

UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES FONDAMENTALES - SANTÉ N°619

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : ASPECTS CELLULAIRES ET MOLECULAIRES DE LA BIOLOGIE

Présentée et soutenue publiquement par

OCÉANE CAMPION

Le 16 septembre 2021

Rôle du récepteur LRP-1 dans la croissance tumorale et l'angiogenèse associée dans un modèle de cancer mammaire triple négatif

Thèse dirigée par **JÉRÔME DEVY**

JURY

M. Jérôme DEVY,	Maître de Conférences HDR,	Université de Reims Champagne-Ardenne,	Directeur de thèse
Mme Sophie PINEL,	Maître de Conférences HDR,	Université de Lorraine,	Rapporteur
M. Frédéric SALTEL,	Directeur de Recherche,	Université de Bordeaux,	Rapporteur
Mme Myriam POLETTE,	Professeur,	Université de Reims Champagne-Ardenne,	Examineur
M. Jean-Louis MERLIN,	Professeur,	Université de Lorraine,	Examineur
M. André MARTINS,	Maître de Conférences HDR,	Université de Tuebingen (Allemagne),	Examineur
M. Stéphane DEDIEU,	Professeur,	Université de Reims Champagne-Ardenne,	Examineur

Remerciements

Être chercheur, c'est remettre en question le monde dans lequel on vit. Au cours de ces dernières années, je me suis retrouvée face à moi-même dans une course contre la montre aux enjeux jamais égalées dans ma vie d'étudiante. Bien qu'il semble impossible de se soustraire du sentiment d'incertitude et de solitude lié à cette aventure de temps à autres, je ne me suis jamais sentie isolée. Et ce, grâce au soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bienveillance et l'intérêt manifestés à l'égard de ma recherche ont magnifié cette aventure. Je ne les remercierais jamais assez de m'avoir tant donné, souvent sans même s'en apercevoir, dans cette étape décisive d'apprenti-chercheur.

Je tiens, tout d'abord, à remercier le Professeur Laurent Martiny pour m'avoir accueillie au sein de l'unité UMR CNRS 7369 - Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire (MEDyC) et pour m'avoir permis de réaliser ces travaux de thèse.

Je souhaite également remercier le Professeur Stéphane Dedieu et le Docteur Stéphane Brezillon pour m'avoir accueillie au sein de leur équipe de recherche « Matrice extracellulaire, Cancer et Cibles thérapeutiques ».

J'aimerais ensuite exprimer toute ma reconnaissance à mon directeur de thèse, le Docteur Jérôme Devy pour m'avoir encadrée durant ces quatre années. Je lui suis reconnaissante de m'avoir fait bénéficier tout au long de ce travail de ses compétences scientifiques et de son expérience au travers de nombreux conseils. Je le remercie pour la confiance globale qu'il m'a accordée. Nonobstant, ses suggestions quant à la rédaction de ce manuscrit m'ont sans aucun doute permis de préciser mon propos.

Je remercie le Professeur Muriel Barberi-Heyob et le Professeur Myriam Polette, qui ont pris le temps de suivre l'avancement de ces travaux en tant que membre de mon comité de suivi individuel.

Je remercie le Docteur Sophie Pinel et le Docteur Frédéric Saltel pour avoir accepté d'évaluer ces travaux en étant que rapporteurs.

Je remercie le Professeur Myriam Polette, le Docteur André Martins, le Professeur Jean-Louis Merlin et le Professeur Stéphane Dedieu d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant qu'examineurs.

Je remercie Madame Fanja Rabenoelina et le Docteur Nicolas Richet pour m'avoir formé et assisté en biologie moléculaire, et au même titre, je tiens à remercier l'ensemble du personnel BIATSS du laboratoire pour leur aide, leur bonne humeur et leurs nombreux conseils au quotidien. Je remercie tout particulièrement Cathy Hachet, Elodie Lelièvre et Lise Chazée pour leurs savoir-faire techniques, qui m'ont été d'une grande aide à de nombreuses reprises. Je remercie notamment Marie-Line Sowa et Isabelle Proult. J'aimerais remercier Camille Bour pour sa disponibilité et son aide précieuse en imagerie préclinique, mais aussi pour sa joie de vivre communicante et son oreille attentive. Je souhaite également remercier Jean-Luc Breda, notre animalier préféré, avec qui c'est toujours un plaisir de travailler. J'ai également une pensée pour Christophe Schneider, ses conseils et sa sympathie au quotidien ; mais aussi pour Olivier Boquet, un compagnon de culture hors pair, dont la conscience professionnelle m'a toujours inspirée.

Je voudrais aussi remercier l'ensemble des maîtres de conférences et chargés de recherche du laboratoire pour les fructueux échanges scientifiques que nous avons pu avoir, le partage de leurs expériences, leur bienveillance et leur intérêt au quotidien, qui ont contribué à faire mûrir ces travaux. J'ai une pensée particulièrement pour le Docteur Stéphanie Salesse, le Docteur Jessica Thevenard-Devy, mais aussi le Docteur Amar Bennisroune.

Je voudrais remercier l'ensemble des doctorants du laboratoire MEDyC que j'ai côtoyé au cours de ces quatre dernières années pour tous les échanges scientifiques (ou non) que nous avons pu avoir. Je garde en souvenir beaucoup de moments d'amitié et de rires qui ont su apporter de la légèreté à nos journées de labeur.

*
**

Je remercie le service d'anatomopathologie du CHU de Reims, et tout particulièrement le Docteur Camille Boulagnon-Rombi pour son expertise ainsi que Madame Caroline Fischel et Madame Nicole Bouland pour leur précieuse aide technique et leur persévérance.

Je remercie le Professeur Andréas Bikfalvi pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire de l'angiogenèse et du microenvironnement des cancers (LAMC) rattaché à l'INSERM (U1029) et l'université de Bordeaux pendant deux semaines au mois de juillet 2019. Je remercie tout particulièrement le Docteur Clotilde Billottet pour son encadrement chevronné, sa disponibilité et sa sympathie.

Je remercie le Docteur Frédéric Saltel en tant que responsable scientifique de la plateforme Oncoprot affiliée à l'unité BaRITOn (INSERM US005), mais également Jean-wiliam Dupuy, Ingénieur, pour avoir effectué les expériences de protéomique et coordonné la collaboration. Je tiens à remercier tout particulièrement le Docteur Anne-Aurélien Raymond pour son implication et son expérience précieuse qui ont su nous guider dans l'analyse et la valorisation des données.

Je finirais par remercier la plateforme multimodale PICT pour la mise à disposition de son matériel d'imagerie.

*
**

Je souhaite remercier la société anglaise MR Solutions™, et tout particulièrement le Docteur David Taylor, fondateur et président, ainsi que Madame Nicky Doughty, PDG, de m'avoir donné l'opportunité de collaborer avec eux. Je leur adresse toute ma reconnaissance pour m'avoir permis d'élargir mes compétences dans le domaine de l'imagerie préclinique. Au même titre, je souhaite remercier Angéla Camaro pour le partage de ses compétences techniques et sa disponibilité, et c'est sans

compter sur sa gentillesse. Je remercie également Fabrice Chaumard, directeur du marketing, pour sa disponibilité, son professionnalisme et sa sympathie. Je souhaite également remercier l'ensemble des membres de la Team Application, mais aussi Rosslan, Mark et Stuart pour leur assistance technique.

Je remercie tout particulièrement La ligue contre le cancer qui a financé ces travaux.

*
**

Enfin, je remercie les amis qui me sont chers et que j'ai certainement délaissés ces quatre dernières années. Merci d'avoir fait l'effort d'être des oreilles attentives à des problèmes qui n'ont de sens que pour moi.

Je remercie également mon compagnon, ma distraction préférée, qui m'a permis de sortir la tête de l'eau (ou de l'incubateur) quand j'en avais le plus besoin. Merci de m'épauler au quotidien et de toujours me pousser à me dépasser.

Finalement, je souhaite remercier mes parents pour leur soutien et confiance indéfectible dans mes choix et l'exigence qu'ils m'ont toujours inculquée. Je remercie tout particulièrement mon papa pour le temps qu'il a passé à la relecture attentive de ce manuscrit. Je ne saurais dire si ma plus grande fierté est cet accomplissement en tant que tel ou le fait de vous rendre si fiers. C'est la reconnaissance la plus importante à mes yeux, aussi subjective soit-elle... Cette thèse vous est dédiée.

TABLE DES MATIERES

Liste des Abréviations	5
Liste des Figures	7
Liste des Tableaux	11
Introduction	13
I. Les cancers mammaires, cas spécifique du cancer mammaire triple négatif	15
I.1. Le sein : architecture et évolution physiologique	15
I.2. Le cancer mammaire	16
I.2.1. Epidémiologie et facteurs de risques	17
I.2.2. Le diagnostic	18
I.2.2.1. La mammographie	18
I.2.2.2. L'échographie	19
I.2.2.3. L'imagerie par résonance magnétique	20
Quelle est la procédure en cas de suspicion de cancer ?	21
I.2.3. Les différentes classifications des cancers mammaires	21
I.2.3.1. La classification BIRADS de l'ACR	22
I.2.3.2. La classification TNM	23
I.2.3.3. La classification par stade UICC	23
I.2.3.4. La classification histologique	25
I.2.3.5. La classification moléculaire	26
I.2.3.5.1. Les luminaux	27
I.2.3.5.2. Les enrichis en HER2	27
I.2.3.5.3. Les normal-like	28
I.2.3.5.4. Les basal-like	29
I.2.3.5.5. Le phénotype claudin-low	30
I.2.3.6. La classification moléculaire des TNBC	30
I.2.3.6.1. Basée sur les altérations génomiques somatiques	30
I.2.3.6.2. Basée sur le statut BRCA/HRD	31
I.2.3.6.3. Basée sur le transcriptome	32
I.2.4. Les traitements du cancer mammaire	34
I.2.4.1. La chirurgie	34
I.2.4.2. Traitement adjuvant ou néoadjuvant	35
I.2.4.3. La radiothérapie	35
I.2.4.4. La chimiothérapie	36
I.2.4.5. Les thérapies ciblées	37
I.2.4.5.1. L'hormonothérapie pour les cancers ER+	41
I.2.4.5.2. Les thérapies ciblant HER2 pour les cancers HER2+	42
I.2.4.5.3. Les thérapies ciblant l'angiogenèse	43
I.2.4.5.4. Les thérapies ciblant les voies de réparation de l'ADN et les points de contrôle du cycle cellulaire	45
I.2.4.5.5. L'immunothérapie	47
I.2.4.5.6. Les thérapies ciblant les voies de signalisation impliquée dans la cancérogenèse	50
I.2.4.5.7. La thérapie ciblant PARP	52
I.2.4.5.8. La thérapie ciblant les récepteurs aux androgènes	53
I.2.4.5.9. La thérapie ciblant Hsp90	54
I.2.5. La résistance aux traitements	54
I.2.6. Le suivi des patientes atteintes d'un cancer mammaire	58
I.2.6.1. La mammographie de suivi et les techniques associées	59
I.2.6.2. L'IRM dans l'évaluation de la réponse au traitement	59
I.2.6.3. L'imagerie moléculaire	61
II. Le microenvironnement tumoral, acteur crucial de la progression tumorale	65
II.1. La progression tumorale	65
II.1.1. L'état précancéreux	65
Quelle est l'origine du cancer ?	65
II.1.2. Le cancer et ses caractéristiques distinctives	66
II.2. La composition du microenvironnement tumoral	83
II.2.1. La Matrice Extracellulaire	83
II.2.1.1. La composition de la MEC	84
II.2.1.1.1. Les collagènes	84
II.2.1.1.2. L'élastine et les glycoprotéines associées	88
II.2.1.1.3. Les autres glycoprotéines	89
II.2.1.1.3.1. La laminine	89
II.2.1.1.3.2. La fibronectine	90
II.2.1.1.3.3. Les thrombospondines	91
II.2.1.1.4. Les glycosaminoglycanes et les protéoglycanes	92

