou rapports des chances de l'expression des chimiokines ou leurs récepteurs dans des échantillons de cancers du sein, en fonction de différents paramètres, déjà décrits dans la figure 51. Lim_mL : signature mature Luminal ; Lim_MaSC : signature Mammary Stem Cell ; ALDH1_pos-like : signature ALDH1+ ; Lim_pL : signature progenitor Luminal ; CD44+/CD24- : signature CD44+/CD24- ; MaSC to pL : signature de transition des sous-populations ; CLDN-low : signature claudin-low. Les cases rouges reflètent une corrélation positive, les cases bleues représentent une corrélation négative ; plus la couleur est pâle et plus la corrélation est faible (proche de 1).

En détail, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux chimiokines CXCL1 et CCL5, ainsi qu'aux récepteurs CXCR2, CXCR3, CCR1 et CCR5. Une corrélation positive entre tous ces gènes est retrouvée (Pearson, $r=0,24$) : le groupe I à gauche correspond à une expression faible de ces gènes alors que le groupe II à droite est associé à une forte expression (Figure 53). Ces groupes corrélaient avec différentes signatures géniques, précédemment décrites. Ainsi, le groupe II (expression élevée) est associé plus fréquemment à des tumeurs triple négatives (TN), et moins fréquemment à des tumeurs HR⁺/HER⁻ par rapport au groupe I (test de Fisher, $p=4,36E-148$). De même, le groupe II corréla plus souvent avec un profil claudin-low (test de Fisher, $p=1,14E-61$).

De manière intéressante, les échantillons du groupe II sont également associés à des profils de CSC (test de Fisher) : CD44⁺/CD24⁻ ($p=4,53E-138$), MaSC et pL ($p<1,00E-250$), transition MaSC-pL ($p=9,26E-199$) et ALDH1⁺ ($p=6,40E-10$) (Figure 53). La figure 54 montre la forte corrélation entre l'expression élevée de CXCL1, CCL5, CXCR2, CXCR3, CCR1 ou CCR5 et le profil CD44⁺/CD24⁻ like.

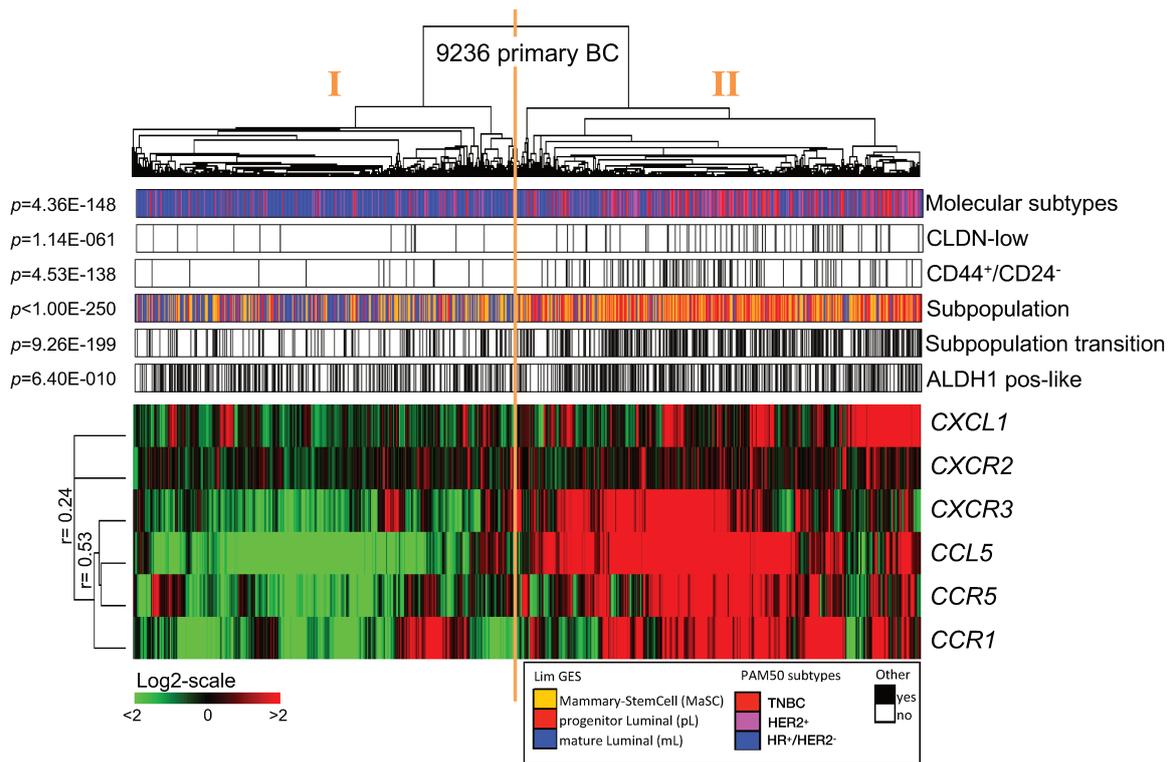


Figure 53. Classification hiérarchique d'échantillons de cancer du sein en fonction de l'expression génique des chimiokines et récepteurs d'intérêt.

Dendrogramme représentant la classification hiérarchique de 9236 échantillons de patientes atteintes de cancer du sein primaire, en fonction de l'expression de CXCL1, CXCR2, CXCR3, CCL5, CCR5 et CCR1 (Pearson). De haut en bas sous le dendrogramme sont représentés par des barres : les sous-types moléculaires (bleu : HR+/HER2-, rose : HER2+, rouge : TN). Les autres signatures sont comme décrites dans la légende de la figure 50.

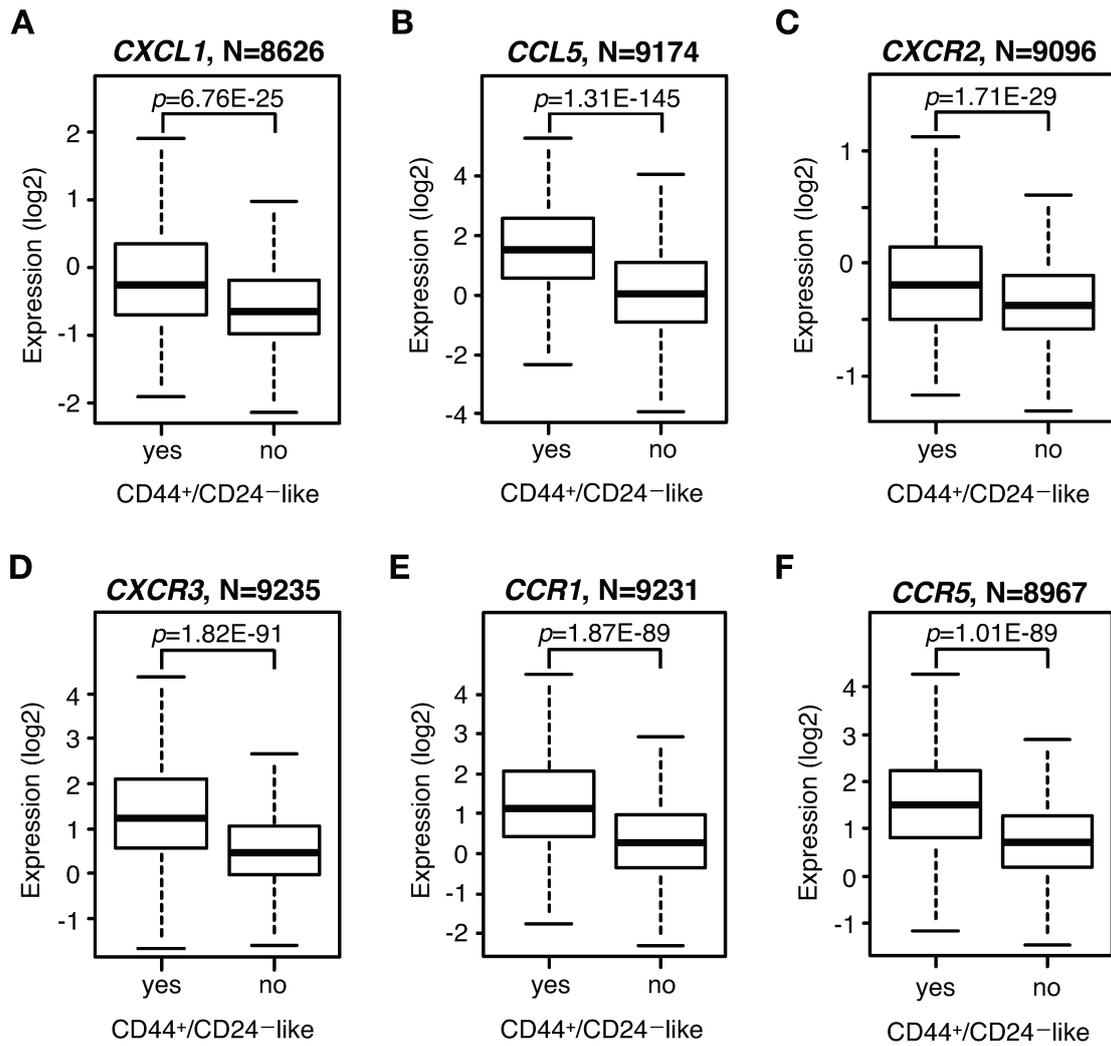


Figure 54. Association entre le profil CD44+/CD24- et l'expression des chimiokines et récepteurs d'intérêt.

Box plot des niveaux d'expression de CXCL1 (A), CCL5 (B), CXCR2 (C), CXCR3 (D), CCR1 (E) et CCR5 (F) en fonction du profil CD44+/CD24- de chaque échantillon de tumeurs mammaires. *t* test.

CXCL1 est un ligand de CXCR2 alors que CCR1 et CCR5 sont deux récepteurs de CCL5. Les couples ligands-récepteurs ont donc été étudiés ensemble. La corrélation entre la co-expression des couples de ligand-récepteur et la signature de CSC CD44⁺/CD24⁻ a été analysée par régression logistique (Figure 55). Ainsi, nous avons pu montrer que la forte expression des couples CXCL1/CXCR2, CCL5/CCR1 et CCL5/CCR5 est corrélée avec le profil de CSC CD44⁺ CD24⁻, tous sous-types confondus ($p=1,06E-48$, $p=4,59E-139$, $p=1,29E-127$ respectivement) (Figure 55A). Ces résultats sont également retrouvés dans les tumeurs HR⁺/HER2⁻ (*Hormone Receptor⁺*) (Figure 55B), les tumeurs HER2⁺ (Figure 55C) et les tumeurs triple-négatives (Figure 55D).

Ces résultats suggèrent que l'expression élevée de CXCL1, CCL5, CXCR2, CXCR3, CCR1 et CCR5 est globalement associée à une signature de cellules souches mammaires, cancéreuses ou normales, ainsi qu'à des tumeurs de type plus agressif. En particulier, la co-expression des couples ligand-récepteur, tels que CXCL1-CXCR2, CCL5-CCR1 et CCL5-CCR5 corrélient avec la signature génique CD44⁺ CD24⁻ dans différents sous-types de cancers du sein.

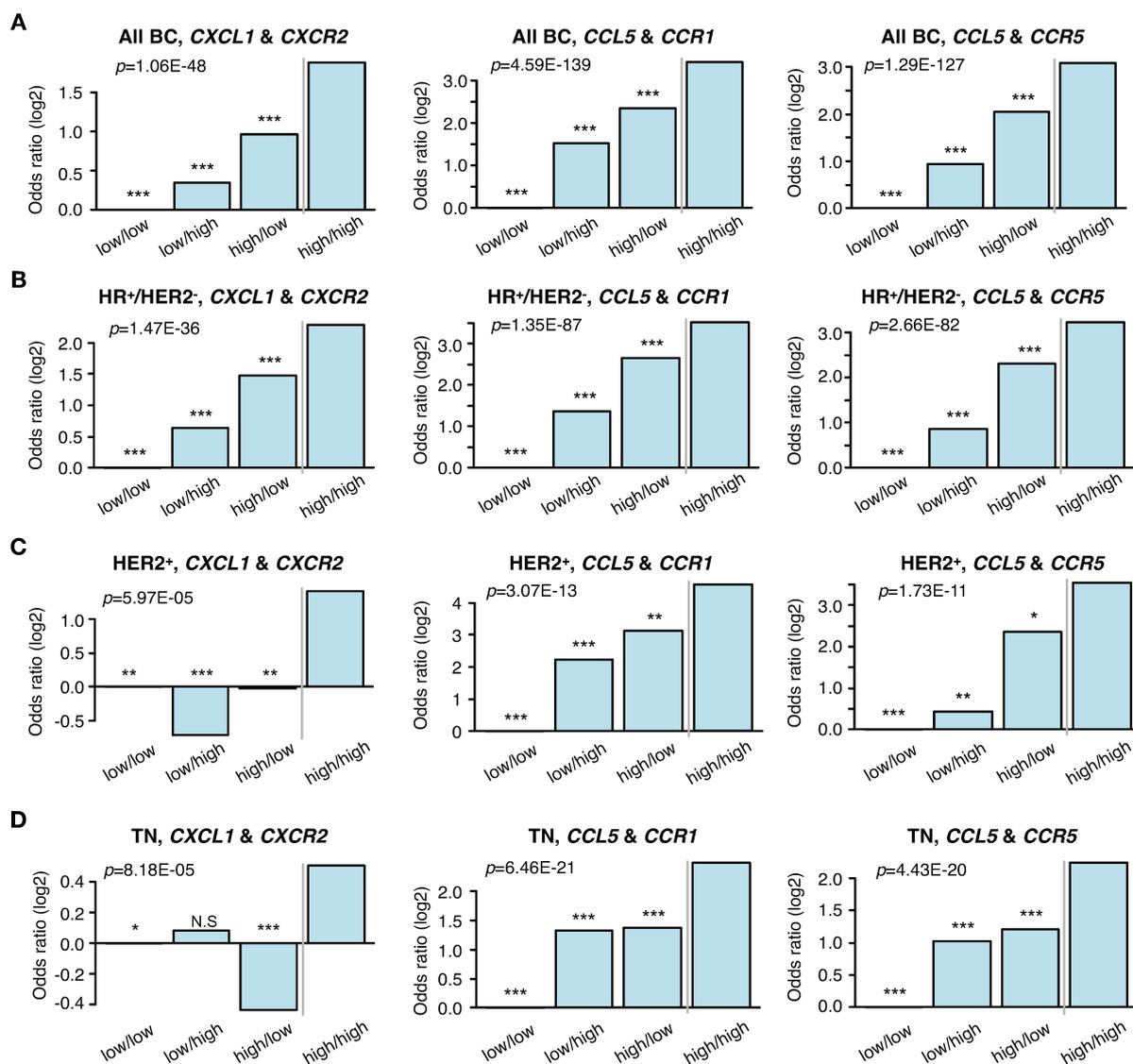


Figure 55. Association entre le profil CD44⁺/CD24⁻ et la co-expression de couples chimiokine-récepteur d'intérêt.

Histogramme des niveaux d'expression de CXCL1/CXCR2 (gauche), CCL5/CCR1 (centre) et CCL5/CCR5 (droite) en fonction du profil CD44⁺/CD24⁻ de chaque échantillon. Chaque barre représente le coefficient de régression logistique d'une combinaison. Quatre niveaux d'expression ont été définis : low/low pour une faible expression du ligand et du récepteur ; low/high pour une faible expression du ligand ; high/low pour une faible expression du récepteur ; high/high pour une expression élevée du ligand et du récepteur. La signature CD44⁺/CD24⁻ est la variable expliquée alors que l'expression des gènes constitue la variable explicative. Les corrélations ont été établies dans tous les sous-types de cancer du sein (A), les tumeurs HR⁺/HER2⁻ (B), les tumeurs HER2⁺ (C) et les tumeurs triple-négatives (TN, D). Test ANOVA et test de Tukey.

B. Etude de la corrélation entre l'expression de chimiokines et leurs récepteurs et la survie sans métastases dans le cancer du sein

Enfin, nous nous sommes intéressés à la corrélation entre l'expression de ces chimiokines et récepteurs et la survie sans métastase (MFS) des patientes étudiées.

En particulier, la MFS a été analysée dans les trois principaux sous-types de cancer du sein (HR⁺, HER2⁺ et TN), ainsi que dans tous les cancers du sein, en fonction de l'expression faible (*low-med*) ou forte (*high-med*) des gènes *CXCL1* (Figure 56), *CXCR2* (Figure 57), *CCL5* (Figure 58), *CCR1* (Figure 59) et *CCR5* (Figure 60). L'expression de *CXCL1* n'est pas associée à une variation significative de la MFS dans le cancer du sein et en particulier dans les sous-types HER2⁺ et TN (Figures 56A, 56C et 56D). En revanche, l'expression forte de *CXCL1* est corrélée à une augmentation significative de la MFS dans les cancers du sein HR⁺ (log-rank, $p=0,00609$) (Figure 56B). L'expression élevée du gène *CXCR2* n'est pas corrélée avec une variation de la MFS, quel que soit le sous-type de cancer du sein étudié (Figure 57).

Concernant la chimiokine *CCL5*, sa forte expression génique est associée à une augmentation significative de la MFS dans les sous-types HER2⁺ et TN (log-rank, $p=0,0361$ et $p=0,000105$ respectivement) (Figure 58). Une expression élevée de *CCR1* est corrélée à une diminution de la MFS dans tous les cancers du sein et en particulier les tumeurs HR⁺ (log-rank, $p=0,00542$ et $p=0,00869$ respectivement) (Figures 59A et 59B), alors qu'elle est corrélée à une augmentation de la MFS dans les tumeurs TN (log-rank, $p=0,047$) (Figure 59D) et à aucune variation dans les tumeurs HER2⁺ (Figure 59C). Enfin, l'expression de *CCR5* est corrélée à une augmentation de la MFS dans les tumeurs HER2⁺ et TN (log-rank, $p=0,0506$ et $p=0,000132$ respectivement) (Figure 60).

La figure 61 montre la MFS selon le niveau d'expression d'une chimiokine et de son ou ses récepteur(s). Les couples *CXCL1/CXCR2* et *CXCL9/CXCR3* ne sont pas associés à une différence significative de survie entre les différentes combinaisons d'expression (log-rank, $p=0,231$ et $p=0,112$ respectivement) (Figures 61A et 61C). En revanche, il existe une variation significative de la MFS entre les différentes combinaisons d'expression de *CCL5/CCR1/CCR5* (log-rank, $p=0,00162$) (Figure 61B). En particulier, la combinaison *CCL5^{low}/CCR1^{high}/CCR5^{low}* est associée à une MFS à 5 ans de 65%, alors que la MFS augmente à 84% pour des échantillons *CCL5^{low}/CCR1^{low}/CCR5^{high}*.

Nous avons également étudié l'impact sur la survie de l'expression d'autres chimiokines détectées dans les milieux conditionnés après irradiation, telles que *CCL19* et *CCL20*, ainsi que leurs récepteurs respectifs *CCR7* et *CCR6*. Ainsi, les différents niveaux d'expression des couples *CCL19/CCR7* et *CCL20/CCR6* sont liés à une variation significative de la MFS à 5 ans (log-rank, $p=0,0086$ et $p=0,0268$ respectivement) (Figures 61D et 61E).

Nous avons ainsi pu mettre en évidence une corrélation entre l'expression des chimiokines ainsi que leurs récepteurs et les signatures moléculaires propres aux CSC. De plus, l'expression du récepteur CCR1 corrèle avec une MFS diminuée dans le cancer du sein et en particulier les tumeurs HR⁺.

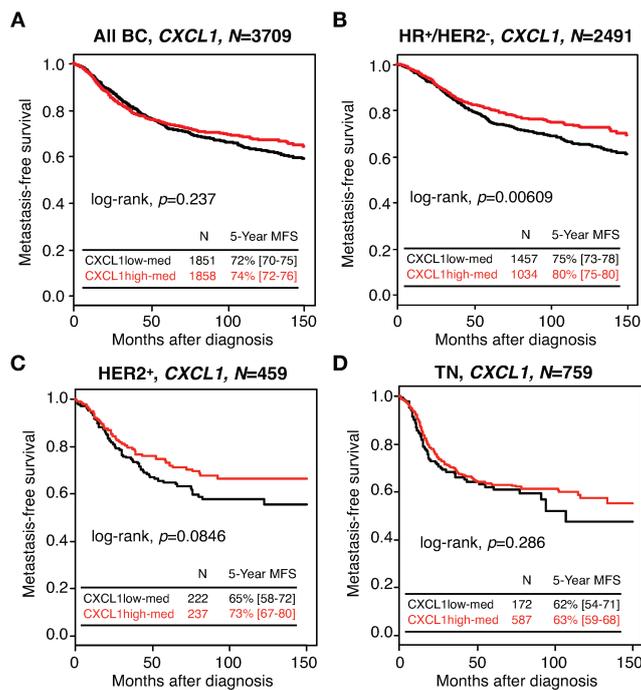


Figure 56. Survie sans métastase selon l'expression de CXCL1 dans différents sous-types de cancer du sein.

Courbes de survie sans métastase (MFS) des patientes atteintes de cancer du sein tous sous-types confondus (A), HR+/HER2- (B), HER2+ (C) et TN (D) selon le niveau d'expression de CXCL1 ("low-med" ou "high-med"). Les courbes Kaplan-Meier sont représentées. Test log-rank.

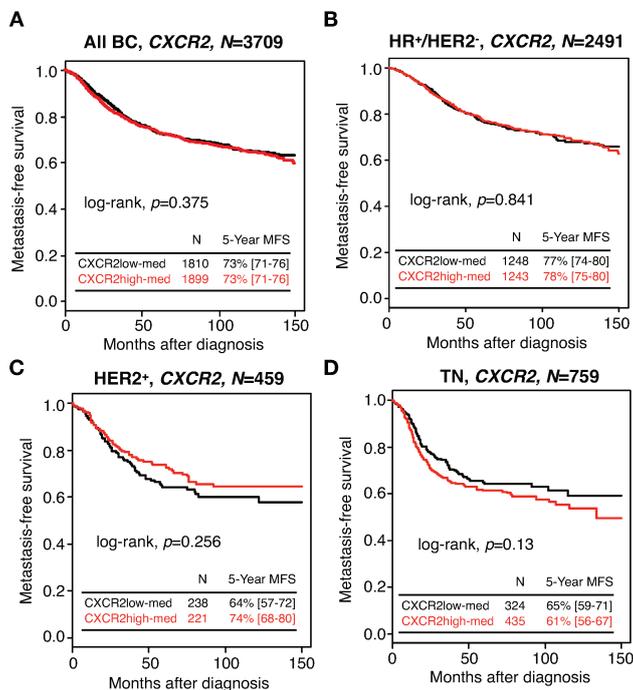


Figure 57. Survie sans métastase selon l'expression de CXCR2 dans différents sous-types de cancer du sein.

Courbes de survie sans métastase (MFS) des patientes atteintes de cancer du sein tous sous-types confondus (A), HR+/HER2- (B), HER2+ (C) et TN (D) selon le niveau d'expression de CXCR2 ("low-med" ou "high-med"). Les courbes Kaplan-Meier sont représentées. Test log-rank.

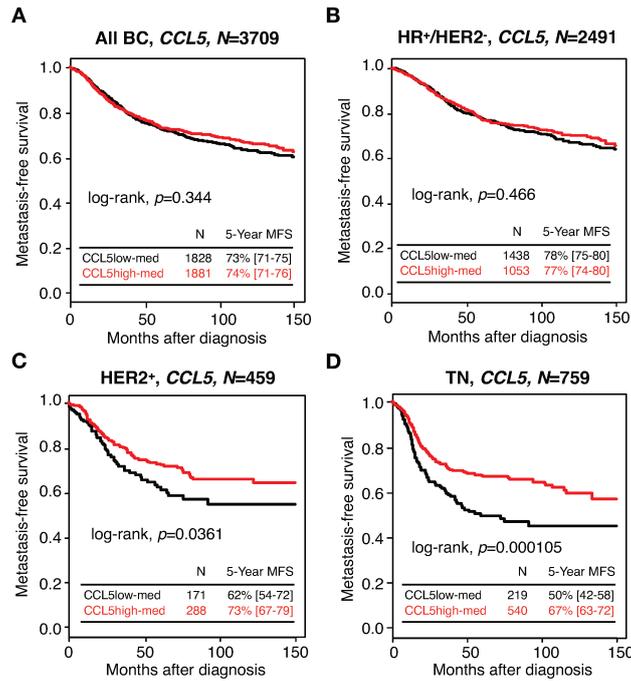


Figure 58. Survie sans métastase selon l'expression de CCL5 dans différents sous-types de cancer du sein.

Courbes de survie sans métastase (MFS) des patientes atteintes de cancer du sein tous sous-types confondus (A), HR⁺/HER2⁻ (B), HER2⁺ (C) et TN (D) selon le niveau d'expression de CCL5 ("low-med" ou "high-med"). Les courbes Kaplan-Meier sont représentées. Test log-rank.

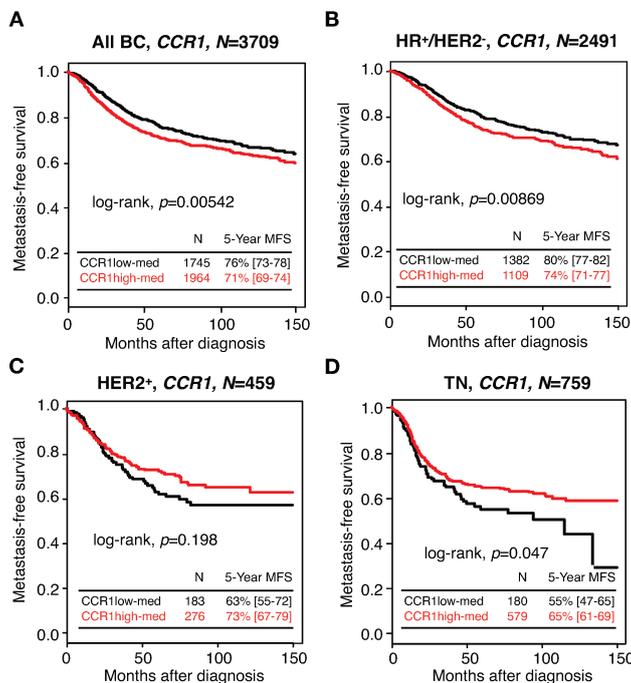


Figure 59. Survie sans métastase selon l'expression de CCR1 dans différents sous-types de cancer du sein.

Courbes de survie sans métastase (MFS) des patientes atteintes de cancer du sein tous sous-types confondus (A), HR⁺/HER2⁻ (B), HER2⁺ (C) et TN (D) selon le niveau d'expression de CCR1 ("low-med" ou "high-med"). Les courbes Kaplan-Meier sont représentées. Test log-rank.

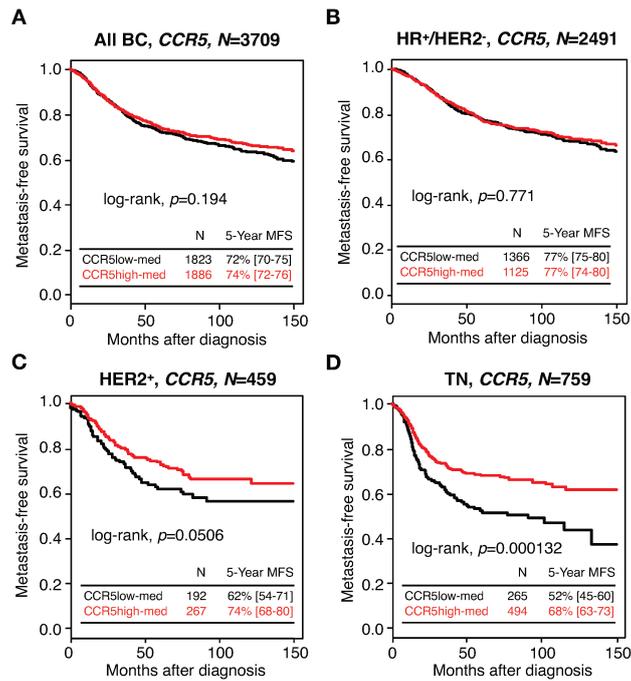


Figure 60. Survie sans métastase selon l'expression de CCR5 dans différents sous-types de cancer du sein.

Courbes de survie sans métastase (MFS) des patientes atteintes de cancer du sein tous sous-types confondus (A), HR+/HER2- (B), HER2+ (C) et TN (D) selon le niveau d'expression de CCR5 ("low-med" ou "high-med"). Les courbes Kaplan-Meier sont représentées. Test log-rank.

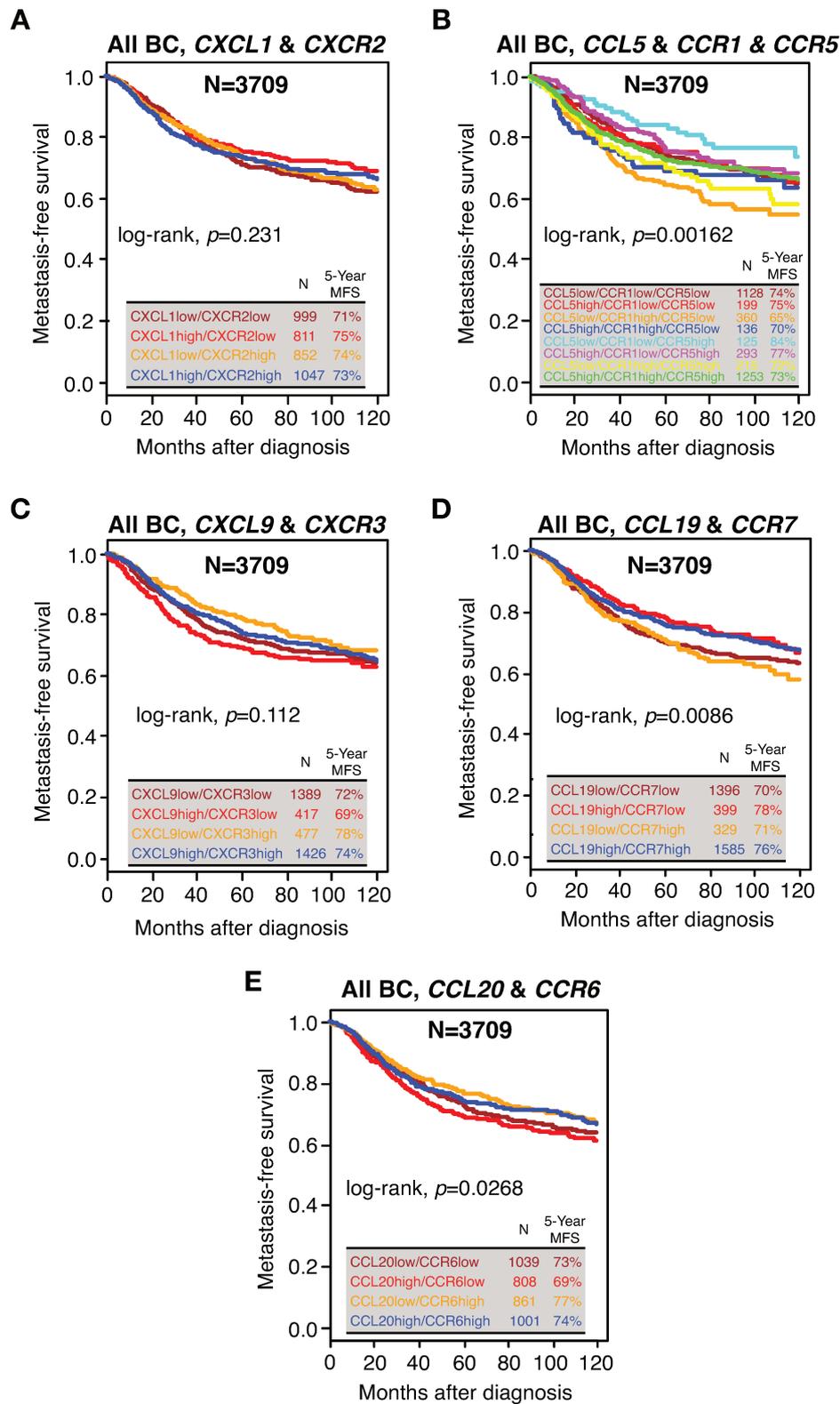


Figure 61. Survie sans métastase selon l'expression de couples de chimiokines et récepteurs.

Courbes de survie sans métastase (MFS) des patientes atteintes de cancer du sein tous sous-types confondus, selon le niveau d'expression de chimiokines ("low" ou "high") et de leur(s) récepteur(s) associé(s) : CXCL1/CXCR2 (A), CCL5/CCR1/CCR5 (B), CXCL9/CXCR3 (C), CCL19/CCR7 (D) et CCL20/CCR6 (E). Les courbes Kaplan-Meier sont représentées. Test log-rank, N=3709.

VI. Résultats complémentaires et préliminaires

Au cours de ma thèse, j'ai eu l'occasion de m'intéresser à d'autres aspects en lien avec la reprogrammation. Les résultats préliminaires ci-dessous constituent de nouvelles pistes à explorer, sur lesquelles nous reviendrons lors de la discussion.

A. Sécrétion de chimiokines par les CSC ALDH⁺

Nous sommes partis d'une constatation simple qui est que le nombre de CSC dans une population donnée retourne systématiquement à son point d'équilibre de quelques pourcents. Nous avons donc émis l'hypothèse que la proportion de CSC est régulée par la sécrétion de facteurs solubles par les CSC afin de contrôler leur auto-renouvellement et la reprogrammation des non-CSC.

Comme pour l'étude de la population ALDH⁻, j'ai trié les SUM159PT à l'aide du marqueur Aldefluor et j'ai ensemencé les cellules ALDH⁺. J'ai analysé par cytométrie de flux la proportion de cellules ALDH⁺ dans cette population, tous les jours après tri (Figure 62). J'ai ainsi pu observer que les cellules ALDH⁺ se différencient très rapidement pour reformer une population hétérogène, semblable à la population totale de départ. La vitesse de différenciation était en revanche très variable selon les répétitions, mais le pourcentage de cellules ALDH⁺ 6 jours après le tri, est toujours équivalent à celui observé dans la population initiale lors du tri.

Nous nous sommes alors interrogés sur l'éventuel rôle des cytokines et chimiokines dans ce phénomène. Nous émettons l'hypothèse que les chimiokines pourraient induire une boucle de rétro-contrôle permettant le maintien d'une petite population de CSC au sein de la population totale, comme évoqué précédemment.

J'ai donc récolté le CM des cellules ALDH⁺ et des cellules ALDH⁻ et analysé leur contenu par chimiokines et cytokines arrays (Figure 63). La puce à cytokines montre que plusieurs cytokines et chimiokines présentent une sécrétion accrue dans le CM provenant de cellules ALDH⁺ par rapport au CM ALDH⁻ (Figures 63A et 63B). Si nous ne nous intéressons qu'aux chimiokines dont la sécrétion est augmentée plus de 2

fois dans le CM de cellules ALDH⁺ par rapport aux cellules ALDH⁻ (ratio supérieur à 2), nous retrouvons de manière intéressante CCL5 (ratio=7,04) et CXCL1 (ratio=2,34). D'autres cytokines présentent également une sécrétion augmentée dans les cellules ALDH⁺ : G-CSF (ratio=36,53), sICAM-1 (ratio=4,18) et IL-6 (ratio=4,27).

La chimiokine CXCL8 est quand à elle fortement sécrétée (Figure 63A) mais de manière égale dans les deux populations (ratio=1,08). La puce à chimiokines réalisée dans les mêmes conditions vient confirmer ces résultats (Figures 63C et 63D). En effet, CXCL1 et CCL5 présentent aussi une sécrétion augmentée dans les cellules ALDH⁺ (ratios=3,20 et 6,91 respectivement). On retrouve également la sécrétion accrue d'autres chimiokines telles que CCL3/4, CCL7, CCL15, CCL17, CCL18, CCL22, CXCL5, CXCL7, CXCL10 et CXCL11 (ratios \geq 2). Comme précédemment, la sécrétion de CXCL8 est élevée (Figure 63C) mais ne varie pas entre les deux conditions (Figure 63D, ratio=1,004).

Ces résultats restent néanmoins à confirmer par une répétition des puces à protéines ou par des tests ELISA. Ils suggèrent que **les CSC ALDH⁺ lorsqu'elles se différencient, sécrètent un cocktail de chimiokines, en l'absence de stimulation par l'irradiation. Certaines chimiokines sont communes à celles sécrétées lors de la reprogrammation.** Il serait intéressant d'étudier le rôle de ces chimiokines sécrétées conjointement à la différenciation des cellules ALDH⁺.

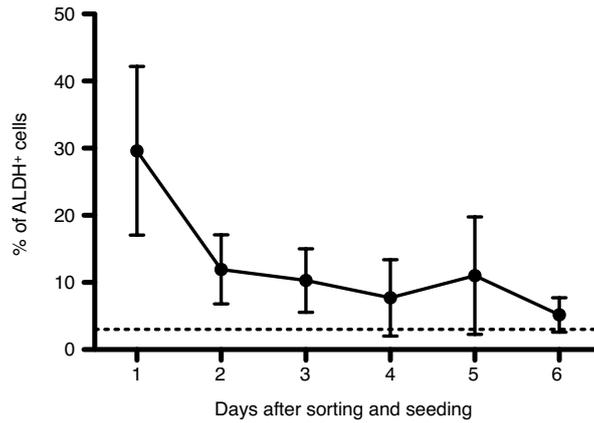


Figure 62. Evolution de la population ALDH⁺ après le tri.

Les SUM159PT ont été triées puisensemencées. Chaque jour pendant 6 jours après le tri, les cellules ont été marquées à l'aide d'un test Aldefluor et le pourcentage de cellules ALDH⁺ a été analysé par cytométrie de flux. n=3. La ligne en pointillé indique le pourcentage initial de CSC.

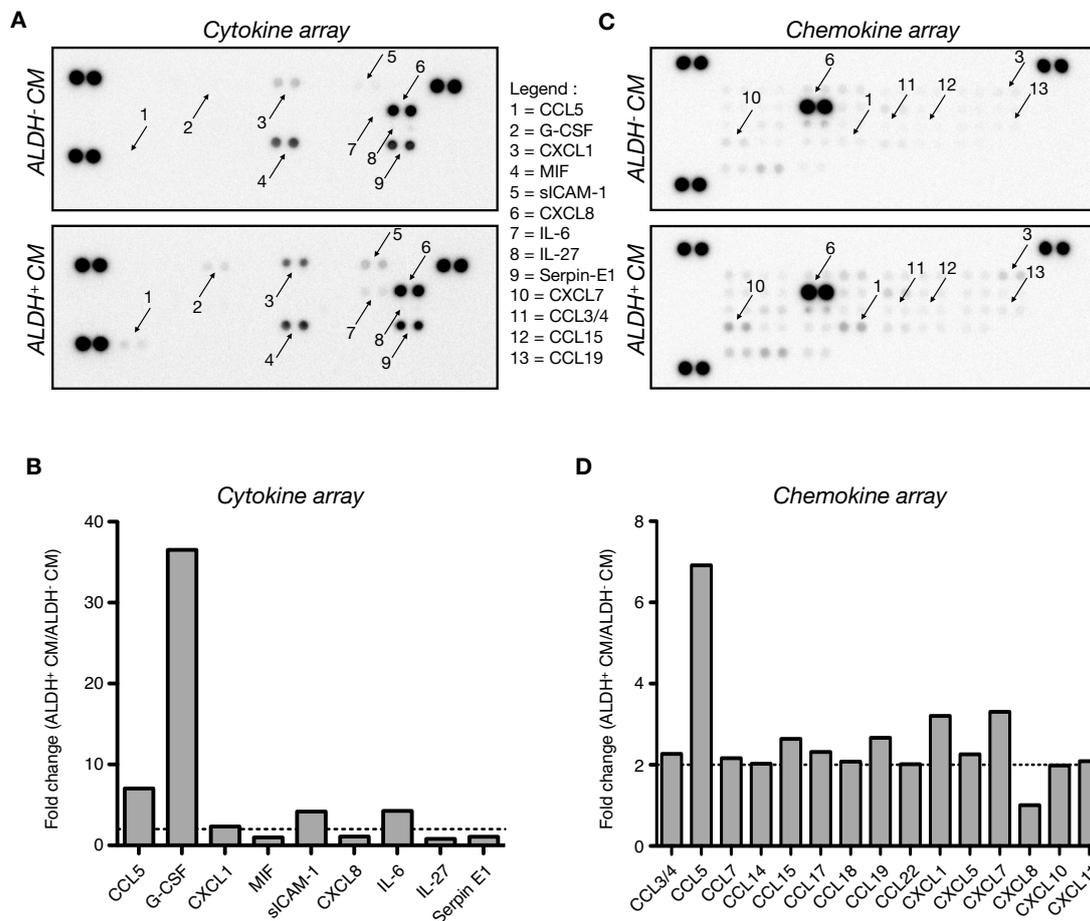


Figure 63. Etude du contenu du milieu conditionné de cellules ALDH⁺.

Les SUM159PT ALDH⁺ et ALDH⁻ ont été triées puisensemencées. Six jours après le tri, le milieu conditionné des deux populations a été collecté et analysé par cytokines (A, B) et chimiokines arrays (C, D). La légende est commune aux deux arrays. Les histogrammes montrent le ratio de l'intensité des spots dans le CM ALDH⁺ sur le CM ALDH⁻. La ligne en pointillé sur les histogrammes correspond à un ratio de 2. n=1.

B. Implication des vésicules extracellulaires dans la reprogrammation

Au cours de ma thèse, je me suis focalisée sur la composante protéique du CM et sur son action dans la reprogrammation. Cependant, il existe beaucoup d'autres composants du CM, dont les vésicules extracellulaires (VEC) font partie. Les VEC peuvent être de différentes natures (microvésicules, exosomes ou corps apoptotiques), différenciés selon leur taille et leur compartiment d'origine. Les microvésicules sont en effet issues de bourgeonnements de la membrane plasmique alors que les exosomes sont générés dans les corps multivésiculaires, qui fusionnent ensuite avec la membrane plasmique (Tkach et Théry, 2016). Les VEC jouent des rôles importants dans la communication intercellulaire, dans un contexte normal comme tumoral. Au niveau tumoral, elles participent ainsi à l'invasion cellulaire, en favorisant la dégradation de la matrice extracellulaire. Ces VEC peuvent induire l'EMT dans des cellules cancéreuses. Elles modulent également le stroma tumoral et permettent la mise en place de niches pré-métastatiques (Tkach et Théry, 2016). Enfin, il a été montré que les CSC produisaient également des VEC, qui peuvent contenir des protéines de la famille Wnt et qui communiquent avec les cellules cancéreuses et les cellules du stroma (Hannafon et Ding, 2015).

Plusieurs études ont montré que les VEC pouvaient être à l'origine des effets indirects des radiations ionisantes (effets *bystander*), tels que des changements dans la prolifération cellulaire et l'induction de l'apoptose *via* la diffusion de radicaux libres (Jella *et al.*, 2014 ; Xu *et al.*, 2015c ; Szatmari *et al.*, 2017). De plus, la quantité de VEC produites ainsi que leur contenu peuvent être affectés par la radiothérapie (Jelonek *et al.*, 2016). Enfin, Katsman et collaborateurs ont montré que les ARN et miARN véhiculés par des VEC issues de cellules souches embryonnaires entraînent une dédifférenciation de cellules de la rétine, associée à une réexpression de facteurs associés à la pluripotence tels que SOX2 et OCT4 (Katsman *et al.*, 2012).

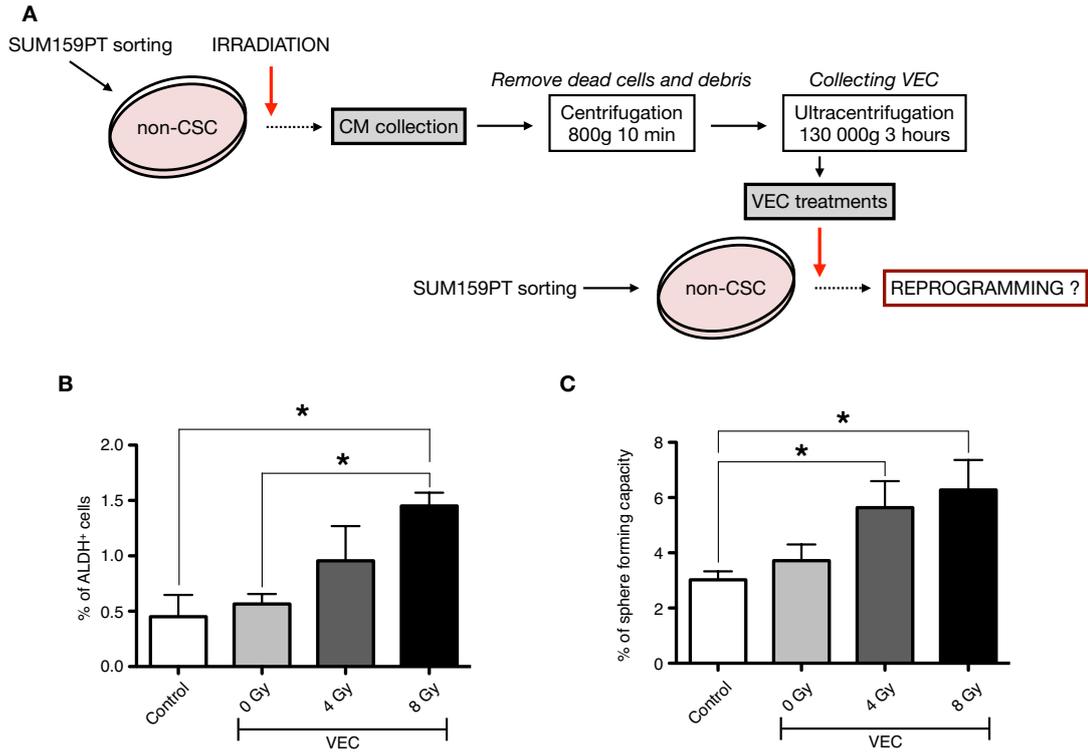


Figure 64. Etude du rôle des VEC dans la reprogrammation de non-CSC en CSC.

Les SUM159PT ALDH⁻ ont été triées, ensemencées et irradiées 24 heures plus tard. Comme décrit en A, le CM est collecté 5 jours après irradiation, puis centrifugé pour éliminer les débris cellulaires. Le milieu est ensuite ultra-centrifugé et le culot récupéré dans du PBS correspond aux VEC. Les VEC sont ensuite utilisées en traitements sur des non-CSC fraîchement triées. Cinq jours après traitements, la reprogrammation est analysée par cytométrie de flux grâce au marquage ALDH (B) et par test de capacité de formation de sphères (C). t test, n=3. *, p<0,05.

Je me suis donc intéressée aux VEC produites dans notre lignée cellulaire en l'absence ou en présence d'irradiation. Le milieu conditionné des cellules triées et irradiées ou non est récupéré et centrifugé une première fois pour éliminer les débris cellulaires. Le milieu est ensuite ultra-centrifugé et le culot contenant les VEC est collecté. Ces VEC sont ensuite directement utilisées en traitement sur des non-CSC ALDH⁻ fraîchement triées (Figure 64A).

Cinq jours après traitement par les VEC issues de non-CSC non irradiées (0 Gy) ou irradiées (4 Gy et 8 Gy), j'ai analysé la reprogrammation des cellules. La figure 64B montre ainsi que le traitement par les VEC issues de non-CSC irradiées à 8 Gy entraîne l'induction de cellules ALDH⁺ (1,45% \pm 0,121%) de manière significative par rapport à la condition contrôle non traitée (0,45% \pm 0,194%) et par rapport à la condition traitée aux VEC issues de cellules non irradiées (0,57% \pm 0,09%) ($p=0,0123$ et $p=0,0042$ respectivement).

J'ai également étudié la capacité de formation de sphères des cellules traitées aux VEC (Figure 64C). Le traitement aux VEC issues de non-CSC irradiées (4 Gy et 8 Gy) induit une capacité de formation de sphères significativement accrue (5,64% \pm 0,95% et 6,27% \pm 1,09% respectivement) par rapport à la condition contrôle non traitée (3,022% \pm 0,31%) ($p=0,031$ et $p=0,021$ respectivement). Ces résultats indiquent un rôle des VEC induites après irradiation dans la reprogrammation. En effet, les VEC issues de cellules non irradiées n'induisent aucune reprogrammation.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'absorption des VEC par les cellules non-CSC traitées. Pour cela, les non-CSC ALDH⁻ ont été triées puisensemencées et marquées à l'aide du Dil (*Di-alkyl indocarbocyanine*). Il s'agit d'un composé extrêmement lipophile, qui s'intercale dans l'ensemble des membranes cellulaires. Les VEC produites par des cellules Dil⁺ portent donc également cette fluorescence. J'ai récupéré le CM de ces cellules marquées, cinq jours après irradiation

(Figure 65A). Après retrait des débris cellulaires par centrifugation, les milieux ont été analysés par cytométrie de flux afin de quantifier la proportion de VEC fluorescentes dans chacune des conditions (Figure 65B). On observe ainsi une augmentation du nombre de particules fluorescentes détectées en cytométrie, après irradiation.

J'ai ensuite utilisé ces CM issues de non-CSC Dil⁺ irradiées ou non, débarrassés des débris cellulaires, pour traiter des non-CSC fraîchement triées (Figure 65A). Vingt-quatre heures après l'ajout du CM, l'analyse des cellules en cytométrie de flux montre l'apparition de cellules Dil⁺ dans toutes les conditions traitées au CM (Figure 65C). Néanmoins, la proportion de cellules Dil⁺ augmente proportionnellement à la dose d'irradiation. Ainsi, la production plus importante de VEC par les cellules irradiées se traduit directement par une absorption de VEC plus élevée par les cellules. Cette augmentation de cellules Dil⁺ a également été confirmée par microscopie (Figure 65D). Ces résultats sont préliminaires et devront être répétés.

L'ensemble de nos résultats, même s'ils sont préliminaires, suggère **un rôle des VEC dans le processus de reprogrammation, mais également une différence de contenu et/ou de quantité de VEC sécrétées entre les conditions irradiées ou non.**

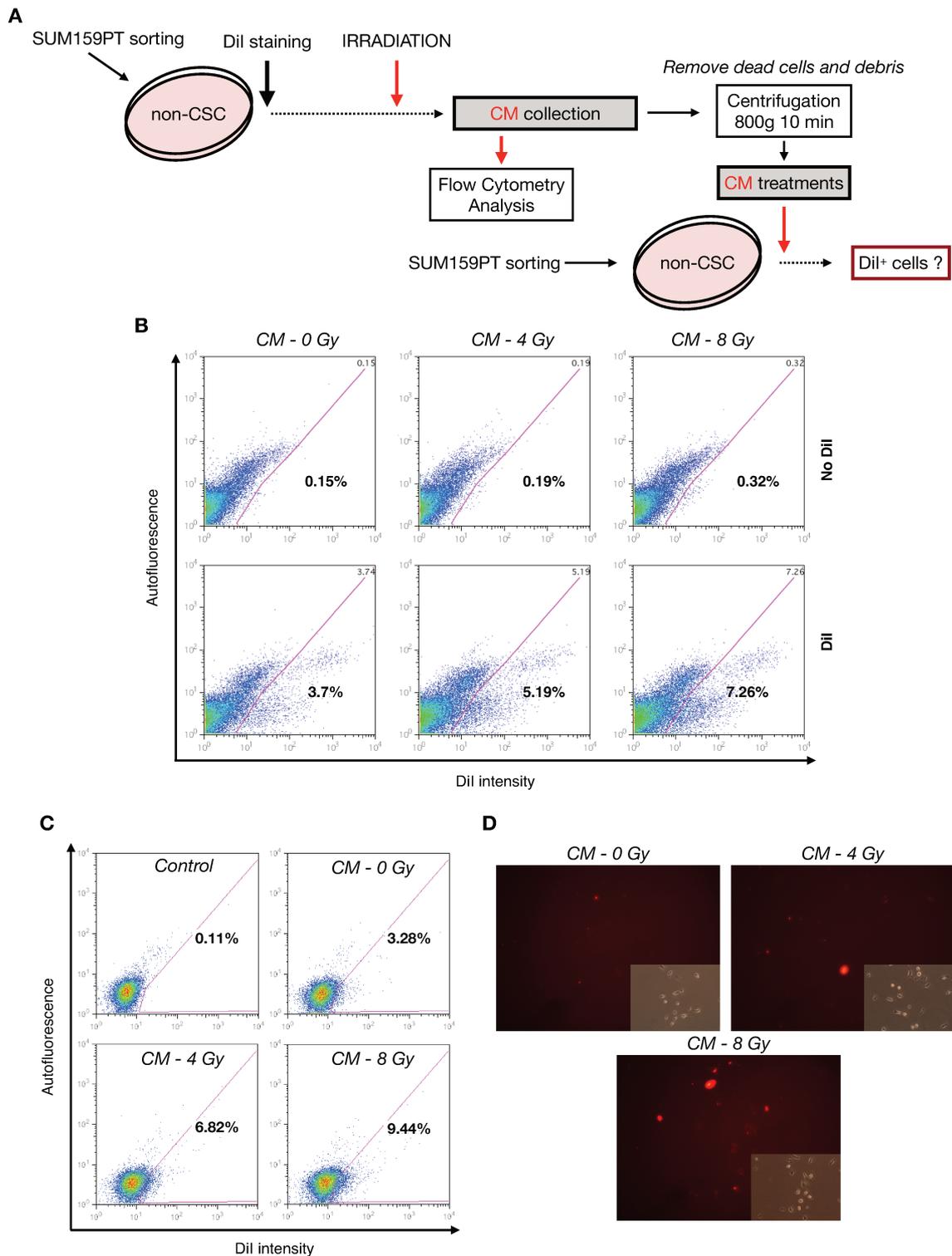


Figure 65. Etude préliminaire de l'absorption des VEC par les non-CSC traitées.

Les SUM159PT ALDH⁻ ont été triées, ensemencées et irradiées 24 heures plus tard. Comme décrit en (A) les cellules sont marquées au Dil. Le CM est collecté 5 jours après irradiation, puis centrifugé pour éliminer les débris cellulaires et analysé en cytométrie de flux. (B) Analyse des CM issues de cellules marquées au Dil au cytomètre de flux. Le CM est ensuite utilisé en traitements sur des non-CSC fraîchement triées. Vingt-quatre heures après traitements, la présence de cellules Dil⁺ est analysée par cytométrie de flux (C) et par microscopie Nikon Eclipse Ti, objectif 10x (D). n=1.

DISCUSSION
&
PERSPECTIVES

DISCUSSION & PERSPECTIVES

De nombreux progrès ont été effectués dans le domaine des CSC depuis leur première identification en 1997 (Bonnet et Dick). Il n'existe cependant pas de marqueur universel et la mise en évidence de la plasticité des cellules cancéreuses ainsi que d'un modèle de développement tumoral bidirectionnel a rendu l'étude des CSC plus complexes. Bien qu'elle n'ait pas encore été prouvée *in vivo*, la découverte de la reprogrammation de non-CSC en CSC induite par les radiations ionisantes pourrait expliquer en partie les phénomènes de récurrences et de résistances aux traitements. Dans le cancer du sein en particulier, malgré une bonne prise en charge de la tumeur primaire, la survie globale diminue drastiquement dans le cas de récurrences locales ou de métastases. La compréhension des mécanismes qui peuvent donner naissance à ces rechutes et ces résistances est essentielle pour améliorer l'efficacité des traitements existants.

Dans ce contexte, le but de ma thèse a été d'identifier des mécanismes responsables de la reprogrammation de non-CSC en CSC dans le cancer du sein. Ce domaine demeure peu exploré et les mécanismes à l'origine de cette reprogrammation restent méconnus. J'ai donc débuté ce travail par une approche globale, avec de nombreuses pistes d'exploration. J'ai pu mettre en évidence le rôle des chimiokines CXCL1 et CCL5 dans la reprogrammation radio-induite. Nous reviendrons donc dans un premier temps sur l'implication *in vitro* des chimiokines et de leurs récepteurs dans la reprogrammation et le rétro-contrôle de la population CSC. Nous discuterons également de la reprogrammation *in vivo* en nous intéressant aux résultats obtenus grâce à l'étude des xénogreffes et des analyses cliniques. Enfin, plusieurs pistes seront abordées quant à la poursuite du projet et l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

I. Mise en place de l'étude de la reprogrammation

Pour étudier la reprogrammation, il a été nécessaire de pouvoir identifier, quantifier et isoler les CSC. La difficulté de mon travail a reposé sur l'étude d'une population relativement rare. Il n'y a pas de marqueur universel de CSC, et il existe une importante hétérogénéité de distribution des marqueurs identifiés à ce jour dans les différentes lignées cellulaires cancéreuses mammaires. La combinaison de marqueurs CD44⁺/CD24⁻ par exemple, varie beaucoup selon la lignée étudiée. En effet, ce marqueur caractériserait plutôt des cellules de type basal, et correspond à presque 100% de la population totale dans des lignées triple négatives, telles que notre lignée d'étude, les SUM159PT (Fillmore et Kuperwasser, 2008). Nous avons choisi d'utiliser l'activité enzymatique de l'ALDH comme marqueur de CSC. En effet, l'enzyme ALDH possède une forte activité dans les cellules souches normales et cancéreuses mammaires (Ginestier *et al.*, 2007). Les cellules ALDH⁺ issues de prélèvements mammaires normaux humains présentent une formation de sphères et une clonogénicité accrue, ainsi que l'expression de marqueurs de surface propres aux cellules progénitrices. De la même manière, les cellules ALDH⁺ provenant d'échantillons de cancers du sein montrent une tumorigénicité accrue lorsqu'injectées en souris immunodéficientes. Enfin, l'expression de la protéine ALDH1 dans les tumeurs corrèle avec une survie globale diminuée (Ginestier *et al.*, 2007).

L'activité enzymatique ALDH peut donc être considérée comme un bon marqueur de CSC et nous pouvons ainsi détecter 2 à 3% de cellules ALDH⁺ dans notre modèle d'étude, la lignée SUM159PT. Cette lignée a été choisie pour son bon pourcentage de reprogrammation après irradiation, comme précédemment décrit par Lagadec *et al.* (2012). Il était important d'avoir suffisamment de iCSC après irradiation pour pouvoir étudier les mécanismes à l'origine de la reprogrammation. J'ai pu voir que d'autres lignées, comme les MDA-MB-231, présentent moins de 0,5% de cellules ALDH⁺ et une induction de CSC moins élevée que dans les SUM159PT après irradiation.

Néanmoins, la seule étude d'un marqueur de CSC, tel que l'ALDH, n'est pas suffisante et doit être complétée par l'utilisation d'un test fonctionnel. Pour cela, nous avons analysé à chaque expérience la capacité de formation de sphères des cellules, après différents traitements. Les CSC possèdent en effet la capacité de croître en l'absence d'ancrage. En théorie, une sphère est formée à partir d'une seule cellule, qui peut être une cellule souche ou une cellule progénitrice (Dontu *et al.*, 2003 ; Ponti *et al.*, 2005). Nous avons montré que les radiations ionisantes affectaient fortement la capacité de formation de sphères. Cependant, après quatre générations, nous avons observé une capacité de formation de sphères accrue dans les cellules irradiées par rapport aux cellules non irradiées. Lors de la première génération de sphères, les cellules sontensemencées en conditions non adhérentes 6 jours après le tri, soit 5 jours après irradiation en ce qui concerne les cellules irradiées. Celles-ci sont donc toujours affectées par les radiations ionisantes et on observe un ralentissement de la croissance cellulaire, avec 40 à 60 % de mortalité parmi les cellules irradiées. Ceci peut donc expliquer la baisse initiale de capacité à former des sphères par rapport aux cellules non irradiées. J'ai pu d'ailleurs observer un effet immédiat du milieu conditionné issu de cellules irradiées, dès la première génération de sphères. J'ai aussi étudié la formation de sphères après irradiation jusqu'à la septième génération, sans observer d'enrichissement en CSC. En effet, la culture en conditions non adhérentes n'entraîne pas nécessairement d'expansion de la population CSC (Calvet *et al.*, 2014) en fonction de la lignée étudiée. La relevance de ce test peut ainsi dépendre du contexte cellulaire et des traitements appliqués.

Nous avons également pu nous apercevoir lors de l'utilisation du mélange de cellules natives et de cellules Stb⁺ que les sphères étaient formées d'un mélange des deux populations. Les sphères ne résultent donc pas forcément d'une cellule unique. Des cellules ou des sphères déjà formées peuvent s'agréger entre elles : le nombre de sphères est alors sous-évalué. Au laboratoire, nous avons étudié la formation de sphères en effectuant la moyenne de plusieurs dilutions cellulaires, limitant ainsi la sous-évaluation de la capacité de formation de sphères. Cependant, nous essayons

également de mettre en place un système de micro-puits, permettant d'isoler les cellules, et ainsi d'avoir réellement une sphère issue d'une seule cellule.

Il serait intéressant d'étudier la tumorigénicité des CSC induites par les traitements au CM et aux chimiokines, *in vivo*. En effet, il s'agit du meilleur test fonctionnel permettant d'étudier la capacité d'un petit nombre de cellules à former une tumeur.

II. Reprogrammation radio-induite : rôle des chimiokines et de leurs récepteurs

1. Rétro-contrôle des cellules ALDH⁺ par les chimiokines ?

Mes travaux de thèse ont mis en évidence le rôle des chimiokines et de leurs récepteurs dans la reprogrammation radio-induite. Nous avons ainsi montré que le milieu conditionné de non-CSC irradiées induit la reprogrammation en CSC de non-CSC non irradiées. Grâce à l'étude de ce milieu conditionné, j'ai mis en évidence la sécrétion spécifique de chimiokines après irradiation, dont CXCL1 et CCL5. Le profil de sécrétion détecté par test ELISA montre une augmentation progressive de la concentration de CXCL1, tous les jours après irradiation. Le maximum de sécrétion dans la condition irradiée est atteint 5 jours après irradiation, ce qui correspond également au pic de reprogrammation. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette observation : soit ces chimiokines sont des effecteurs directs de la reprogrammation et entraînent l'induction de CSC, soit elles sont sécrétées en parallèle et sont la signature des cellules reprogrammées. Nous observons cependant que l'inhibition par anticorps neutralisants de CXCL1 et CCL5 diminue l'induction d'iCSC par les radiations ionisantes. Il semblerait donc que ces chimiokines agissent directement en induisant la reprogrammation. Les résultats préliminaires que j'ai pu obtenir au laboratoire montrent que les CSC ALDH⁺ isolées après tri sécrètent également un cocktail de cytokines et de chimiokines, en parallèle de leur différenciation et en l'absence d'irradiation. Parmi ces chimiokines, on retrouve CXCL1 et CCL5. Ces chimiokines pourraient donc être liées à la plasticité des cellules cancéreuses, dans le

sens de la différenciation comme de la dédifférenciation. Cette observation nous amène à l'hypothèse de rétro-contrôle de la population CSC par les chimiokines.

Par la suite, nous avons montré que des traitements par ces chimiokines induisent une augmentation de la formation de sphères ainsi qu'une faible induction de CSC ALDH⁺ par CXCL1, alors que l'inhibition de CXCL1 et CCL5 entraîne une diminution de la reprogrammation. Ces résultats suggèrent donc un rôle direct des chimiokines dans la reprogrammation. Cependant, l'absence d'effet additionnel de co-traitements dans la reprogrammation. Cependant, l'absence d'effet additionnel de co-traitements sur la reprogrammation d'une part, et l'absence d'effet des traitements sur la population totale d'autre part, appuient également notre hypothèse de rétro-contrôle de la population CSC.