II.2.1.1.5. Les intégrines	95
II.2.1.1.6. SPARC	97
II.2.1.1.7. Les matrikines et les matricryptines	97
II.2.1.2. La dégradation de la matrice extracellulaire	97
II.2.2. Les différentes cellules du microenvironnement tumoral	104
II.2.2.1. Les adipocytes associés au cancer	105
II.2.2.2. Les fibroblastes associés au cancer	106
II.2.2.3. Les cellules du système immunitaire	108
II.2.2.4. Les cellules endothéliales et les péricytes	109
II.2.2.5. Les cellules souches	110
II.2.2.5.1. Les cellules souches tumorales	110
II.2.2.5.2. Les cellules souches mésenchymateuses	111
II.3. Les propriétés physicochimiques du microenvironnement tumoral	111
II.3.1. Les propriétés chimiques	112
II.3.1.1. L'hypoxie	112
II.3.1.2. L'acidose	113
II.3.1.3. Le stress oxydatif	115
II.3.2. Les propriétés physiques	116
III. L'angiogenèse tumorale	119
III.1. L'État physiologique / L'anatomie des vaisseaux sanguins	119
III.2. Les processus d'angiogenèse tumorale	121
III.2.1. L'Angiogenèse par bourgeonnement	122
III.2.1.1. Concept des <i>tip/stalk cells</i> : Voie Notch	122
III.2.1.2. Expansion du système vasculaire naissant	124
III.2.1.2.1. Croissance et guidage des bourgeons par les <i>tip cells</i>	125
III.2.1.2.2. Fusions des bourgeons et formation d'une lumière	127
III.2.1.2.3. Maturation des vaisseaux sanguins nouvellement formés	128
III.2.2. Les processus alternatifs de néovascularisation dans les tumeurs	129
III.2.2.1. Angiogenèse par intussusception	129
III.2.2.2. Mimicrie vasculaire / Mimétique vasculogénique	130
III.2.2.3. Co-optation des vaisseaux existants	131
III.2.2.4. Cellules endothéliales précurseurs / Cellules souches cancéreuses	132
III.3. La vascularisation tumorale	133
III.3.1. Caractéristiques des vaisseaux sanguins tumoraux	134
III.3.1.1. Anomalies morphologiques et fonctionnelles des cellules endothéliales tumorales	134
III.3.1.2. Les péricytes tumoraux et les voies de signalisation associées	136
III.3.2. Mécanismes moléculaires impliqués dans la formation des vaisseaux sanguins tumoraux	139
III.3.2.1. Le <i>switch angiogenic</i>	139
III.3.2.2. La régulation de l'angiogenèse tumorale	140
III.3.2.2.1. Les régulateurs positifs de l'angiogenèse	140
III.3.2.2.1.1. Le VEGF	141
III.3.2.2.1.2. Le FGF-2	143
III.3.2.2.1.3. Le HGF	144
III.3.2.2.1.4. Le PDGF	144
III.3.2.2.2. Les inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse	145
III.3.2.2.2.1. La thrombospondine-1	146
III.3.2.2.2.2. Les TIMPs	146
III.3.2.2.2.3. Les matrikines anti-angiogéniques	148
III.3.2.2.3. Les voies de signalisation orchestrant la régulation complexe de l'angiogenèse	149
III.3.2.2.3.1. Le système Angiopoïétines/Tie2	149
III.3.2.2.3.2. La voie du TGF- β	151
III.3.2.2.3.3. La voie de l'éphrine/Eph	153
III.3.2.2.3.4. Les interleukines	154
IV. LRP-1 (Low-density lipoprotein receptor-related protein 1)	157
IV.1. La structure et la distribution du récepteur LRP-1	159
IV.1.1. Structure du récepteur LRP-1	159
IV.1.1.1. La chaîne α extracellulaire	160
IV.1.1.2. La chaîne β transmembranaire	160
IV.1.2. La distribution de LRP-1	161
IV.2. Les grandes fonctions de LRP-1	162
IV.2.1. L'endocytose & la régulation du protéome membranaire	162
IV.2.2. La signalisation cellulaire médiée par l'assemblage de complexes protéiques de signalisation intracellulaire	164
IV.2.3. La régulation de l'expression génique par protéolyse intra-membranaire régulée	166
IV.3. Les implications physiologiques et pathologiques de LRP-1	168
IV.3.1. Rôle dans le métabolisme des lipoprotéines et des lipides	168
IV.3.2. Rôle dans l'inflammation, la réponse immunitaire et la phagocytose	170
IV.3.3. Rôle protecteur dans l'athérosclérose	171
IV.3.4. Rôle protecteur contre la formation des anévrismes	172
IV.3.5. Rôle promoteur dans la maladie d'Alzheimer	172
IV.3.6. Rôle controversé dans le cancer	174

Objectifs du travail	179
Matériels et méthodes	181
Résultats – Partie I	197
Résultats - Partie II	239
Discussion	251
Partie I	253
Partie II.....	269
Conclusions et perspectives	277
Productions scientifiques	287
Bibliographie	289

LISTE DES ABBREVIATIONS

Aβ	peptide β -amyloïde	CTGF	<i>Connective Tissue Growth Factor</i>
AD	<i>Alzheimer disease</i>	CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
ADAM	<i>A Disintegrin and Metalloprotease</i>	DBT	<i>Digital Breast Tomosynthesis</i>
ADAMTS	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs</i>	DCE	<i>Dynamic Contrast Enhancement</i>
ADN	Acide DésoxyriboNucléique	DLL	<i>Delta Like Ligand</i>
Ang	Angiopoïétine	DSB	<i>DNA Double Strand Breaks</i>
APOBEC	<i>Apolipoproteins B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like</i>	DWI	<i>Diffusion Weighted Imaging</i>
APP	<i>Amyloid precursor protein</i>	EC	<i>Endothelial Cell</i>
ARNm	AcideRibonucléique messenger	EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
AT	Ataxie Télengiectasie	EMT	<i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i>
ATM	Ataxie Télangiectasie Mutée	eNOS	<i>endothelial Nitric Oxide Synthase 3</i>
ATP	Adénosine TriPhosphate	EPR	<i>Enhanced Permeability and Retention</i>
BAT	<i>Brown Adipose Tissue</i>	ER	<i>Eostrogen Receptor</i>
BBB	<i>Blood Brain Barrier</i>	ERK	<i>Extracellular Receptor Kinase</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>	EV	<i>Extracellular Vesicles</i>
BL	<i>Basal Like</i>	FACIT	<i>Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helices</i>
BLBC	<i>Basal Like Breast Cancer</i>	FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>	FAS1	<i>Fatty acid synthase subunit beta</i>
BOLD	<i>Blood-Oxygen-Level Dependent</i>	FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
BRCA	<i>Breast CAncer</i>	FDG	<i>FluoroDeoxyGlucose</i>
BSGI	<i>Breast Specific Gamma Imaging</i>	FN	<i>Fibronectine</i>
CAA	<i>Cancer-Associated Apipocyte</i>	GAG	<i>glycoaminoglycane</i>
CAF	<i>Cancer-Associated Fibroblast</i>	GLUT	<i>Glucose Transporter</i>
CCIS	<i>Carcinome Canalaire In Situ</i>	GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
CCN2	<i>Cellular Communication Network Factor 2</i>	GSEA	<i>Gene Set Enrichment Analysis</i>
CDK	<i>Cyclin-dependant Kinase</i>	HA	<i>Hyaluronic Acid</i>
CESM	<i>Contrast-Enhanced Spectral Mammography</i>	HER2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2 ou ErbB2</i>
Chk	<i>Checkpoint kinase</i>	HIF	<i>Hypoxia-Inducible Factor</i>
CI-TNS	<i>Carcinome Infiltrant de Type Non Spécifique</i>	HRD	<i>Homologous recombination repair (HRR) pathway deficiency</i>
CK	<i>Cytokératine</i>	HS	<i>Héparane-Sulfate</i>
CLIS	<i>Carcinome Lobulaire In Situ</i>	Hsp	<i>Heat Shock Protein</i>
CNA	<i>Copy Number Alterations</i>	ICD	<i>IntraCellular Domain</i>
CR	<i>Cystein-Rich</i>	IDL	<i>Intermediate Density Lipoprotein</i>
CS	<i>Chondroïtine-Sulfate</i>	IFN	<i>Interféron</i>
CSC	<i>Cancer Stem Cells</i>	IGFBP	<i>Insulin-like Growth Factor Binding Protein</i>
CSF	<i>Colonies Stimulating Factors</i>	IHC	<i>Immunohistochimie</i>
CTC	<i>Circulating Tumor Cells</i>	IL	<i>Interleukine</i>
ctDNA	<i>circulant DNA</i>	IMC	<i>Indice de Masse Corporelle</i>

IRM	Imagerie par resonance magnétique	PGE	Prostaglandine E
JAK	<i>Janus Kinase ou Just Another Kinase</i>	PI3K	<i>PhosphoInositide 3-Kinase</i>
JAM	<i>Junctional Adhesion Molecule</i>	PP	Plasminogène/Plasmine
LAR	<i>Luminal androgen receptor</i>	PR	<i>Progesteron Receptor</i>
LDLR	<i>Low Density Lipoprotein Receptor</i>	pRB	protéine du Rétinoblastome
LH-RH	<i>LH Releasing Hormone ou Lutéinostimuline</i>	PSAP	<i>Prosaposin</i>
LOX	<i>Lysyl Oxidase</i>	PTEN	<i>Phosphatase and TENsin homolog</i>
LRP-1	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein 1</i>	RA	Récepteur aux Androgènes
LRR	<i>Local-Regional Recurrence</i>	RGD	Arg-Gly-Asp
LTC	Lymphocytes T Cytotoxiques	RIP	
MACIT	<i>Membrane-Associated Collagens with Interrupted Triple helices</i>	ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
MAGP	<i>Microfibril-Associated Glycoproteins</i>	RTK	Récepteur Tyrosine Kinase
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>	Sdc	Syndécan
MB	Membrane Basale	SERPIN	<i>SERine Protease INhibitor</i>
MBI	<i>Molecular Breast Imaging</i>	SPARC	<i>Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i>	STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
MEC	Matrice Extracellulaire	TAA	<i>Tumor Associated Adipocytes</i>
MEF	<i>Mouse Embryonic Fibroblast</i>	TADC	<i>Tumor-Associated Dendritic Cells</i>
MEK	<i>MAPK ERK Kinase</i>	TAM	<i>Tumor Associated Macrophages</i>
MET	<i>Mesenchymal-Epithelial Transition</i>	TDM	Tomodensitométrie
MHCI/II	<i>Major Histocompatibility Complex Class I/II</i>	TEC	<i>Tumor Endothelial Cells</i>
miARN	micro-Acide RiboNucléique	TERT	<i>Telomerase Reverse Transcriptase</i>
MMP	<i>Matrix MetalloProteinase</i>	TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
MSL	<i>Mesenchymal Stem-Like</i>	Th	<i>(lymphocytes) T helper</i>
mTOR	<i>mammalian Target Of Rapamycin</i>	THBS	Thrombospondine
NAC	<i>Neo.Adjuvant Chemotherapy</i>	TIC	<i>Tumor Initiating cell</i>
NADPH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>	TIMP	<i>TIMP Metalloproteinase Inhibitor</i>
NanoEL	<i>Nanoparticles Induced Endothelial Leakiness</i>	TINAGL1	<i>Tubulointerstitial Nephritis Antigen Like 1</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor-κappa B</i>	TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
NHEJ	<i>Non-Homologous End-Joining</i>	TNBC	<i>Triple Negative Breast Cancer</i>
NK	<i>Natural Killer</i>	TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
NO	<i>Oxid Nitric</i>	TNM	<i>Tumor Node Metastases</i>
NRP-1	Neuropiline-1	uPAR	<i>urokinase Plasminogen Activator Receptor</i>
PARP	<i>Poly- (ADP-riboses) Polymerase</i>	VE-	
pCR	<i>pathological Complete Response</i>	Cadhérine	<i>Vascular endothelial Cadhérine</i>
PD-1	<i>Programmed cell Death protein 1</i>	VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
PD-L1	<i>Programmed cell Death Ligand 1</i>	VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>	VSMC	<i>Vascular Smooth Muscle Cells</i>
PECAM-1	<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule -1</i>	WAT	<i>White Adipose Tissue</i>
PEM	<i>Positron Emission Mammography</i>	ZEB	<i>Zinc finger E-box-binding homeobox 1</i>
PET	<i>Positron Emission Tomography</i>	ZO1/2	<i>Zonula Occludens-1/-2</i>
PG	Protéoglycane	α-SMA	<i>α-Smooth Muscle Actin</i>

LISTE DES FIGURES

Introduction

Figure 1	Anatomie du sein de la femme	15
Figure 2	Les différentes cellules du sein de la femme et leurs marqueurs associés	16
Figure 3	Évolution des taux d'incidence du cancer du sein chez la femme entre 1990 et 2018 en France métropolitaine	17
Figure 4	Clichés issus de mammographies	19
Figure 5	Clichés issus d'échographies mammaires	20
Figure 6	Clichés issus d'une IRM mammaire	20
Figure 7	Sous-types moléculaires du cancer du sein et leurs caractéristiques	27
Figure 8	Répartition des sous-types intrinsèques au sein des TNBC basés sur le transcriptome	33
Figure 9	Méthodes chirurgicales appliquées au cancer mammaire	35
Figure 10	Répartition des domaines de recherche et développement de médicaments ciblés pour le traitement du TNBC enregistré dans les essais cliniques	38
Figure 11	Mécanisme d'action du tamoxifène et des inhibiteurs de l'aromatase	41
Figure 12	Stratégies thérapeutiques ciblant la voie du VEGF	44
Figure 13	Représentation schématique du cycle cellulaire et ses différents points de contrôle	46
Figure 14	Inhibiteurs des points de contrôle immunitaire dans le traitement du cancer	48
Figure 15	Interaction entre les différentes voies de signalisation impliquées dans les TNBC	50
Figure 16	Mécanismes sous-jacents à la résistance thérapeutique des TNBC	55
Figure 17	Radiorésistance intrinsèque des TNBC	56
Figure 18	Exemple de suivi d'un traitement par IRM	60
Figure 19	Caractéristiques du cancer selon Hanahan & Weinberg	67
Figure 20	Induction de l'angiogenèse tumorale	71
Figure 21	Induction de l'EMT par la signalisation du TGF- β , Notch et WNT	73
Figure 22	La transition épithélio-mésenchymateuse	73
Figure 23	La cascade métastatique	74
Figure 24	Organotropisme des métastases mammaires en fonction du sous-type de cancer	76
Figure 25	Points de contrôle à la surface des cellules T et des cellules dendritiques immatures	79
Figure 26	Rôle de l'inflammation dans la carcinogenèse	81
Figure 27	Représentation schématique de la synthèse et de l'assemblage des fibres de collagène	84
Figure 28	La membrane basale	86
Figure 29	Représentation schématique d'une fibre élastique mature	89
Figure 30	Diversité et structures des protéoglycanes	92
Figure 31	Les intégrines	95
Figure 32	Voies de signalisation des intégrines Outside-in et Inside-out	96
Figure 33	Structure et fonction des protéines ADAM	100
Figure 34	Profil d'expression des métalloprotéines et leur(s) inhibiteur(s) physiologique(s) dans les cellules tumorales et stromales	102