Lagadec *et al.* avaient d'ailleurs montré que la présence de CSC initiales (distinguable grâce à une fluorescence rouge) induisait une diminution de la reprogrammation après irradiation dans la population non-CSC (Lagadec *et al.*, 2012). Il est nécessaire de confirmer nos observations. Tout d'abord, la sécrétion de chimiokines par les cellules ALDH⁺ dont CXCL1 et CCL5 sera confirmée par une répétition de la puce à protéines ainsi que par test ELISA. Je propose également d'étudier l'effet des chimiokines CXCL1 et CCL5 ou de leur inhibition sur la différenciation des cellules ALDH⁺ isolées, au cours du temps. Il serait également intéressant de voir si le CM issu de cinq jours de culture de cellules ALDH⁺ isolées peut avoir un quelconque effet sur la reprogrammation.

2. Expression des récepteurs et population reprogrammable

L'implication des chimiokines dans la reprogrammation nous a poussé à nous questionner sur l'existence d'une population "reprogrammable", c'est-à-dire des non-CSC ALDH⁻ qui seraient plus sensibles à un signal inducteur. Selon notre hypothèse, ces cellules particulières deviendraient des iCSC ALDH⁺ après irradiation. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que les cellules exprimant les récepteurs de chimiokines pourraient constituer cette population reprogrammable. J'ai étudié l'expression membranaire de récepteurs de chimiokines dans plusieurs lignées. Les

cellules positives pour CCR1 (récepteur de CCL5), CXCR2 (récepteur de CXCL1) et CXCR3 (récepteur de CXCL9) représentaient une population faible, comprise entre 0,5 et 5% de la population totale, ce qui correspond au taux de reprogrammation. J'ai donc étudié la capacité de reprogrammation des cellules positives pour au moins un de ces récepteurs en comparaison des cellules négatives pour ces récepteurs. J'ai pu voir que les cellules qui exprimaient au moins un récepteur (CXCR2 et/ou CXCR3) avaient tendance à mieux reprogrammer, par rapport aux cellules négatives pour l'expression des trois récepteurs. Cependant, nous nous sommes aperçus de l'importante plasticité d'expression de ces récepteurs à la membrane : les cellules négatives réexpriment les récepteurs très rapidement à la membrane après le tri. Cette labilité d'expression ne nous permet pas de confirmer que ce sont les cellules qui expriment les récepteurs à la membrane qui sont reprogrammées. Il serait intéressant d'inhiber complètement leur expression. Ainsi, des KO spécifiques pour chaque récepteur pourraient nous permettre de voir si un récepteur est essentiel dans le processus de reprogrammation.

Le récepteur CCR5, dont CCL5 est un ligand, est exprimé dans une plus large population (10 à 20% de la population totale). J'ai donc étudié son implication dans un second temps, séparément des autres récepteurs. La différence de reprogrammation entre les populations ALDH⁻ CCR5⁺ et ALDH⁻ CCR5⁻ est beaucoup plus marquée. Ce résultat nous pousse à croire que la population reprogrammable est comprise au sein des cellules ALDH⁻ CCR5⁺. Pour vérifier l'implication de CCR5 dans la reprogrammation, je propose de traiter spécifiquement la population ALDH⁻ CCR5⁺ au Maraviroc, inhibiteur de CCR5, et à l'anticorps neutralisant anti-CCL5, en combinaison de l'irradiation.

D'autre part, la population CCR5⁺ pourrait correspondre à des CSC : une autre équipe a montré que les cellules CCR5⁺ dans la lignée SUM159PT correspondaient à des CSC formant plus de sphères, et plus de tumeurs *in vivo* (Jiao *et al.*, 2018). Ils n'ont cependant pas effectué de co-marquage Aldefluor, contrairement à notre étude. J'ai d'ailleurs pu montrer que les cellules ALDH⁻ CCR5⁺ et ALDH⁻ CCR5⁻ ne

présentent pas de différences quant à leur capacité à former des sphères. En l'absence d'une induction, comme les radiations ionisantes, les cellules ALDH⁻ CCR5⁺ ne définissent donc pas une population de CSC.

Il serait également intéressant d'étudier la capacité de reprogrammation en fonction de l'expression de chaque récepteur, séparément, pour CCR1, CXCR2 et CXCR3, comme nous l'avons fait pour CCR5.

3. Identification de voies de signalisation impliquées dans la reprogrammation

D'autres thérapies, notamment certaines chimiothérapies, induisent également la sécrétion de facteurs solubles impliqués dans la biologie des CSC. Dans le cancer du sein, il a été décrit que le milieu conditionné de cellules cancéreuses traitées au paclitaxel entraînait un enrichissement en marqueurs de CSC dans des cellules non traitées. Ce milieu comporte des chimiokines, telles que CCL2 et CXCL8, dont la sécrétion est augmentée, même après retrait de la chimiothérapie. Ces chimiokines pro-inflammatoires induisent l'activation des voies Wnt/ β -caténine et NF- κ B, qui induisent à leur tour la sécrétion de chimiokines (Jia *et al.*, 2017). Les auteurs n'étudient cependant pas la reprogrammation mais seulement l'enrichissement de la population de CSC.

Il serait intéressant pour la poursuite du projet d'étudier la signalisation sous-jacente, induite par les chimiokines, qui pourrait être à l'origine de la reprogrammation. Nous avons vu dans l'introduction que la voie IL-6/NF- κ B pouvait participer à l'induction de CSC (Saha *et al.*, 2016). Nous pourrions ainsi étudier la voie NF- κ B lors de la reprogrammation radio-induite et après traitements aux chimiokines. D'autres voies de signalisation pourraient être impliquées, notamment la voie PI3K/AKT (Korkaya *et al.*, 2009) et la voie JAK2/STAT3 (Marotta *et al.*, 2011). En particulier, dans le cancer du poumon, la voie STAT3 est plus activée dans la population de cellules ALDH⁺ par rapport aux cellules ALDH⁻ et régule l'activité de l'enzyme ALDH1A3 (Shao *et al.*, 2014). Kim *et al.* montrent également que la voie STAT3, activée par IL-6, active l'expression du gène *OCT4* dans des non-CSC mammaires.

De plus, les auteurs observent une sécrétion de CXCL1 augmentée dans des non-CSC cultivées en conditions non adhérentes par rapport à des non-CSC cultivées en monocouche. Ils n'ont cependant pas étudié l'implication de CXCL1 dans l'acquisition d'un phénotype souche (Kim *et al.*, 2013).

J'ai par ailleurs analysé par phospho-kinase array le profil de phosphorylation de kinases ainsi que leurs protéines cibles (données non montrées). Ces résultats sont préliminaires, et montrent une induction de la phosphorylation de STAT3 au niveau des résidus Y705 et S727 6 heures après irradiation et traitement au CM issu de non-CSC irradiées. Ces résultats doivent être confirmés. Il est cependant difficile d'étudier les modifications qui affectent une sous-population rare (iCSC) au sein d'une population globale.

Jiao et collaborateurs ont montré que l'effet de CCR5, dont l'expression définirait une population CSC, passe par l'induction de voies de réparation de l'ADN, associée à une meilleure survie aux agents génotoxiques (Jiao *et al.*, 2018). Dans le cancer de l'œsophage, la sécrétion de CXCL1 protège les cellules cancéreuses de la radiothérapie en activant également des voies de réponse aux dommages à l'ADN (Zhang *et al.*, 2017a). Il serait donc intéressant d'évaluer la capacité d'induction des voies de réparation de l'ADN dans les cellules à l'origine des CSC induites par l'irradiation. Il pourrait ainsi exister une population de cellules possédant une meilleure capacité d'activation de ces voies et qui serait donc plus à même de reprogrammer.

4. Rôle potentiel de la sénescence

En réponse aux dommages à l'ADN, la cellule peut également entrer en sénescence. Cet arrêt permanent dans le cycle cellulaire est associé à la sécrétion d'un cocktail de protéines particulières, appelé SASP (*Senescence-Associated Secretory Phenotype*) (Sabin et Anderson, 2011). On y retrouve notamment des chimiokines, telles que CXCL1, CXCL8, CCL3, CCL5, CCL20 et des cytokines telles que l'IL-6 (Coppé *et al.*, 2010). Ce SASP peut également être associé à l'induction de

CSC. Dans le myélome multiple, les CSC CD138^{low} sont induites par des stress génotoxiques (radiothérapie et chimiothérapie). Les cellules sénescents non-CSC, qui ont subi le même stress génotoxique, sécrètent un SASP composé notamment de CCL5 et CXCL10, qui entraînent l'émergence de CSC CD138^{low} (Cahu *et al.*, 2012). De manière intéressante, les CSC induites ne proviennent pas des cellules sénescents, mais répondent à leur stimuli. Lagadec *et al.* ont montré que les non-CSC entraînent en sénescence après irradiation, alors que les CSC résistent à la sénescence radio-induite (Lagadec *et al.*, 2010).

Une autre étude montre qu'une exposition courte au SASP promeut la plasticité cellulaire et la réexpression de marqueurs de cellules souches normales dans un modèle d'induction de la sénescence dans des kératinocytes (Ritschka *et al.*, 2017). Il serait intéressant de voir si la sécrétion de CXCL1 et CCL5 après irradiation correspond au SASP, et si c'est ce dernier qui entraîne l'induction de CSC après irradiation.

III. Potentiel thérapeutique du ciblage de la reprogrammation

Au cours de ma thèse, nous avons souhaité valider l'implication des chimiokines dans la reprogrammation *in vivo*. De manière à être au plus proche d'un contexte clinique et conserver l'hétérogénéité des cellules cancéreuses, les cellules n'ont pas été triées avant injection en souris : nous avons donc étudié l'effet de l'inhibition de CXCL1 et CCL5 sur l'enrichissement en CSC après irradiation dans un modèle murin de xénogreffes. Nous avons analysé différents paramètres à propos desquels nous allons discuter.

1. Croissance tumorale

Premièrement, la croissance tumorale a été évaluée au cours du temps, en fonction des différents traitements (anticorps isotypiques, anti-CXCL1, anti-CCL5 ou les deux ; irradiation ou non). Si l'on ne s'intéresse qu'aux trois premiers traitements, on observe qu'il n'y a pas de différence entre les trois conditions, et que la croissance

tumorale présente la même évolution. Ce résultat suggère que les traitements simples antiCXCL1 et antiCCL5 n'ont pas d'effet sur le volume tumoral. On peut tout de même noter que le traitement antiCXCL1 semble empêcher la reprise de la croissance tumorale jusqu'à la fin du suivi lorsqu'il est combiné à la radiothérapie.

D'autres équipes avaient montré que l'inhibition de CCL5 ou de CXCL1 entraînait une perte de la croissance tumorale (Cambien *et al.*, 2011 ; Wang *et al.*, 2006). Cependant, ces deux études ont été effectuées dans le cancer colorectal, et la simple différence de modèles étudiés pourrait expliquer que nous n'ayons pas eu le même effet.

En revanche, la co-inhibition de CXCL1 et CCL5 est associée à une croissance tumorale plus importante par rapport aux autres conditions. Ces résultats sont assez étonnants, cependant, les souris ont survécu plus longtemps et dans de meilleures conditions, malgré la croissance tumorale continue.

Les chimiokines sont d'importants effecteurs du système immunitaire, qui vont notamment recruter les cellules immunitaires aux sites d'inflammation (Balkwill, 2004). CXCL1, produite par les macrophages, est impliquée dans le recrutement de neutrophiles aux sites d'inflammation (Filippo *et al.*, 2013). CCL5 participe quant à elle au recrutement de macrophages, lymphocytes T, éosinophiles, basophiles et cellules NK (Aldinucci et Colombatti, 2014). Notre expérience a été effectuée en souris SCID, qui ne présentent pas de lymphocytes T ou B, mais qui possèdent quand même cellules NK et macrophages. Le recrutement de cellules NK au sein de la tumeur a été corrélé à un gain de survie dans de nombreux types de cancer (Larsen *et al.*, 2014). Les chimiokines CXCL1 et CCL5 pourraient donc également jouer un rôle anti-tumoral en agissant sur le microenvironnement tumoral, indépendamment ou en parallèle de leur action sur la reprogrammation cellulaire et les CSC. Ceci pourrait expliquer l'effet observé du co-traitement antiCXCL1 et antiCCL5 sur la croissance des xénogreffes dans notre expérience.

Il serait de fait très intéressant de compléter l'expérience *in vivo* par l'étude de l'infiltration de macrophages et de cellules NK dans les xénogreffes par des

marquages spécifiques comme par exemple le CD68 et le CD335 (NKp46) respectivement. J'ai conservé et fixé les tumeurs, qui peuvent ainsi être marquées en immunohistochimie. L'utilisation d'un modèle murin de développement tumoral nous permettrait de mieux appréhender ces variations du microenvironnement. Nous pourrions par exemple utiliser le modèle de souris C3(1)/Tag-sSHIP:GFP (*Green Fluorescent Protein*), qui développent spontanément et de manière prédictible des tumeurs mammaires et dont les CSC expriment spécifiquement la protéine GFP (Travaux de thèse du Dr Tian de l'unité CNRS UMR8161, en collaboration avec notre équipe).

2. Survie sans métastases

Les analyses de la survie des souris selon les différents traitements administrés ont montré des résultats très intéressants : la combinaison de l'irradiation et du co-traitement antiCXCL1 et antiCCL5 induit un réel gain de survie. De plus, l'expression génique de chimiokines ou récepteurs est corrélée à des tumeurs plus agressives, ainsi qu'à la MFS pour certains récepteurs, dans des échantillons de patientes atteintes de cancers du sein. L'étude de la MFS est particulièrement intéressante dans le cancer du sein, puisque la survenue de métastases affecte fortement la survie des patientes. Ainsi, l'expression forte de CCR1, récepteur de CCL5, est associée à une MFS diminuée, lorsqu'elle est combinée à une faible expression de CCL5 et CCR5. A l'inverse, la forte expression de CCR5 combinée à la faible expression de CCR1 et CCL5 est corrélée à un gain de survie sans métastases. D'autre part, nous avons observé un gain de survie associé à l'expression de CCL5, CCR1 et CCR5 dans les tumeurs triple négatives notamment. Ces résultats pourraient également être expliqués par la modulation du microenvironnement tumoral par les chimiokines. Il serait intéressant d'étudier la corrélation de l'expression des chimiokines et récepteurs avec l'infiltration de cellules immunitaires dans les tumeurs. L'étude de la survie globale pourrait également apporter des informations supplémentaires sur le rôle des chimiokines et de leurs récepteurs. De plus, seules des signatures géniques

ont été étudiées ; il serait donc intéressant de vérifier la corrélation entre la survie des patientes et la détection de chimiokines et leurs récepteurs dans les tumeurs associées, au niveau protéique, par marquage immunohistochimique et valider leur expression au niveau des cellules cancéreuses.

Les chimiokines sont également impliquées dans la mise en place de métastases à des sites spécifiques (Zlotnik *et al.*, 2011). Nous avons donc voulu étudier la survenue de métastases dans les souris xénotreffées. Cependant, très peu de métastases étaient détectables par qPCR. Une partie de chaque organe a été fixée afin de réaliser des marquages en immunohistochimie. Ceux-ci pourraient donc permettre de visualiser des métastases qu'on ne pouvait détecter par qPCR.

3. Enrichissement en CSC

L'un des objectifs de l'expérience *in vivo* était d'étudier l'impact de l'inhibition de CXCL1 et CCL5 sur la population CSC présente dans la tumeur. En effet, la reprogrammation de non-CSC en CSC n'a pas encore été démontrée *in vivo* et nous manquons d'outils permettant cette démonstration. Le rôle de l'inhibition de CXCL1 et CCL5 sur l'enrichissement en CSC *in vivo* n'avait jamais été étudié. J'ai donc analysé plusieurs paramètres, dont l'activité enzymatique de l'ALDH par cytométrie de flux, l'expression protéique de OCT4, SOX2 et NANOG par cytométrie de flux ainsi que l'expression génique de *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* et *ALDH1A1* par qPCR. L'étude de l'activité de l'enzyme ALDH n'a pas été pas très concluante. Les pourcentages de cellules ALDH⁺ restent très faibles après irradiation, inférieurs à 2%, excepté à J7 pour la condition antiCXCL1 + antiCCL5. La condition antiCXCL1 + antiCCL5 était la seule condition où nous avons pu observer une diminution forte du pourcentage de cellules ALDH⁺ à J14, par rapport à l'augmentation induite par la radiothérapie à J7. Il est cependant compliqué de conclure quant à un effet du double traitement sur l'enrichissement en CSC. Nous avons beaucoup de mortalité des cellules lors de l'expérience, ce qui pourrait expliquer ce résultat. En revanche, l'analyse de l'expression protéique des facteurs associés à la pluripotence, OCT4,

SOX2 et NANOG, s'est révélée plus intéressante. J'ai calculé pour chaque condition le ratio du pourcentage de cellules positives à 5*3 Gy sur le pourcentage de cellules positives à 0 Gy. Ce ratio a ensuite été centré sur 0, de sorte que les valeurs positives représentent un enrichissement en cellules positives. Nous avons ainsi pu voir que dans la condition isotypique à J7, il y a un enrichissement en cellules OCT4+, SOX2+ et NANOG+ alors que les simples traitements et le co-traitement entraîne une diminution de la proportion de cellules positives, avec un ratio inférieur à 0. Enfin, l'analyse par qPCR de *ALDH1A1* a montré à J14 une diminution de son expression après inhibition de CCL5 ou co-inhibition de CXCL1 et CCL5.

Ces résultats restent sommaires et constituent une étude préliminaire sur l'enrichissement en CSC *in vivo*, qui sera poursuivie au sein du laboratoire. En effet, notre équipe développe un vecteur rapporteur de reprogrammation, qui permettra d'identifier les CSC des non-CSC et surtout des CSC induites après reprogrammation. Ce vecteur servira à développer un modèle murin de tumorigenèse mammaire comprenant ce rapporteur de reprogrammation. Il devrait ainsi nous permettre de mettre en évidence la reprogrammation *in vivo*, et de compléter l'étude sur le rôle des chimiokines dans cette reprogrammation.

Nous avons également vu dans l'étude des bases de données cliniques que l'expression des chimiokines et récepteurs était corrélée à des signatures géniques de CSC dans des échantillons de patientes atteintes de cancers du sein. Ces résultats viennent appuyer l'importance des chimiokines dans la biologie des CSC. Au vu de l'ensemble de nos résultats, les chimiokines, ainsi que leurs récepteurs, pourraient constituer des cibles thérapeutiques d'intérêt, venant compléter les thérapies conventionnelles. Cependant, les effets sur le microenvironnement de l'inhibition des chimiokines devront être évalués.

IV. Perspectives - Les vésicules extracellulaires, inducteurs potentiels de la reprogrammation

Le milieu conditionné peut être composé de nombreux facteurs, dont des protéines et des acides nucléiques. Les VEC forment également une composante importante du CM. Elles peuvent elles-même contenir des facteurs spécifiques, dont des protéines, des lipides et des acides nucléiques (Raposo et Stoorvogel, 2013). Je me suis donc intéressée aux VEC produites après irradiation et à leur rôle potentiel dans la reprogrammation. J'ai obtenu des résultats préliminaires dont l'étude est actuellement poursuivie par d'autres membres de notre équipe. Les VEC présentent un intérêt particulier dans l'étude de la reprogrammation radio-induite pour plusieurs raisons. Comme présenté dans l'introduction, les VEC peuvent être à l'origine des effets indirects des radiations ionisantes, définis comme les effets *bystander* agissant à distance sur des cellules non irradiées (Jella *et al.*, 2014 ; Xu *et al.*, 2015c ; Szatmari *et al.*, 2017). De plus, les radiations ionisantes peuvent affecter fortement et spécifiquement la quantité de VEC produites ainsi que leur contenu (Jelonek *et al.*, 2016). D'autres stimuli, induisant également la reprogrammation, peuvent influencer la production de VEC par les cellules : l'hypoxie peut ainsi induire une production accrue de VEC (Zhang *et al.*, 2012b ; Wang *et al.*, 2014c) de même que des inhibiteurs de HDAC (Xiao *et al.*, 2013). Enfin, Katsman et collaborateurs ont montré que les ARN et miARN véhiculés par des VEC issues de cellules souches embryonnaires entraînent une dédifférenciation de cellules de la rétine, accompagnée d'une réexpression de facteurs associés à la pluripotence tels que SOX2 et OCT4 (Katsman *et al.*, 2012). Une autre équipe a pu montrer que des VEC produites par les cellules tumorales ont la capacité d'induire un phénotype de CSC dans des cellules murines non cancéreuses de type iPSC (Yan *et al.*, 2014). L'ensemble de ces données nous ont poussé à nous intéresser à ces VEC dans l'étude de la reprogrammation.

Les résultats que j'ai pu obtenir sont préliminaires et montrent une induction de la reprogrammation par les VEC issues de non-CSC irradiées. Cela implique que ces VEC contiennent des facteurs spécifiques induisant la reprogrammation. J'ai

également pu voir que les VEC étaient bien absorbées par les cellules traitées. De nombreuses analyses restent à réaliser. Dans un premier temps, il sera nécessaire d'identifier précisément quel type de VEC est impliqué dans le processus de reprogrammation. On peut en effet distinguer trois classes de VEC : les microvésicules, les exosomes et les corps apoptotiques dont les principaux critères de distinction reposent sur la taille et la biogenèse de ces vésicules (Colombo *et al.*, 2014). Des analyses en microscopie électronique permettront de visualiser la production de VEC après irradiation. De plus, les protéines de surface exprimées spécifiquement par les différents types de VEC nous permettront d'identifier par western blot quels types de VEC sont produits par l'irradiation.

Dans un second temps, il sera intéressant d'analyser le contenu des VEC. Nous pourrons d'une part étudier le contenu protéique des vésicules. D'autre part, l'analyse du contenu en ARNm et micro-ARN (miR) me paraît particulièrement intéressant. En effet, plusieurs études ont démontré le rôle de miR dans l'action des VEC. Xu *et al.* ont montré que les exosomes propagent les effets de l'irradiation (effet *bystander*) grâce au miR-21, présent dans les exosomes et responsable d'une activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN (Xu *et al.*, 2015c). Nous avons vu précédemment que ces voies de réparation pouvaient être impliquées dans la biologie des CSC, qui présentent une meilleure capacité de réparation de l'ADN. D'autres miR, comme le miR-1587, peuvent induire une tumorigénicité accrue dans des cellules cancéreuses de gliome (Figuerola *et al.*, 2017). Le miR-196b-5p, véhiculé par les exosomes, induit également un phénotype de CSC dans des cellules de cancer colorectal, associé à une activation de la voie STAT3 (Ren *et al.*, 2017). De la même manière, les microvésicules produites par les CAF induisent une résistance à l'hormonothérapie associée à l'acquisition d'un phénotype ER⁻ et à la génération de CSC CD133⁺ dans des modèles de cancers du sein de type luminal. Ces VEC contiennent notamment le miR-221 et les auteurs montrent que la voie IL-6/STAT3 est responsable de la genèse de ces VEC contenant ce miR (Sansone *et al.*, 2017). Ces

deux études sont particulièrement intéressantes, puisque la voie STAT3 peut également être activée par les chimiokines.

Une étude récente montre que les exosomes produits par la moelle osseuse de souris irradiées entraînent une réponse inflammatoire dans des souris non irradiées et traitées avec ces mêmes exosomes. Cette réponse inflammatoire est accompagnée de la sécrétion dans le sang de plusieurs chimiokines, dont CCL5, CCL11 et CXCL16 (Szatmari *et al.*, 2018). Il serait donc intéressant pour la poursuite du projet de regarder si les traitements aux VEC issues de cellules irradiées induisent la sécrétion de chimiokines.

V. Perspectives - Rôle du stress oxydant dans la biologie des CSC et dans la reprogrammation

Au cours de ma thèse, j'ai étudié l'impact des rayons ionisants sur la reprogrammation de non-CSC en CSC dans le cancer du sein. Les effets de la radiothérapie passent par l'endommagement de l'ADN, dont les bases peuvent être directement excitées par les rayons ionisants. De manière indirecte, l'irradiation va également induire la génération de ROS, qui à leur tour, vont endommager les acides nucléiques, les protéines et les lipides. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, des systèmes anti-oxydants sont mis en place par la cellule, tels que la SOD, la catalase ainsi que les glutathions peroxydases. Ils peuvent être à l'origine de mécanismes de résistances (Zhou *et al.*, 2014). Au laboratoire, nous avons pour projet d'étudier l'implication des ROS dans la reprogrammation. En effet, les MaSC épithéliales ainsi que les CSC présentent des niveaux de ROS plus faibles que les cellules différenciées, normales ou cancéreuses, ainsi qu'une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse du GSH aux fonctions antioxydantes (Diehn *et al.*, 2009). Il serait donc intéressant dans un premier temps de mesurer la quantité de ROS produites après reprogrammation, en comparant la population non-CSC et la population iCSC. Dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire PhLAM (Physique des Lasers, Atomes et Molécules), je vais utiliser la sonde HyPer (*Hydrogen peroxide sensor*) qui détecte les niveaux de H₂O₂

intracellulaires, associée au vecteur rapporteur de CSC que notre équipe a développé. La génération de iCSC sera suivie par microscopie dans le temps, par *time lapse*. Nous pourrions ainsi voir s'il y a une corrélation entre le niveau de H₂O₂ dans les cellules et l'expression du rapporteur de CSC. En parallèle, d'autres sondes exogènes pourront être utilisées, telles que le DCFDA (*Dichlorofluorescein diacetate*) et le CellROX. Il serait également intéressant d'analyser l'effet d'un traitement au H₂O₂ sur la proportion de iCSC. Nous émettons en effet l'hypothèse que les ROS pourraient induire la reprogrammation. Dans les cellules souches normales, de nombreuses études font état de l'induction de la différenciation de ces cellules lors d'une exposition à une forte concentration de ROS (Ji *et al.*, 2010 ; Zhou *et al.*, 2014). A l'inverse, une étude réalisée sur les iPSC montre que la production de ROS est essentielle au processus de reprogrammation nucléaire. L'inhibition des enzymes NOX (*Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Oxydase*), sources de ROS, entraîne une diminution de l'efficacité de la reprogrammation en iPSC, mais une production trop importante de ROS diminue également la reprogrammation nucléaire (Zhou *et al.*, 2016c). Les ROS semblent donc avoir un rôle double, selon leur abondance : de faibles niveaux de ROS pourraient induire certains processus biologiques, alors que des niveaux importants de ROS constitueraient un stress oxydant délétère pour la cellule (Schieber et Chandel, 2014).

Nous avons également vu que la diminution de l'expression d'enzymes tels que la SOD peut conférer une radiorésistance aux cellules cancéreuses, dans un modèle de cancer de l'œsophage (Zhang *et al.*, 2017a). Dans cette étude en particulier, c'est CXCL1, sécrété par les CAF, qui induit une augmentation de ROS dans les cellules cancéreuses. Il existe donc un lien entre la sécrétion de chimiokines et la production de ROS, qui peut être induite par les chimiokines (Batra *et al.*, 2012 ; Jin *et al.*, 2014 ; Li *et al.*, 2014b). Il serait donc intéressant de voir si le traitement des non-CSC par CXCL1 et CCL5 induit la production de ROS. D'autre part, l'étude de mécanismes anti-oxydants, tels que l'expression de SOD, pourrait nous indiquer si les iCSC proviennent de non-CSC qui présentent une meilleure activation de voies permettant

de diminuer les ROS. Dans ce sens, il est important de noter que l'enzyme ALDH possède elle-même une activité anti-oxydante, en métabolisant les aldéhydes toxiques générées par le stress oxydant (Singh *et al.*, 2013b). Ainsi, l'induction de CSC ALDH⁺ après irradiation pourrait être le signe d'une meilleure résistance au stress oxydant (Xu *et al.*, 2015b).

Enfin, les ROS peuvent induire l'activation de voies de signalisation telles que NF- κ B, MAPK et PI3K/AKT (Hein *et al.*, 2014 ; Zhang *et al.*, 2016). Li *et al.* montrent également que le stress oxydant peut induire l'activation de la voie STAT3, qui induit elle-même la sécrétion de CCL2 par les CAF. CCL2 à son tour induit une augmentation du stress oxydant (Li *et al.*, 2014b). Ces résultats suggèrent donc l'existence d'une boucle d'auto-amplification entre CCL2 et les ROS, via la voie STAT3. L'étude de cette voie de signalisation, déjà discutée précédemment, semble donc particulièrement importante pour la suite du projet.

Pour conclure, l'ensemble de mes résultats de thèse ont permis la mise en évidence du rôle de chimiokines, CXCL1 et CCL5, dans la reprogrammation radio-induite de non-CSC en CSC dans le cancer du sein. Ainsi, la sécrétion de CXCL1 et CCL5 est induite par les radiations ionisantes. Ces chimiokines participent à l'acquisition de caractéristiques de CSC dans une population 100% non-CSC. Les radiations ionisantes modulent également l'expression des récepteurs de chimiokines, dont j'ai pu montrer l'implication dans la biologie des CSC. *In vivo*, l'inhibition de CXCL1 et CCL5 augmente la survie des souris xénotreffées. Enfin, l'analyse des données cliniques a révélé la corrélation entre l'expression des chimiokines et leurs récepteurs, et des signatures géniques de CSC ainsi que de sous-types de cancer du sein plus agressifs. Par ailleurs, j'ai débuté l'analyse de plusieurs autres mécanismes pouvant également jouer un rôle dans la reprogrammation, et qui ne sont pas nécessairement indépendants les uns des autres (Figure 66).

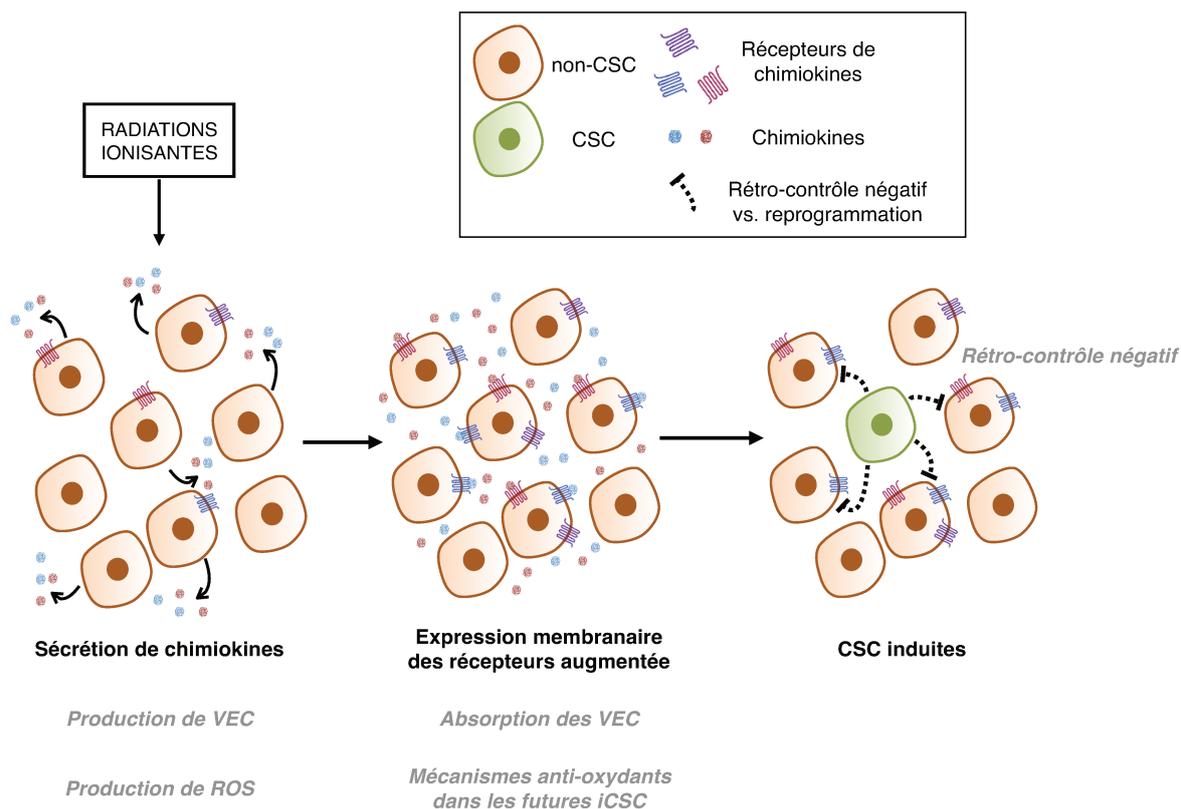


Figure 66. Mécanismes impliqués dans la reprogrammation radio-induite de non-CSC mammaires en CSC.