Figure 35	Régulation du système Plasminogène/Plasmine et ses rôles fonctionnels	103
Figure 36	Représentation schématique du microenvironnement tumoral et ses composants	104
Figure 37	Représentation schématique des différentes origines et des différents rôles des CAFs	107
Figure 38	L'effet Warburg	114
Figure 39	Organisation générale du système vasculaire	119
Figure 40	Signalisation de VEGF/VEGFR – DLL4/Notch	123
Figure 41	Rôle de la signalisation Delta Jagged Notch dans la régulation de la distance entre deux <i>tip cells</i>	124
Figure 42	Étapes de sélection de la <i>tip cell</i>	125
Figure 43	Élongation et guidage du bourgeon	126
Figure 44	Rétablissement de la quiescence endothéliale	128
Figure 45	Processus alternatifs d'angiogenèse dans les tumeurs	129
Figure 46	Détachement, recrutement et maturation des péricytes tumoraux	137
Figure 47	Le <i>switch angiogenic</i>	139
Figure 48	Les différents acteurs du switch angiogenic	140
Figure 49	La famille du VEGF et ses récepteurs	141
Figure 50	Les isoformes du VEGF-A	142
Figure 51	Modèle schématique du système ligand-récepteur angiopoïétine-Tie2	149
Figure 52	Signalisation du TGF- β (et BMP9) dans les cellules endothéliales	152
Figure 53	Structure du récepteur LRP-1 mature	160
Figure 54	Schéma représentatif des grandes fonctions de LRP-1	162
Figure 55	Régulation de l'expression génique par LRP1-ICD	167
Figure 56	Les différentes lipoprotéines et leurs caractéristiques	166
Figure 57	Schéma simplifié du métabolisme des lipides et du cholestérol	168
Figure 58	Impact d'une expression réduite de LRP-1 dans la maladie d'Alzheimer	173
Figure 59	Représentation schématique des différentes fonctions de LRP-1 potentiellement impliquées dans la progression tumorale	175

Matériels et méthodes

Figure 60	Représentation schématique du dosage de l'activité plasmine avec le S-2251 TM	186
Figure 61	Protocole de Matrigel® Plug	191
Figure 62	Protocole de CAMs assay	191

Résultats

Figure 1	<i>LRP-1 is preferentially expressed in TNBC cell lines</i>	215
Figure 2	<i>LRP-1 plays a pro-tumorigenic role in vivo, by supporting tumor angiogenesis, in MDAMB-231 orthotopic xenografts</i>	216
Figure 3	<i>LRP-1 repression affects MDA-MB-231 Matrigel® plugs angiogenesis</i>	218
Figure 4	<i>shLRP-1 MDA-MB-231 secretome restricts the angiogenic potential of endothelial cells</i>	220
Figure 5	<i>LRP-1 may affect angiogenesis through TGFβ signalling and the plasminogen/plasmin system modulation</i>	222
Figure 6	<i>LRP-1 modulates plasmin activity in 24h MDA-MB-231 secretome</i>	225

Figure S1	<i>LRP-1 targeted shRNA stability over time</i>	226
Figure S2	<i>Hemorrhages in shLRP-1 CAMs</i>	227
Figure S3	<i>Proteomic enrichment in shLRP-1 secretome</i>	228
Figure S4	<i>Morphological profile of shLRP-1 CAMs and 3D spheroid</i>	229
Figure R1	Etude de la modulation de l'expression du VEGF en fonction de l'expression de LRP-1	236
Figure R2	Caractérisation et étude des sécrétomes issues de cellules invalidées pour l'expression de LRP-1 par l'intermédiaire de siARN et de shARN	238
Figure R3	Modulation du sécrétome angiogénique des MDA-MB-231 shLRP-1 en hypoxie	244
Figure R4	Influence de l'expression de LRP-1 sur la migration transendothéliale en hypoxie	248
Figure R5	Diminution de l'expression de LRP-1 dans les MDA-MB-231 Brain	249

Discussion

Figure 63	Mécanisme d'action des shARN et des siARN	255
Figure 64	Rôles bivalents du TGF- β dans la carcinogénèse mammaire	260
Figure 65	Facteurs contribuant au phénotype claudin-low et son impact sur le comportement tumoral	228
Figure 66	Microscopie électronique à transmission d'une cellule MDA-MB-231 envahissant une matrice 3D de collagène	273
Figure 67	Interactions entre la tumeur et cellules endothéliales lors de l'adhésion et de la transmigration des cellules tumorales	274

Conclusion

Figure 68	Modulation du sécrétome des MDA-MB-231 réprimées pour LRP-1 en normoxie et en hypoxie	285

Liste des Tableaux **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1	Classification ACR	22
Tableau 2	Classification TNM	24
Tableau 3	Classification par stade UICC	23
Tableau 4	Répartition des tumeurs mammaires selon leur caractéristique biomoléculaire	26
Tableau 5	Les différents types de collagène	85
Tableau 6	Les MMPs	99
Tableau 7	Les MT-MMPs	100
Tableau 8	Les ADAM et les ADAMTS	101
Tableau 9	Les TIMPs	102
Tableau 10	Les matrikines anti-angiogéniques	148
Tableau 11	Les interleukines pro et anti-angiogéniques	155
Tableau 12	Liste non exhaustive de ligands de LRP-1	159
Tableau 13	Primers PCR utilisés	190
Tableau S1	<i>Primer sequences used for qRT-PCR analysis genes</i>	230

Introduction

INTRODUCTION

I. Les cancers mammaires, cas spécifique du cancer mammaire triple négatif

I.1. Le sein : architecture et évolution physiologique

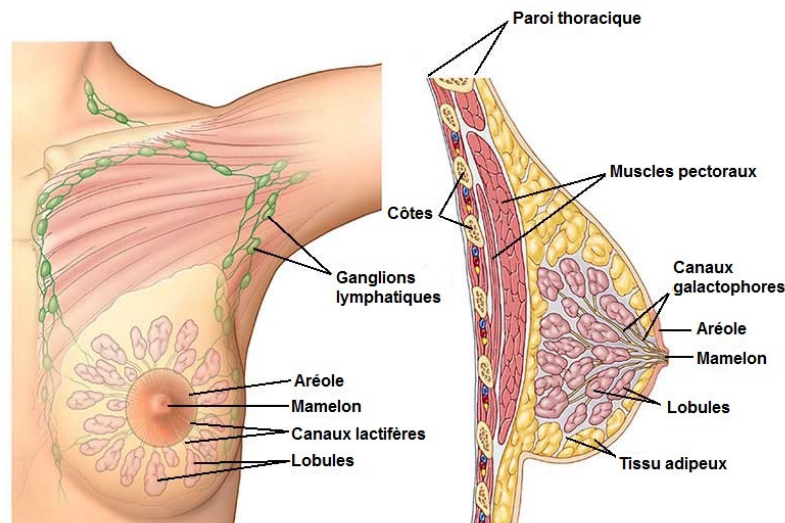


Figure 1 : Anatomie du sein de la femme. © Army & Sam Collins, 2015.

Chez la femme, le sein est une glande exocrine assurant la production de lait après l'accouchement. La glande mammaire est constituée de deux compartiments cellulaires séparés par une membrane basale : un compartiment mésenchymateux, richement vascularisé et innervé, et un compartiment épithélial. Ce dernier renferme une structure en grappe composée d'alvéoles ou acini associée à la fonction sécrétrice de la glande (Fig. 1). Les alvéoles, regroupées au sein de lobules, sont eux-mêmes regroupés en lobes. La glande mammaire est constituée de 10 à 20 lobes et comprend également un réseau de canaux permettant l'évacuation des sécrétions. Les alvéoles sont ainsi réparties autour de canaux alvéolaires, appelés canaux intralobulaires qui s'associent pour former un canal galactophore. Plusieurs canaux galactophores interlobulaires se réunissent à leur tour pour former un canal galactophore principal (ou conduit lactifère) qui converge vers le mamelon. Ainsi, chaque lobe est drainé par un canal galactophore qui débouche individuellement au niveau du mamelon (Gusterson et al., 2012).

Le sein se développe tout au long de la vie de la femme, du stade fœtal à la ménopause, sous l'influence des hormones sexuelles (l'œstrogène et la progestérone) et d'un certain nombre de facteurs de croissance. Les changements hormonaux liés à la mise en place des cycles menstruels induisent la formation des lobules. Au cours des cycles, jusqu'à l'âge de 35 ans, les lobules se complexifient du fait d'une augmentation du nombre d'alvéoles. La gestation et la lactation entraînent des modifications importantes du sein et participent à la différenciation maximale de ces lobules. Ces changements s'observent sous l'influence des œstrogènes, de la progestérone et des facteurs de croissance tels que le TGF- α (*Transforming Growth Factor alpha*) et ne se produiront que si une gestation survient (Russo & Russo, 2004). Les changements hormonaux qui surviennent lors de la parturition induisent la lactogenèse. Durant 2 à 3 jours après l'accouchement, la glande mammaire va sécréter un liquide riche en protéines et en

anticorps, c'est le colostrum. Par la suite la sécrétion grasseuse augmente et se transformera en lait. Ainsi la glande mammaire n'achève son développement qu'avec la première lactation. À la fin de celle-ci, le tissu alvéolaire est détruit et est remplacé par du tissu adipeux dans lequel se développera une nouvelle masse glandulaire au cours d'un nouveau cycle de reproduction. A la ménopause, les alvéoles régressent mais les canaux galactophores sont maintenus.

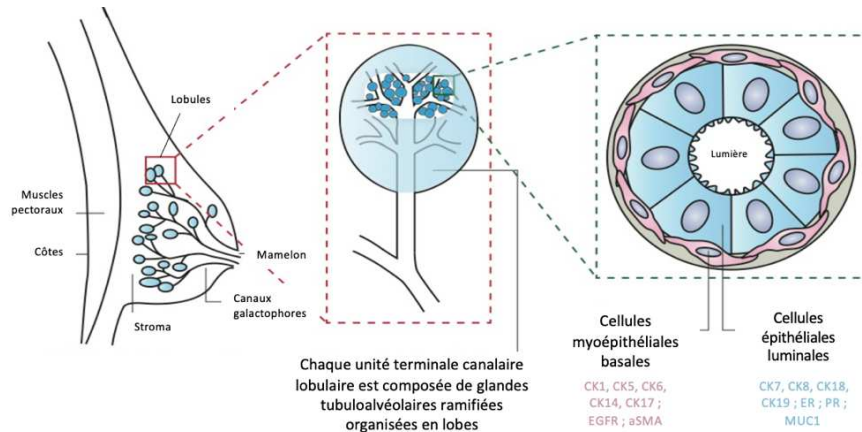


Figure 2 : Les différentes cellules du sein de la femme et leurs marqueurs associés.

Adaptée d'après Eric Wong et Jenna Rebelo dans Pandya & Moore, 2011.

Pour comprendre comment la stratification des différents types de cancer du sein s'opère, il est nécessaire de revenir sur l'histologie du tissu mammaire normal. Les canaux et lobules sont bordés par plusieurs types cellulaires :

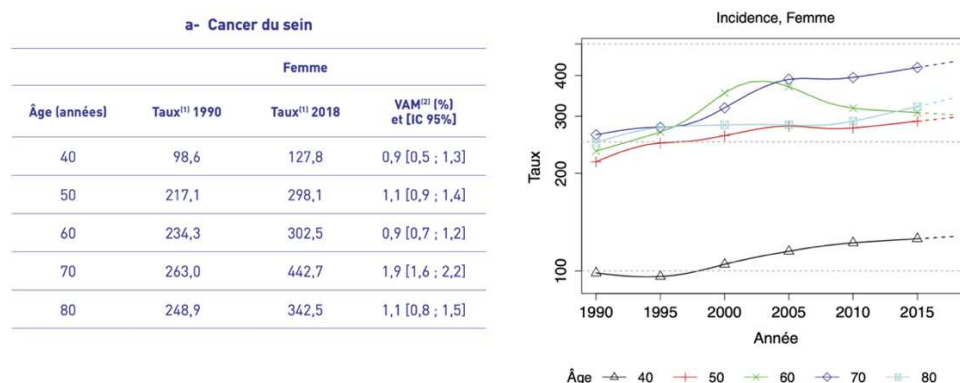
- Les cellules luminales, qui bordent la lumière des lobules et des canaux, expriment la mucine MUC1, BCL2, le récepteur aux œstrogènes (ER), le récepteur à la progestérone (PR), GATA3, les cytokératines CK-7, CK-8, CK-18, CK-19 et certaines molécules d'adhésion des cellules épithéliales (Abd El-Rehim et al., 2004) ;
- Les cellules myoépithéliales (ou basales) entourent les cellules luminales et sont au contact de la membrane basale. Elles expriment les cytokératines CK-1, CK-5, CK-6, CK-14, CK-17, la vimentine, l'EGFR et des marqueurs musculaires lisses comme l'actine musculaire lisse (α SMA) et p63 (Abd El-Rehim et al., 2004) ;
- Les cellules souches progénitrices, en faible nombre, qui peuvent se différencier en cellule basale ou luminale, sont situées dans les canaux (Deugnier et al., 2007).