Les non-CSC triées sécrètent des chimiokines, dont CXCL1 et CCL5 après irradiation. L'irradiation induit également une augmentation de l'expression membranaire des récepteurs de chimiokines. Ces chimiokines et leurs récepteurs induisent enfin la reprogrammation de non-CSC en CSC. En gris, plusieurs pistes et hypothèses sont à étudier. Les VEC pourraient également participer à l'induction de CSC, de même que les ROS produites après irradiation. Des mécanismes anti-oxydants dans une sous-population particulière pourraient être à l'origine des cellules qui reprogramment. Enfin, il semblerait exister un rétro-contrôle négatif, nécessaire au maintien d'un faible pourcentage de CSC au sein de la population totale.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

ABLETT, M., O'BRIEN, C., SIMS, A., FARNIE, G., AND CLARKE, R. 2013. A differential role for CXCR4 in the regulation of normal versus malignant breast stem cell activity. *Oncotarget* 5, 3, 599–612.

ACHARYYA, S., OSKARSSON, T., VANHARANTA, S., ET AL. 2012. A CXCL1 Paracrine Network Links Cancer Chemoresistance and Metastasis. *Cell* 150, 1, 165–78.

AKISHIMA-FUKASAWA, Y., NAKANISHI, Y., INO, Y., MORIYA, Y., KANAI, Y., AND HIROHASHI, S. 2009. Prognostic Significance of CXCL12 Expression in Patients With Colorectal Carcinoma. *American Journal of Clinical Pathology* 132, 2, 202–10.

AL-MAYAH, A., IRONS, S., PINK, R., CARTER, D., AND KADHIM, M. 2012. Possible Role of Exosomes Containing RNA in Mediating Nontargeted Effect of Ionizing Radiation. *Radiation Research* 181, 6, 539–545.

ALDINUCCI, D. AND COLOMBATTI, A. 2014. The Inflammatory Chemokine CCL5 and Cancer Progression. *Mediators of Inflammation* 2014, 1–12.

ALLINEN, M., BEROUKHIM, R., CAI, L., ET AL. 2004. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell* 6, 1, 17–32.

AMANN, B., PERABO, F.G., WIRGER, A., HUGENSCHMIDT, H., AND SCHULTZE-SEEMANN, W. 1998. Urinary levels of monocyte chemo-attractant protein-1 correlate with tumour stage and grade in patients with bladder cancer. *British journal of urology* 82, 1, 118–21.

ANSELL, S., MAURER, M., ZIESMER, S., ET AL. 2012. Elevated pretreatment serum levels of interferon-inducible protein-10 (CXCL10) predict disease relapse and prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients. *American Journal of Hematology* 87, 9, 865–9.

ANSIEAU, S. 2013. EMT in breast cancer stem cell generation. *Cancer Letters* 338, 1, 63–8.

ARNOLD, A. AND PAPANIKOLAOU, A. 2005. Cyclin D1 in Breast Cancer Pathogenesis. *Journal of Clinical Oncology* 23, 18, 4215–24.

ASSELIN-LABAT, M.-L., SHACKLETON, M., STINGL, J., ET AL. 2006. Steroid Hormone Receptor Status of Mouse Mammary Stem Cells. *Journal of the National Cancer Institute* 98, 14, 1011–4.

ASSELIN-LABAT, M.-L., VAILLANT, F., SHERIDAN, J., ET AL. 2010. Control of mammary stem cell function by steroid hormone signalling. *Nature* 465, 7299, 798-802.

AUFFINGER, B., TOBIAS, A.L., HAN, Y., ET AL. 2014. Conversion of differentiated cancer cells into cancer stem-like cells in a glioblastoma model after primary chemotherapy. *Cell death and differentiation* 21, 7, 1119–31.

AVILION, A., NICOLIS, S., PEVNY, L., PEREZ, L., VIVIAN, N., AND LOVELL-BADGE, R. 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & Development* 17, 1, 126–40.

BACHELERIE, F., BEN-BARUCH, A., BURKHARDT, A.M., ET AL. 2014. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. *Pharmacological reviews* 66, 1, 1–79.

BAGGIOLINI AND LOETSCHER. 2000. Chemokines in inflammation and immunity. *Immunology today* 21, 9, 418–20.

BAGGIOLINI, M. 1998. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392, 6676, 565–8.

BAGGIOLINI, M. 2001. Chemokines in pathology and medicine. *Journal of internal medicine* 250, 2, 91–104.

BAI, L. AND ROHRSCHEIDER, L. 2010. s-SHIP promoter expression marks activated stem cells in developing mouse mammary tissue. *Genes & Development* 24, 17, 1882–92.

BAI, M., CHEN, X., AND BA, Y.I. 2016. CXCL10/CXCR3 overexpression as a biomarker of poor prognosis in patients with stage II colorectal cancer. *Molecular and clinical oncology* 4, 1, 23–30.

BAILEY, C., NEGUS, R., MORRIS, A., ET AL. 2007. Chemokine expression is associated with the accumulation of tumour associated macrophages (TAMs) and progression in human colorectal cancer. *Clinical & Experimental Metastasis* 24, 2, 121–30.

BĂLĂȘOIU, M., BĂLĂȘOIU, A.T., MOGOANTĂ, S.Ș., ET AL. 2014. Serum and tumor microenvironment IL-8 values in different stages of colorectal cancer. *Romanian journal of morphology and embryology*, 55, 2 Suppl, 575–8.

BALKWILL, F. 2004. Cancer and the chemokine network. *Nature reviews. Cancer* 4, 7, 540–50.

BAO, S., WU, Q., MCLENDON, R., ET AL. 2006. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444, 7120, 756–60.

BAPAT, S.A., MALI, A.M., KOPPIKAR, C.B., AND KURREY, N.K. 2005. Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer. *Cancer research* 65, 8, 3025–9.

BARAT, S., CHEN, X., BUI, K., ET AL. 2017. Gamma-Secretase Inhibitor IX (GSI) Impairs Concomitant Activation of Notch and Wnt-Beta-Catenin Pathways in CD44+ Gastric Cancer Stem Cells. *Stem Cells Translational Medicine* 6, 3, 819–29.

BASSE, C. AND AROCK, M. 2015. The increasing roles of epigenetics in breast cancer: Implications for pathogenicity, biomarkers, prevention and treatment. *International Journal of Cancer* 137, 12, 2785–94.

BATRA, S., CAI, S., BALAMAYOORAN, G., AND JEYASEELAN, S. 2012. Intrapulmonary Administration of Leukotriene B₄ Augments Neutrophil Accumulation and Responses in the Lung to Klebsiella Infection in CXCL1 Knockout Mice. *The Journal of Immunology* 188, 7, 3458–68.

BECK, B., DRIESSENS, G., GOOSSENS, S., ET AL. 2011. A vascular niche and a VEGF–Nrp1 loop regulate the initiation and stemness of skin tumours. *Nature* 478, 7369, nature10525.

BENNANI-BAITI, I., COOPER, A., LAWLOR, E., ET AL. 2010. Intercohort Gene Expression Co-Analysis Reveals Chemokine Receptors as Prognostic Indicators in Ewing's Sarcoma. *Clinical Cancer Research* 16, 14, 3769–78.

BENNETT, L.D., FOX, J.M., AND SIGNORET, N. 2011. Mechanisms regulating chemokine receptor activity. *Immunology* 134, 3, 246–56.

BENOY, I.H., SALGADO, R., VAN DAM, P., ET AL. 2004. Increased serum interleukin-8 in patients with early and metastatic breast cancer correlates with early dissemination and survival. *Clinical cancer research* 10, 21, 7157–62.

BERTOS, N. AND PARK, M. 2011. Breast cancer — one term, many entities? *Journal of Clinical Investigation* 121, 10, 3789–96.

BISSELL, M. AND HINES, W. 2011. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nature medicine* 17, 3, 320.

BOIKO, A., RAZORENOVA, O., RIJN, M., ET AL. 2010. Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271. *Nature* 466, 7302, 133–7.

BONDEVA, T., PIROLA, L., BULGARELLI-LEVA, G., RUBIO, I., WETZKER, R., AND WYMANN, M.P. 1998. Bifurcation of lipid and protein kinase signals of PI3Kγ to the protein kinases PKB and MAPK. *Science* 282, 5387, 293–6.

BONNET, D. AND DICK, J. 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3, 7, 730–7.

BOSCH, T., KOOPMANS, A., VAARWATER, J., BERG, M., KLEIN, A., AND VERDIJK, R. 2013. Chemokine Receptor CCR7 Expression Predicts Poor Outcome in Uveal Melanoma and Relates to Liver Metastasis Whereas Expression of CXCR4 Is Not of Clinical Relevance CCR7 Predicts Poor Outcome in Uveal Melanoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 54, 12, 7354–61.

BOTTA, C., DI MARTINO, M.T., CILIBERTO, D., ET AL. 2016. A gene expression inflammatory signature specifically predicts multiple myeloma evolution and patients survival. *Blood cancer journal* 6, 12, e511.

BOURILLOT, P., AKSOY, I., SCHREIBER, V., ET AL. 2009. Novel STAT3 Target Genes Exert Distinct Roles in the Inhibition of Mesoderm and Endoderm Differentiation in Cooperation with Nanog. *Stem Cells* 27, 8, 1760–71.

BOYER, L., LEE, T., COLE, M., ET AL. 2005. Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. *Cell* 122, 6, 947–56.

BOYLE, S., GIENIEC, K., GREGOR, C., FAULKNER, J., MCCOLL, S., AND KOCHETKOVA, M. 2017. Interplay between CCR7 and Notch1 axes promotes stemness in MMTV-PyMT mammary cancer cells. *Molecular Cancer* 16, 1, 19.

BOYLE, S.T., INGMAN, W.V., POLTAVETS, V., ET AL. 2016. The chemokine receptor CCR7 promotes mammary tumorigenesis through amplification of stem-like cells. *Oncogene* 35, 1, 105–15.

BROOKS, M. AND WICHA, M. 2015. Tumor Twitter: Cellular Communication in the Breast Cancer Stem Cell Niche. *Cancer Discovery* 5, 5, 469–71.

BROWN, J. AND WILSON, W. 2004. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nature Reviews Cancer* 4, 6, 437–47.

BROXMEYER, H.E. 2008. Chemokines in hematopoiesis. *Current opinion in hematology* 15, 1, 49–58.

CAHU, J., BUSTANY, S., AND SOLA, B. 2012. Senescence-associated secretory phenotype favors the emergence of cancer stem-like cells. *Cell Death & Disease* 3, 12, e446.

CALABRESE, C., POPPLETON, H., KOCAK, M., ET AL. 2007. A Perivascular Niche for Brain Tumor Stem Cells. *Cancer Cell* 11, 1, 69–82.

CALLAHAN, R. AND HURVITZ, S. 2011. Human epidermal growth factor receptor-2-positive breast cancer: Current management of early, advanced, and recurrent disease. *Current opinion in obstetrics & gynecology* 23, 1, 37–43.

CALVET, C., ANDRÉ, F., AND MIR, L. 2014. The Culture of Cancer Cell Lines as Tumorspheres Does Not Systematically Result in Cancer Stem Cell Enrichment. *PLoS ONE* 9, 2, e89644.

CAMBIEN, B., RICHARD-FIARDO, P., KARIMDJEE, B., ET AL. 2011. CCL5 Neutralization Restricts Cancer Growth and Potentiates the Targeting of PDGFR β in Colorectal Carcinoma. *PLoS ONE* 6, 12, e28842.

CAMPBELL, L. AND POLYAK, K. 2007. Breast Tumor Heterogeneity: Cancer Stem Cells or Clonal Evolution? *Cell Cycle* 6, 19, 2332–8.

CARO, G., CARVELLO, M., PESCE, S., ET AL. 2016. Circulating Inflammatory Mediators as Potential Prognostic Markers of Human Colorectal Cancer. *PLOS ONE* 11, 2, e0148186.

CASSIER, P., TREILLEUX, I., BACHELOT, T., ET AL. 2011. Prognostic value of the expression of C-Chemokine Receptor 6 and 7 and their ligands in non-metastatic breast cancer. *BMC cancer* 11, 1, 213.

CHAFFER, C., BRUECKMANN, I., SCHEEL, C., ET AL. 2011. Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 19, 7950–5.

CHAMBERS, I., COLBY, D., ROBERTSON, M., ET AL. 2003. Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells. *Cell* 113, 5, 643–55.

CHARAFE-JAUFFRET, E., GINESTIER, C., IOVINO, F., ET AL. 2009. Breast Cancer Cell Lines Contain Functional Cancer Stem Cells with Metastatic Capacity and a Distinct Molecular Signature. *Cancer Research* 69, 4, 1302–13.

CHAU, W., IP, C., MAK, A., LAI, H.-C., AND WONG, A. 2012. c-Kit mediates chemoresistance and tumor-initiating capacity of ovarian cancer cells through activation of Wnt/ β -catenin–ATP-binding cassette G2 signaling. *Oncogene* 32, 22, 2767-81.

CHAVEY, C., BIBEAU, F., GOURGOU-BOURGADE, S., ET AL. 2007. Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content. *Breast cancer research* 9, 1, R15.

CHEN, C., FINGERHUT, J., AND YAMASHITA, Y. 2016. The ins(ide) and outs(ide) of asymmetric stem cell division. *Current Opinion in Cell Biology* 43, 1–6.

CHEN, L., FAN, J., CHEN, H., ET AL. 2014. The IL-8/CXCR1 axis is associated with cancer stem cell-like properties and correlates with clinical prognosis in human pancreatic cancer cases. *Scientific Reports* 4, 5911.

CHEN, Y., JACAMO, R., KONOPLEVA, M., GARZON, R., CROCE, C., AND ANDREEFF, M. 2013. CXCR4 downregulation of let-7a drives chemoresistance in acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Investigation* 123, 6, 2395–407.

CHENG, D., KONG, H., AND LI, Y. 2014. Prognostic value of interleukin-8 and MMP-9 in nasopharyngeal carcinoma. *Head and Neck Surgery* 271, 3, 503–9.

CHENG, W., REN, X., ZHANG, C., ET AL. 2016. Bioinformatic profiling identifies an immune-related risk signature for glioblastoma. *Neurology* 86, 24, 2226–34.

CHENG, W.-L., WANG, C.-S., HUANG, Y.-H., TSAI, M.-M., LIANG, Y., AND LIN, K.-H. 2011. Overexpression of CXCL1 and its receptor CXCR2 promote tumor invasion in gastric cancer. *Annals of Oncology* 22, 10, 2267–76.

CHU, Q., PANU, L., HOLM, N., LI, B., JOHNSON, L., AND ZHANG, S. 2010. High Chemokine Receptor CXCR4 Level in Triple Negative Breast Cancer Specimens Predicts Poor Clinical Outcome. *Journal of Surgical Research* 159, 2, 689–95.

CHUTHAPISITH, S., EREMIN, J., EL-SHEEMEY, M., AND EREMIN, O. 2010. Breast cancer chemoresistance: emerging importance of cancer stem cells. *Surgical oncology* 19, 1, 27–32.

CIOFFI, M., D'ALTERIO, C., CAMERLINGO, R., ET AL. 2015. Identification of a distinct population of CD133+CXCR4+ cancer stem cells in ovarian cancer. *Scientific Reports* 5, 1, 10357.

CLARK-LEWIS, I., DEWALD, B., GEISER, T., MOSER, B., AND BAGGIOLINI, M. 1993. Platelet factor 4 binds to interleukin 8 receptors and activates neutrophils when its N terminus is modified with Glu-Leu-Arg. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 8, 3574–7.

CLEVERS, H. AND NUSSE, R. 2012. Wnt/ β -Catenin Signaling and Disease. *Cell* 149, 6, 1192–205.

COLE, J., JOSEPH, S., SUDHAHAR, C., AND DAHL, K. 2014. Enrichment for Chemoresistant Ovarian Cancer Stem Cells from Human Cell Lines. *Journal of Visualized Experiments* 91.

COLLINS, A., BERRY, P., HYDE, C., STOWER, M., AND MAITLAND, N. 2005. Prospective Identification of Tumorigenic Prostate Cancer Stem Cells. *Cancer Research* 65, 23, 10946–51.

COLOMBO, M., RAPOSO, G., AND THÉRY, C. 2014. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 30, 1, 1–35.

CONLEY, S., GHEORDUNESCU, E., KAKARALA, P., ET AL. 2012. Antiangiogenic agents increase breast cancer stem cells via the generation of tumor hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 8, 2784–9.

COPPÉ, J.-P., DESPREZ, P.-Y., KRTOLICA, A., AND CAMPISI, J. 2010. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Pathology: Mechanisms of Disease* 5, 1, 99–118.

CREIGHTON, C.J., LI, X., LANDIS, M., ET AL. 2009. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 33, 13820–5.

CROKER, A. AND ALLAN, A. 2012. Inhibition of aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity reduces chemotherapy and radiation resistance of stem-like ALDH^{hi}CD44⁺ human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment* 133, 1, 75–87.

CUNNINGHAM, H.D., SHANNON, L.A., CALLOWAY, P.A., ET AL. 2010. Expression of the C-C chemokine receptor 7 mediates metastasis of breast cancer to the lymph nodes in mice. *Translational oncology* 3, 6, 354–61.

DAHAN, GALA, M., DELMAS, ET AL. 2014. Ionizing radiations sustain glioblastoma cell dedifferentiation to a stem-like phenotype through survivin: possible involvement in radioresistance. *Cell Death & Disease* 5, 11, e1543.

DAMAJ, B.B., MCCOLL, S.R., NEOTE, K., HÉBERT, C.A., AND NACCACHE, P.H. 1996. Diverging signal transduction pathways activated by interleukin 8 (IL-8) and related chemokines in human neutrophils. IL-8 and Gro- α differentially stimulate calcium influx through IL-8 receptors A and B. *The Journal of biological chemistry* 271, 34, 20540–4.

DANG, C.V. 2012. MYC on the Path to Cancer. *Cell* 149, 1, 22–35.

DANIEL, C.W., DE OME, K.B., YOUNG, J.T., BLAIR, P.B., AND FAULKIN, L.J. 1968. The in vivo life span of normal and preneoplastic mouse mammary glands: a serial transplantation study. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 61, 1, 53–60.

DARASH-YAHANA, M., PIKARSKY, E., ABRAMOVITCH, R., ET AL. 2004. Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis. *The FASEB Journal* 18, 11, 1240–2.

DE LOS ANGELES, A., FERRARI, F., XI, R., ET AL. 2015. Hallmarks of pluripotency. *Nature* 525, 7570, 469–78.

DEBEB, B., LACERDA, L., XU, W., ET AL. 2012. Histone Deacetylase Inhibitors Stimulate Dedifferentiation of Human Breast Cancer Cells Through WNT/ β -Catenin Signaling. *Stem Cells* 30, 11, 2366–77.

DEGUCHI, K., ICHIKAWA, D., SOGA, K., ET AL. 2010. Clinical significance of vascular endothelial growth factors C and D and chemokine receptor CCR7 in gastric cancer. *Anticancer research* 30, 6, 2361–6.

DEHEEGER, M., LESNIAK, M.S., AND AHMED, A.U. 2014. Cellular plasticity regulated cancer stem cell niche: a possible new mechanism of chemoresistance. *Cancer cell & microenvironment* 1, 5.

DELLA DONNA, L., LAGADEC, C., AND PAJONK, F. 2012. Radioresistance of prostate cancer cells with low proteasome activity. *The Prostate* 72, 8, 868–74.

DENT, R., TRUDEAU, M., PRITCHARD, K., ET AL. 2007. Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clinical Cancer Research* 13, 15, 4429–34.

DESCAMPS, S., PAWLOWSKI, V., RÉVILLION, F., ET AL. 2001. Expression of nerve growth factor receptors and their prognostic value in human breast cancer. *Cancer research* 61, 11, 4337–40.

DESURMONT, T., SKRYPEK, N., DUHAMEL, A., ET AL. 2015. Overexpression of chemokine receptor CXCR2 and ligand CXCL7 in liver metastases from colon cancer is correlated to shorter disease-free and overall survival. *Cancer Science* 106, 3, 262–9.

DEWANGAN, J., SRIVASTAVA, S., AND RATH, S.K. 2017. Salinomycin: A new paradigm in cancer therapy. *Tumour biology* 39, 3, 1010428317695035.

DIEHN, M., CHO, R.W., LOBO, N.A., ET AL. 2009. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* 458, 7239, 780–3.

DING, Y., SHIMADA, Y., MAEDA, M., ET AL. 2003. Association of CC chemokine receptor 7 with lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. *Clinical cancer research* 9, 9, 3406–12.

DU, P., LIU, Y., REN, H., ET AL. 2016. Expression of chemokine receptor CCR7 is a negative prognostic factor for patients with gastric cancer: a meta-analysis. *Gastric Cancer* 20, 2, 235–45.

DONTU, G., ABDALLAH, W., FOLEY, J., ET AL. 2003. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes & Development* 17, 10, 1253–70.

DUBROVSKA, A., HARTUNG, A., BOUCHEZ, L.C., ET AL. 2012. CXCR4 activation maintains a stem cell population in tamoxifen-resistant breast cancer cells through AhR signalling. *British journal of cancer* 107, 1, 43–52.

ELSTON, C.W. AND ELLIS, I.O. 1991. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19, 5, 403–10.

ENGSTRØM, M., OPDAHL, S., HAGEN, A., ET AL. 2013. Molecular subtypes, histopathological grade and survival in a historic cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment* 140, 3, 463–73.

ERAMO, A., LOTTI, F., SETTE, G., ET AL. 2008. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell death and differentiation* 15, 3, 504–14.

ERIKSSON, D. AND STIGBRAND, T. 2010. Radiation-induced cell death mechanisms. *Tumor Biology* 31, 4, 363–72.

EROLE, P., BOSCH, A., PÉREZ-FIDALGO, J., AND LLUCH, A. 2012. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treatment Reviews* 38, 6, 698–707.

EWINGTON, L., TAYLOR, A., SRIRAKSA, R., HORIMOTO, Y., LAM, E., AND EL-BAHRAWY, M. 2012. The expression of interleukin-8 and interleukin-8 receptors in endometrial carcinoma. *Cytokine* 59, 2, 417–22.

FANG, D., NGUYEN, T., LEISHEAR, K., ET AL. 2005. A Tumorigenic Subpopulation with Stem Cell Properties in Melanomas. *Cancer Research* 65, 20, 9328–37.

FANG, W., YAO, M., BRUMMER, G., ET AL. 2016. Targeted gene silencing of CCL2 inhibits triple negative breast cancer progression by blocking cancer stem cell renewal and M2 macrophage recruitment. *Oncotarget* 7, 31, 49349–67.

FARMER, P., BONNEFOI, H., BECETTE, V., ET AL. 2005. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene* 24, 29, 4660–71.

FENG, X., ZHANG, J., SMUGA-OTTO, K., ET AL. 2012. Protein Kinase C Mediated Extraembryonic Endoderm Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 30, 3, 461–70.

FERNANDEZ, E.J. AND LOLIS, E. 2002. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annual review of pharmacology and toxicology* 42, 469–99.

FIGUEROA, J., PHILLIPS, L., SHAHAR, T., ET AL. 2017. Exosomes from Glioma-Associated Mesenchymal Stem Cells Increase the Tumorigenicity of Glioma Stem-like Cells via Transfer of miR-1587. *Cancer Research* 77, 21, canres.2524.2016.

FILIPPO, K., DUDECK, A., HASENBERG, M., ET AL. 2013. Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. *Blood* 121, 24, 4930–4937.

FILLMORE, C. AND KUPERWASSER, C. 2008. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Research* 10, 2, 1–13.

FLORES, R., KELLY, A., LI, Y., ET AL. 2017. A novel prognostic model for osteosarcoma using circulating CXCL10 and FLT3LG. *Cancer* 123, 1, 144–54.

FOUSE, S., SHEN, Y., PELLEGRINI, M., ET AL. 2008. Promoter CpG Methylation Contributes to ES Cell Gene Regulation in Parallel with Oct4/Nanog, PcG Complex, and Histone H3 K4/K27 Trimethylation. *Cell Stem Cell* 2, 2, 160–9.

FRANKENBERGER, C., RABE, D., BAINER, R., ET AL. 2015. Metastasis Suppressors Regulate the Tumor Microenvironment by Blocking Recruitment of Prometastatic Tumor-Associated Macrophages. *Cancer Research* 75, 19, 4063–73.

FRENCH, A., ADAMS, C., ANDERSON, L., KITCHEN, J., HUGHES, M., AND WOOD, S. 2008. Development of Human Cloned Blastocysts Following Somatic Cell Nuclear Transfer with Adult Fibroblasts. *Stem Cells* 26, 2, 485–93.

FU, N., LINDEMAN, G.J., AND VISVADER, J.E. 2014. The mammary stem cell hierarchy. *Current topics in developmental biology* 107, 133–60.

FUCHS, E. AND CHEN, T. 2013. A matter of life and death: self-renewal in stem cells. *EMBO reports* 14, 1, 39–48.

FUJIMOTO, H., SANGAI, T., ISHII, G., ET AL. 2009. Stromal MCP-1 in mammary tumors induces tumor-associated macrophage infiltration and contributes to tumor progression. *International Journal of Cancer* 125, 6, 1276–84.

GALLMEIER, E., HERMANN, P., MUELLER, M., ET AL. 2011. Inhibition of Ataxia Telangiectasia- and Rad3 -Related Function Abrogates the In Vitro and In Vivo Tumorigenicity of Human Colon Cancer Cells Through Depletion of the CD133+ Tumor-Initiating Cell Fraction. *Stem Cells* 29, 3, 418–29.

GANGHAMMER, S., GUTJAHR, J., HUTTERER, E., et al. 2016. Combined CXCR3/CXCR4 measurements are of high prognostic value in chronic lymphocytic leukemia due to negative co-operativity of the receptors. *Haematologica* 101, 3, e99–102.

GAO, J., LI, Z., TANG, W., WU, Q., LIU, G., AND ZHENG, W. 2015. Chemokine C-C motif ligand 18 expression correlates with tumor malignancy in breast cancer. *Pathologie Biologie* 63, 4-5, 199–203.

GAO, X., McDONALD, J., NAIDU, M., HAHNFELDT, P., AND HLATKY, L. 2014. A Proposed Quantitative Index for Assessing the Potential Contribution of Reprogramming to Cancer Stem Cell Kinetics. *Stem Cells International* 2014, 1–8.

GAO, X., SISHC, B., NELSON, C., HAHNFELDT, P., BAILEY, S., AND HLATKY, L. 2016. Radiation-Induced Reprogramming of Pre-Senescent Mammary Epithelial Cells Enriches Putative CD44(+)/CD24(-/low) Stem Cell Phenotype. *Frontiers in oncology* 6, 138.

GAO, Z., SARSOOR, E., KALEN, A., LI, L., KUMAR, M., AND GOSWAMI, P. 2008. Late ROS accumulation and radiosensitivity in SOD1-overexpressing human glioma cells. *Free Radical Biology and Medicine* 45, 11, 1501–9.

GASSENMAIER, M., CHEN, D., BUCHNER, A., ET AL. 2013. CXC Chemokine Receptor 4 is Essential for Maintenance of Renal cell Carcinoma-Initiating Cells and Predicts Metastasis. *Stem Cells* 31, 8, 1467–76.

GELMINI, S., MANGONI, M., CASTIGLIONE, F., ET AL. 2009. The CXCR4/CXCL12 axis in endometrial cancer. *Clinical & Experimental Metastasis* 26, 3, 261–8.

GHISOLFI, L., KEATES, A., HU, X., LEE, D., AND LI, C. 2012. Ionizing Radiation Induces Stemness in Cancer Cells. *PLOS ONE* 7, 8, e43628.

GINESTIER, C., HUR, M., CHARAFE-JAUFFRET, E., ET AL. 2007. ALDH1 Is a Marker of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome. *Cell Stem Cell* 1, 5, 555–67.

GINESTIER, C., LIU, S., DIEBEL, M., ET AL. 2010. CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts. *Journal of Clinical Investigation* 120, 2, 485–97.

GLADSTONE, M. AND SU, T.T. 2012. Radiation responses and resistance. *International review of cell and molecular biology* 299, 235–53.

GOFFART, N., LOMBARD, A., LALLEMAND, F., ET AL. 2016. CXCL12 mediates glioblastoma resistance to radiotherapy in the subventricular zone. *Neuro-Oncology* 19, 1, 66–77.

GÓMEZ-MIRAGAYA, J., PALAFOX, M., PARÉ, L., ET AL. 2017. Resistance to Taxanes in Triple-Negative Breast Cancer Associates with the Dynamics of a CD49f+ Tumor-Initiating Population. *Stem Cell Reports* 8, 5, 1392–407.

GRÉPIN, R., GUYOT, M., GIULIANO, S., ET AL. 2014. The CXCL7/CXCR1/2 Axis Is a Key Driver in the Growth of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Research* 74, 3, 873–83.

GRIVENNIKOV, S., GRETEN, F., AND KARIN, M. 2010. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* 140, 6, 883–99.

GÜNTHER, K., LEIER, J., HENNING, G., ET AL. 2005. Prediction of lymph node metastasis in colorectal carcinoma by expression of chemokine receptor CCR7. *International Journal of Cancer* 116, 5, 726–33.

GUO, J.-C.C., LI, J., ZHOU, L., ET AL. 2016. CXCL12-CXCR7 axis contributes to the invasive phenotype of pancreatic cancer. *Oncotarget* 7, 38, 62006–18.

GUO, L., CUI, Z.-M., ZHANG, J., AND HUANG, Y. 2011a. Chemokine axes CXCL12/CXCR4 and CXCL16/CXCR6 correlate with lymph node metastasis in epithelial ovarian carcinoma. *Chinese Journal of Cancer* 30, 5, 336–43.

GUO, S., LIU, M., AND GONZALEZ-PEREZ, R. 2011b. Role of Notch and its oncogenic signaling crosstalk in breast cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1815, 2, 197–213.

GUPTA, P., ONDER, T., JIANG, G., ET AL. 2009. Identification of Selective Inhibitors of Cancer Stem Cells by High-Throughput Screening. *Cell* 138, 4, 645–59.

GUPTA, P.B., FILLMORE, C.M., JIANG, G., ET AL. 2011. Stochastic State Transitions Give Rise to Phenotypic Equilibrium in Populations of Cancer Cells. *Cell* 146, 4, 633–44.

AL-HAJJ, M., WICHA, M., BENITO-HERNANDEZ, A., MORRISON, S., AND CLARKE, M. 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 7, 3983–8.

HAMILTON, O. AND OLSZEWSKI U. 2013. Chemotherapy-induced Enrichment of Cancer Stem Cells in Lung Cancer. *Journal of Bioanalysis & Biomedicine* s9.

HANAHAN, D. AND WEINBERG, R.A. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 1, 57–70.

HANAHAN, D. AND WEINBERG, R.A. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 5, 646–74.

HANNAFON, B.N. AND DING, W.-Q.Q. 2015. Cancer stem cells and exosome signaling. *Stem cell investigation* 2, 11.