I.2. Le cancer mammaire

Relevant d'une nomenclature générique, le cancer du sein fait référence à tout un ensemble de proliférations néoplasiques de la glande mammaire qui diffèrent tant du point de vue histologique et moléculaire qu'en ce qui concerne leur évolution. Le terme de « cancer du sein » ne désigne que les tumeurs malignes, potentiellement agressives, du sein tandis que le terme de « tumeur du sein » désigne à la fois les tumeurs malignes et bénignes. Souvent utilisé, le terme « carcinome » désigne les types les plus fréquents du cancer du sein d'origine épithéliale.

1.2.1. Épidémiologie et facteurs de risques

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent dans les pays occidentaux et constitue le premier cancer chez la femme dans le monde avec 2 088 849 nouveaux cas et 626 679 décès recensés en 2018. Il présente l'incidence la plus élevée tous cancers confondus avec 38,9/100 000 personnes touchées, tous sexes confondus, et constitue l'un des cancers les plus meurtriers (11,6% de la mortalité due aux cancers) derrière le cancer du poumon (18,4%) (GLOBOCAN. Bray et al., 2018). En France, le cancer du sein constitue le cancer le plus diagnostiqué chez la femme avec 58 459 nouveaux cas estimés en 2018. Il est aussi, à l'échelle mondiale le plus meurtrier avec 12 146 décès estimés pour l'année 2018 (Santé Publique France, 2019). Cependant, le taux de mortalité associé au cancer du sein dans le monde diminue depuis 15 ans et l'incidence semble se stabiliser, notamment pour les femmes de moins de 60 ans (Fig. 3). En 2013-2014, grâce au programme national de dépistage organisé en France, près de 37 000 cancers du sein ont été détectés, dont la majorité à un stade précoce. En 2018, le taux de dépistage était de 50,3% de la population soit près de 2,3 millions de femmes.



Le risque de développer un cancer mammaire peut être influencé par différents facteurs : génétiques, hormonaux et environnementaux. Six à dix pour cent des cancers du sein sont associés à des prédispositions génétiques. Une incidence accrue observée dans certaines familles a permis de mettre en évidence la présence de mutations de certains gènes. Les principaux étant *BRCA1* et 2 (*BReast CAncer*), *PT53*, *PTEN* (*Phosphatase and TENsin homolog*) et *AT* (*Ataxia Telangiectasia*) (Dumitrescu & Cotarla, 2005). Parmi les facteurs de risque, le facteur de risque hormonal le plus important correspond à une exposition prolongée aux œstrogènes. Ainsi, une ménarche précoce (avant 8 ans) et une ménopause tardive (après 54 ans) sont associés à un risque élevé de développement de cancers mammaires. Il est admis que les traitements hormonaux substitutifs de la ménopause favoriseraient la croissance de tumeurs pré-existantes mais n'auraient cependant pas d'effet initiateur sur la cancérogenèse (Ringa & Fournier, 2008). Le lien entre l'apport d'œstrogènes exogènes et l'apparition de cancer est évoqué de manière de plus en plus récurrente (Yue et al. 2013). Des données montrent que la prise prolongée (5 ans ou plus) d'un traitement hormonal substitutif multiplie par 1,2 à 2 le risque de développer un

cancer du sein (INCa. 2012). Les œstrogènes se fixent sur leurs récepteurs cytoplasmiques et induisent leurs translocations nucléaires où ils agissent comme des facteurs de transcription. Les facteurs environnementaux participent également au développement de ce type de cancer. Il a été démontré qu'une consommation élevée d'acides gras trans augmentait le risque de développer un cancer du sein (Chajès et al., 2008). De même, une consommation journalière d'alcool provoque une augmentation du risque de 10% (Testino, 2011). Enfin, une exposition prolongée à certains polluants tels que l'insecticide dichlorodiphényltrichloroéthane, ou encore des constituants du plastique tels que le 4-nonylphénol, le bisphénol A et les phtalates (Merhi et al. 2007) agissant en tant que perturbateurs endocriniens, augmenteraient également le risque de développer un cancer du sein hormonaux-dépendant.

I.2.2. Le diagnostic

Bien que les outils de diagnostic et les traitements soient de plus en plus performants, la prise en charge précoce de cancers peu avancés et à ganglions négatifs présente de meilleurs résultats de guérison que les cancers avancés à ganglions positifs. Ainsi, la détection précoce des cancers par la prévention apparaît comme la première des solutions pour les guérir. Pour permettre ce diagnostic, de nombreuses méthodes sont aujourd'hui disponibles (Yang et al., 2020).

I.2.2.1. La mammographie

La mammographie constitue une des méthodes la plus répandue pour le dépistage du cancer du sein. Malgré des avantages substantiels, il existe plusieurs critiques et limites de la mammographie de dépistage, qui en font une question parfois controversée. Bien que sa sensibilité générale varie de 70% à 85%, la mammographie de dépistage affiche une baisse de sensibilité chez 50% des femmes ayant les seins denses (Buist et al., 2009). La sensibilité d'un test diagnostic correspond à sa capacité à détecter un maximum de malades (c'est-à-dire à avoir le moins de faux négatifs), tandis que la spécificité d'un test est sa capacité à ne détecter que les malades (avoir le moins de faux positifs) (Adeca, 2015).

De surcroît, la mammographie permet une détection préférentiellement des cancers à croissance lente (Wishart et al., 2008). De nombreux articles scientifiques soutiennent que les cancers détectés par mammographie sont généralement moins agressifs et ont tendance à avoir un meilleur pronostic que les cancers détectés par d'autres modalités de dépistage, telles que l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Une étude a révélé que chez les femmes présentant un risque élevé de cancer du sein, les cancers détectés lors de la mammographie de dépistage étaient principalement des carcinomes canaux in situ (CCIS) ou des tumeurs de grade inférieur, tandis que les cancers détectés par IRM étaient le plus souvent invasifs (Sung et al., 2016). C'est pourquoi un examen d'imagerie supplémentaire peut être justifiée chez les femmes à haut risque ou chez les femmes à risque moyen avec des seins denses. Une forte densité mammaire pose un double problème : Il a été montré que les femmes présentant une densité

mammographique de 75% ou plus avaient un risque élevé de cancer du sein par rapport à celles présentant une densité inférieure à 10% (Boyd et al., 2007). Par ailleurs, des analyses récentes suggèrent que 1% à 10% des cancers détectés par mammographie sont rapportés sans importance clinique ou sur-diagnostiqués (Puliti et al., 2012 ; Etzioni et al., 2014) ; cependant, n'est-ce-pas le point même du dépistage à large échelle ? plutôt prévenir que guérir ? Dans le cadre d'études menées en suède (Two-County Trial) et en Angleterre, il a été mis en évidence que le dépistage avait considérablement réduit la mortalité du cancer mammaire, avec des avantages absolus estimés à 8,8 et 5,7 décès par cancer du sein évités pour 1000 femmes dépistées, respectivement, pendant 20 ans à partir de 50 ans. Ils ont constaté qu'entre 2 et 2,5 vies étaient sauvées (Duffy et al., 2010).



Figure 4 : Clichés issus de mammographies.

Image d'une patiente saine (gauche) et présentant une anomalie (droite).

D'après le Dr Hardit (www.chirurgie-gynecologie.fr, 2012)

Plus performante que la mammographie 2D, la mammographie 3D ou tomosynthèse mammaire (DBT pour *Digital Breast Tomosynthesis*) crée une reconstruction volumétrique du tissu mammaire à partir d'une série d'expositions aux rayons X acquises sous plusieurs angles différents, conduisant à une meilleure visibilité des lésions dans le sein quelle que soit la densité tissulaire. En 2011, le DBT a été approuvé par la FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) pour être utilisé en combinaison avec la mammographie standard pour le dépistage du cancer du sein. Cette modalité répond aux principales limitations de la mammographie conventionnelle de dépistage en augmentant la sensibilité sans réduire la spécificité (Friedewald et al., 2014).

1.2.2.2. L'échographie

L'échographie, repose sur l'utilisation d'ondes sonores de haute fréquence (ultrasons) pour générer des images relativement précises avec une résolution spatiale de 0,1 à 1 mm. Cette technique constitue la modalité la plus couramment utilisée pour l'imagerie complémentaire de la mammographie. L'échographie est peu coûteuse, largement disponible et n'expose pas les patientes à un rayonnement ionisant. L'échographie détecte environ 1,9 à 4,2 cancers supplémentaires pour 1000 femmes dont la mammographie est négative ; cette variabilité dépend en grande partie de l'opérateur (Houssami & Ciatto, 2011).

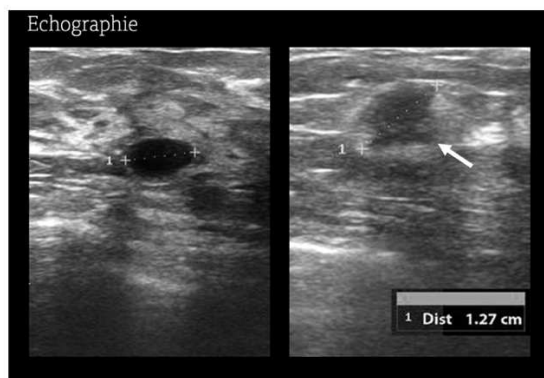


Figure 5 : Clichés issus d'échographies mammaires.

Image d'une patiente saine, présentant un kyste bénin au contour bien définis (gauche), et présentant une anomalie tumorale (droite). D'après le Dr Karazaitri (www.dr-karazaitri-ma.com, 2021)

Plusieurs études ont évalué l'utilité clinique de l'échographie chez les femmes ayant une poitrine dense comme technique complémentaire à la mammographie. Notamment, il a été mis en évidence que sur 335 cancers du sein diagnostiqués uniquement par échographie, le cancer n'avait pas été détecté par mammographie pour 72 patients (21%), en raison d'erreurs d'interprétation ou parce qu'il n'était pas inclus dans le champ de vision en raison de sa localisation ou du positionnement du sein de la patiente (Kaplan, 2001).

I.2.2.3. L'imagerie par résonance magnétique

L'IRM représente la méthode d'imagerie la plus sensible pour la détection du cancer du sein (Fig. 6). Les sensibilités s'échelonnent de 71% à 100% contre 35% à 50% pour la mammographie chez les femmes à haut risque et aux seins denses (Lehmann, 2006).

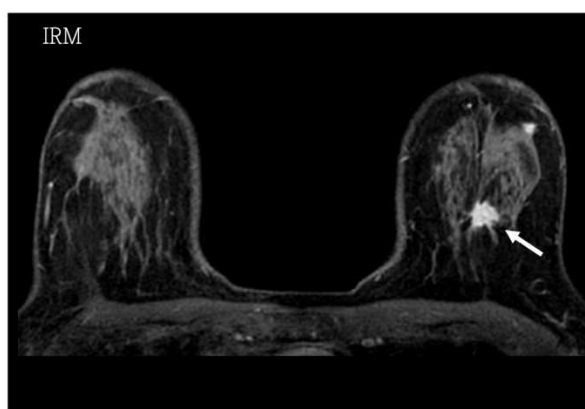


Figure 6 : Clichés issus d'une IRM mammaire. Image d'une patiente présentant une anomalie tumorale au niveau de son sein droit. D'après le Dr Delalogue (<https://docteurimago.fr>)

Une étude a révélé que l'IRM constituait une modalité de choix chez les femmes à haut risque ayant des antécédents de carcinome lobulaire *in situ* (CLIS). Dans cette étude portant sur 14 patientes ; 12 cancers ont été détectés par l'utilisation de l'IRM ; et 5 par la mammographie.

L'imagerie par résonance magnétique, utilisée en complément de la mammographie, a ainsi abouti à un gain supplémentaire de 50% dans la détection des cancers mammaires (Sung et al., 2011).

Un des avantages de l'IRM concerne sa capacité à imager la néovascularisation, phénomène retrouvé dans les tumeurs du sein agressives. L'angiogenèse (*Cf. Chap. III*) conduit à des changements dans l'architecture micro-vasculaire de la tumeur et à une augmentation de la perméabilité vasculaire. La détection de ces changements se présente souvent par une augmentation puis une élimination rapide du produit de contraste lors d'imagerie de perfusion, constatation caractéristique du cancer du sein agressif (Azzam et al., 2019).