HARADA, K., FERDOUS, T., CUI, D., ET AL. 2016. Induction of artificial cancer stem cells from tongue cancer cells by defined reprogramming factors. *BMC Cancer* 16, 1, 548.

HARICHARAN, S. AND LI, Y. 2014. STAT signaling in mammary gland differentiation, cell survival and tumorigenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 382, 1, 560–9.

HATSELL, S. AND COWIN, P. 2006. Gli3-mediated repression of Hedgehog targets is required for normal mammary development. *Development* 133, 18, 3661–70.

HEDDLESTON, J., LI, Z., MCLENDON, R., HJELMELAND, A., AND RICH, J. 2009. The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle* 8, 20, 3274–84.

HEFLER, L., TEMPFER, C., HEINZE, G., ET AL. 1999. Monocyte chemoattractant protein-1 serum levels in ovarian cancer patients. *British journal of cancer* 81, 5, 855–9.

HEIN, A.L., OUELLETTE, M.M., AND YAN, Y. 2014. Radiation-induced signaling pathways that promote cancer cell survival (review). *International journal of oncology* 45, 5, 1813–9.

HERMANN, P., HUBER, S., HERRLER, T., ET AL. 2007. Distinct Populations of Cancer Stem Cells Determine Tumor Growth and Metastatic Activity in Human Pancreatic Cancer. *Cell Stem Cell* 1, 3, 313–23.

HERNÁNDEZ-VARGAS, H., OUZOUNOVA, M., CALVEZ-KELM, F., ET AL. 2011. Methylome analysis reveals Jak-STAT pathway deregulation in putative breast cancer stem cells. *Epigenetics* 6, 4, 428–39.

HILLER, D., MESCHONAT, C., KIM, R., LI, B., AND CHU, Q. 2011. Chemokine receptor CXCR4 level in primary tumors independently predicts outcome for patients with locally advanced breast cancer. *Surgery* 150, 3, 459–65.

HOLLAND, J., KLAUS, A., GARRATT, A., AND BIRCHMEIER, W. 2013. Wnt signaling in stem and cancer stem cells. *Current Opinion in Cell Biology* 25, 2, 254–64.

HONG, J., RYU, K., LEE, J., ET AL. 2016. Serum level of CXCL10 is associated with inflammatory prognostic biomarkers in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Hematological Oncology* 35, 480–6.

HORI, K., SEN, A., AND ARTAVANIS-TSAKONAS, S. 2013. Notch signaling at a glance. *Journal of cell science* 126, Pt 10, 2135–40.

HU, X., GHISOLFI, L., KEATES, A., ET AL. 2012. Induction of cancer cell stemness by chemotherapy. *Cell Cycle* 11, 14, 2691–8.

HUANG, M., LI, Y., ZHANG, H., AND NAN, F. 2010. Breast cancer stromal fibroblasts promote the generation of CD44+CD24- cells through SDF-1/CXCR4 interaction. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 29, 1, 1–10.

HWANG, T.-L.L., LEE, L.-Y.Y., WANG, C.-C.C., LIANG, Y., HUANG, S.-F.F., AND WU, C.-M.M. 2012. CCL7 and CCL21 overexpression in gastric cancer is associated with lymph node metastasis and poor prognosis. *World journal of gastroenterology* 18, 11, 1249–56.

ILIOPOULOS, D., HIRSCH, H., WANG, G., AND STRUHL, K. 2011. Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancer cells via IL6 secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 4, 1397–402.

ISHIGAMI, S., NATSUGOE, S., OKUMURA, H., ET AL. 2007. Clinical Implication of CXCL12 Expression in Gastric Cancer. *Annals of Surgical Oncology* 14, 11, 3154–8.

ISHIKAWA, K., SASAKI, A., HARAGUCHI, N., YOSHIKAWA, Y., AND MORI, M. 2007. A Case of an α -Fetoprotein-Producing Intrahepatic Cholangiocarcinoma Suggests Probable Cancer Stem Cell Origin. *The Oncologist* 12, 3, 320–4.

ISHIZAWA, K., RASHEED, Z., KARISCH, R., ET AL. 2010. Tumor-Initiating Cells Are Rare in Many Human Tumors. *Cell Stem Cell* 7, 3, 279–82.

ISO, T., KEDES, L., AND HAMAMORI, Y. 2003. HES and HERP families: Multiple effectors of the notch signaling pathway. *Journal of Cellular Physiology* 194, 3, 237–55.

IZUMI, D., ISHIMOTO, T., MIYAKE, K., ET AL. 2015a. CXCL12/CXCR4 activation by cancer-associated fibroblasts promotes integrin β 1 clustering and invasiveness in gastric cancer. *International Journal of Cancer* 138, 5, 1207–19.

IZUMI, K., MIZOKAMI, A., LIN, H.-P., ET AL. 2015b. Serum chemokine (CC motif) ligand 2 level as a diagnostic, predictive, and prognostic biomarker for prostate cancer. *Oncotarget* 7, 7, 8389–98.

JACKSON, S. 2002. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 23, 5, 687–96.

JEDESZKO, C., VICTOR, B., PODGORSKI, I., AND SLOANE, B. 2009. Fibroblast Hepatocyte Growth Factor Promotes Invasion of Human Mammary Ductal Carcinoma In situ. *Cancer Research* 69, 23, 9148–55.

JELLA, K., RANI, S., O'DRISCOLL, L., MCCLEAN, B., BYRNE, H., AND LYNG, F. 2014. Exosomes Are Involved in Mediating Radiation Induced Bystander Signaling in Human Keratinocyte Cells. *Radiation Research* 181, 6, 138–45.

JELONEK, K., WIDLAK, P., AND PIETROWSKA, M. 2016. The Influence of Ionizing Radiation on Exosome Composition, Secretion and Intercellular Communication. *Protein and peptide letters* 23, 7, 656–63.

JENSEN, E.V. 1975. Estrogen receptors in hormone-dependent breast cancers. *Cancer research* 35, 11 Pt. 2, 3362–4.

JI, A.-R., KU, S.-Y., CHO, M., ET AL. 2010. Reactive oxygen species enhance differentiation of human embryonic stem cells into mesendodermal lineage. *Experimental & Molecular Medicine* 42, 3, 175-86.

JI, W.-T., CHEN, H.-R., LIN, C.-H., LEE, J.-W., AND LEE, C.-C. 2014. Monocyte Chemotactic Protein 1 (MCP-1) Modulates Pro-Survival Signaling to Promote Progression of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *PLOS ONE* 9, 2, e88952.

JIA, D., LI, L., ANDREW, S., ET AL. 2017. An autocrine inflammatory forward-feedback loop after chemotherapy withdrawal facilitates the repopulation of drug-resistant breast cancer cells. *Cell Death & Disease* 8, 7, e2932.

JIANG, H., GEBHARDT, C., UMANSKY, L., ET AL. 2015. Elevated chronic inflammatory factors and myeloid-derived suppressor cells indicate poor prognosis in advanced melanoma patients. *International Journal of Cancer* 136, 10, 2352–60.

JIAO, X., VELASCO-VELÁZQUEZ, M.A., WANG, M., ET AL. 2018. CCR5 Governs DNA Damage Repair and Breast Cancer Stem Cell Expansion. *Cancer research* 78, 7, 1657–1671.

JIN, V., O'GEEN, H., IYENGAR, S., GREEN, R., AND FARNHAM, P. 2007. Identification of an OCT4 and SRY regulatory module using integrated computational and experimental genomics approaches. *Genome Research* 17, 6, 807–17.

JIN, L., BATRA, S., DOUDA, D., PALANIYAR, N., AND JEYASEELAN, S. 2014. CXCL1 Contributes to Host Defense in Polymicrobial Sepsis via Modulating T Cell and Neutrophil Functions. *The Journal of Immunology* 193, 7, 3549–58.

JONES, D. AND WAGERS, A. 2008. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 1, 11–21.

JOSHI, P., JACKSON, H., BERISTAIN, A., ET AL. 2010. Progesterone induces adult mammary stem cell expansion. *Nature* 465, 7299, 803–7.

JUNG, M.-J., RHO, J.-K., KIM, Y.-M., ET AL. 2012. Upregulation of CXCR4 is functionally crucial for maintenance of stemness in drug-resistant non-small cell lung cancer cells. *Oncogene* 32, 2, 209–21.

JUNG, S., KIM, C., PARK, C., ET AL. 2011. Correlation between Chemokine Receptor CXCR4 Expression and Prognostic Factors in Patients with Prostate Cancer. *Korean Journal of Urology* 52, 9, 607–11.

KANG, H., WATKINS, G., PARR, C., DOUGLAS-JONES, A., MANSEL, R., AND JIANG, W. 2005. Stromal cell derived factor-1: its influence on invasiveness and migration of breast cancer cells in vitro, and its association with prognosis and survival in human breast cancer. *Breast Cancer Research* 7, 4, 1–9.

KATANCIK, J., SHARMA, A., AND NARDIN, E. 2000. Interleukin 8, Neutrophil-Activating Peptide-2 and GRO- α Bind to and Elicit Cell Activation via Specific and Different Amino Acid Residues of CXCR2. *Cytokine* 12, 10, 1480–8.

KATO, M., KITAYAMA, J., KAZAMA, S., AND NAGAWA, H. 2003. Expression pattern of CXC chemokine receptor-4 is correlated with lymph node metastasis in human invasive ductal carcinoma. *Breast Cancer Research* 5, 5, 1–7.

KATSMAN, D., STACKPOLE, E., DOMIN, D., AND FARBER, D. 2012. Embryonic Stem Cell-Derived Microvesicles Induce Gene Expression Changes in Müller Cells of the Retina. *PLoS ONE* 7, 11, e50417.

KAWADA, K., HOSOGI, H., SONOSHITA, M., ET AL. 2007. Chemokine receptor CXCR3 promotes colon cancer metastasis to lymph nodes. *Oncogene* 26, 32, 4679–88.

KELLY, E., BAILEY, C.P., AND HENDERSON, G. 2008. Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *British journal of pharmacology* 153 Suppl 1, S379–88.

KEYMEULEN, A., ROCHA, A., OUSSET, M., ET AL. 2011. Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance. *Nature* 479, 7372, 189–93.

KIEFER, F. AND SIEKMANN, A. 2011. The role of chemokines and their receptors in angiogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68, 17, 2811–30.

KIM, M., KIM, S.-H., CHO, Y.-Y., ET AL. 2012. ERK1 and ERK2 regulate embryonic stem cell self-renewal through phosphorylation of Klf4. *Nature Structural and Molecular Biology* 19, 3, nsmb.2217.

KIM, S.-Y., KANG, J., SONG, X., ET AL. 2013. Role of the IL-6-JAK1-STAT3-Oct-4 pathway in the conversion of non-stem cancer cells into cancer stem-like cells. *Cellular Signalling* 25, 4, 961–9.

KNUDSON, A. 1993. Antioncogenes and human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 23, 10914–21.

KNUDSON, A. 2001. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nature Reviews Cancer* 1, 2, 157-62.

KODAMA, J., HASENGAOWA, KUSUMOTO, T., ET AL. 2007. Association of CXCR4 and CCR7 chemokine receptor expression and lymph node metastasis in human cervical cancer. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology* 18, 1, 70–6.

KOJIMA, Y., ACAR, A., EATON, E., ET AL. 2010. Autocrine TGF- β and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 46, 20009–14.

KONG, L., GUO, S., LIU, C., ET AL. 2016. Overexpression of SDF-1 activates the NF- κ B pathway to induce epithelial to mesenchymal transition and cancer stem cell-like phenotypes of breast cancer cells. *International Journal of Oncology* 48, 1085–94.

KORKAYA, H., PAULSON, A., CHARAFE-JAUFFRET, E., ET AL. 2009. Regulation of Mammary Stem/Progenitor Cells by PTEN/Akt/ β -Catenin Signaling. *PLOS Biology* 7, 6, e1000121.

KRAUSE, M., YAROMINA, A., EICHELER, W., KOCH, U., AND BAUMANN, M. 2011. Cancer Stem Cells: Targets and Potential Biomarkers for Radiotherapy. *Clinical Cancer Research* 17, 23, 7224–9.

KRESO, A. AND DICK, J.E. 2014. Evolution of the Cancer Stem Cell Model. *Cell Stem Cell* 14, 3, 275–91.

KROHN, A., SONG, Y.-H., MUEHLBERG, F., DROLL, L., BECKMANN, C., AND ALT, E. 2009. CXCR4 receptor positive spheroid forming cells are responsible for tumor invasion in vitro. *Cancer Letters* 280, 1, 65–71.

KÜHNELT-LEDDIHN, L., MÜLLER, H., EISENDLE, K., ZELGER, B., AND WEINLICH, G. 2012. Overexpression of the chemokine receptors CXCR4, CCR7, CCR9, and CCR10 in human primary cutaneous melanoma: a potential prognostic value for CCR7 and CCR10? *Archives of Dermatological Research* 304, 3, 185–93.

LACEY, J., KREIMER, A., BUYS, S., ET AL. 2009. Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort. *BMC Cancer* 9, 1, 1–8.

LAGADEC, C., VLASHI, E., BHUTA, S., ET AL. 2014. Tumor cells with low proteasome subunit expression predict overall survival in head and neck cancer patients. *BMC cancer* 14, 152.

LAGADEC, C., VLASHI, E., DELLA DONNA, L., ET AL. 2010. Survival and self-renewing capacity of breast cancer initiating cells during fractionated radiation treatment. *Breast cancer research: BCR* 12, 1, R13.

LAGADEC, C., VLASHI, E., DELLA DONNA, L., DEKMEZIAN, C., AND PAJONK, F. 2012. Radiation-induced reprogramming of breast cancer cells. *Stem cells* 30, 5, 833–44.

LARSEN, S.K., GAO, Y., AND BASSE, P.H. 2014. NK cells in the tumor microenvironment. *Critical reviews in oncogenesis* 19, 1-2, 91–105.

LEE, W., KIM, S., YOON, J.-H., ET AL. 2016. Meta-Analysis of Tumor Stem-Like Breast Cancer Cells Using Gene Set and Network Analysis. *PLOS ONE* 11, 2, e0148818.

LEE, E. AND MULLER, W. 2010. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2, 10, a003236.

LEE, Y., JUNG, W., AND KOO, J. 2015. Adipocytes can induce epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment* 153, 2, 323–35.

LEHMANN, B., BAUER, J., CHEN, X., ET AL. 2011. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *Journal of Clinical Investigation* 121, 7, 2750–67.

LENGAUER, C., KINZLER, K., AND VOGELSTEIN, B. 1998. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 6712, 643-9.

LENOS, K. AND VERMEULEN, L. 2016. Cancer stem cells don't waste their time cleaning—low proteasome activity, a marker for cancer stem cell function. *Annals of Translational Medicine* 4, 24, 519.

LEWIS, C. AND POLLARD, J. 2006. Distinct Role of Macrophages in Different Tumor Microenvironments. *Cancer Research* 66, 2, 605–12.

LI, J., JIANG, K., QIU, X., ET AL. 2014a. Overexpression of CXCR4 is significantly associated with cisplatin-based chemotherapy resistance and can be a prognostic factor in epithelial ovarian cancer. *BMB Reports* 47, 1, 33–8.

LI, J., WANG, G., WANG, C., ET AL. 2007. MEK/ERK signaling contributes to the maintenance of human embryonic stem cell self-renewal. *Differentiation; research in biological diversity* 75, 4, 299–307.

LI, L., XU, L., YAN, J., ET AL. 2015a. CXCR2–CXCL1 axis is correlated with neutrophil infiltration and predicts a poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 34, 1, 1–10.

LI, P., ZHOU, C., XU, L., AND XIAO, H. 2013. Hypoxia Enhances Stemness of Cancer Stem Cells in Glioblastoma: An In Vitro Study. *International Journal of Medical Sciences* 10, 4, 399–407.

LI, R., ZHANG, H., LIU, H., ET AL. 2016. High expression of C-C chemokine receptor 2 associates with poor overall survival in gastric cancer patients after surgical resection. *Oncotarget* 7, 17, 23909–18.

LI, X., LEWIS, M.T., HUANG, J., ET AL. 2008. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *Journal of the National Cancer Institute* 100, 9, 672–9.

LI, X., XU, Q., WU, Y., ET AL. 2014b. A CCL2/ROS autoregulation loop is critical for cancer-associated fibroblasts-enhanced tumor growth of oral squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 35, 6, 1362–70.

LI, X.-P., YANG, X.-Y., BISKUP, E., ET AL. 2015b. Co-expression of CXCL8 and HIF-1 α is associated with metastasis and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 6, 26, 22880–9.

LI, Y., READER, J., MA, X., KUNDU, N., KOCHER, T., AND FULTON, A. 2015c. Divergent roles of CXCR3 isoforms in promoting cancer stem-like cell survival and metastasis. *Breast Cancer Research and Treatment* 149, 2, 403–15.

LIAN, S., ZHAI, X., WANG, X., ET AL. 2016. Elevated expression of growth-regulated oncogene-alpha in tumor and stromal cells predicts unfavorable prognosis in pancreatic cancer. *Medicine* 95, 30, e4328.

LIAO, D. AND JOHNSON, R. 2007. Hypoxia: A key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* 26, 2, 281–290.

LIM, E., VAILLANT, F., WU, D., ET AL. 2009. Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nature Medicine* 15, 8, 907–13.

LIM, E., WU, D., PAL, B., ET AL. 2010. Transcriptome analyses of mouse and human mammary cell subpopulations reveal multiple conserved genes and pathways. *Breast cancer research: BCR* 12, 2, R21.

LIN, L., CHEN, Y.-S., YAO, Y.-D., ET AL. 2015. CCL18 from tumor-associated macrophages promotes angiogenesis in breast cancer. *Oncotarget* 6, 33, 34758–73.

LIN, Z.-Y., CHUANG, Y.-H., AND CHUANG, W.-L. 2012. Cancer-associated fibroblasts up-regulate CCL2, CCL26, IL6 and LOXL2 genes related to promotion of cancer progression in hepatocellular carcinoma cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 66, 7, 525–9.

LIU, G., YUAN, X., ZENG, Z., ET AL. 2006. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Molecular Cancer* 5, 1, 1–12.

LIU, H., SHEN, Z., WANG, X., ET AL. 2015. Increased expression of C-C motif ligand 2 associates with poor prognosis in patients with gastric cancer after gastrectomy. *Tumor Biology* 37, 3, 3285–93.

LIU, J., PAN, S., HSIEH, M., ET AL. 2013a. Targeting Wnt-driven cancer through the inhibition of Porcupine by LGK974. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 50, 20224–9.

LIU, K., LIN, B., ZHAO, M., ET AL. 2013b. The multiple roles for Sox2 in stem cell maintenance and tumorigenesis. *Cellular Signalling* 25, 5, 1264–71.

LIU, S., CONG, Y., WANG, D., ET AL. 2014. Breast Cancer Stem Cells Transition between Epithelial and Mesenchymal States Reflective of their Normal Counterparts. *Stem Cell Reports* 2, 1, 78–91.

LIU, S., GINESTIER, C., OU, S., ET AL. 2011. Breast Cancer Stem Cells Are Regulated by Mesenchymal Stem Cells through Cytokine Networks. *Cancer Research* 71, 2, 614–24.

LIU, Y., JI, R., LI, J., ET AL. 2010. Correlation effect of EGFR and CXCR4 and CCR7 chemokine receptors in predicting breast cancer metastasis and prognosis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 29, 1, 1–9.

LOLIS, E. AND MURPHY, J.W. 2007. The Structural Biology of Chemokines. *Humana Press*, 2–30.

LOMBARDO, Y., GIORGIO, A., COOMBES, C., STEBBING, J., AND CASTELLANO, L. 2015. Mammosphere Formation Assay from Human Breast Cancer Tissues and Cell Lines. *Journal of Visualized Experiments* 97.

LONG, H., XIANG, T., QI, W., ET AL. 2015. CD133+ ovarian cancer stem-like cells promote non-stem cancer cell metastasis via CCL5 induced epithelial-mesenchymal transition. *Oncotarget* 6, 8, 5846–59.

LONG, H., XIE, R., XIANG, T., ET AL. 2012. Autocrine CCL5 signaling promotes invasion and migration of CD133+ ovarian cancer stem-like cells via NF- κ B-mediated MMP-9 upregulation. *Stem cells* 30, 10, 2309–19.

LU, H., CLAUSER, K., TAM, W., ET AL. 2014. A breast cancer stem cell niche supported by juxtacrine signalling from monocytes and macrophages. *Nature Cell Biology* 16, 11, 1105–17.

LU, H., SAMANTA, D., XIANG, L., ET AL. 2015. Chemotherapy triggers HIF-1-dependent glutathione synthesis and copper chelation that induces the breast cancer stem cell phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 33, E4600–9.

LU, M. AND WU, B. 2016. Structural studies of G protein-coupled receptors. *IUBMB Life* 68, 11, 894–903.

LU, P., WEAVER, V., AND WERB, Z. 2012. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *The Journal of Cell Biology* 196, 4, 395–406.

LU, X., QIAN, C.-N., MU, Y.-G., ET AL. 2011. Serum CCL2 and serum TNF- α – Two new biomarkers predict bone invasion, post-treatment distant metastasis and poor overall survival in nasopharyngeal carcinoma. *European Journal of Cancer* 47, 3, 339–46.

LUBOSHITS, G., SHINA, S., KAPLAN, O., ET AL. 1999. Elevated expression of the CC chemokine regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in advanced breast carcinoma. *Cancer research* 59, 18, 4681–7.

LUNARDI, S., JAMIESON, N., LIM, S., ET AL. 2014. IP-10/CXCL10 induction in human pancreatic cancer stroma influences lymphocytes recruitment and correlates with poor survival. *Oncotarget* 5, 22, 11064–80.

LUO, M., BROOKS, M., AND WICHA, M.S. 2015. Epithelial-mesenchymal plasticity of breast cancer stem cells: implications for metastasis and therapeutic resistance. *Current pharmaceutical design* 21, 10, 1301–10.

MA, X., NORSWORTHY, K., KUNDU, N., ET AL. 2009. CXCR3 expression is associated with poor survival in breast cancer and promotes metastasis in a murine model. *Molecular Cancer Therapeutics* 8, 3, 490–8.

MA, Y.C., HUANG, J., ALI, S., LOWRY, W., AND HUANG, X.Y. 2000. Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins. *Cell* 102, 5, 635–46.

MAEKAWA, S., IWASAKI, A., SHIRAKUSA, T., ET AL. 2008. Association between the expression of chemokine receptors CCR7 and CXCR3, and lymph node metastatic potential in lung adenocarcinoma. *Oncology reports* 19, 6, 1461–8.

MALIETZIS, G., LEE, G., BERNARDO, D., ET AL. 2015. The prognostic significance and relationship with body composition of CCR7-positive cells in colorectal cancer. *Journal of Surgical Oncology* 112, 1, 86–92.

MANDEVILLE, J.T. AND MAXFIELD, F.R. 1997. Effects of buffering intracellular free calcium on neutrophil migration through three-dimensional matrices. *Journal of cellular physiology* 171, 2, 168–78.

MANI, S., GUO, W., LIAO, M.-J., ET AL. 2008. The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell* 133, 4, 704–15.

MAO, Y., KELLER, E.T., GARFIELD, D.H., SHEN, K., AND WANG, J. 2013. Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer metastasis reviews* 32, 1-2, 303–15.

MARCATO, P., DEAN, C., PAN, D., ET AL. 2011a. Aldehyde Dehydrogenase Activity of Breast Cancer Stem Cells Is Primarily Due To Isoform ALDH1A3 and Its Expression Is Predictive of Metastasis. *Stem Cells* 29, 1, 32–45.

MARCATO, P., DEAN, C.A., GIACOMANTONIO, C.A., AND LEE, P.W. 2011b. Aldehyde dehydrogenase: its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. *Cell cycle* 10, 9, 1378–84.

MARCUCCI, F., RUMIO, C., AND LEFOULON, F. 2016. Anti-Cancer Stem-like Cell Compounds in Clinical Development – An Overview and Critical Appraisal. *Frontiers in Oncology* 6, 115.

MARÉCHAL, R., DEMETTER, P., NAGY, N., ET AL. 2009. High expression of CXCR4 may predict poor survival in resected pancreatic adenocarcinoma. *British journal of cancer* 100, 9, 1444–51.

MAROTTA, L., ALMENDRO, V., MARUSYK, A., ET AL. 2011. The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of CD44+CD24– stem cell-like breast cancer cells in human tumors. *Journal of Clinical Investigation* 121, 7, 2723–35.

MASHINO, K., SADANAGA, N., YAMAGUCHI, H., ET AL. 2002. Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Cancer research* 62, 10, 2937–41.

MASUDA, T., NAKASHIMA, Y., ANDO, K., ET AL. 2014. Nuclear expression of chemokine receptor CXCR4 indicates poorer prognosis in gastric cancer. *Anticancer research* 34, 11, 6397–403.

MASUI, T., OTA, I., YOOK, J.-I.I., ET AL. 2014. Snail-induced epithelial-mesenchymal transition promotes cancer stem cell-like phenotype in head and neck cancer cells. *International journal of oncology* 44, 3, 693–9.

MATHIEU, J., ZHANG, Z., ZHOU, W., ET AL. 2011. HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells. *Cancer research* 71, 13, 4640–52.

MCINTOSH, K., BALCH, C., AND TIWARI, A. 2016. Tackling multidrug resistance mediated by efflux transporters in tumor-initiating cells. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 12, 6, 633–44.

MELLADO, M., RODRÍGUEZ-FRADE, J.M., ARAGAY, A., ET AL. 1998. The chemokine monocyte chemotactic protein 1 triggers Janus kinase 2 activation and tyrosine phosphorylation of the CCR2B receptor. *Journal of immunology* 161, 2, 805–13.

MELLADO, M., RODRÍGUEZ-FRADE, J.M., MAÑES, S., AND MARTÍNEZ-A, C. 2001. Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation. *Annual review of immunology* 19, 397–421.

MITCHEM, J., BRENNAN, D., KNOLHOFF, B., ET AL. 2013. Targeting Tumor-Infiltrating Macrophages Decreases Tumor-Initiating Cells, Relieves Immunosuppression, and Improves Chemotherapeutic Responses. *Cancer Research* 73, 3, 1128–41.

MITSUI, K., TOKUZAWA, Y., ITOH, H., ET AL. 2003. The Homeoprotein Nanog Is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells. *Cell* 113, 5, 631–42.

MIYAKE, M., HORI, S., MORIZAWA, Y., ET AL. 2016. CXCL1-Mediated Interaction of Cancer Cells with Tumor-Associated Macrophages and Cancer-Associated Fibroblasts Promotes Tumor Progression in Human Bladder Cancer. *Neoplasia* 18, 10, 636–46.

MOORE, N., HOUGHTON, J., AND LYLE, S. 2012. Slow-Cycling Therapy-Resistant Cancer Cells. *Stem Cells and Development* 21, 10, 1822–30.

MOREL, A.-P., LIÈVRE, M., THOMAS, C., HINKAL, G., ANSIEAU, S., AND PUISIEUX, A. 2008. Generation of Breast Cancer Stem Cells through Epithelial-Mesenchymal Transition. *PLOS ONE* 3, 8, e2888.

MOREL, A.-P., GINESTIER, C., POMMIER, R., ET AL. 2017. A stemness-related ZEB1-MSRB3 axis governs cellular pliancy and breast cancer genome stability. *Nature Medicine* 23, 5, 568–78.

MÜLLER, A., HOMEY, B., SOTO, H., ET AL. 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, 6824, 50–6.

MUNAKATA, K., UEMURA, M., TANAKA, S., ET AL. 2016. Cancer Stem-like Properties in Colorectal Cancer Cells with Low Proteasome Activity. *Clinical Cancer Research* 22, 21, 5277–86.

MURAKAMI, T., MAKI, W., CARDONES, A.R., ET AL. 2002. Expression of CXC chemokine receptor-4 enhances the pulmonary metastatic potential of murine B16 melanoma cells. *Cancer research* 62, 24, 7328–34.

NAIR, N., CALLE, A., ZAHRA, M., ET AL. 2017. A cancer stem cell model as the point of origin of cancer-associated fibroblasts in tumor microenvironment. *Scientific Reports* 7, 1, 6838.

NAKADA, H., NAKAGOMI, H., HIROTSU, Y., ET AL. 2017. A study of tumor heterogeneity in a case with breast cancer. *Breast Cancer* 24, 3, 483–9.

NARIȚA, D., SECLAMAN, E., URSONIU, S., ILINA, R., CIREAP, N., AND ANGHEL, A. 2011. Expression of CCL18 and interleukin-6 in the plasma of breast cancer patients as compared with benign tumor patients and healthy controls. *Romanian journal of morphology and embryology*, 52, 4, 1261–7.

NASTASE, A., PASLARU, L., HERLEA, V., ET AL. 2014. Expression of interleukine-8 as an independent prognostic factor for sporadic colon cancer dissemination. *Journal of medicine and life* 7, 2, 215–9.

NIWA, H., BURDON, T., CHAMBERS, I., AND SMITH, A. 1998. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes & Development* 12, 13, 2048–60.

NIWA, Y., AKAMATSU, H., NIWA, H., SUMI, H., OZAKI, Y., AND ABE, A. 2001. Correlation of tissue and plasma RANTES levels with disease course in patients with breast or cervical cancer. *Clinical cancer research*, 7, 2, 285–9.

NKONDJOCK, A. AND GHADIRIAN, P. 2005. Facteurs de risque du cancer du sein. *médecine/sciences* 21, 2, 175–80.

NOWELL, P. 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 4260, 23–8.

O'BRIEN, C., POLLETT, A., GALLINGER, S., AND DICK, J. 2006. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445, 7123, 106-10.

O'CONNOR, T. AND CRYSTAL, R. 2006. Genetic medicines: treatment strategies for hereditary disorders. *Nature Reviews Genetics* 7, 4, 261-76.

O'HAYRE, M., SALANGA, C.L., HANDEL, T.M., AND ALLEN, S.J. 2008. Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment. *The Biochemical journal* 409, 3, 635–49.

OGLE, B., CASCALHO, M., AND PLATT, J. 2005. Biological implications of cell fusion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 7, 567–75.

OGURA, M., TAKEUCHI, H., KAWAKUBO, H., ET AL. 2013. Clinical significance of CXCL-8/CXCR-2 network in esophageal squamous cell carcinoma. *Surgery* 154, 3, 512–20.

OLADIPO, O., CONLON, S., O'GRADY, A., ET AL. 2011. The expression and prognostic impact of CXC-chemokines in stage II and III colorectal cancer epithelial and stromal tissue. *British journal of cancer* 104, 3, 480–7.

ORIMO, A., GUPTA, P., SGROI, D., ET AL. 2005. Stromal Fibroblasts Present in Invasive Human Breast Carcinomas Promote Tumor Growth and Angiogenesis through Elevated SDF-1/CXCL12 Secretion. *Cell* 121, 3, 335–48.

OSBORNE, C., WILSON, P., AND TRIPATHY, D. 2004. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer: Potential Diagnostic and Therapeutic Applications. *The Oncologist* 9, 4, 361–77.

OUYANG, Y., LIU, K., HAO, M., ET AL. 2016. Radiofrequency ablation-increased CXCL10 is associated with earlier recurrence of hepatocellular carcinoma by promoting stemness. *Tumor Biology* 37, 3, 3697–704.

PALCZEWSKI, K., KUMASAKA, T., HORI, T., ET AL. 2000. Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. *Science* 289, 5480, 739–45.

PAN, J., ZHANG, Q., WANG, Y., AND YOU, M. 2010. 26S Proteasome Activity Is Down-Regulated in Lung Cancer Stem-Like Cells Propagated In Vitro. *PLOS ONE* 5, 10, e13298.

PARDAL, R., CLARKE, M., AND MORRISON, S. 2003. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nature Reviews Cancer* 3, 12, 895–902.

PARKER, C., KIM, R., LI, B., AND CHU, Q. 2012. The chemokine receptor CXCR4 as a novel independent prognostic marker for node-positive breast cancer patients. *Journal of Surgical Oncology* 106, 4, 393–8.

PASTUSHENKO, I., BRISEBARRE, A., SIFRIM, A., ET AL. 2018. Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature* 556, 7702, 463–8.

PEITZSCH, C., COJOC, M., HEIN, L., ET AL. 2016. An Epigenetic Reprogramming Strategy to Resensitize Radioresistant Prostate Cancer Cells. *Cancer Research* 76, 9, 2637–51.

PELLETIER, S., DUHAMEL, F., COULOMBE, P., POPOFF, M.R., AND MELOCHE, S. 2003. Rho family GTPases are required for activation of Jak/STAT signaling by G protein-coupled receptors. *Molecular and cellular biology* 23, 4, 1316–33.

PEROU, C., SØRLIE, T., EISEN, M., ET AL. 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 6797, 747–52.

PETROVA, R. AND JOYNER, A. 2014. Roles for Hedgehog signaling in adult organ homeostasis and repair. *Development* 141, 18, 3445–57.

PHILLIPS, T., MCBRIDE, W., AND PAJONK, F. 2006. The Response of CD24 ⁻/low / CD44 ⁺ Breast Cancer-Initiating Cells to Radiation. *Journal of the National Cancer Institute* 98, 24, 1777–85.

PLACE, A., HUH, S., AND POLYAK, K. 2011. The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment. *Breast Cancer Research* 13, 6, 227.

POLK, A., SVANE, I.-M., ANDERSSON, M., AND NIELSEN, D. 2018. Checkpoint inhibitors in breast cancer – Current status. *Cancer Treatment Reviews* 63, 122–134.

PONTI, D., COSTA, A., ZAFFARONI, N., ET AL. 2005. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer research* 65, 13, 5506–11.

POPPEL, A., DURRANT, L.G., SPENDLOVE, I., ET AL. 2012. The chemokine, CXCL12, is an independent predictor of poor survival in ovarian cancer. *British journal of cancer* 106, 7, 1306–13.

PRADO, G., SUETOMI, K., SHUMATE, D., ET AL. 2007. Chemokine Signaling Specificity: Essential Role for the N-Terminal Domain of Chemokine Receptors. *Biochemistry* 46, 31, 8961.

PRAT, A., KARGINOVA, O., PARKER, J.S., ET AL. 2013. Characterization of cell lines derived from breast cancers and normal mammary tissues for the study of the intrinsic molecular subtypes. *Breast cancer research and treatment* 142, 2, 237–55.

PRAT, A., PARKER, J., KARGINOVA, O., ET AL. 2010. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Research* 12, 5, 1–18.

PRINCE, M., SIVANANDAN, R., KACZOROWSKI, A., ET AL. 2007. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 3, 973–8.

PRISE, K. AND O’SULLIVAN, J. 2009. Radiation-induced bystander signalling in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 9, 5, 351–360.

PU, Y., LI, S., ZHANG, C., BAO, Z., YANG, Z., AND SUN, L. 2015. High expression of CXCR3 is an independent prognostic factor in glioblastoma patients that promotes an invasive phenotype. *Journal of Neuro-Oncology* 122, 1, 43–51.

QIANG, L., WU, T., ZHANG, H.-W.W., ET AL. 2012. HIF-1 α is critical for hypoxia-mediated maintenance of glioblastoma stem cells by activating Notch signaling pathway. *Cell death and differentiation* 19, 2, 284–94.

QIU, G.-Z., JIN, M.-Z., DAI, J.-X., SUN, W., FENG, J.-H., AND JIN, W.-L. 2017. Reprogramming of the Tumor in the Hypoxic Niche: The Emerging Concept and Associated Therapeutic Strategies. *Trends in Pharmacological Sciences* 38, 8, 669–86.

RAHA, D., WILSON, T., PENG, J., ET AL. 2014. The Cancer Stem Cell Marker Aldehyde Dehydrogenase Is Required to Maintain a Drug-Tolerant Tumor Cell Subpopulation. *Cancer Research* 74, 13, 3579–90.

RAJA, U., GOPAL, G., SHIRLEY, S., RAMAKRISHNAN, A., AND RAJKUMAR, T. 2017. Immunohistochemical expression and localization of cytokines/chemokines/growth factors in gastric cancer. *Cytokine* 89, 82–90.

RAJAGOPALAN, L. AND RAJARATHNAM, K. 2006. Structural basis of chemokine receptor function--a model for binding affinity and ligand selectivity. *Bioscience reports* 26, 5, 325–39.

RAMAN, D., SOBOLIK-DELMAIRE, T., AND RICHMOND, A. 2011. Chemokines in health and disease. *Experimental cell research* 317, 5, 575–89.

RAO, S. AND JACKSON, J. 2016. SASP: Tumor Suppressor or Promoter? Yes! *Trends in Cancer* 2, 11, 676–87.

RAPOSO, G. AND STOORVOGEL, W. 2013. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of Cell Biology* 200, 4, 373–83.

RASTI, A., ABOLHASANI, M., ZANJANI, L., ASGARI, M., MEHRAZMA, M., AND MADJD, Z. 2017. Reduced expression of CXCR4, a novel renal cancer stem cell marker, is associated with high-grade renal cell carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 143, 1, 95–104.

RAVE-FRÄNK, M., TEHRANY, N., KITZ, J., ET AL. 2016. Prognostic value of CXCL12 and CXCR4 in inoperable head and neck squamous cell carcinoma. *Strahlentherapie und Onkologie* 192, 1, 47–54.

REIS, S., LEITE, K., PIOVESAN, L., ET AL. 2012. Increased expression of MMP-9 and IL-8 are correlated with poor prognosis of Bladder Cancer. *BMC Urology* 12, 1, 1–5.

REISZ, J.A., BANSAL, N., QIAN, J., ZHAO, W., AND FURDUI, C.M. 2014. Effects of ionizing radiation on biological molecules--mechanisms of damage and emerging methods of detection. *Antioxidants & redox signaling* 21, 2, 260–92.

REN, D., LIN, B., ZHANG, X., ET AL. 2017. Maintenance of cancer stemness by miR-196b-5p contributes to chemoresistance of colorectal cancer cells via activating STAT3 signaling pathway. *Oncotarget* 8, 30, 49807–23.

RENTOFT, M., COATES, P., LOLJUNG, L., WILMS, T., LAURELL, G., AND NYLANDER, K. 2014. Expression of CXCL10 is associated with response to radiotherapy and overall survival in squamous cell carcinoma of the tongue. *Tumor Biology* 35, 5, 4191–8.

REYA, T., MORRISON, S., CLARKE, M., AND WEISSMAN, I. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 6859, 105–11.

REYNOLDS, B. AND WEISS, S. 1996. Clonal and Population Analyses Demonstrate That an EGF-Responsive Mammalian Embryonic CNS Precursor Is a Stem Cell. *Developmental Biology* 175, 1, 1–13.

RICH, J. 2016. Cancer stem cells: understanding tumor hierarchy and heterogeneity. *Medicine* 95, 1S, S2-7.

RIOS, A., FU, N., LINDEMAN, G., AND VISVADER, J. 2014. In situ identification of bipotent stem cells in the mammary gland. *Nature* 506, 7488, 322–7.

RITSCHKA, B., STORER, M., MAS, A., ET AL. 2017. The senescence-associated secretory phenotype induces cellular plasticity and tissue regeneration. *Genes & Development* 31, 2, 172–183.

ROBBINS, D., FEI, D., AND RIOBO, N. 2012. The Hedgehog Signal Transduction Network. *Sci. Signal.* 5, 246, re6–re6.

RODDA, D., CHEW, J.-L., LIM, L.-H., ET AL. 2005. Transcriptional Regulation of Nanog by OCT4 and SOX2. *Journal of Biological Chemistry* 280, 26, 24731–7.

RODRÍGUEZ-FRADE, J.M., VILA-CORO, A.J., DE ANA, A.M., ALBAR, J.P., MARTÍNEZ-A, C., AND MELLADO, M. 1999. The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 7, 3628–33.

LE ROLLE, A.-F.F., CHIU, T.K., FARA, M., ET AL. 2015. The prognostic significance of CXCL1 hypersecretion by human colorectal cancer epithelia and myofibroblasts. *Journal of translational medicine* 13, 199.

ROMPOLAS, P., MESA, K., AND GRECO, V. 2013. Spatial organization within a niche as a determinant of stem-cell fate. *Nature* 502, 7472, 513-8.

SABIN, R. AND ANDERSON, R. 2011. Cellular Senescence - its role in cancer and the response to ionizing radiation. *Genome Integrity* 2, 1, 1–9.

SAHA, S., MUKHERJEE, S., KHAN, P., ET AL. 2016. Aspirin Suppresses the Acquisition of Chemoresistance in Breast Cancer by Disrupting an NFκB–IL6 Signaling Axis Responsible for the Generation of Cancer Stem Cells. *Cancer Research* 76, 7, 2000–12.

SAIGUSA, S., TOIYAMA, Y., TANAKA, K., ET AL. 2010. Stromal CXCR4 and CXCL12 Expression is Associated with Distant Recurrence and Poor Prognosis in Rectal Cancer After Chemoradiotherapy. *Annals of Surgical Oncology* 17, 8, 2051-8.

SAKANE, R., TSUBAMOTO, H., SAKATA, K., ET AL. 2014. Expression of chemokine ligand 18 in stage IA low-grade endometrial cancer. *Anticancer research* 34, 10, 5331–6.

SALVUCCI, O., BOUCHARD, A., BACCARELLI, A., ET AL. 2006. The role of CXCR4 receptor expression in breast cancer: a large tissue microarray study. *Breast Cancer Research and Treatment* 97, 3, 275–83.

SANSONE, P., BERISHAJ, M., RAJASEKHAR, V., ET AL. 2017. Evolution of Cancer Stem-like Cells in Endocrine-Resistant Metastatic Breast Cancers Is Mediated by Stromal Microvesicles. *Cancer Research* 77, 8, 1927–41.

SARKAR, S., HORN, G., MOULTON, K., ET AL. 2013. Cancer Development, Progression, and Therapy: An Epigenetic Overview. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 10, 21087–113.

SARVAIYA, P.J., GUO, D., ULASOV, I., GABIKIAN, P., AND LESNIAK, M.S. 2013. Chemokines in tumor progression and metastasis. *Oncotarget* 4, 12, 2171–85.

SASAKI, S., BABA, T., SHINAGAWA, K., MATSUSHIMA, K., AND MUKAIDA, N. 2014. Crucial involvement of the CCL3–CCR5 axis–mediated fibroblast accumulation in colitis–associated carcinogenesis in mice. *International Journal of Cancer* 135, 6, 1297–306.

SCHEEL, C. AND WEINBERG, R. 2012. Cancer stem cells and epithelial–mesenchymal transition: Concepts and molecular links. *Seminars in Cancer Biology* 22, 5-6, 396–403.

SCHIEBER, M. AND CHANDEL, N. 2014. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology* 24, 10, R453–62.

SCHWAB, L., PEACOCK, D., MAJUMDAR, D., ET AL. 2012. Hypoxia-inducible factor 1 α promotes primary tumor growth and tumor-initiating cell activity in breast cancer. *Breast Cancer Research* 14, 1, 1–25.

SCHWITALLA, S., FINGERLE, A.A., CAMMARERI, P., ET AL. 2013. Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell* 152, 1-2, 25–38.

SHACKLETON, M., VAILLANT, F., SIMPSON, K., ET AL. 2006. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 439, 7072, 84–8.

SHAFEE, N., SMITH, C., WEI, S., ET AL. 2008. Cancer Stem Cells Contribute to Cisplatin Resistance in Brca1/p53–Mediated Mouse Mammary Tumors. *Cancer Research* 68, 9, 3243–50.

SHAO, C., SULLIVAN, J.P., GIRARD, L., ET AL. 2014. Essential role of aldehyde dehydrogenase 1A3 for the maintenance of non-small cell lung cancer stem cells is associated with the STAT3 pathway. *Clinical cancer research* 20, 15, 4154–66.

SHUANG, Z.-Y., WU, W.-C., XU, J., ET AL. 2014. Transforming growth factor- β 1-induced epithelial–mesenchymal transition generates ALDH-positive cells with stem cell properties in cholangiocarcinoma. *Cancer Letters* 354, 2, 320–8.

SIMA, A., SIMA, H., RAFATPANAH, H., ET AL. 2014. Serum Chemokine Ligand 5 (CCL5/RANTES) Level Might be Utilized as a Predictive Marker of Tumor Behavior and Disease Prognosis in Patients with Gastric Adenocarcinoma. *Journal of Gastrointestinal Cancer* 45, 4, 476–80.

SINGH, J.K., FARNIE, G., BUNDRED, N.J., ET AL. 2013a. Targeting CXCR1/2 significantly reduces breast cancer stem cell activity and increases the efficacy of inhibiting HER2 via HER2-dependent and -independent mechanisms. *Clinical cancer research*, 19, 3, 643–56.

SINGH, S., BROCKER, C., KOPPAKA, V., ET AL. 2013b. Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilic stress. *Free Radical Biology and Medicine* 56, 89–101.

SINGH, S.K., CLARKE, I.D., TERASAKI, M., ET AL. 2003. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer research* 63, 18, 5821–8.

SISHC, B., NELSON, C., MCKENNA, M., ET AL. 2015. Telomeres and Telomerase in the Radiation Response: Implications for Instability, Reprograming, and Carcinogenesis. *Frontiers in Oncology* 5, 257.

SMITH, J., THO, L., XU, N., AND GILLESPIE, D. 2010. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 Pathways in DNA Damage Signaling and Cancer. *Advances in Cancer Research* 108, 3, 73-112.

SORIANO, S.F., SERRANO, A., HERNANZ-FALCÓN, P., ET AL. 2003. Chemokines integrate JAK/STAT and G-protein pathways during chemotaxis and calcium flux responses. *European journal of immunology* 33, 5, 1328–33.

SØRLIE, T., PEROU, C.M., TIBSHIRANI, R., ET AL. 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 19, 10869–74.

SOUTH, A., CHO, R., AND ASTER, J. 2012. The double-edged sword of Notch signaling in cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 23, 4, 458–64.

STANISAVLJEVIĆ, L., ABMUS, J., STORLI, K., LEH, S., DAHL, O., AND MYKLEBUST, M. 2015. CXCR4, CXCL12 and the relative CXCL12-CXCR4 expression as prognostic factors in colon cancer. *Tumor Biology* 37, 6, 7441–52.

STEFANSSON, O. AND ESTELLER, M. 2013. Epigenetic Modifications in Breast Cancer and Their Role in Personalized Medicine. *The American Journal of Pathology* 183, 4, 1052–63.

STEG, A., BEVIS, K., KATRE, A., ET AL. 2012. Stem Cell Pathways Contribute to Clinical Chemoresistance in Ovarian Cancer. *Clinical Cancer Research* 18, 3, 869–81.

STENDAHL, M., KRONBLAD, A., RYDÉN, L., EMDIN, S., BENGSSON, N.O., AND LANDBERG, G. 2004. Cyclin D1 overexpression is a negative predictive factor for tamoxifen response in postmenopausal breast cancer patients. *British journal of cancer* 90, 10, 1942–8.

STERLACCI, W., SAKER, S., HUBER, B., FIEGL, M., AND TZANKOV, A. 2015. Expression of the CXCR4 ligand SDF-1/CXCL12 is prognostically important for adenocarcinoma and large cell carcinoma of the lung. *Virchows Archiv* 468, 4, 463–71.

STINGL, J., EAVES, C., ZANDIEH, I., AND EMERMAN, J. 2001. Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue. *Breast Cancer Research and Treatment* 67, 2, 93–109.

STINGL, J., EIREW, P., RICKETSON, I., ET AL. 2006. Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature* 439, 7079, 993–7.

STRICKER, S. AND POLLARD, S. 2014. Reprogramming cancer cells to pluripotency. *Epigenetics* 9, 6, 798–802.

STRIETER, R.M., POLVERINI, P.J., KUNKEL, S.L., ET AL. 1995. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *The Journal of biological chemistry* 270, 45, 27348–57.

STUELTEN, C., BUSCH, J., TANG, B., ET AL. 2010. Transient Tumor-Fibroblast Interactions Increase Tumor Cell Malignancy by a TGF- β Mediated Mechanism in a Mouse Xenograft Model of Breast Cancer. *PLOS ONE* 5, 3, e9832.

SU, L., ZHANG, J., XU, H., ET AL. 2005. Differential Expression of CXCR4 Is Associated with the Metastatic Potential of Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Clinical Cancer Research* 11, 23, 8273–80.

SUETSUGU, A., NAGAKI, M., AOKI, H., MOTOHASHI, T., KUNISADA, T., AND MORIWAKI, H. 2006. Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 351, 4, 820–4.

SUGASAWA, H., ICHIKURA, T., TSUJIMOTO, H., ET AL. 2008. Prognostic significance of expression of CCL5/RANTES receptors in patients with gastric cancer. *Journal of Surgical Oncology* 97, 5, 445–50.

SUI, P., HU, P., ZHANG, T., ZHANG, X., LIU, Q., AND DU, J. 2014. High expression of CXCR-2 correlates with lymph node metastasis and predicts unfavorable prognosis in resected esophageal carcinoma. *Medical Oncology* 31, 2, 809.

SUN, J.H., FAN, N., AND ZHANG Y. 2016. Correlation between serum level of chemokine (C-C motif) ligand 18 and poor prognosis in breast cancer. *Genetics and Molecular Research* 15, 3.

SUZUKI, M., MOHAMED, S., NAKAJIMA, T., ET AL. 2008. Aberrant methylation of CXCL12 in non-small cell lung cancer is associated with an unfavorable prognosis. *International journal of oncology* 33, 1, 113–9.

SZATMÁRI, T., KIS, D., BOGDÁNDI, E., ET AL. 2017. Extracellular Vesicles Mediate Radiation-Induced Systemic Bystander Signals in the Bone Marrow and Spleen. *Frontiers in Immunology* 8, 347.

SZATMÁRI, T., PERSA, E., KIS, E., ET AL. 2018. Extracellular vesicles mediate low dose ionizing radiation-induced immune and inflammatory responses in the blood. *International Journal of Radiation Biology*, 1–31.

TAKAHASHI, K., SIVINA, M., HOELLENRIEGEL, J., ET AL. 2015. CCL3 and CCL4 are biomarkers for B cell receptor pathway activation and prognostic serum markers in diffuse large B cell lymphoma. *British journal of haematology* 171, 5, 726–35.

TAKAHASHI, K. AND YAMANAKA, S. 2006. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126, 4, 663–76.

TAKAHASHI, R., TAKESHITA, F., FUJIWARA, T., ONO, M., AND OCHIYA, T. 2011. Cancer Stem Cells in Breast Cancer. *Cancers* 3, 1, 1311–28.

TAKAISHI, S., OKUMURA, T., TU, S., ET AL. 2009. Identification of Gastric Cancer Stem Cells Using the Cell Surface Marker CD44. *Stem Cells* 27, 5, 1006–20.

TALATI, P., GU, L., ELLSWORTH, E., ET AL. 2015. Jak2-Stat5a/b Signaling Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Stem-Like Cell Properties in Prostate Cancer. *The American Journal of Pathology* 185, 9, 2505–22.

TANABE, Y., SASAKI, S., MUKAIDA, N., AND BABA, T. 2016. Blockade of the chemokine receptor, CCR5, reduces the growth of orthotopically injected colon cancer cells via limiting cancer-associated fibroblast accumulation. *Oncotarget* 7, 30, 48335–45.

TANEI, T., MORIMOTO, K., SHIMAZU, K., ET AL. 2009. Association of Breast Cancer Stem Cells Identified by Aldehyde Dehydrogenase 1 Expression with Resistance to Sequential Paclitaxel and Epirubicin-Based Chemotherapy for Breast Cancers. *Clinical Cancer Research* 15, 12, 4234–41.

TANG, S., XIANG, T., HUANG, S., ET AL. 2016a. Ovarian cancer stem-like cells differentiate into endothelial cells and participate in tumor angiogenesis through autocrine CCL5 signaling. *Cancer Letters* 376, 1, 137–47.

TANG, X., LI, X., LI, Z., ET AL. 2016b. Downregulation of CXCR7 inhibits proliferative capacity and stem cell-like properties in breast cancer stem cells. *Tumor Biology* 37, 10, 13425–33.

TATA, P., MOU, H., PARDO-SAGANTA, A., ET AL. 2013. Dedifferentiation of committed epithelial cells into stem cells in vivo. *Nature* 503, 7475, 218–23.

TERPOS, E., POLITOU, M., SZYDLO, R., GOLDMAN, J., APPERLEY, J., AND RAHEMTULLA, A. 2003. Serum levels of macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 α) correlate with the extent of bone disease and survival in patients with multiple myeloma. *British Journal of Haematology* 123, 1, 106–9.

THELEN, M. 2001. Dancing to the tune of chemokines. *Nature immunology* 2, 2, 129–34.

TILL, J.E. AND MCCULLOCH, E.A. 1961. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation research* 14, 213–22.

TILL, J.E., MCCULLOCH, E.A., AND SIMINOVITCH, L. 1964. A Stochastic Model Of Stem Cell Proliferation, Based On The Growth Of Spleen Colony-Forming Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 51, 29–36.

TKACH, M. AND THÉRY, C. 2016. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell* 164, 6, 1226–32.

TOMAO, S., TOMAO, F., ROSSI, L., ET AL. 2015. Triple-negative breast cancer: new perspectives for targeted therapies. *OncoTargets and Therapy Volume 8*, 177–93.

TORRES, L., RIBEIRO, F., PANDIS, N., ANDERSEN, J., HEIM, S., AND TEIXEIRA, M. 2007. Intratumor genomic heterogeneity in breast cancer with clonal divergence between primary carcinomas and lymph node metastases. *Breast Cancer Research and Treatment* 102, 2, 143–55.

TRAUTMANN, F., COJOC, M., KURTH, I., ET AL. 2014. CXCR4 as biomarker for radioresistant cancer stem cells. *International Journal of Radiation Biology* 90, 8, 687–99.

TRAVERSO, N., RICCIARELLI, R., NITTI, M., ET AL. 2013. Role of Glutathione in Cancer Progression and Chemoresistance. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013, 1–10.

TSUYADA, A., CHOW, A., WU, J., ET AL. 2012. CCL2 Mediates Cross-talk between Cancer Cells and Stromal Fibroblasts That Regulates Breast Cancer Stem Cells. *Cancer Research* 72, 11, 2768–79.

TSUZUKI, H., TAKAHASHI, N., KOJIMA, A., ET AL. 2006. Oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas expressing CCR7 have poor prognoses. *Auris Nasus Larynx* 33, 1, 37–42.

TU, Z., XIE, S., XIONG, M., ET AL. 2016. CXCR4 is involved in CD133-induced EMT in non-small cell lung cancer. *International Journal of Oncology* 50, 2, 505–14.

TURNER, N., NEVEN, P., LOIBL, S., AND ANDRE, F. 2017. Advances in the treatment of advanced oestrogen-receptor-positive breast cancer. *The Lancet* 389, 10087, 2403–14.

TUTT, A. AND YARNOLD, J. 2006. Radiobiology of breast cancer. *Clinical oncology* 18, 3, 166–78.

UCHI, Y., TAKEUCHI, H., MATSUDA, S., ET AL. 2016. CXCL12 expression promotes esophageal squamous cell carcinoma proliferation and worsens the prognosis. *BMC Cancer* 16, 1, 514.

UENO, T., TOI, M., SAJI, H., ET AL. 2000. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. *Clinical cancer research*, 6, 8, 3282–9.

VALKOVIĆ, T., LUČIN, K., KRSTULJA, M., DOBI-BABIĆ, R., AND JONJIĆ, N. 1998. Expression of monocyte chemotactic protein-1 in human invasive ductal breast cancer. *Pathology - Research and Practice* 194, 5, 335–40.

VARGO-GOGOLA, T. AND ROSEN, J. 2007. Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nature Reviews Cancer* 7, 9, 659-72.

VARLAKHANOVA, N., COTTERMAN, R., DEVRIES, W., ET AL. 2010. myc maintains embryonic stem cell pluripotency and self-renewal. *Differentiation* 80, 1, 9–19.

VERMEULEN, L., MELO, F., HEIJDEN, M., ET AL. 2010. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nature Cell Biology* 12, 5, 468–76.

VILLASANTE, A., PIAZZOLLA, D., LI, H., GOMEZ-LOPEZ, G., DJABALI, M., AND SERRANO, M. 2011. Epigenetic regulation of Nanog expression by Ezh2 in pluripotent stem cells. *Cell cycle* 10, 9, 1488–98.

VISVADER, J. 2009. Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes & Development* 23, 22, 2563–77.

VISVADER, J. AND LINDEMAN, G. 2008. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nature Reviews Cancer* 8, 10, 755–68.

VLASHI, E., CHEN, A.M., BOYRIE, S., ET AL. 2016. Radiation-Induced Dedifferentiation of Head and Neck Cancer Cells Into Cancer Stem Cells Depends on

Human Papillomavirus Status. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 94, 5, 1198–206.

VLASHI, E., KIM, K., LAGADEC, C., ET AL. 2009. In vivo imaging, tracking, and targeting of cancer stem cells. *Journal of the National Cancer Institute* 101, 5, 350–9.

VLASHI, E., LAGADEC, C., CHAN, M., FROHNEN, P., MCDONALD, A.J., AND PAJONK, F. 2013. Targeted elimination of breast cancer cells with low proteasome activity is sufficient for tumor regression. *Breast cancer research and treatment* 141, 2, 197–203.

VLASHI, E., LAGADEC, C., VERGNES, L., ET AL. 2011. Metabolic state of glioma stem cells and nontumorigenic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 38, 16062–7.

VLASHI, E., LAGADEC, C., VERGNES, L., ET AL. 2014. Metabolic differences in breast cancer stem cells and differentiated progeny. *Breast cancer research and treatment* 146, 3, 525–34.

WAGNER, P., MOO, T.-A., ARORA, N., ET AL. 2008. The Chemokine Receptors CXCR4 and CCR7 are Associated with Tumor Size and Pathologic Indicators of Tumor Aggressiveness in Papillary Thyroid Carcinoma. *Annals of Surgical Oncology* 15, 10, 2833–41.

WALLDEN, B., STORHOFF, J., NIELSEN, T., ET AL. 2015. Development and verification of the PAM50-based Prosigna breast cancer gene signature assay. *BMC Medical Genomics* 8, 1, 54.

WANG, D., WANG, H., BROWN, J., ET AL. 2006. CXCL1 induced by prostaglandin E2 promotes angiogenesis in colorectal cancer. *The Journal of Experimental Medicine* 203, 4, 941–951.

WANG, J., LEVASSEUR, D.N., AND ORKIN, S.H. 2008. Requirement of Nanog dimerization for stem cell self-renewal and pluripotency. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 17, 6326–31.

WANG, J., WAKEMAN, T., LATHIA, J., ET AL. 2010. Notch Promotes Radioresistance of Glioma Stem Cells. *Stem Cells* 28, 1, 17–28.

WANG, L., ZHANG, C., XU, J., ET AL. 2016a. CXCL1 gene silencing inhibits HGC803 cell migration and invasion and acts as an independent prognostic factor for poor survival in gastric cancer. *Molecular medicine reports* 14, 5, 4673–9.

WANG, M., CHEN, G.-Y.Y., SONG, H.-T.T., HONG, X., YANG, Z.-Y.Y., AND SUI, G.-J.J. 2011. Significance of CXCR4, phosphorylated STAT3 and VEGF-A expression in resected non-small cell lung cancer. *Experimental and therapeutic medicine* 2, 3, 517–22.

WANG, M., WANG, Y., AND ZHONG, J. 2015a. Side population cells and drug resistance in breast cancer. *Molecular Medicine Reports*, 11, 4297-302.

WANG, S.-C.C., YU, C.-F.F., HONG, J.-H.H., TSAI, C.-S.S., AND CHIANG, C.-S.S. 2013a. Radiation therapy-induced tumor invasiveness is associated with SDF-1-regulated macrophage mobilization and vasculogenesis. *PLOS ONE* 8, 8, e69182.

WANG, T., WEI, Y., TIAN, L., ET AL. 2016b. C-C motif chemokine ligand 5 (CCL5) levels in gastric cancer patient sera predict occult peritoneal metastasis and a poorer prognosis. *International Journal of Surgery* 32, 136–42.

WANG, W., QUAN, Y., FU, Q., ET AL. 2014a. Dynamics between Cancer Cell Subpopulations Reveals a Model Coordinating with Both Hierarchical and Stochastic Concepts. *PLOS ONE* 9, 1, e84654.

WANG, X., NG, R., MING, X., ET AL. 2013b. Epigenetic Regulation of Pluripotent Genes Mediates Stem Cell Features in Human Hepatocellular Carcinoma and Cancer Cell Lines. *PLOS ONE* 8, 9, e72435.

WANG, Y., LI, W., PATEL, S., ET AL. 2014b. Blocking the formation of radiation-induced breast cancer stem cells. *Oncotarget* 5, 11, 3743–55.

WANG, Z., LIU, H., SHEN, Z., ET AL. 2015b. The prognostic value of CXC-chemokine receptor 2 (CXCR2) in gastric cancer patients. *BMC Cancer* 15, 1, 766.

WANG, Z., XIE, H., ZHOU, L., ET AL. 2016c. CCL2/CCR2 axis is associated with postoperative survival and recurrence of patients with non-metastatic clear-cell renal cell carcinoma. *Oncotarget* 7, 32, 51525–34.

WANG, T., GILKES, D., TAKANO, N., ET AL. 2014c. Hypoxia-inducible factors and RAB22A mediate formation of microvesicles that stimulate breast cancer invasion and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 31, E3234–E3242.

WEIGELT, B., BAEHNER, F., AND REIS-FILHO, J. 2010. The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. *The Journal of Pathology* 220, 2, 263–80.

WILEY, H.E., GONZALEZ, E.B., MAKI, W., WU, M.T., AND HWANG, S.T. 2001. Expression of CC chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma. *Journal of the National Cancer Institute* 93, 21, 1638–43.

WOODWARD, W.A., CHEN, M.S., BEHBOD, F., ALFARO, M.P., BUCHHOLZ, T.A., AND ROSEN, J.M. 2007. WNT/beta-catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 2, 618–23.

WU, C. AND ALMAN, B.A. 2008. Side population cells in human cancers. *Cancer letters* 268, 1, 1–9.

WU, W., QIAN, L., CHEN, X., AND DING, B. 2015. Prognostic significance of CXCL12, CXCR4, and CXCR7 in patients with breast cancer. *International journal of clinical and experimental pathology* 8, 10, 13217–24.

WU, Y., JIN, M., XU, H., ET AL. 2010. Clinicopathologic Significance of HIF-1 α , CXCR4, and VEGF Expression in Colon Cancer. *Clinical and Developmental Immunology* 2010, e537531.

WU, Z., HAN, X., YAN, J., ET AL. 2012. The prognostic significance of chemokine receptor CXCR3 expression in colorectal carcinoma. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 66, 5, 373–7.

XIA, X., LIU, K., ZHANG, H., AND SHANG, Z. 2015. Correlation between CCR7 expression and lymph node metastatic potential of human tongue carcinoma. *Oral diseases* 21, 1, 123–31.

XIA, Y., LIU, L., XIONG, Y., ET AL. 2017. Prognostic value of CC-chemokine receptor seven expression in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with tyrosine kinase inhibitor. *BMC Cancer* 17, 1, 70.

XIANG, Z., JIANG, D., XIA, G., ET AL. 2015. CXCL1 expression is correlated with Snail expression and affects the prognosis of patients with gastric cancer. *Oncology Letters* 10, 4, 2458-64.