La spécificité de l'IRM dépend de l'expérience du radiologue, et les faux positifs peuvent être exclus lorsque des images antérieures sont disponibles (Kriege et al., 2004).

Quelle est la procédure en cas de suspicion de cancer ?

En cas de suspicion de cancer à la suite de la réalisation d'un ou plusieurs examens susmentionnés, une biopsie est réalisée dans le cadre du bilan diagnostique initial. Ce bilan a pour objectif de préciser le type histologique de la tumeur, la classification du cancer (TNM, stade UICC...), ainsi que d'autres critères pronostiques ou prédictifs de réponses à certains traitements. Un bilan d'extension loco-régional est par la suite réalisé pour évaluer la taille de la tumeur et déceler des lésions additionnelles dans le sein concerné et dans le sein controlatéral. Ces éléments guideront la stratégie thérapeutique à mettre en place et fourniront des informations relatives au risque de récurrence locale ou à distance ainsi que sur le pronostic des patientes. Une échographie axillaire peut être réalisée pour évaluer l'extension ganglionnaire. Un bilan d'extension général peut, lui aussi, être réalisé afin de rechercher de métastases. Il repose sur l'imagerie et le dosage de marqueurs tumoraux, notamment par le biais d'une biopsie liquide (Ignatiadis et al., 2021). L'ensemble de ces informations permet aux praticiens de confronter leurs expertises respectives pour fixer les différentes étapes de la prise en charge des patientes ainsi que leurs suivis.

I.2.3. Les différentes classifications des cancers mammaires

Le cancer du sein représente une maladie complexe associé à un grand degré d'hétérogénéité inter- et intra-tumorale (Marusyk et al., 2012). Pour cette raison, une approche personnalisée est nécessaire pour obtenir les meilleures réponses thérapeutiques. Plusieurs classifications complémentaires les unes des autres sont utilisées, dont la classification BIRADS, TNM et le stade UICC des tumeurs qui fait état de l'état clinique de la tumeur et de son stade/grade, les classifications histologiques et les classifications dites moléculaires. Ces classifications sont complémentaires les unes des autres.

1.2.3.1. La classification BIRADS de l'ACR

À la suite d'une mammographie ou d'une échographie, la classification BIRADS (*Breast Imaging Reporting And Data System*) de l'ACR est utilisée par les radiologues pour décrire la présence ou l'absence d'anomalies lors de toutes imageries de dépistage. Elle offre un langage commun dans la description des examens et simplifie les conduites à tenir. La classification ACR propose une meilleure stratification du risque de développer un cancer en classant les lésions en fonction de leur degré de suspicion sur une échelle variant de 0 à 6 (Tab. 1).

CLASSIFICATION ACR	
ACR0	Anomalie détectée en attente d'un bilan de diagnostic (dépistage)
ACR1	Mammographie normale
ACR2	Sont considérées comme bénignes (VPP (valeur prédictive positive) de cancer : 0%) - Masses rondes avec calcifications grossières (adénofibrome ou kyste) - Ganglion intra-mammaire - Masses(s) ronde(s) correspondant à un/des kyste(s) typique(s) en échographie - Masse(s) de densité mixte (lipome, hamartome, galactocèle, kyste huileux) - Cicatrice(s) connue(s) - Calcifications cutanées, vasculaires - Grandes calcifications en bâtonnets, à centre clair, pariétales, à type de lait calcique dystrophiques, fils de suture calcifiés - Calcifications rondes, régulières et diffuses
ACR3	Sont considérées comme probablement bénignes (VPP <= 2%) - Calcifications rondes ou amorphes, peu nombreuses, en petits amas ronds isolés - Petit(s) amas rond(s) ou ovale(s) de calcifications polymorphes, peu nombreuses, évoquant un début de calcification d'adénofibrome - Masse(s) bien circonscrite(s), ronde(s), ovale(s) sans micro-lobulations, non calcifiée(s), non liquidienne(s) en échographie - Asymétrie focale de densité à limites concaves et/ou mélangée à de la graisse
ACR4	Sont considérés comme indéterminés (VPP > 2% et <= 95% ; A >= 2% et <= 10% ; B >= 10% et <= 50% ; C >= 50% et < 95%) - Calcifications rondes nombreuses et/ou groupées en amas au contour ni rond, ni ovale - Calcifications amorphes ou poussiéreuses, groupées et nombreuses - Calcifications grossières hétérogènes peu nombreuses - Distorsion(s) architecturale(s) en dehors d'une cicatrice connue et stable - Masse(s) non liquidienne(s) ronde(s), ovale(s) de contour microlobulé, ou masqué par du tissu fibro-glandulaire normale, ou évolutive - Asymétrie(s) focale(s) de densité à limites convexes ou évolutive(s)
ACR5	Sont considérées comme typiquement malignes (VPP >= 95%) - Calcifications fines linéaires, ou fins linéaires ramifiés - Calcifications grossières hétérogènes ou fines calcifications polymorphes nombreuses et groupées en amas - Calcifications groupées quelle que soit leur morphologie, dont la distribution est linéaire ou segmentaire (topographie, intra-galactophorique) - Calcifications associées à une distorsion architecturale ou à une masse - Calcifications agroupées ayant augmenté en nombre ou calcifications dont la morphologie et la distribution sont devenues plus suspectes - Masse de contour flou ou irrégulier - Masse de contour spiculé
ACR6	Lésions dont la malignité est prouvée (prélèvements)

Tableau 1 : Classification ACR

I.2.3.2. La classification TNM

Le système de classification TNM (*Tumor Node Metastasis*) des tumeurs primaires, des ganglions lymphatiques et des métastases a été publié pour la première fois en 1959 par l'*American Joint Commission of Cancer*. Depuis, elle est régulièrement mise à jour, la huitième édition a été révisée et publiée en 2017. Les catégories TNM sont déterminées et le stade de la maladie est défini au moment du diagnostic. Le but étant de prédire au mieux l'état clinique du patient pour déterminer un plan thérapeutique adapté (Cserni et al., 2018 ; Sawaki et al., 2019). Comme son nom l'indique, la classification TNM caractérise la tumeur selon trois critères : la masse tumorale en place et son extension locale (T), son extension locorégionale avec l'envahissement des ganglions (N) et à distance avec le développement de métastases (M). Chaque critère est associé à un chiffre dont la valeur augmente avec la gravité. Lorsque la détermination est impossible, la lettre X est associée au critère TNM (Tab. 2).

I.2.3.3. La classification par stade UICC

Les tumeurs caractérisées TNM sont ensuite regroupées par stade UICC (Union internationale contre le cancer) : du stade 0 pour les cancers *in situ* au stade IV pour les cancers métastatiques (Tab. 3). Il existe d'autres critères déterminant la gravité de la tumeur afin d'assurer un risque minime de rechute ; par exemple la prise en compte de la présence d'embolies vasculaires.

CLASSIFICATION PAR STADE UICC	
0	Tis N0 M0 ; T1 N0 M0
IIA	T0 N1 M0 ; T1 N1 M0 ; T2 N0 M0
IIB	T2 N1 M0 ; T3 N0 M0
IIIA	T0 N2 M0 ; T1 N2 M0 ; T2 N2 M0 ; T3 N1 M0 ; T3 N2 M0
IIIB	T4 N0 M0 ; T4 N1 M0 ; T4 N2 M0
IIIC	Tous T N3 M0
IV	Tous T Tous N M1

Tableau 3 : Classification par stade UICC

CLASSIFICATION TNM	
TUMOR (T)	
TX	Tumeur primitive non évaluable
T0	Tumeur primitive non palpable • Tis : carcinome in situ • Tis (CCIS) : carcinome canalaire in situ • Tis (CLIS) : carcinome lobulaire in situ • Tis (Paget) : maladie de Paget du mamelon sans tumeur sous-jacente NB : la maladie de Paget associée à une tumeur est classée en fonction de la taille de la tumeur
T1	Tumeur ≤ 2 cm dans sa plus grande dimension
T1MIC	Micro-invasion ≤ 1 mm dans sa plus grande dimension • T1a : 1 mm < tumeur ≤ 5 mm • T1b : 5 mm < tumeur ≤ 1 cm • T1c : 1 cm < tumeur ≤ 2 cm
T2	2 cm < tumeur ≤ 5 cm dans sa plus grande dimension
T3	Tumeur > 5 cm dans sa plus grande dimension
T4	Tumeur, quelle que soit sa taille, avec une extension directe soit à la paroi thoracique (a), soit à la peau (b) • T4a : extension à la paroi thoracique en excluant le muscle pectoral • T4b : œdème (y compris peau d'orange) ou ulcération de la peau du sein, ou nodules de perméation situés sur la peau même du sein • T4c : T4a + T4b • T4d : cancer inflammatoire
Ganglions lymphatiques régionaux (N)	
Nx	Envahissement des ganglions lymphatiques non évaluable
N0	Absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique et absence d'examen complémentaire à la recherche de cellules tumorales isolées • N0(i-) : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique, étude immunohistochimique (IHC) négative • N0(i+) : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique, IHC positive avec amas cellulaire ≤ 0,2 mm (considéré comme sans atteinte ganglionnaire) • N0(moi-) : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique, biologie moléculaire (RT-qPCR) négative • N0(moi+) : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique, RT-qPCR positive
N1mi	Micrométastases > 0,2 mm et ≤ 2 mm
N1	Envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires et/ou envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique
N2	Envahissement de 4 à 9 ganglions axillaires ou envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects, en l'absence d'envahissement ganglionnaire axillaire • N2a : Envahissement de 4 à 9 ganglions axillaires avec amas cellulaire > 2 mm • N2b : Envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects, en l'absence d'envahissement ganglionnaire axillaire
N3	Envahissement d'au moins 10 ganglions axillaires ou envahissement des ganglions sous-claviculaires (niveau III axillaire) ou envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects avec envahissement ganglionnaire axillaire ou envahissement de plus de 3 ganglions axillaires et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique ou envahissement des ganglions sus-claviculaires homolatéraux • N3a : Envahissement d'au moins 10 ganglions axillaires (avec amas cellulaire > 2 mm) ou envahissement des ganglions sous-claviculaires • N3b : Envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects avec envahissement ganglionnaire axillaire ou envahissement de plus de 3 ganglions axillaires et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique • N3c : Envahissement des ganglions sus-claviculaires homolatéraux
MÉTASTASES À DISTANCE (M)	
MX	Renseignements insuffisants pour classer les métastases à distance
M0	Absence de métastases à distance
M1	Présence de métastases à distance

Tableau 2 : Classification TNM

1.2.3.4. La classification histologique

Cette classification repose sur l'examen histologique d'un échantillon tumoral par un anatomopathologiste. La plupart des tumeurs malignes du sein sont des adénocarcinomes développés soit à partir des cellules épithéliales des lobules glandulaires (carcinomes lobulaires), soit à partir des cellules épithéliales des canaux galactophores (carcinomes canaux), qui représentent, à eux deux, environ 98% des carcinomes mammaires.

Dans de rares cas, les cellules cancéreuses mammaires prolifèrent en carcinome *in situ* sans qu'il y ait de rupture de la lame basale et par conséquent sans envahir le tissu conjonctif voisin, par opposition au carcinome infiltrant (Arpino et al., 2004). Ces tumeurs épithéliales non infiltrantes peuvent envahir les canaux (carcinome intracanaux) dans 4% des cas et présentent le plus souvent des microcalcifications mammographiques et une multicentricité. Il existe 4 types architecturaux de carcinomes canaux *in situ* (massif, cribriforme, papillaire et comédo) dont le pronostic est favorable. Ces tumeurs épithéliales de bas grade peuvent aussi prendre place au niveau des lobules (carcinome lobulaire), et sont associées à une prolifération de cellules de petite taille au niveau des canalicules intra-lobulaires. Elles représentent environ 2,5% des cancers mammaires et se caractérisent par un multicentrisme et une tendance à la bilatéralisation.

Malheureusement, le carcinome est souvent infiltrant et ses formes les plus fréquentes sont le carcinome canaux infiltrant (70%) et le carcinome lobulaire infiltrant (5 à 15%). Mais il existe également des formes rares de carcinomes infiltrants, tels que les carcinomes médullaires, mucineux (ou colloïdes), tubuleux, apocrines ou encore la maladie de Paget (tumeur du mamelon). Les tumeurs malignes en dehors des carcinomes primitifs du sein sont rares, elles représentent moins de 1% de toutes les tumeurs malignes du sein et constituent un groupe de lésions disparates incluant les sarcomes phyllodes, les sarcomes mésenchymateux, les angiosarcomes et les lymphomes non hodgkiniens primitifs du sein (Tubiana & Koscielny, 1990).

En se basant sur cette classification histologique, le grade de la tumeur est défini par l'apparence des cellules cancéreuses en comparaison à celle des cellules normales et saines. Certains cancers possèdent leur propre système de classification histologique, mais la plupart des cancers solides reçoivent un grade entre 1 et 3. Plus ce nombre est important, plus le grade l'est aussi. Les cancers de bas grade sont formés de cellules bien différenciées, avec une apparence et un comportement proches des cellules normales du tissu dans lequel ils se sont développés. Les cancers de haut grade sont formés de cellules dont l'apparence et l'organisation est très différente de celle des cellules normales. Leur susceptibilité de se propager est grande.

Dans le cadre des cancers mammaires triples négatifs, qui nous intéressent, une grande variété de types histologiques existe. La forme la plus fréquente de carcinome infiltrant nommée « carcinome infiltrant de type non spécifique » (CI-TNS) ne présente pas suffisamment de

caractéristiques histologiques pour être rattaché à une catégorie connue. Les CI-TNS représentent 80% des carcinomes mammaires (Lakhani et al., 2012) et cette forme concerne 90% des TNBC (*Triple Negative Breast Cancer*) (Gluz et al., 2009). Les caractéristiques morphologiques de ce sous-type varient considérablement entre les différents cas. D'autre part, 10% des TNBC appartiennent à des types histologiques spéciaux, parmi lesquels, on retrouve le carcinome métaplasique, le carcinome médullaire, le carcinome lobulaire invasif, le carcinome apocrine et le carcinome adénoïde kystique (Zhao et al., 2018). Plusieurs études se sont intéressées aux répercussions pronostiques de ces différents types histologiques. Il a été montré que le carcinome métaplasique et le carcinome lobulaire infiltrant étaient associés à un pronostic moins favorable que le CI-TNS, tandis que le carcinome kystique, apocrine et adénoïde étaient associés à un meilleur pronostic (Mills et al., 2018). Cette classification histopathologique des TNBC a été largement décrite antérieurement. Néanmoins, très peu de recommandations de traitement se font dans les recommandations actuelles selon le type histologique du cancer du sein du patient. Les renseignements pronostiques de certains types histologiques sont pour autant plus que précieux et peuvent être utiles pour prendre des décisions cliniques concernant le suivi des patients et les approches thérapeutiques, par exemple l'intensité de la dose et la durée de l'adjuvant chimiothérapie (Zhao et al., 2020)

I.2.3.5. La classification moléculaire

La classification moléculaire, pratique de référence, se base sur l'expression immunohistochimique des récepteurs aux œstrogènes (ER), à la progestérone (PR) et la surexpression de HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor-2*) (*ERBB2*). Cette classification a permis de faire émerger moins cinq sous-types moléculaires ou intrinsèques distincts de cancer du sein à savoir les luminaux (Luminal A et Luminal B), les enrichis en HER2, les basal-like (incluant une partie des TNBC) et les normal-like (Perou et al., 2000). Cette stratification histopathologique ER+/- PR+/- et HER2+/- dont les profils d'expression sont maintenus après 16 semaines de traitement à la doxorubicine ainsi que dans les métastases, constitue une étape cruciale pour la mise en œuvre de thérapies plus précises dans la prise en charge du cancer mammaire (Fig. 7 ; Tab. 4). La sous-classification moléculaire initiale du cancer du sein conduit à de meilleurs résultats, en guidant l'administration de thérapies ciblées telles que l'hormonothérapie (Tamoxifène®) pour les tumeurs exprimant les récepteurs hormonaux ou encore la thérapie ciblant HER2 (Trastuzumab®) pour les tumeurs surexprimant HER2

Caractéristiques de la tumeur	Basal-like (%)	Luminal A (%)	Luminal B (%)	HER2-like (%)
HER2+	10	12	20	100
RE+	12	96	97	46
Grade III	84	19	53	74
Tumeur > 2 cm	75	53	69	74
Présence de ganglions N+	40	52	65	66

Tableau 4 : Répartitions des tumeurs mammaires selon leur caractéristique biomoléculaire.

D'après www.arcagy.org/infocancer, 2018.

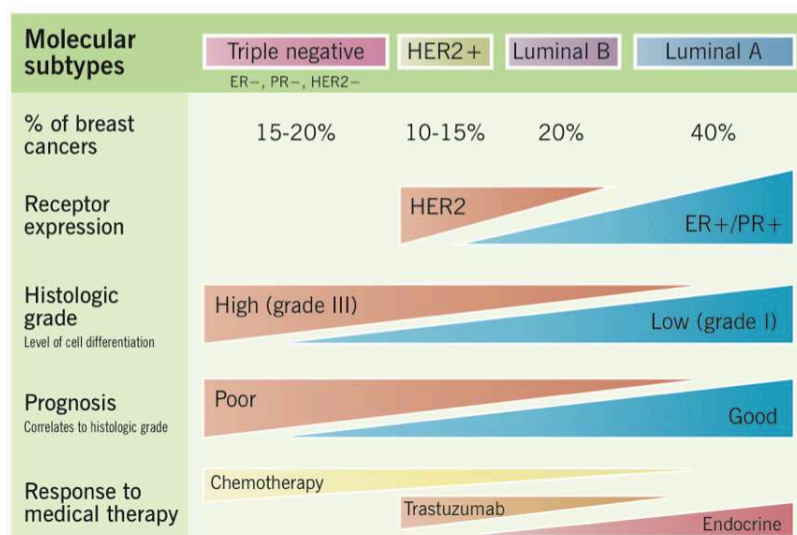


Figure 7 : Sous-types moléculaires du cancer du sein et leurs caractéristiques.

D'après Eric Wong et Jenna Rebelo dans Pandya & Moore, 2011.

I.2.3.5.1. Les luminaux

Le profil luminal est caractérisé par une hormono-sensibilité des cellules tumorales corrélée à une forte expression du récepteur ER α . Ce sous-type regroupe les tumeurs présentant une forte expression des gènes caractéristiques de cellules épithéliales luminales telles que les cytokératines 8, 18 et 19 ainsi que GATA3, un gène impliqué dans le développement et la différenciation des tumeurs ER+. Ce groupe comprend majoritairement des tumeurs de faible grade avec des formes histologiques particulières : cribriforme, mucineux, lobulaire et carcinomes canaux infiltrants de grade histopronostique I et II. Dans plus de 10 % des cas, ces tumeurs sont associées à une mutation du gène de maintien du génome, TP53.

Parmi les cancers luminaux, deux sous-types distincts existent : les luminaux A et les B représentant respectivement une fréquence de 50-60% et 10-20% des tumeurs mammaires. Les tumeurs luminales A, avec le pronostic le plus favorable, n'expriment pas HER2 et sont caractérisées par : ER+, PR $\geq$ 20%, HER2 négatif, Ki67 <14%. Pour les tumeurs luminales B, il existe deux sous-types HER2+ et HER2-. Les luminales B HER2+ sont caractérisées par : ER+, tout niveau de PR, HER2+, tout niveau de Ki67 alors que les luminales B HER2- sont caractérisées par : ER+, HER2- et au moins l'un des éléments suivants : PR négatif ou <20% et Ki67 $\geq$ 20% (Gao & Swain, 2018). Le pronostic des tumeurs luminales B est moins bon que celui des tumeurs luminales A.

I.2.3.5.2. Les enrichis en HER2

Le profil tumoral mammaire dit enrichi en HER2 est diagnostiqué dans 10 à 15% des cancers du sein. Il est caractérisé par une amplification du gène *HER2* (erb-B2) associée à forte prolifération (Ki67++). Le récepteur au facteur de croissance épidermique HER2 est impliqué dans la stimulation de la prolifération cellulaire incontrôlée en activant de manière constitutive

ses voies de signalisation associées (PI3K/Akt et MAPK). Pour exemple, les cancers du sein peuvent avoir jusqu'à 25 à 50 copies du gène *HER2* et une augmentation du niveau protéique de HER2 de 40 à 100 fois, correspondant à jusqu'à 2 millions de récepteurs exprimés à la surface des cellules tumorales (Kallioniemi et al., 1992). Les tumeurs HER2+ sont caractérisées par une faible expression des récepteurs ER et PR, et un grade histologique élevé. Elles présentent également l'expression de marqueurs basaux comme les cytokératines 5, 6, 17 et 14, EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), c-kit, la myosine, la cavéoline ou encore NGFR/p75 (*Nerve Growth Factor Receptor/p75*) (Gutierrez & Schiff, 2011). Ces tumeurs présentent une sensibilité accrue à certains agents cytotoxiques tels que la doxorubicine, probablement en raison de la co-amplification du gène de la topoisomérase-2 qui est proche du locus HER2 sur le chromosome 17 (Villman et al., 2006). Elles présentent une résistance relative aux agents hormonaux et une propension à métastaser au niveau du cerveau et des viscères (Gabos et al., 2006). Aujourd'hui, le pronostic s'est considérablement amélioré grâce à une chimiothérapie appropriée associée à la thérapie ciblée.

I.2.3.5.3. Les normal-like

Contrairement aux autres sous-types intrinsèques, les tumeurs dites de type normal (normal-like) qui représentent 2,9% des cancers mammaires (Jaber et al., 2020), se voient peu caractérisées. L'expression génique de ces tumeurs est proche de celle du tissu mammaire normal. Elles semblent cependant partager des caractéristiques communes avec le sous-type luminal A, à savoir ER+ PR+ et Ki67 faible (Perou et al., 2000). Le phénotype des tumeurs de ce sous type n'est pas décrit, mais une étude a mis en évidence que l'expression de la Kératine 6a qui marque les cellules progénitrices bipotentielles mammaires, semblait être caractéristique du phénotype de type normal (Bu et al., 2011). Leur pronostic se voit intermédiaire.

I.2.3.5.4. Les basal-Like

Environ 15% des cancers du sein sont de type basal (BLBC), des lésions souvent agressives, très récurrentes, par conséquent avec un mauvais pronostic, avec une plus grande incidence chez les femmes jeunes et préménopausées. Sur le plan histologique, les cellules sont caractérisées, entre autres, par une forte expression des cytokératines 5, 6, 14, 17 et de l'EGFR, (Valentin et al., 2012). Les cellules présentent des indices mitotiques élevés (Ki67++) et les tumeurs sont souvent de haut grade. Les BLBC se caractérisent par la présence de zones nécrotiques ou fibreuses centrales, des bords invasifs, des infiltrats lymphocytaires et des caractéristiques médullaires atypiques (Putti et al., 2005). Sur la base d'observation clinique, les patients atteints de BLBC semblent se répartir en deux groupes cliniquement distincts : ceux susceptibles de subir une récurrence et de succomber à leur maladie dans les 3 à 5 premières années après le diagnostic, et ceux qui semblent montrer une excellente survie à long terme (>10 ans) (Mulligan et al., 2008; Cheang et al., 2008). Alors que des signatures multigéniques, basées sur l'expression de gènes associés à la prolifération (Wirapati et al., 2008) existent, leurs valeurs pronostiques ne semblent pas s'appliquer aux BLBC, très prolifératifs (Yau et al., 2010). Au

niveau moléculaire, les BLBC sont majoritairement définis par le manque d'expression des récepteurs hormonaux ER et PR et la non-surexpression de HER2 (Milioli et al., 2017).

Étant donné que les TNBC sont littéralement définis par la non-expression de ces trois marqueurs, ils ont tendance à être référencés dans la pratique clinique actuelle comme des tumeurs basales. Cependant, il est important de souligner que les sous-types moléculaires ne sont pas seulement le reflet de ces paramètres cliniques. Ainsi, certains pensent à tort que les termes TNBC et BLBC sont synonymes ; par identification génique, ces dénominations tumorales sont distinctes (Alluri & Newman, 2014), mais elles ne s'excluent pas mutuellement pour autant. En effet, Bertucci et al., ont montré que 71% des TNBC étaient BLBC, alors que 77% des BLBC sont des TNBC (Bertucci et al., 2008). Ainsi, beaucoup d'essais thérapeutiques dans le cadre du traitement des BLBC sélectionnent les patients sur la base de la triple négativité immunohistochimie (IHC). Toutefois, les profils d'expression génique, reposant sur de nombreuses variables, seraient probablement plus appropriés pour définir ce sous-type. S'appuyer sur l'expression IHC de seulement 3 marqueurs semble limité si l'objectif est d'identifier un sous-groupe moléculaire distinct et homogène de tumeurs susceptibles de répondre de la même manière à un traitement donné. L'approximation triple négative du phénotype basal est due à l'unique disponibilité dans la pratique clinique de l'IHC comparé à des techniques plus coûteuses, comme l'utilisation de puces à ADN qui donne accès à de nombreuses informations incluant des valeurs d'expression des gènes (ARNm), des microARN (miARN) et les mesures d'aberration du nombre de copies (CNA pour *Copy Number Alterations*). Le risque est que les TNBC n'appartenant pas intrinsèquement aux BLBC, soient inclus dans des essais cliniques et contribuent à l'hétérogénéité du groupe traité. Ils conduiraient ainsi à une conclusion faussement négative d'inactivité d'un médicament pour le traitement des BLBC (Bertucci et al., 2008). En utilisant plusieurs variables cliniques, une étude a pu mettre en évidence que l'utilisation des cinq marqueurs (ER, PR, HER2, EGFR et CK5/6) était significativement plus utile au diagnostic que l'utilisation des trois marqueurs conventionnels pour distinguer les tumeurs BLBC des TNBC.