XIAO, W., DONG, W., ZHANG, C., ET AL. 2013. Effects of the epigenetic drug MS-275 on the release and function of exosome-related immune molecules in hepatocellular carcinoma cells. *European Journal of Medical Research* 18, 1, 1–7.

XIAO, Y.-C., YANG, Z.-B., CHENG, X.-S., ET AL. 2015. CXCL8, overexpressed in colorectal cancer, enhances the resistance of colorectal cancer cells to anoikis. *Cancer Letters* 361, 1, 22–32.

XIE, G., JI, A., YUAN, Q., ET AL. 2014. Tumour-initiating capacity is independent of epithelial-mesenchymal transition status in breast cancer cell lines. *British journal of cancer* 110, 10, 2514–23.

XIE, G., YAO, Q., LIU, Y., ET AL. 2012. IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition promotes the generation of breast cancer stem-like cells analogous to mammosphere cultures. *International journal of oncology* 40, 4, 1171–9.

XU, C., SUN, X., QIN, S., ET AL. 2015a. Let-7a regulates mammosphere formation capacity through Ras/NF- κ B and Ras/MAPK/ERK pathway in breast cancer stem cells. *Cell Cycle* 14, 11, 1686–97.

XU, H., LIN, F., WANG, Z., ET AL. 2017. CXCR2 Promotes Breast Cancer Metastasis and Chemoresistance via suppression of AKT1 and activation of COX2. *Cancer Letters*, 412, 69-80.

XU, J., CHEN, Y., AND OLOPADE, O. 2010. MYC and Breast Cancer. *Genes & Cancer* 1, 6, 629–40.

XU, X., CHAI, S., WANG, P., ET AL. 2015b. Aldehyde dehydrogenases and cancer stem cells. *Cancer Letters* 369, 1, 50–7.

XU, Z., ROBITAILLE, A., BERNDT, J., ET AL. 2016. Wnt/ β -catenin signaling promotes self-renewal and inhibits the primed state transition in naïve human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, 42, e6382–90.

XU, S., WANG, J., DING, N., ET AL. 2015c. Exosome-mediated microRNA transfer plays a role in radiation-induced bystander effect. *RNA Biology* 12, 12, 1355–63.

YAAL-HAHOSHEN, N., SHINA, S., LEIDER-TREJO, L., ET AL. 2006. The Chemokine CCL5 as a Potential Prognostic Factor Predicting Disease Progression in Stage II Breast Cancer Patients. *Clinical Cancer Research* 12, 15, 4474–80.

YAMASHITA, T., JI, J., BUDHU, A., ET AL. 2009. EpCAM-Positive Hepatocellular Carcinoma Cells Are Tumor-Initiating Cells With Stem/Progenitor Cell Features. *Gastroenterology* 136, 3, 1012–24.

YAN, T., MIZUTANI, A., CHEN, L., ET AL. 2014. Characterization of Cancer Stem-Like Cells Derived from Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Transformed by Tumor-Derived Extracellular Vesicles. *Journal of Cancer* 5, 7, 572–84.

YAN, Y., HEIN, A.L., GREER, P.M., ET AL. 2015. A novel function of HER2/Neu in the activation of G2/M checkpoint in response to γ -irradiation. *Oncogene* 34, 17, 2215–26.

YANG, XIN, WANG, ET AL. 2015. Chemokine receptor CXCR4 and its ligand CXCL12 expressions and clinical significance in bladder cancer. *Genetics and molecular research* 14, 4, 17699–707.

YANG, Y., ZHAI, C., CHANG, Y., ET AL. 2016. High expression of chemokine CCL2 is associated with recurrence after surgery in clear-cell renal cell carcinoma. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 34, 5, 238.e19–26.

YAO, M., YU, E., STAGGS, V., FAN, F., AND CHENG, N. 2016. Elevated expression of chemokine C-C ligand 2 in stroma is associated with recurrent basal-like breast cancers. *Modern Pathology* 29, 8, 810–23.

YIN, H. AND GLASS, J. 2011. The phenotypic radiation resistance of CD44+/CD24(- or low) breast cancer cells is mediated through the enhanced activation of ATM signaling. *PLOS ONE* 6, 9, e24080.

YING, J., XU, Q., ZHANG, G., LIU, B., AND ZHU, L. 2012. The expression of CXCL12 and CXCR4 in gastric cancer and their correlation to lymph node metastasis. *Medical Oncology* 29, 3, 1716–22.

YOSHIDOME, H., KOHNO, H., SHIDA, T., ET AL. 2009. Significance of monocyte chemoattractant protein-1 in angiogenesis and survival in colorectal liver metastases. *International journal of oncology* 34, 4, 923–30.

YU, F., YAO, H., ZHU, P., ET AL. 2007. let-7 Regulates Self Renewal and Tumorigenicity of Breast Cancer Cells. *Cell* 131, 6, 1109–23.

ZHANG, H., YUE, J., JIANG, Z., ET AL. 2017a. CAF-secreted CXCL1 conferred radioresistance by regulating DNA damage response in a ROS-dependent manner in esophageal squamous cell carcinoma. *Cell Death & Disease* 8, 5, e2790.

ZHANG, J., LIU, J., LIU, Y., ET AL. 2015a. miR-101 represses lung cancer by inhibiting interaction of fibroblasts and cancer cells by down-regulating CXCL12. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 74, 215–21.

ZHANG, J., WANG, X., VIKASH, V., ET AL. 2016. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016, 1–18.

ZHANG, J., YAN, Y., CUI, X., ET AL. 2017b. CCL2 expression correlates with Snail expression and affects the prognosis of patients with gastric cancer. *Pathology - Research and Practice* 213, 3, 217–21.

ZHANG, L., YE, S.-B., MA, G., ET AL. 2013. The expressions of MIF and CXCR4 protein in tumor microenvironment are adverse prognostic factors in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of Translational Medicine* 11, 1, 1–10.

ZHANG, M., TSIMELZON, A., CHANG, C.-H., ET AL. 2015b. Intratumoral Heterogeneity in a Trp53-Null Mouse Model of Human Breast Cancer. *Cancer Discovery* 5, 5, 520–33.

ZHANG, N.-H.H., LI, J., LI, Y., ET AL. 2012a. Co-expression of CXCR4 and CD133 proteins is associated with poor prognosis in stage II-III colon cancer patients. *Experimental and therapeutic medicine* 3, 6, 973–82.

ZHANG, H.-C., LIU, X.-B., HUANG, S., ET AL. 2012b. Microvesicles Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Stimulated by Hypoxia Promote Angiogenesis Both In Vitro and In Vivo. *Stem Cells and Development* 21, 18, 3289–3297.

ZHANG, S., BALCH, C., CHAN, M., ET AL. 2008. Identification and Characterization of Ovarian Cancer-Initiating Cells from Primary Human Tumors. *Cancer Research* 68, 11, 4311–20.

ZHANG, X., ZHAO, X., SHAO, S., ET AL. 2014. Notch1 induces epithelial-mesenchymal transition and the cancer stem cell phenotype in breast cancer cells and STAT3 plays a key role. *International Journal of Oncology* 46, 1141-8.

ZHANG, Y., YAO, F., YAO, X., ET AL. 2009. Role of CCL5 in invasion, proliferation and proportion of CD44+/CD24- phenotype of MCF-7 cells and correlation of CCL5 and CCR5 expression with breast cancer progression. *Oncology reports* 21, 4, 1113–21.

ZHAO, B.-C.C., WANG, Z.-J.J., MAO, W.-Z.Z., ET AL. 2011. CXCR4/SDF-1 axis is involved in lymph node metastasis of gastric carcinoma. *World journal of gastroenterology* 17, 19, 2389–96.

ZHAO, J. 2016. Cancer stem cells and chemoresistance: The smartest survives the raid. *Pharmacology & Therapeutics* 160, 145–58.

ZHOU, B., SUN, C., LI, N., ET AL. 2016a. Cisplatin-induced CCL5 secretion from CAFs promotes cisplatin-resistance in ovarian cancer via regulation of the STAT3 and PI3K/Akt signaling pathways. *International Journal of Oncology* 48, 5, 2087-97.

ZHOU, D., SHAO, L., AND SPITZ, D.R. 2014. Reactive oxygen species in normal and tumor stem cells. *Advances in cancer research* 122, 1–67.

ZHOU, H., WU, J., WANG, T., ZHANG, X., AND LIU, D. 2016b. CXCL10/CXCR3 axis promotes the invasion of gastric cancer via PI3K/AKT pathway-dependent MMPs production. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 82, 479–88.

ZHOU, G., MENG, S., LI, Y., GHEBRE, Y., AND COOKE, J. 2016c. Optimal ROS Signaling Is Critical for Nuclear Reprogramming. *Cell Reports* 15, 5, 919–25.

ZHOU, S., SCHUETZ, J., BUNTING, K., ET AL. 2001. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nature Medicine* 7, 9, 1028–34.

ZHOU, S., XU, S., TAO, H., ET AL. 2013. CCR7 Expression and Intratumoral FOXP3+ Regulatory T Cells are Correlated with Overall Survival and Lymph Node Metastasis in Gastric Cancer. *PLOS ONE* 8, 9, e74430.

ZLOTNIK, A., BURKHARDT, A.M., AND HOMEY, B. 2011. Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. *Nature reviews. Immunology* 11, 9, 597–606.

ZLOTNIK, A., YOSHIE, O., AND NOMIYAMA, H. 2006. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome biology* 7, 12, 243.

ZOU, A., LAMBERT, D., YEH, H., ET AL. 2014. Elevated CXCL1 expression in breast cancer stroma predicts poor prognosis and is inversely associated with expression of TGF- β signaling proteins. *BMC cancer* 14, 781.

ZUCCARI, D., LEONEL, C., CASTRO, R., ET AL. 2012. An immunohistochemical study of interleukin-8 (IL-8) in breast cancer. *Acta Histochemica* 114, 6, 571–6.

ANNEXES

ANNEXE 1

Stade	Tumeur (T)	Ganglion (N)	Métastase (M)	Description
0	in situ	N0	M0	Cancer non invasif
I	T1	N0	M0	Tumeur < 2 cm, pas de propagation à l'extérieur du sein
II	T0/1	N1	M0	Tumeur de 2 à 5 cm et/ou atteinte ganglionnaire satellite mineure
	T2	N0/1		
	T3	N0		
III	T0/1/2	N2	M0	Atteinte locale importante et/ou atteinte ganglionnaire satellite majeure
	T4	N0/1/2		
	Tout T	N3		
IV	Tout T	Tout N	M1	Tumeur avancée localement et métastases à distance

Tableau de la classification TNM des stades de cancer de sein

ANNEXE 2

Effet de la radiothérapie sur les cellules souches cancéreuses de cancer du sein : résistance, reprogrammation et traitements.

Bailleul-Dubois J., Bidan N., Le Bourhis X., Lagadec C.

Mots clés : cellules souches cancéreuses, radiothérapie, résistance, reprogrammation, traitements

Résumé :

L'identification des cellules souches cancéreuses (CSC) cette dernière décennie a permis l'émergence de nouveaux espoirs. Néanmoins, leur caractérisation a mis en évidence une certaine résistance aux traitements anti-cancéreux tels que la radiothérapie. De plus, il a récemment été montré que certaines cellules non-CSC pouvaient réacquérir le phénotype de cellules souches cancéreuses sous l'effet de traitement anticancéreux, enrichissant d'autant la population résistante. Nous proposons dans cette revue de faire un tour d'horizon des différentes propriétés des CSC et tout particulièrement des mécanismes de radiorésistance, de reprogrammation et des approches thérapeutiques envisagées pour outrepasser ces résistances.

Keywords : Cancer stem cells, radiotherapy, resistance, reprogramming

Abstract :

In the past decade, the identification of cancer stem cells (CSC) has raised new hope for the development of anti-cancer therapies. Nevertheless, CSC characterization highlights the relative resistance of CSCs to conventional therapies such as ionizing radiation. Moreover, it has been recently shown that some anti-cancer treatments could induce non-CSCs reprogramming into CSCs through anti-cancer treatment effect, enriching tumor with resistant cells. In this review, we will discuss CSC properties ; we will especially describe the radio-

resistance of CSC, reprogramming and explore the therapeutic approaches to by-pass these resistances.

1. Introduction

Malgré d'incommensurables efforts menés par la recherche et une multiplication/diversification des traitements, le cancer demeure la principale cause de mortalité. Néanmoins, depuis une décennie, de nouvelles pistes telles que l'immunothérapie ont amené de nouveaux espoirs. Parmi ces nouvelles approches, un concept a particulièrement révolutionné la vision que l'on avait de l'organisation tumorale. En effet, il a longtemps été admis que le développement tumoral suivait un modèle stochastique de développement darwinien, selon lequel chaque cellule cancéreuse a le potentiel de reformer une nouvelle tumeur et que l'hétérogénéité tumorale s'opérait au gré des avantages sélectifs apportés par les mutations. Ainsi, le séquençage génome entier (WGS : *whole genome sequencing*) sur cellule unique permet aujourd'hui de reconstruire l'historique de la tumeur avec l'acquisition progressive de mutations majeures conduisant à l'expansion de clones.

En 1997, la découverte d'une sous-population hautement tumorigène dans les leucémies a remis en cause le modèle stochastique au profit d'un modèle d'organisation hiérarchique des tumeurs [1]. Ces cellules, alors nommées « cellules souches cancéreuses » (CSC), cellules souches tumorales (CST) ou cellules initiateuses de tumeur (CIT), sont les seules tumorales à avoir la capacité de régénérer une tumeur avec une certaine diversité cellulaire. Ainsi, en étudiant l'expression des marqueurs de surface CD34 et CD38, Bonnet et Dick ont montré que seules les cellules leucémiques CD34⁺⁺/CD38⁻ représentaient la population capable d'initier des leucémies *in vivo*. A l'inverse, dans les mêmes conditions, le phénotype CD34⁺/CD38⁺ n'entraînait aucun développement tumoral. De manière essentielle, à l'instar des cellules souches normales, les CST CD34⁺⁺/CD38⁻ régénéraient des

tumeurs avec une diversité cellulaires contenant des cellules CD34⁺⁺/CD38⁻ signe d'une capacité d'auto-renouvellement et des cellules CD34⁺/CD38⁺, signe d'une capacité de différenciation [1].

Dans le cancer du sein, la sous-population CD44⁺/CD24⁻/low a été la première population des CSC de tumeurs solides à être identifiée [2]. Depuis, l'existence des CSC a été mise en évidence dans quasiment l'ensemble des tumeurs solides. Néanmoins, la fréquence de cette population peut varier de 0,1% à presque 30% en fonction du modèle utilisé ou du protocole expérimental, comme c'est le cas pour certains mélanomes [3]. Dans le cadre du cancer du sein, qui nous intéresse plus particulièrement dans cette revue, il est à noter que les tumeurs mammaires les plus agressives et de plus mauvais pronostic sont associées à un taux élevé de CSC [4–6]. Ainsi, Qi *et al.* ont présenté lors de la conférence annuelle de la Radiation Research Society en 2016 des résultats corrélant de manière forte la radiorésistance tumorale et la fréquence en CSC (données non publiées). Dans un contexte d'amélioration de la prise en charge des patients, l'identification de prédictors de la réponse à la radiothérapie pourrait la rendre plus efficace. Il a ainsi été montré que les CSC, directement, ou l'expression de protéines associées au phénotype souche, comme EZH2, pouvaient servir à prédire les récurrences loco-régionales après radiothérapie de cancers du sein inflammatoires [7].

Le modèle stochastique et le modèle hiérarchique ayant fait la preuve de leur existence, un troisième modèle unificateur a été proposé. Dans ce modèle, les différents clones tumoraux dérivent de CSC hétérogènes évoluant en parallèle et pouvant acquérir des mutations tout au long de la vie de la tumeur [8]. Ces mutations pouvant affecter la capacité des CSC à différencier, la fréquence en CSC varie potentiellement d'un clone à l'autre au sein d'une même tumeur.

Nous proposons dans cette revue d'exposer le concept de CSC de décrire leurs propriétés et leur rôle dans la radiorésistance tumorale.

2. Propriétés et marqueurs de CSC

Le facteur essentiel qui a permis la découverte et l'étude des CSC est le développement et la démocratisation de la cytométrie en flux. Cette technique a rendu possibles l'identification et l'étude de populations exprimant spécifiquement certains marqueurs membranaires. Néanmoins, des tests biologiques ont également été développés afin de caractériser ces populations.

Comme cité précédemment, l'expression de la protéine de surface CD44 (CD44+), combinée à une absence ou très faible expression de la protéine membranaire CD24 (CD24-/low) définit une population cellulaire tumorigène, capable de régénérer des tumeurs *in vivo*, et de reproduire l'hétérogénéité tumorale [6]. La *side population*, ou population exclue, repose sur l'activité importante de pompes d'efflux exprimées à la membrane des cellules souches normales et cancéreuses, et peut être identifiée en cytométrie en flux par un test d'exclusion de colorants vitaux tel que le hoechst [9]. Un autre marqueur couramment utilisé dans le cancer du sein est l'activité élevée des enzymes aldéhydes-déshydrogénases dans les CSC (ALDH+/high). Les ALDH permettent l'oxydation des aldéhydes en acides carboxyliques, elles interviennent notamment dans le métabolisme oxydatif du rétinol en acide rétinoïque [10]. Enfin, il a également été démontré que les CSC de cancer du sein ont une activité faible du protéasome, responsable de la régulation de nombreuses fonctions cellulaires [11].

L'expression de marqueurs ne suffisant pas à faire d'une cellule une cellule souche, des tests biologiques ont été développés pour mettre en évidence les propriétés d'auto-renouvellement et de différenciation des CSC. En effet, comme les cellules souches normales, les CSC sont capables d'effectuer des divisions symétriques et asymétriques, ce qui a pour conséquence un auto-renouvellement du pool de CSC d'une part, et une hétérogénéité tumorale avec des cellules filles plus différenciées, d'autre part. Sur cette base, il existe deux tests fonctionnels complémentaires permettant de définir les CSC. *In vitro*, la fréquence en CSC d'une

population est évaluée par sa capacité à résister à l'anoïkis (apoptose induite par la perte de l'adhérence des cellules) et par sa capacité à générer des sphères dans des conditions de culture sans encrage et sans sérum. Le second test, *in vivo*, consiste à évaluer la tumorigénicité en souris immunodéficientes d'une population cellulaire caractérisée et isolée. Cette méthode repose sur la capacité d'un faible nombre de cellules à générer une tumeur de manière successive sur plusieurs transplants. Comme mentionné précédemment, la fréquence d'une population en CSC peut varier d'un modèle expérimental à l'autre. Ainsi des injections en souris hautement immunodéficiente NOD/SCID *interleukin-2 receptor gamma chain null (Il2rg-/-)* peuvent permettre d'observer une fréquence accrue de CSC par rapport aux souris *non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency (NOD/SCID)* [3].

Une des difficultés rencontrées dans le développement de thérapies ciblant spécifiquement les CSC est le fait que les CSC partagent de très nombreuses propriétés avec les cellules souches normales. Ainsi, de nombreux facteurs impliqués dans la régulation et le maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires et adultes ont été identifiés comme étant également impliqués dans la régulation et le maintien des CSC [12]. Ainsi, de nombreuses voies de signalisation activées au cours du développement et responsables de la régulation des fonctions des cellules souches normales, telles que les voies Notch, Hedgehog (SHH), ou encore Wnt, participent également au maintien du phénotype des CSC [13]. De plus, des études suggèrent un rôle similaire des facteurs de pluripotence tels que Sox2, Oct4 et Nanog dans les CSC [14–16].

3. Radiorésistance et CSC

La radiothérapie est l'une des principales options thérapeutiques utilisées dans le traitement des cancers solides et du cancer du sein en particulier. Les rayonnements ionisants

entraînent l'apparition d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), responsables de lésions dans la cellule au niveau des protéines, des lipides et des acides nucléiques. Au niveau de l'ADN, l'irradiation provoque des dommages tels que des cassures double-brin. La protéine p53 joue un rôle clé dans l'établissement de la réponse aux dommages à l'ADN. Elle est activée par les kinases ATM/ATR, recrutées au niveau des sites endommagés de l'ADN, ainsi que par les kinases Chk1 et Chk2. Suite à son activation, p53 induit un arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN ou la sénescence ou l'apoptose de la cellule [17,18].

Plusieurs études ont démontré en parallèle la radiorésistance des CSC [19,20]. Phillips *et al.* ont les premiers montré une radiorésistance des CSC dans le cancer du sein. Ils ont ainsi montré que les cellules cultivées en mammosphères résistent mieux aux rayonnements ionisants que les cellules cultivées en monocouche. La fraction de cellules survivant est enrichie en CSC CD44+/CD24-/low, ALDH+, *side population* et cellules avec faible activité du protéasome [19,21–23]. Seules deux études montrent qu'il existe certaines tumeurs ou lignées de cancer du sein pour lesquelles les CSC sont plus radiosensibles que les non-CSC et peuvent ainsi être éradiquées par un traitement de radiothérapie [24,25].

-Moins de ROS Produits

Diehn *et al.* se sont intéressés aux ROS produites après irradiation, et il est apparu dans un premier temps que les CSC mammaires présentaient de meilleures défenses face au stress oxydatif avec une production moins importante des ROS par les rayons ionisants [23]. Pour comprendre d'où provenait cette radiorésistance des CSC observée à la fois *in vitro* et *in vivo*, ils ont effectué une analyse ciblée des voies d'oxydo-réduction par qRT-PCR multiplexée sur cellules uniques sur système microfluidique 96.96 Dynamic Array™ IFC for Gene Expression (Fluidigm®). Ils ont ainsi identifié que plusieurs gènes impliqués dans la biosynthèse du GSH étaient surexprimés dans les CSC. La surexpression de la glutathion-s-transférase pi a été

confirmée par Croker et Allan [26]. Ils ont ensuite validé l'implication du glutathion par une déplétion des CSC en GSH, ce qui a entraîné une radiosensibilisation des cellules [23]. Par ailleurs, nous avons pu montrer que la radiorésistance des CSC est directement corrélée avec l'expression de protéines *scavenger* telles que les SOD et les thiorédoxines membranaires [6]. Ainsi, une inhibition combinée du métabolisme de GSH (BSO : buthionine-sulphoximine) et des thiorédoxines (Au : Auranofin) avant irradiation augmente la survie globale des souris et s'accompagne d'une réduction du taux de CSC AldefluorTM-positive [27].

-Mois de cassures et une meilleure réparation

L'analyse des dommages à l'ADN et les mécanismes de réparation ont permis de mettre en évidence que la plus faible production de ROS dans les CSC engendrait moins de foyers γ H2AX [20,28,29]. De plus, Yin et Glass n'ont pas pu observer de différence d'activité des mécanismes de réparation des NHEJ (*non-homologous end joining*) [29]. En revanche, ils ont observé une forte activation de la voie ATM. Une analyse d'expression par hybridation des ARNm sur micropuce Affymetrix® (HuGene Array) a permis de mettre en évidence la surexpression de BRCA1, ATR et ATM [30]. Karimi-Busheri *et al.* ont observé une surexpression de la protéine APE1 (*human AP endonucléase 1*) induisant une augmentation d'activité de la voie de réparation des cassures simple-brins (SSBR : *single-strand break repair pathway*). Par ailleurs, Al-Assar *et al.* ont observé comme les autres une diminution des foci γ H2AX, mais plus intéressant, une augmentation des foci RAD51, signe d'une activation plus importante des mécanismes de réparation par recombinaison homologue (*homologous recombination repair pathway*, [HR]) [31]. Ainsi, l'inhibition de la réparation par HR par PC124781 radiosensibilise les CSC, alors que l'inhibition de la réparation par NHEJ (NU7026) n'a pas d'effet [31].

-Quiescence, arrêt du cycle en G2 et Chk1

Une exposition aux rayons ionisants des CSC induit un arrêt marqué du cycle cellulaire en G2-S (jusqu'à 60% de la population de CSC) avec une diminution de la cycline D et E [21,31] et une augmentation de la phosphorylation de CDC25c [32]. Cet arrêt s'accompagne d'une augmentation de l'expression et/ou de la phosphorylation de Chk1 [26,33,34]. De manière intéressante, l'inhibition de l'expression de Chk1 par ARNsi sensibilise les CSC à la radiothérapie.

-Augmentation des voies de survie

Un traitement de radiothérapie induit une activation de nombreuses voies de signalisation dont les voies canoniques impliquées dans le maintien du phénotype souche. Ainsi, l'équipe du Pr Pajonk a montré que l'expression de Jagged-1 était augmentée, après irradiation fractionnée, en même temps que l'activation de son récepteur Notch1 (localisation nucléaire de Notch-ICD) [20]. Alors que l'équipe Pr Pajonk observe une augmentation de l'activité de la voie de signalisation Notch [35], une étude de Woodward *et al.* montre qu'une population de cellules épithéliales mammaires enrichie en cellules progénitrices *side population* après irradiation présente une activation accrue de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine [25]. De manière intéressante, Lamb *et al.* [36] ont observé une augmentation très importante de l'expression de la protéine DNA-PK dans les mammosphères générées à partir des lignées MCF7 et T47D. L'inhibition par la doxycycline de l'expression de DNA-PK induit une diminution de la capacité oxydative mitochondriale et une diminution de l'activité glycolytique. De plus, cette inhibition provoque une réduction de l'expression de NRF1/2 et ses cibles : les voies de signalisation Notch, Shh, Wnt, TGF et Stat1/3 ; ce qui a pour conséquence une réduction de la capacité des cellules à former des sphères ainsi qu'une radiosensibilisation.

D'autres voies impliquées dans le maintien du phénotype souche sont également impliquées dans la résistance des CSC à la radiothérapie. Ainsi, l'activation de Wnt et d'Akt permet l'activation de la -Caténine, leurs inhibitions provoquent la radiosensibilisation des CSC [37]. Enfin l'inhibition de mTOR (*mammalian target of rapamycin*) induit une augmentation de MnSOD ce qui a pour conséquence une diminution de la production de ROS. L'absence de ROS empêche l'activation de divisions symétriques et prévient ainsi l'enrichissement en CSC [38]. A contrario, la metformin, utilisée en routine pour le traitement contre le diabète, active l'AMPK qui inhibe à son tour mTOR. Dans ces conditions, l'expression des effecteurs sous-jacents (S6K1 et 4EBP1) essentiels à la survie des cellules est également diminuée, induisant une radiosensibilité des CSC [39].

-Autres mécanismes liés à la résistance des BCSC

De manière plus anecdotique, il a été montré qu'il existait une sous-population de BCSC exprimant HER2, même dans une lignée n'exprimant pas HER2 [40]. Cette population de BCSC HER+/CD44+/CD24-/low est plus agressive que celle composée par les BCSC HER-/CD44+/CD24-/low, avec une augmentation de l'invasion, de la capacité à former des sphères, de la tumorigénicité et de la radorésistance. Ainsi, l'inhibition ciblée de HER pourrait radiosensibiliser cette population.

Li *et al.* ont observé que les BCSC surexpriment GRP78 (*glucose-regulated protein 78*) [41]. Cette protéine chaperon du réticulum endoplasmique est essentielle à la survie des précurseurs embryonnaires et aux cellules souches hématopoïétiques. Son KO pour inhibition génique rétablit la sensibilité des BCSC à la radiothérapie.

Afin, lors d'une présentation au 53^e congrès de l'ASTRO, Connolly *et al.* ont montré que le facteur d'initiation de la traduction eIF4G active la voie de signalisation S6K induisant ainsi la surexpression de protéines de réponse aux dommages à l'ADN (DDR) ainsi que l'activation des voies de survie.

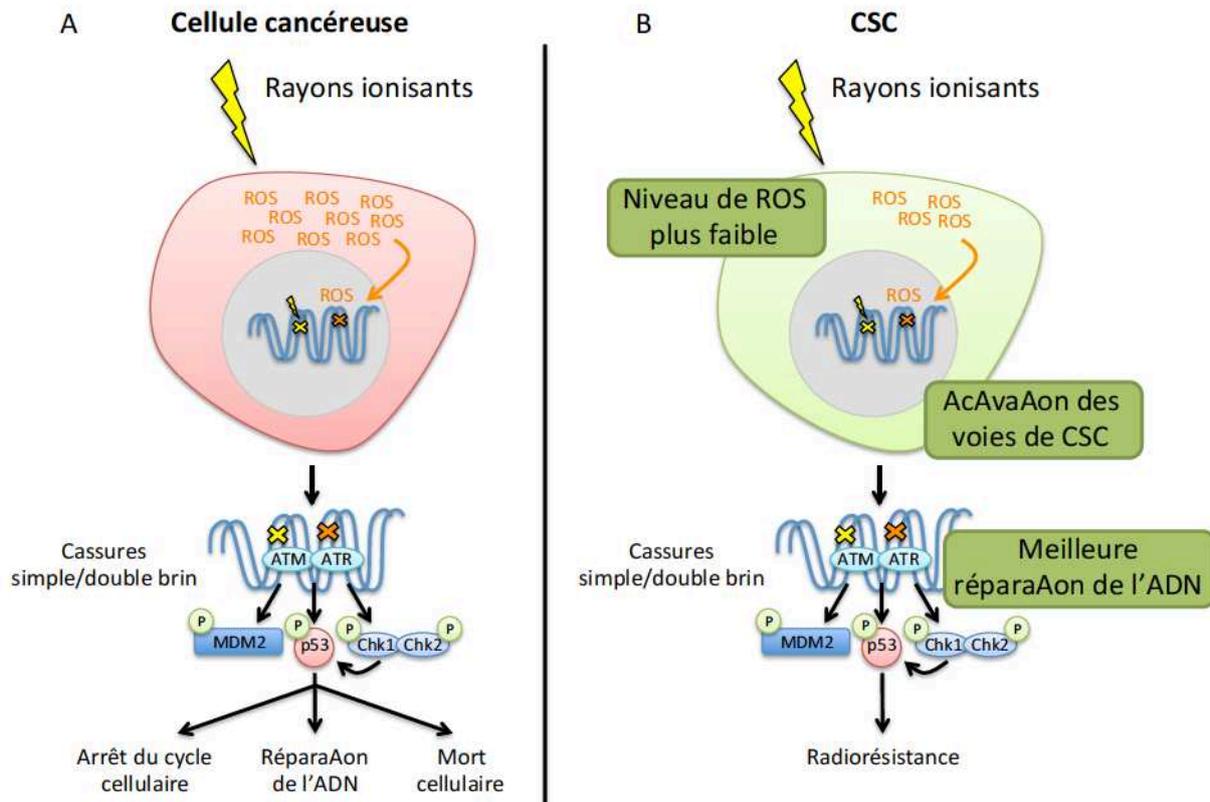


Figure 1 : Mécanisme de réponse à la radiothérapie et radiorésistance des CSC. **A.** Réponse à la radiothérapie dans les cellules cancéreuses. Les rayons ionisants entraînent des cassures à l'ADN, ainsi que la production de ROS, également responsables de cassures. Ces cassures simple- et double-brin sont responsables de l'activation des kinases ATM/ATR, qui vont à leur tour activer des effecteurs dont p53 et Chk1/Chk2. La phosphorylation de MDM2 empêche sa liaison à p53, inhibant ainsi la dégradation de p53. La phosphorylation de Chk1/Chk2 va aussi activer p53. La cellule est alors orientée vers un arrêt du cycle, la réparation de l'ADN, ou la mort cellulaire. **B.** Réponse à la radiothérapie dans les CSC et mécanismes de radiorésistance. Suite à l'irradiation, les CSC vont produire moins de ROS que les non-CSC, entraînant ainsi moins de dommages à l'ADN dus à ces derniers. Des voies de signalisation propres aux CSC (Wnt, Notch) sont activées préférentiellement dans les CSC. Enfin, il semblerait que les CSC soient capables de meilleures réparations de l'ADN.