Parmi les patients TNBC traités par chimiothérapie adjuvante à base d'anthracycline, l'identification des marqueurs basaux positifs a pu mettre rétrospectivement en évidence une cohorte de patients avec des résultats significativement plus mauvais, suggérant que la distinction basale ou non des TNBC est plus que pertinente pour prédire la réponse aux traitements et la survie des patients (Cheang et al., 2008). La classification des TNBC n'est pas un substitut idéal pour définir les BLBC. Une caractérisation des tumeurs basales aux niveaux génomique et transcriptomique accompagnée d'une approche plus robuste, se prêtant à la pratique clinique, pour définir précisément les BLBC doit encore être développée (Milioli et al., 2017).

I.2.3.5.5. Le phénotype *claudin-low*

En 2007, un nouveau groupe de tumeurs nommé *claudin-low*, pour littéralement « faible en claudine », a été isolé (Herschkowitz et al. 2007). Au fil des années, le profil *claudin-low* a été décrit comme de mauvais pronostic (Eroles et al. 2012) et associé aux tumeurs TNBC présentant également une faible expression de GATA3 et des cytokératines 18/19. Les tumeurs présentant ce phénotype diffèrent des tumeurs basal-like du fait de la faible expression de l'occludine et des claudines 3, 4, 7 qui sont impliquées dans la formation des jonctions serrées. Ce groupe présente également une faible expression de la E-cadhérine, et une forte expression de gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT pour *Epithelial-Mesenchymal Transition*) (Prat et al., 2010). En étudiant les caractéristiques génomiques, transcriptomiques et cliniques de ce profil *claudin-low*, une équipe de recherche de l'université d'Oslo, a montré que la classification dite *claudin-low* n'est pas simplement un sous-type analogue aux 5 sous-types intrinsèques comme décrit précédemment, mais est un phénotype complexe qui peut caractériser les différents sous-types de cancer mammaire (Fougner et al., 2020). Les tumeurs *claudin-low* se distinguent par une faible instabilité génomique, une faible charge mutationnelle et une diminution de la prolifération, ainsi que des niveaux élevés d'infiltration de cellules immunitaires et de cellules stromales. Dans d'autres aspects, les tumeurs *claudin-low* reflètent les caractéristiques de leur sous-type intrinsèque. En somme, ces résultats soulignent l'hétérogénéité des tumeurs mammaires dites *claudin-low* améliorant ainsi la compréhension de caractéristiques tumorales potentiellement pertinents sur le plan clinique. Ces travaux ont justifié une redéfinition des *claudin-low* comme phénotype du cancer (Fougner et al., 2020).

1.2.3.6. La classification moléculaire des TNBC

1.2.3.6.1. Basée sur les altérations génomiques somatiques

Les génomes des cancers abritent un grand nombre d'altérations, mais seuls quelques-unes d'entre elles jouent un rôle décisif dans la carcinogenèse en conférant un avantage sélectif à la croissance tumorale (Stratton et al., 2009). Les études de profilage génomique du TNBC chez l'homme, y compris les analyses de l'exome, ont donné lieu à l'identification de nombreuses altérations récurrentes dans certains gènes acteur du cancer. Les mutations somatiques dont les altérations du nombre de copies (CNA) comptent parmi les altérations génomiques les plus communes du TNBC. Le gène *TP53* est le plus souvent muté, mais à l'heure actuelle aucun ciblage médicamenteux de *TP53* n'a pu prouver son efficacité clinique. D'autres gènes mutés dans les TNBC, avec une prévalence supérieure à 5%, ont été identifiés, tels que *PIK3CA*, *PTEN*, *KMT2C* et *RB1* (Bareche et al., 2018 ; Staaf et al., 2019). L'amplification de *MYC* est l'altération du nombre de copie la plus fréquente dans les TNBC. D'autres gènes dont *EGFR*, *PTEN*, *CCND1*, *RB1* et *CCNE1* sont également fréquemment mutés (Nik-Zainal et al., 2016 ; Bareche et al., 2018). En raison de la complexité de l'analyse des altérations dans les gènes uniques, les altérations des gènes individuels ont été regroupées en fonction des voies de signalisation moléculaire affectées pour obtenir une classification cohérente. Parmi ces voies, on retrouve la voie de signalisation du PDGF/VEGF, la voie PI3K/AKT/mTOR, la voie

JAK/STAT3 ou encore des voies associées au cycle cellulaire (Balko et al., 2014 ; Bareche et al., 2018).

La plupart des processus mutationnels génèrent différents types de mutation, que l'on appelle « signature génomique ». Au cours de la dernière décennie, les études de séquençage à grande échelle ont mis en évidence de nombreuses signatures mutationnelles dans un grand nombre de cancers humains (Alexandrov et al., 2013). L'analyse de séquences de génome entier de 560 cancers du sein a permis l'identification d'une substitution de douze bases et six signatures de réarrangement (Nik-Zainal et al., 2016). Sur la base de ces signatures mutationnelles, Jiang et al. ont établis à partir de quatre sous-types de mutation somatique un classement des TNBC : (I) APOBEC ; (II) HDR ; (III) Clock-like ; et (IV) Mixte: sans signature dominante (Jiang et al., 2019). Ce sous-typage basé sur les signatures mutationnelles fait progresser notre compréhension des processus mutationnels sous-jacents à la carcinogénèse des TNBC.

I.2.3.6.2. Basée sur le statut BRCA/HRD

Les facteurs étiologiques au niveau génétique qui favorisent l'initiation et le développement du TNBC sont encore mal connus. Il a été admis que les patientes portant une altération des gènes *BRCA1/2* prédisposant au cancer du sein et de l'ovaire ont un risque accru de 50 à 85% de développer un cancer du sein au cours de leur vie (Evans et al., 2012). Les *BRCA* sont des gènes suppresseurs de tumeur qui réparent l'ADN double brin par réparation par recombinaison homologue. Les mutations de la lignée germinale *BRCA1/2* provoquent des défauts dans la réparation de l'ADN, induisant ainsi une instabilité dans le génome (Tutt et al., 2001). Les patientes atteintes d'un cancer du sein présentant une mutation *BRCA1/2* représentent 5 à 10% des cas de cancer du sein. Parmi ces tumeurs, 60 à 80% présentant un phénotype triple négatif (Atchley et al., 2008). Il est intéressant de noter que 10 à 20% des TNBC portent une mutation germinale de ces gènes (Sharma et al., 2014).

Dans la recherche de biomarqueurs supplémentaires indicatif d'une déficience de recombinaison homologue (HRD pour *Homologous Recombination Deficiency*) au-delà des mutations germinales *BRCA1/2*, trois caractéristiques quantitatives ont été développées pour mesurer l'instabilité génomique, à savoir la perte d'hétérozygotie (LOH pour *Loss of Heterozygosity*) (Abkevich et al., 2012) ; le déséquilibre de l'allèle télomérique (TAI pour *Telomeric Allelic Imbalance*) (Birkbak et al., 2012) ; la transition d'état à grande échelle (LST pour *Large-scale State Transitions*) (Popova et al., 2012). Plusieurs études définissent un groupe de TNBC HRD comme TNBC possédant un score HRD élevé (> 42) et/ou la présence de la mutation *BRCA1/2* (Telli et al., 2016 ; Loibl et al., 2018).

I.2.3.6.3. Basée sur le transcriptome

Depuis de nombreuses années, nombre de chercheurs tentent d'élucider le profil moléculaire des TNBC apportant ainsi toujours un peu plus d'informations sur l'hétérogénéité et la complexité biologique de ce sous-type de cancer mammaire particulièrement agressif. En 2011, Lehmann et ses collègues ont signalé pour la première fois une classification supplémentaire des TNBC basée sur l'étude des profils d'expression génique issus de 587 TNBC. Dès lors, il a été mis en évidence six sous-types moléculaires caractérisés non seulement par des signatures d'expression génique distinctes, mais aussi par un comportement clinique très divergent, à savoir : les sous-types basaux dits basal-like 1 (BL1) et basal-like 2 (BL2), le sous-type immunomodulateur (IM), les sous-types mésenchymateux (M) et de type cellules souches mésenchymateuses dits mésenchymal stem-like (MSL), et enfin, le sous-type luminal androgen receptor (LAR) (Gianni et al., 2016).

Parmi ces sous-types, on distingue donc les sous-types dits « basal-like », qui constituent environ 70% des cancers triple négatifs. Les tumeurs basal-like 1 (BL1) expriment des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, la prolifération et particulièrement la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN alors que les tumeurs basal-like 2 (BL2) se différencient des BL1 en exprimant des gènes prenant part à la signalisation des facteurs de croissance, à la glycolyse et la gluconéogenèse (Zhao et al., 2020).

Les sous-types mésenchymateux (M) et *mésenchymal stem-like* (MSL) apparaissent enrichis en expression génique promouvant la motilité cellulaire impliquée dans l'EMT et la signalisation des facteurs de croissance (EGFR, PDGFR, PI3K/mTOR, Src). Cependant, le sous-type MSL se distingue par la faible prolifération qui lui est associée et la forte expression des gènes liés aux cellules souches. Les carcinomes métaplasiques sont principalement du sous-type M (Vagia et al., 2020).

Le sous-type immunomodulateur (IM) exprime, quant à lui, des gènes impliqués dans la présentation de l'antigène et la réponse immunitaire aux signaux comme *NFKB*, *TNF*, *JAK* et des cytokines. Ce sous-type montre le meilleur pronostic parmi les TNBC.

Cette classification des six sous-types a finalement évolué en quatre sous-types spécifiques aux TNBC (BL1, BL2, M et LAR), car la transcription différentielle des sous-types IM et MSL provenait principalement du microenvironnement tumoral, à savoir des cellules lymphocytaires infiltrantes et des cellules mésenchymateuses stromales associées à la tumeur, respectivement (Gianni et al., 2016). En accord avec cette réévaluation, il a été montré que les gènes distinctifs caractéristiques des sous-types IM et MSL n'étaient pas exprimés dans les lignées cellulaires lors d'expériences *in vitro*, là où le microenvironnement est absent. De plus, avec l'évolution de l'immunothérapie, la caractérisation du sous-type IM s'est vue affinée. Elle représente aujourd'hui une caractéristique immunitaire de la tumeur plutôt qu'un sous-type distinct.

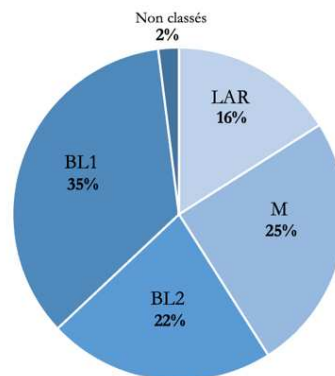


Figure 8 : Répartition des sous-types intrinsèques au sein des TNBC basés sur le transcriptome.
D'après Lehmann et al., 2016.

Par ailleurs, la forte expression des immuno-régulateurs CTLA4, PD1 et PD-L1 engendrée par l'infiltration lymphocytaire de la tumeur TN, est probablement associée à la réponse aux inhibiteurs des points de contrôles immunitaires quel que soit le sous-type moléculaire (Lehmann et al., 2016).

Ces dernières années, des tumeurs triple négatives exprimant le récepteur aux androgènes ont attiré l'attention de certains chercheurs. Les récepteurs aux androgènes (RA) sont des récepteurs nucléaires dont l'expression varie de 80 à 85 % des cancers du sein primitifs et 60 à 75 % des cancers métastatiques. Parmi les TNBC, un sous-type LAR (*Luminal androgen receptor*), qui exprime plus fréquemment les RA (jusqu'à 53 % des cas), a été défini. Le terme luminal est employé en raison de la similitude de différenciation histologique apocrine comparé aux tumeurs lumineuses positives aux récepteurs hormonaux. Les LAR apparaissent associés à un grade histologique plus faible que les autres TNBC (Héquet et al., 2017), avec néanmoins, un tropisme métastatique particulier avec une incidence élevée de dissémination osseuse (Hilborn et al., 2016). Le sous-type LAR est associé à une surexpression de gènes impliqués dans la synthèse des hormones stéroïdes, le métabolisme des androgènes (*AR*, *FOXA1*, *GATA3*) et une sous-expression de gènes impliqués dans la prolifération des basal-like. Fait intéressant, les tumeurs TN présentant une histopathologie lobulaire possèdent des caractéristiques LAR.

Une autre étude importante sur le sous-typage TNBC, réalisée par Jiang et al., s'est basée sur l'étude du transcriptome, dans laquelle les données cliniques, génomiques et transcriptomiques de 465 TNBC primaires d'une population d'Asie de l'Est traités au FUSCC (*Fudan University Shanghai Cancer Center*) ont été analysées de manière approfondie. Les TNBC ont été classés en quatre sous-types: (I) LAR caractérisé par l'enrichissement de la signalisation des récepteurs aux androgènes; (II) IM montrant une expression élevée de gènes impliqués dans la signalisation des cellules immunitaires et des cytokines; (III) Basal et immunosupprimé (BLIS) caractérisé par l'activation de la réparation de l'ADN et la régulation négative des gènes de réponse immunitaire; et (IV) Mésoenchymateux enrichi en gènes impliqués dans les voies de signalisation des cellules souches tumorales mammaires (Jiang et al., 2019).