4. Reprogrammation radio-induite

La radiorésistance des BCSC se traduit par un enrichissement en BCSC après irradiation. Plusieurs équipes se sont interrogées sur l'origine de cet enrichissement. Il a ainsi été montré que les BCSC survivantes étaient recrutées dans une phase active du cycle

cellulaire afin de repeupler la tumeur. Néanmoins, les enrichissements sont tels qu'une simple résistance ne peut l'expliquer.

Les différentes étapes de la cancérisation nécessitent une forte plasticité des cellules cancéreuses. La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) en est un exemple, et l'acquisition d'un caractère mésenchymateux dans le cancer du sein est associée à un sous-type plus agressif et plus invasif et à un enrichissement en BCSC [42]. Outre cette plasticité bien connue, des études démontrent la capacité de reprogrammation de non-CSC en CSC, sous l'influence de divers facteurs tels que les radiations ionisantes.

Dans le cancer du sein, l'équipe du Pr Pajonk a montré que des traitements aux radiations ionisantes sur des populations cellulaires purgées en BCSC induisent l'apparition de BCSC induites (iCSC) [43]. Des échantillons de tumeurs mammaires de patientes, et de lignées cancéreuses mammaires, telles que les SUM159PT ou les MCF-7 purgées en BCSC à l'aide de plusieurs marqueurs, régénèrent des cellules ALDH+, des cellules CD24-/CD44+, et des cellules ZsGreen-cODC+, rapporteur de l'activité du protéasome. De plus, les non-CSC irradiées présentent une capacité accrue à former des sphères, et forment plus de tumeurs *in vivo*. Les cellules souches néoformées réexpriment des facteurs de pluripotence tels qu'Oct4, Sox2 et Nanog. L'induction de BCSC est diminuée par l'inhibition de la voie de signalisation Notch [43]. De manière intéressante, ces observations de reprogrammation ont également été identifiées après traitement de chimiothérapie d'inhibiteur de HDAC avec une activation de la voie Wnt.

Plus récemment, Gao *et al.* ont étudié l'implication de cellules pré-sénescences dans le phénomène d'enrichissement en BCSC après irradiation dans le cancer du sein [44]. En effet, la radiothérapie entraîne une augmentation des cellules sénescences. D'après les auteurs, les non-CSC pré-sénescences subissent une reprogrammation partielle en CSC CD44+/CD24- après irradiation [44].

Cette reprogrammation induite par les radiations ionisantes a également été montrée dans d'autres cancers. Dans des lignées cancéreuses hépatiques, en excluant les CSC à l'aide de la *side population*, les auteurs ont montré que les non-CSC irradiées présentent une formation de sphères accrue, ainsi qu'une expression augmentée d'Oct4 et Sox2. Lorsque Oct4 et Sox2 sont inhibés, les cellules forment moins de sphères et deviennent plus sensibles à l'irradiation [45]. Dans le glioblastome, l'irradiation potentialise l'acquisition de caractères souches dans des cellules différenciées : les cellules irradiées forment plus de neurosphères et expriment de manière augmentée des marqueurs de cellules souches, tels que Nanog et EZH2 [46]. De plus, elles ont des capacités tumorigènes plus élevées lorsqu'injectées en souris. Cette reprogrammation radio-induite dans les glioblastomes serait associée à la surexpression de la survivin (anti-apoptotique) après irradiation [46]

La radiothérapie n'est pas la seule thérapie qui induit une reprogrammation de non-CSC en CSC. Des chimiothérapies sont également capables d'induire la dédifférenciation de non-CSC, notamment dans le glioblastome [47].

La reprogrammation cellulaire de non-CSC en CSC (iCSC) partageant les mêmes caractéristiques que les CSC initiales nécessite un réaménagement chromosomique important avec une modification des marques épigénétiques auxquelles sont soumis les gènes de pluripotence. De plus, les CSC exhibant un métabolisme différent des non-CSC, la reprogrammation cellulaire induit également un changement drastique du métabolisme cellulaire.

Le processus de reprogrammation observé lors de traitements anti-cancéreux pourrait participer plus largement à la plasticité tumorale. Cette plasticité pourrait être ainsi le chaînon manquant du modèle tumoral unifiant modèle stochastique et modèle hiérarchique. Un non-CSC dont le génome est moins bien protégé que celui des CSC qui pourrait acquérir de nouvelles mutations puis reprogrammer, établissant ainsi un nouveau clone. L'inhibition de la

reprogrammation pourrait donc être un moyen efficace de prévenir le développement de résistances et des récurrences.

5. Inhibition de la radiorésistance des CSC

L'inhibition de l'enrichissement en CSC et de la reprogrammation de CSC radio-induites dans le cancer du sein entraînent une diminution de la croissance tumorale et des métastases pulmonaires [48]. Dans cette étude, Wang *et al.* utilisent le disulfirame (DSF), inhibiteur des ALDH, couplé à un traitement au cuivre (Cu^{2+}), ce qui provoque une perte des BCSC préexistantes et induites, après irradiation. *In vivo*, l'utilisation combinée de la radiothérapie et du DSF permet la suppression de la croissance tumorale, associée à une diminution de l'expression de gènes de pluripotence et de la capacité à former des sphères. Le DSF inhibe également le protéasome, ce qui aboutit à l'inhibition de NF- κ B, normalement activé après irradiation et responsable de l'expression de certains gènes associés au maintien des cellules souches normales et cancéreuses [48]

D'autre part, l'inhibition directe des ALDH par du *all-trans acide rétinoïc* (ATRA) ou du DEAB induit une différenciation des cellules (perte de l'expression des marqueurs de CSC) et une diminution de l'agressivité (réduction de l'invasion/migration) [26,49]. Mais, de manière plus intéressante, la population traitée est sensibilisée à la chimiothérapie et la radiothérapie. De même, le ciblage des cellules exprimant CD44 par une inhibition génique (ARNsh) [50] ou des composants naturels tels que le phloroglucinol provoque une inhibition de la voie de signalisation KRAS/PI3K/Akt et KRAS/RAF-1/ERK [51]. Cette inhibition réduit l'expression des marqueurs de CSC ainsi que Oct4, Sox2, Nanog, Notch2 et la -Caténine, et a pour conséquence une sensibilisation à la chimio/radiothérapie. De même, l'inhibition d'Akt [38], de l'EGFR (traitement combiné erlotinib et simvastatine) (Wolfe et Woodward, RRS, données non publiées) ou de Src/p38/PKB [52] prévient l'enrichissement en CSC par radiothérapie.

D'autres traitements ciblant spécifiquement les CSC de cancer du sein se sont révélés efficaces pour radiosensibiliser les CSC. Ainsi, un cotraitement de calcitriol et de vitamine D réduit la capacité des cellules à former des sphères, radiosensibilise les CSC et retarde la croissance tumorale dans un modèle de souris syngénique (MMTV-Wnt1) [53]. Une prise alimentaire de génistéine (faible dose nM) induit à long terme une diminution de la capacité à former des sphères, une réduction de l'expression des marqueurs de CSC et une augmentation de la mort cellulaire [54]. Sur la base de la surexpression de DDX3X dans les BCSC CD133+, Koshio *et al.* ont développé une immunothérapie par vaccination [55]. Ainsi une inoculation de DDX3X (DEAD-Box Helicase 3, X-Linked) active les lymphocytes T CD4+ qui ciblent les BCSC par sécrétion d'IFN et d'IL7. Enfin, He *et al.* ont utilisé des nanoparticules fonctionnalisées pour cibler spécifiquement les CSC de cancer du sein [56]. Ces nanoparticules ont été chargées de paclitaxel et exposent à leur surface des agents ciblant CD44 tels que des anticorps anti-CD44 ou de l'acide hyaluronique (ligand de CD44). Cette stratégie permet d'éliminer les CSC en localisant une forte concentration de drogue anti-tumorale et ainsi de radiosensibiliser la tumeur.

Moins spécifique, l'utilisation de particules *Gold Nano Shell*, de billes de silicone recouvertes d'une couche ultrafine d'or, permet une hyperthermie localisée au niveau de la tumeur. Ces billes sont préférentiellement internalisées par les BCSC [57]. Bien que l'hyperthermie (42°C) temporelle (20 minutes à 1 heure) générée par photothermie peut provoquer [57,58] ou non [56] une diminution de taux de CSC et une baisse de l'expression de ALDH et KLF4, il a systématiquement été observé une radiosensibilisation tumorale [56,58].

6. Conclusion

Il semble donc que cette population de CSC soit en partie la clé d'un traitement efficace contre le cancer. La diversité des marqueurs de CSC et la variabilité dans les mécanismes

impliqués dans le maintien de leur phénotype rendent d'autant plus difficiles leur étude et leur ciblage. Néanmoins, des études cliniques ciblant spécifiquement les CSC ont été entreprises [59]. Dans le cadre du cancer du sein, plusieurs essais cliniques ont été réalisés ou sont en cours. Ainsi, un traitement inhibiteur de la voie Notch (GSI : inhibiteur de la -Sécrétase, RO4919097 ou MK0752) seul ou en combinaison avec des agents de chimiothérapie (paclitaxel, docétaxel, tamoxifène ou létrozole) de patientes atteintes de cancers de sein essentiellement très avancés, voire métastatique a montré des résultats prometteurs. Ainsi l'association GSI et docétaxel montre une faible toxicité et des preuves (très) préliminaires de son efficacité, avec une réduction de taux de CSC (CD44+/CD24-/low ; ALDH+) et une réduction de la capacité des cellules à former des sphères à partir de biopsies. En 2015, une seule étude clinique combinant GSI (RO4919097) et *whole-brain irradiation* ou irradiation stéréotactique sur cinq patientes avec métastases cérébrales était répertoriée aux Etats-Unis. Aucune conclusion n'a été encore apportée.

D'autre part, le protocole KORTUC II tente de cibler préférentiellement les cellules CD44+. Le traitement combinant 0,5% de peroxyde d'hydrogène et 0,83% de sodium hyaluronate C (ligand de CD44) par injection intratumorale avant irradiation montre une efficacité relative avec une radiosensibilisation partielle. Ainsi, les auteurs n'ont observé qu'une seule récurrence sur 72 patientes aux stades précoces de cancer du sein (stage 0, un patient ; stage I, 23 ; stage II, 48) sur un période de suivi de 51,1 mois [60].

De plus, en marge des chimiothérapies (néo)adjuvantes et des radiothérapies conventionnelles, l'irradiation des tumeurs par protons semble plus efficace que l'irradiation par photons pour une dose d'efficacité biologique relative équivalente. Il a ainsi été observé une augmentation de la production de ROS, une diminution de l'agressivité cellulaire, une perte des marqueurs de CSC et une augmentation de l'apoptose [61].

Malgré les difficultés dues à la radiorésistance intrinsèque des CSC ou à leur plasticité phénotypique, l'avancée des connaissances permet aujourd'hui d'envisager de cibler spécifiquement cette population (Fig. 2).

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

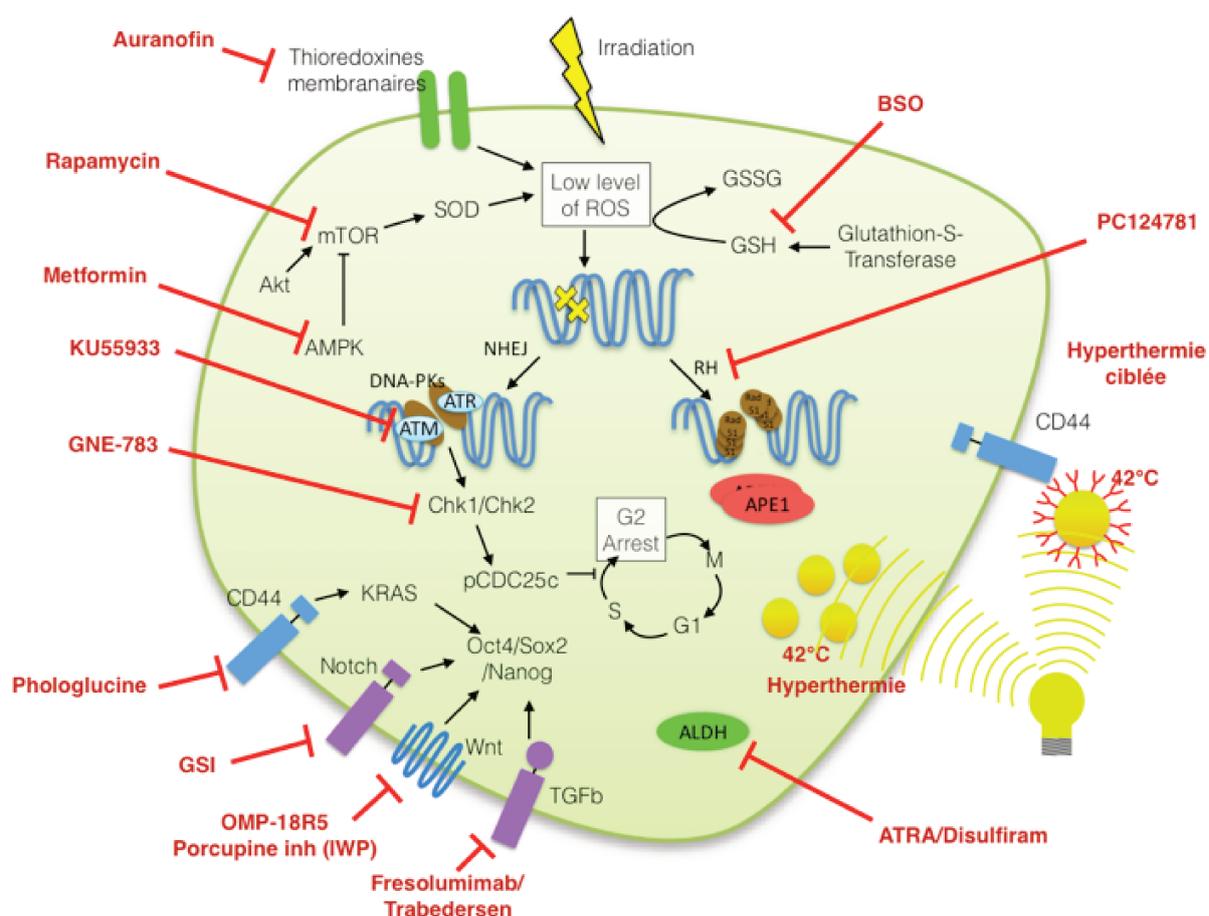


Figure 2 : Radiosensibilisation des CSC potentielles. Les CSC représentent un enjeu majeur dans la réussite d'un traitement de radiothérapie. Cette figure résume les cotraitements possibles permettant de cibler les CSC et ainsi de les rendre sensibles à la radiothérapie

- [1] Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine* 1997;3:730–7.
- [2] Al-Hajj, Wicha. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells 2003.
- [3] Quintana E, Shackleton M, Sabel M, et al. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* 2008;456:593–598.
- [4] Metzger-Filho O, Tutt A, Azambuja E, et al. Dissecting the Heterogeneity of Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2012;30:1879–1887.
- [5] Yin B, Ma ZY, Zhou ZW, et al. The TrkB+ cancer stem cells contribute to post-chemotherapy recurrence of triple-negative breast cancers in an orthotopic mouse model. *Oncogene* 2015;34:761–70.
- [6] Lagadec C, Dekmezian C, Bauché L, et al. Oxygen levels do not determine radiation survival of breast cancer stem cells. *PLoS One* 2012;7:e34545.
- [7] Wolfe, Woodward. Breast cancer stem cell correlates as predictive factors for radiation therapy. *Semin Radiat Oncol* 2015;25:251-9.
- [8] Kreso A, Dick J. Evolution of the Cancer Stem Cell Model. *Cell Stem Cell* 2014;14:275–291.
- [9] Wu C, Alman BA. Side population cells in human cancers. *Cancer Letters* 2008;268:1–9.
- [10] Ginestier, Hur, Charafe-Jauffret, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 2007;1:555-67.
- [11] Vlashi E, Kim K, Lagadec C, et al. In vivo imaging, tracking, and targeting of cancer stem cells. *Journal of the National Cancer Institute* 2009;101:350–9.
- [12] Yamanaka. Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblasts by four transcription factors *Cell Prolif* 2008;41 suppl 1:41-56.
- [13] Matsui WH. Cancer stem cell signaling pathways. *Medicine* 2016;95:S8–S19.
- [14] Lu, Mazur, Lin, et al. The pluripotency factor nanog promotes breast cancer tumorigenesis and metastasis. *Oncogene* 2014;33:2655-64.
- [15] Wang, Herlyn. The emerging roles of Oct4 in tumor-initiating cells 2015.
- [16] Leis, Eguiara, Lopez-Arribillaga, et al. Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells. *Oncogene* 2011;31:1354–1365.
- [17] Gladstone M, Su TT. Radiation responses and resistance. *International Review of Cell and Molecular Biology* 2012;299:235–53.
- [18] Tutt A, Yarnold J. Radiobiology of breast cancer. *Clinical Oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))* 2006;18:166–78.
- [19] Al-Assar O, Muschel R, Mantoni T, et al. Radiation Response of Cancer Stem-Like Cells From Established Human Cell Lines After Sorting for Surface Markers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009;75:1216–1225.
- [20] Phillips T, McBride W, Pajonk F. The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *Journal of the National Cancer Institute* 2006;98:1777–85.
- [21] Lagadec C, Vlashi E, Della Donna L et al. Survival and self-renewing capacity of breast cancer initiating cells during fractionated radiation treatment. *Breast Cancer Res* 2010;12:R13.
- [22] Debeb B, Xu W, Woodward W. Radiation resistance of breast cancer stem cells: understanding the clinical framework. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2009;14:11–7.

- [23] Diehn M, Cho R, Lobo N, et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* 2009;458:780–783.
- [24] Kim S-Y, Rhee J, Song X, et al. Breast cancer stem cell-like cells are more sensitive to ionizing radiation than non-stem cells: role of ATM. *PLoS One* 2012;7:e50423.
- [25] Woodward W, Chen M, Behbod F, et al. WNT/beta-catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104:618–23.
- [26] Croker A, Allan A. Inhibition of aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity reduces chemotherapy and radiation resistance of stem-like ALDHhiCD44+ human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Tr* 2012;133:75–87.
- [27] Rodman S, Spence J, Ronnfeldt T, et al. Enhancement of Radiation Response in Breast Cancer Stem Cells by Inhibition of Thioredoxin- and Glutathione-Dependent Metabolism. *Radiat Res* 2016;186.
- [28] Karimi-Busheri F, Rasouli-Nia A, Mackey J, et al. Senescence evasion by MCF-7 human breast tumor-initiating cells. *Breast Cancer Research : BCR* 2010;12:R31.
- [29] Yin, Glass. The phenotypic radiation resistance of CD44+/CD24– or low breast cancer cells is mediated through the enhanced activation of ATM signaling. *PLoS One* 2011;6:e24080.
- [30] Maugeri-Saccà M, Bartucci M, Maria R. DNA damage repair pathways in cancer stem cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 2012;11:1627–1636.
- [31] Al-Assar O, Mantoni T, Lunardi S, et al. Breast cancer stem-like cells show dominant homologous recombination due to a larger S-G2 fraction. *Cancer Biology Ther* 2011;11:1028–1035.
- [32] Tian Y, Xie G, Ren C, et al. Radiation-induced G2 phase arrest may contribute to the radioresistance of breast cancer stem cells. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2011;31:53–6.
- [33] Yang Z-X, Sun Y-H, He J-G, et al. Increased activity of CHK enhances the radioresistance of MCF-7 breast cancer stem cells. *Oncology Letters* 2015;10:3443–3449.
- [34] Harper W, Elledge S. The DNA Damage Response: Ten Years After. *Molecular Cell* 2007;28.
- [35] Phillips T, Kim K, Vlashi E, et al. Effects of recombinant erythropoietin on breast cancer-initiating cells. *Neoplasia (New York, NY)* 2007;9:1122–9.
- [36] Lamb R, Fiorillo M, Chadwick A, et al. Doxycycline down-regulates DNA-PK and radiosensitizes tumor initiating cells: Implications for more effective radiation therapy. *Oncotarget* 2015;6:14005–25.
- [37] Zhang Y, Wu M, Han X, et al. High-Throughput, Label-Free Isolation of Cancer Stem Cells on the Basis of Cell Adhesion Capacity. *Angewandte Chemie International Edition* 2015;54:10838-42.
- [38] Lai Y, Yu X, Lin X, He S. Inhibition of mTOR sensitizes breast cancer stem cells to radiation-induced repression of self-renewal through the regulation of MnSOD and Akt. *Int J Mol Med* 2016; 37:369-77.
- [39] Song C, Lee H, Dings R, et al. Metformin kills and radiosensitizes cancer cells and preferentially kills cancer stem cells. *Scientific Reports* 2012;2:362.
- [40] Duru N, Fan M, Candas D, et al. HER2-associated radioresistance of breast cancer stem cells isolated from HER2-negative breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 2012;18:6634–6647.
- [41] Li B, Cheng XL, Yang YP, et al. GRP78 mediates radiation resistance of a stem cell-like subpopulation within the MCF-7 breast cancer cell line. *Oncol Rep* 2013;30:2119-26.

- [42] Ye X, Weinberg R. Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. *Trends in Cell Biology* 2015;25:675–86.
- [43] Lagadec C, Vlashi E, Della Donna L, et al. Radiation-induced reprogramming of breast cancer cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 2012;30:833–44.
- [44] Gao X, Sishc B, Nelson C, et al. Radiation-Induced Reprogramming of Pre-Senescent Mammary Epithelial Cells Enriches Putative CD44(+)/CD24(-/low) Stem Cell Phenotype. *Frontiers in Oncology* 2016;6:138.
- [45] Ghisolfi L, Keates A, Hu X, et al. Ionizing radiation induces stemness in cancer cells. *PloS One* 2012;7:e43628.
- [46] Dahan P, Gala M, Delmas C, et al. Ionizing radiations sustain glioblastoma cell dedifferentiation to a stem-like phenotype through survivin: possible involvement in radioresistance. *Cell Death & Disease* 2014;5:e1543.
- [47] Auffinger B, Tobias AL, Han Y, et al. Conversion of differentiated cancer cells into cancer stem-like cells in a glioblastoma model after primary chemotherapy. *Cell Death Differ* 2014;21:1119–1131.
- [48] Wang Y, Li W, Patel SS, et al. Blocking the formation of radiation-induced breast cancer stem cells. *Oncotarget* 2014;5:3743–55.
- [49] Yan Y, Li Z, Xu X, et al. All-trans retinoic acids induce differentiation and sensitize a radioresistant breast cancer cells to chemotherapy. *BMC Complement Altern Med* 2016;16:113.
- [50] Pham P, Phan N. Differentiation of breast cancer stem cells by knockdown of CD44: promising differentiation therapy. *J Transl Med* 2011;9:209.
- [51] Kim RK, Uddin N, Hyun JW, et al. Novel anticancer activity of phloroglucinol against breast cancer stem-like cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2015;286:143–50.
- [52] Kim RK, Cui YH, Yoo KC, et al. Radiation promotes malignant phenotypes through SRC in breast cancer cells. *Cancer Sci* 2015;106: 78-85.
- [53] Jeong Y, Swami S, Krishnan AV, et al. Inhibition of mouse breast tumor-initiating cells by calcitriol and dietary vitamin D *Mol Cancer Ther* 2015;14:1951-61.
- [54] Sims-Mourtada J, Opdenaker LM, , Davis J, et al. Long Term, Low Dose Genistein decreases Stem Cell Populations and Sensitizes Inflammatory Breast Cancer Cell Lines to Radiation. *Cancer Studies and Molecular Medicine - Open Journal* 2015;2:60–65.
- [55] Koshio J, Kagamu H, Nozaki K, et al. DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3, X-linked is an immunogenic target of cancer stem cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII* 2013;62:1619–28.
- [56] He L, Gu J, Lim L, et al. Nanomedicine-Mediated Therapies to Target Breast Cancer Stem Cells. *Frontiers in Pharmacology* 2016;7:313.
- [57] Burke A, Singh R, Carroll D, et al. The resistance of breast cancer stem cells to conventional hyperthermia and their sensitivity to nanoparticle-mediated photothermal therapy. *Biomaterials* 2012;33:2961–2970.
- [58] Atkinson R, Zhang M, Diagaradjane P, et al. Thermal enhancement with optically activated gold nanoshells sensitizes breast cancer stem cells to radiation therapy. *Science Translational Medicine* 2010;2:55ra79.
- [59] Andersson E, Lendahl U. Therapeutic modulation of Notch signalling—are we there yet? *Nature Reviews Drug Discovery* 2014;13:357–378.

- [60] Ogawa Y, Kubota K, Aoyama N, et al. Non-surgical breast-conserving treatment (KORTUC-BCT) using a new radiosensitization method (KORTUC II) for patients with stage I or II breast cancer. *Cancers* 2015;7:2277–89.
- [61] Zhang X, Lin S, Fang B, et al. Therapy-resistant cancer stem cells have differing sensitivity to photon versus proton beam radiation. *Journal of Thoracic Oncology : Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2013;8:1484–91.

ANNEXE 3

Reference	Source of data	N° of samples	Technological platform	N° of probe sets	N° of samples used
van't Veer et al., Nature 2002	http://www.rii.com/publications/2002/vantveer.html	117	Agilent Hu25K	25K	117
van de Vijver et al., NEJM 2002	http://microarray-pubs.stanford.edu/wound_NK1/ https://	295	Agilent Hu25K	25K	254
Expression Project for Oncology (expO), 2005	expo.intgen.org/geo GEO: GSE2109	348	Affymetrix U133 Plus 2.0	54K	348
Wang Y et al., Lancet 2005	GEO: GSE2034	286	Affymetrix U133A	22K	286
Minn AJ et al., Nature 2005	GEO: GSE2603	99	Affymetrix U133A	22K	99
Farmer P et al., Oncogene 2005	GEO: GSE1561	49	Affymetrix U133A	22K	49
Ivshina et al., Cancer Res 2006	GEO: GSE4922, GSE1456	448	Affymetrix U133 A+B	2x22K	448
Sotiriou C et al., J Natl Cancer Inst 2006	GEO: GSE2990	189	Affymetrix U133A	22K	80
Hess KR et al., J Clin Oncol 2006	MDA133	133	Affymetrix U133A	22K	133
Desmedt C et al., Clin Cancer Res 2007	GEO: GSE7390	198	Affymetrix U133A	22K	154
Bonnefoi et al., Lancet Oncol 2007	GEO: GSE6861, GSE4779	161	Affymetrix X3P	61K	125
Klein A et al., Int J Cancer 2007	GEO: GSE6596	26	Affymetrix U133A	22K	24
Schmidt M et al., Cancer Res 2008	GEO: GSE11121	200	Affymetrix U133A	22K	200
Yu K et al., PLoS Genet 2008	GEO: GSE5364	196	Affymetrix U133A	22K	183
Merritt WM et al., N Engl J Med 2008	Array Express: E- MTAB-158	130	Affymetrix U133AAofAv2	23K	130
Marty et al., Breast Cancer Res 2008	GEO: GSE13787	23	Affymetrix U133 Plus 2.0	54K	23
Bos et al., Nature 2009	GEO: GSE12276	204	Affymetrix U133 Plus 2.0	54K	204
Zhang Y et al., Breast Cancer Res Treat 2009	GEO: GSE12093	136	Affymetrix U133A	22K	136
Hoeflich et al., Clin Cancer Res 2009	GEO: GSE12763	30	Affymetrix U133 Plus 2.0	54K	30
Jonsson et al., BCR 2010	GEO: GSE22133	359	Swegene H_v2.1.1 55K	55K	346

Reference	Source of data	N° of samples	Technological platform	N° of probe sets	N° of samples used
Prat A et al., Breast Cancer Res 2010	GEO: GSE18229	337	Agilent Hu25K	25K	264
Popovici V et al., Breast Cancer Res 2010	GEO: GSE20194	278	Affymetrix U133A	22K	91
Chen et al., Breast Cancer Res Treat 2010	GEO: GSE10780	185	Affymetrix U133 Plus 2.0	54K	42
Tabchy A et al., Clin Cancer Res 2010	GEO: GSE20271	178	Affymetrix U133A	22K	178
Miller WR et al., Breast Cancer Res 2010	GEO: GSE5462	116	Affymetrix U133A	22K	116
Silver et al., J Clin Oncol 2010	GEO: GSE18864	84	Affymetrix U133 Plus 2.0	54K	84
Korde et al., Breast Cancer Res Treat 2010	GEO: GSE18728	61	Affymetrix U133 Plus 2.0	54K	61
Barry et al., J Clin Oncol 2010	GEO: GSE23593	50	Affymetrix U133 Plus 2.0	54K	50
Van der Auwera et al., Br J Cancer 2010	Array Express: E-MTAB-1006	96	Affymetrix U133 Plus 2.0	54K	96
Guedj et al., Oncogene 2011	Array Express: E-MTAB-365	537	Affymetrix U133 Plus 2.0	54K	452
Hatzis C et al., JAMA 2011	GEO: GSE25066	508	Affymetrix U133A	22K	508
Sabatier R et al., (our IPC series) PLoS One 2011	GEO: GSE31448	353	Affymetrix U133 Plus 2.0	54K	352
Iwamoto T et al., J Natl Cancer Inst 2011	GEO: GSE22093, GSE23988	164	Affymetrix U133A	22K	100
Desmedt et al., J Clin Oncol 2011	GEO: GSE16446	120	Affymetrix U133 Plus 2.0	54K	120
Pusztai et al., Breast Cancer Res Treat 2011	GEO: GSE22597	83	Affymetrix U133A	22K	83
Curtis et al., Nature 2012	EGA: EGAS00000000083	2136	Illumina HT 12	49K	1974
TCGA, Nature 2012	TCGA Data Portal - BRCA -	1215	Illumina, RNAseq V2	20K	1095
Ellis et al., Nature 2012	GEO: GSE29442, GSE35186	201	Agilent-014850 4x44K	44K	201
TOTAL		10329			9236

RESUME

L'identification des cellules souches cancéreuses (CSC) dans les tumeurs hématologiques et solides a donné naissance à de nombreuses études fondamentales et translationnelles. Cependant, des études récentes démontrent l'existence d'une plasticité des cellules cancéreuses. En effet, les cellules cancéreuses non souches (non-CSC) différenciées peuvent générer des CSC en réponse à divers stimuli (chimiothérapie, radiothérapie, hypoxie...). Ainsi, la radiothérapie entraîne l'induction de CSC à partir de non-CSC, *in vitro*. Cette reprogrammation pourrait participer aux résistances aux traitements, accroître le risque de récurrences et intervenir dans le développement métastatique. Malgré tout, les mécanismes à l'origine de la reprogrammation demeurent méconnus, et il apparaît essentiel d'identifier des cibles thérapeutiques pour prévenir l'apparition de CSC.

Dans le cadre de ma thèse, j'ai mis en évidence que le milieu conditionné de non-CSC irradiées induit la reprogrammation en CSC de cancer du sein. J'ai pu observer par puce à protéines et test ELISA que l'irradiation entraîne la sécrétion spécifique de chimiokines, dont CXCL1 et CCL5. Le rôle de ces chimiokines dans la reprogrammation a été étudié par traitement à l'aide de protéines recombinantes et d'anticorps neutralisants, ainsi que par des inhibiteurs pharmacologiques ciblant les récepteurs. Ces expériences ont permis de montrer l'implication de CXCL1, CCL5 et leurs récepteurs dans la reprogrammation *in vitro*. De plus, l'inhibition *in vivo* de CXCL1 et CCL5, combinée à la radiothérapie dans un modèle murin de xénogreffes induit une augmentation de la survie. Pour finir, l'étude, à partir des bases de données cliniques issues d'analyses transcriptomiques, montre que l'expression des chimiokines et de leurs récepteurs est corrélée à des signatures de CSC, de sous-types plus agressifs dans le cancer du sein, et à une survie sans métastases diminuée.

L'ensemble de mes résultats indique donc un rôle des chimiokines dans la reprogrammation de non-CSC en CSC et qu'elles peuvent constituer des cibles thérapeutiques intéressantes, en combinaison avec les traitements traditionnels.