D'autres travaux concernant la classification des TNBC basées sur le transcriptome ont également été réalisées. Nous pouvons citer, l'étude de Burstein et al., dans laquelle quatre sous-types de TNBC définis à l'aide de données de profilage basés sur des puces à ARN sont décrits ou encore l'étude de Liu et al. qui a permis de développer un système de classification caractérisé par l'intégration des profils de transcriptome à la fois de l'ARN messager et de l'ARN long non codant. Malgré les différences dans les méthodes de classification et la nomenclature utilisées dans les différentes études citées, les résultats de la classification ont montré des corrélations évidentes entre elles. Un effort international de partage et de fusion de données à grande échelle et de comparaison croisée des différentes approches de classification pourrait bien conduire à un consensus final (Burstein et al., 2015 ; Liu et al. 2018a).

I.2.4. Les traitements du cancer mammaire

L'hétérogénéité des cancers mammaires, rend leurs traitements particulièrement complexes. Il convient d'identifier spécifiquement le cancer de la patiente, c'est pourquoi il existe une multitude de classifications disponibles qui ne cessent de s'affiner. De ce fait, cette partie ne saurait satisfaire tous les types de cancer mammaire à traiter, mais nous allons tenter de détailler l'étendu de l'arsenal disponible contre les cancers mammaires à ce jour.

Les bases du traitement du cancer du sein incluent la chirurgie, le plus souvent complétée par une thérapie locorégionale comme la radiothérapie et/ou systémique telle que la chimiothérapie et/ou l'hormonothérapie. Si cela est envisageable, la thérapie ciblée et l'immunothérapie peuvent également être des traitements de choix, seuls ou associés (Waks & Winer, 2019).

I.2.4.1. La chirurgie

La chirurgie apparaît comme un acte obligatoire pour les patientes atteintes d'un cancer mammaire. Selon la taille de la tumeur, plusieurs méthodes chirurgicales peuvent être utilisées (Fig. 9). Pour l'excision locale, on parle de chirurgie conservatrice (tumorectomie ou encore segmentectomie). Seule la tumeur et une partie plus ou moins importante du tissu paracarcinomateux sont retirées. Lorsque la totalité du sein est retirée, on parle de mastectomie pour qualifier cette chirurgie non conservatrice. Pour préciser si la tumeur s'étend au-delà du sein et déterminer si un traitement complémentaire des ganglions est nécessaire, une exérèse du ou des premiers ganglions drainant la tumeur (ganglions sentinelles) est souvent inévitable. Après analyse anatomopathologique, s'il n'y a pas de cellules cancéreuses dans les ganglions sentinelles, il ne sera pas nécessaire d'enlever des ganglions lymphatiques supplémentaires. Cette technique permet de réserver le curage axillaire aux seules patientes qui le nécessitent, en cas d'envahissement ganglionnaire (Riedel et al., 2019).

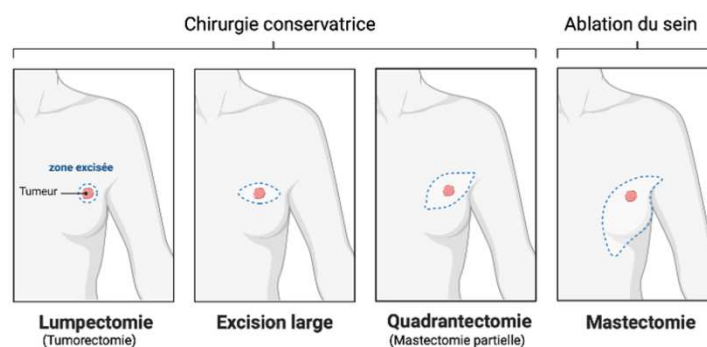


Figure 9 : Méthodes chirurgicales appliquées au cancer mammaire.

Créée sur BioRender.com.

I.2.4.2. Traitement adjuvant ou néoadjuvant

Un traitement vient toujours compléter la chirurgie afin de prévenir un risque de récurrence locale ou de métastases. Administré après la chirurgie, on parle de traitement adjuvant. Dans certains cas, un traitement peut être administré en amont de la chirurgie, il est alors question de traitement néoadjuvant (NAC). Bien que les résultats de survie des patients recevant un traitement NAC ne soient significativement pas différents de ceux traités par un traitement adjuvant (King et al., 2015 ; Bagegni et al., 2019), le traitement NAC peut présenter quelques avantages. La réduction de la taille de la tumeur peut permettre une chirurgie conservatrice du sein chez les patientes qui auraient eu besoin d'une mastectomie. Le downstaging (ou fonte tumorale) ganglionnaire peut éviter le curage des ganglions lymphatiques axillaires. Le NAC permet également d'évaluer *in vivo* l'efficacité du traitement, ce qui permet de changer l'approche thérapeutique si la tumeur n'y répond pas. L'évaluation de l'efficacité du traitement possède également une valeur pronostique clé, car les patients atteignant une réponse pathologique complète (pCR) au moment de la chirurgie améliorent significativement leur taux de survie (Cortazar et al., 2014). Le NAC constitue la norme de traitements pour les patients dont la tumeur est très localement avancée et les cancers du sein inflammatoires. De surcroît, il est de plus en plus utilisé dans le traitement des TNBC et des HER2+. La réponse au traitement néoadjuvant peut néanmoins être mitigée. Une étude portant sur 13 939 femmes a montré que le taux moyen de pCR était de 19% avec NAC, allant de 0,3% pour les cancers de type luminal A à 38,7% pour les cancers enrichis en HER2 (Haque et al., 2018). Cependant, cette étude ne s'est penchée que sur des patientes cT1-4N1-3M0, il semblerait donc que le grade tumoral et d'autres paramètres soient à prendre en compte dans l'administration d'un traitement NAC. De plus, il a été mis en évidence que la chirurgie devait être réalisée dans les 6 semaines suivant le traitement NAC afin de bénéficier de résultats oncologiques optimaux et d'influencer négativement la récurrence et la survie (Sutton et al., 2020).

I.2.4.3. La radiothérapie

Alors que son indication sur la totalité du sein, était incontournable après une chirurgie conservatrice dans les années 1990, de nouveaux concepts sont apparus et ont bousculé sa

pratique généralisée. Depuis, l'avancée des techniques et leur précision, la radiothérapie tumorale a bénéficié d'un regain d'intérêt pour son application en traitement néoadjuvant pour certains sous-types moléculaires avec une sélection des patientes selon le rapport bénéfice/risque. La radiothérapie néoadjuvante du sein en totalité n'a montré que des effets modestes qu'elle soit administrée seule (Riet et al., 2017) ou concomitamment avec de la chimiothérapie (Toledano et al., 2006). Face à une augmentation significative des toxicités aiguës et tardives de ces deux traitements, la radiothérapie appliquée de manière partielle et rapprochée se veut plus prometteuse. Notamment, elle permet de réduire le volume irradié avec précision par rapport à l'irradiation totale du sein, limitant le risque de fibrose et la détérioration esthétique (Van der Leij et al., 2015) ; elle permettrait notamment d'augmenter les taux de réponses pathologiques partielles, facteur prédictif d'une meilleure survie pour certains sous-types (Keilty et al., 2020 ; Belkacemi et al., 2020).

La radiothérapie adjuvante dans le cadre du TNBC

Bien que la radiothérapie adjuvante pour le TNBC ait pu être controversée, une étude rétrospective récente portant sur 22 802 patientes a mis en évidence les bénéfices d'un traitement radiothérapeutique adjuvant sur la survie des patientes comparés aux patientes n'ayant pas reçu de radiothérapie (Yao et al., 2019). En outre, une étude réalisée sur 768 patientes, portant sur l'évaluation du risque de récurrence locorégionale (LRR pour *Local regional recurrence*) dans le cadre du traitement des TNBC à un stade précoce a mis en évidence que les taux de survie sans récurrence à 5 ans étaient de 94% pour une chirurgie conservatrice du sein combinée à la radiothérapie contre 87% et 85% pour une mastectomie radicale combinée ou non à la radiothérapie, respectivement. Ainsi, la radiothérapie post-opératoire semble minimiser le risque de LRR des TNBC, autour de 10% (77 patientes / 768) dans cette étude, soulignant l'importance de la radiothérapie dans le contrôle local de TNBC (Abdulkarim et al., 2011). De plus, une étude rétrospective sur 10 ans, a évalué l'impact d'une dose de rayonnement de rappel de 16 Gy sur le contrôle local, la fibrose et la survie globale des patientes atteintes d'un cancer du sein de stade I et II ayant subi une chirurgie conservatrice du sein. L'incidence cumulée de la LRR à 10 ans était de 10,2 % pour le groupe sans radiothérapie de rappel contre 6,2 % dans le groupe ayant reçu une dose de rayonnement supplémentaire respectivement ($p < .0001$). Bien que le contrôle local de la tumeur ait pu être amélioré avec cette dose de rappel, aucune différence de survie globale n'a pu être mise en évidence (Bartelink et al., 2007). Notamment, la résistance au traitement ou la récurrence locale survenant après un traitement chirurgical associé à la radiothérapie peut limiter les bénéfices à long terme de la radiothérapie.

I.2.4.4. La chimiothérapie

La chimiothérapie est connue du grand public comme la stratégie thérapeutique de référence pour traiter les cancers. Il existe de nombreux médicaments de chimiothérapie avec différents mécanismes d'action qui peuvent être utilisés seuls ou en association pour une meilleure efficacité. Un protocole de chimiothérapie est élaboré pour chaque patient. La

chimiothérapie est administrée par cures ou cycles, en alternance avec des périodes de repos. Les traitements chimiothérapeutiques s'attaquent aux cellules fortement prolifératives sans distinction entre les cellules tumorales et les cellules saines, entraînant un certain nombre d'effets secondaires variables selon les patients et les traitements reçus. Parmi de nombreux agents chimiothérapeutiques, tels que la doxorubicine (A), la cyclophosphamide (C), le paclitaxel (T), l'épirubicine (E) ou encore le 5-fluorouracil (F), voici plusieurs associations qui peuvent être proposées dans le traitement du cancer mammaire : AC-T ou T-AC ; TC ; CAF ou FAC ; CEF ou encore EC. Les sels de platine sont également employés. Cette classe regroupe trois molécules couramment utilisées : le cisplatine, l'oxaliplatine, et le carboplatine. Bien évidemment, cette liste ne saurait être exhaustive. Les femmes dont le cancer est enrichi en HER2 pourraient bénéficier en association avec la chimiothérapie d'une thérapie ciblée contre HER2 (trastuzumab (Herceptin®)), tout comme les femmes dont le cancer est hormono-sensible qui pourront bénéficier d'une hormothérapie associée.

Il a été mis en évidence que le taux de réponse des patients TNBC à la chimiothérapie néoadjuvante était plus élevé que celui des patients non-TNBC (Wahba & El-Hadaad, 2015). Concernant le choix de la thérapie, la chimiothérapie reste le traitement systémique principal aux stades précoce et tardif du TNBC. Actuellement, les anthracyclines, les taxanes et les anti-métabolites sont des schémas de chimiothérapie approuvés par la FDA et recommandés dans les contextes adjuvant et néoadjuvant du TNBC (Gu et al., 2016). Bien que les agents à base de platine montrent une activité prometteuse dans le TNBC, leur utilisation reste controversée. Une méta-analyse récente comprenant 8 essais randomisés portant sur 1345 patientes a évalué le rôle des agents à base de platine dans la chimiothérapie néoadjuvante chez les patients atteints de TNBC. Cette étude a révélé que l'ajout d'agents à base de platine améliorait la réponse pathologique complète par rapport au traitement néoadjuvant à base d'anthracyclines, de cyclophosphamide, de taxanes et de fluorouracile (49,1% vs 35,9%). Les effets indésirables hématologiques étaient similaires dans les deux groupes, à l'exception d'une plus grande thrombopénie, non inéluctablement limitante, dans le groupe à base de platine (Li et al., 2020). Globalement, l'ajout de carboplatine néoadjuvant à la chimiothérapie standard dans les TNBC permet d'obtenir un avantage d'activité substantiel, avec une augmentation significative du taux de pCR d'environ 15%, même si l'association de traitement idéale, ou la meilleure séquence avec d'autres agents chimiothérapeutiques, reste à identifier (Garufi et al., 2020).

1.2.4.5. Les thérapies ciblées

La recherche fondamentale sur la biologie du cancer nous a permis, nous permet et nous permettra de toujours mieux comprendre le développement des cancers et de développer de nouveaux traitements spécifiques capables de cibler, dans certaines situations bien précises, les cellules cancéreuses et/ou leur microenvironnement pour bloquer leur évolution maligne. Bien que les cancers soient classés par sous-types spécifiques selon des critères d'inclusions ou d'exclusions, chaque cancer est unique et présente ses propres hétérogénéités, même au sein d'un même sous-groupe. En plus de l'hétérogénéité qui le caractérise à un instant T, le cancer

évolue et acquiert de nouvelles mutations tout au long de sa progression (évolution clonale), suggérant une hétérogénéité longitudinale et temporelle supplémentaire. L'utilisation de thérapies ciblées est de plus en plus fréquente dans le traitement de nombreux cancers, seule ou en association avec d'autres traitements. Dans cette partie, nous détaillerons une liste non exhaustive des thérapies ciblées disponibles pour les cancers mammaires, en particulier celles prometteuses pour le TNBC.

Les thérapies ciblées dans le cadre du TNBC

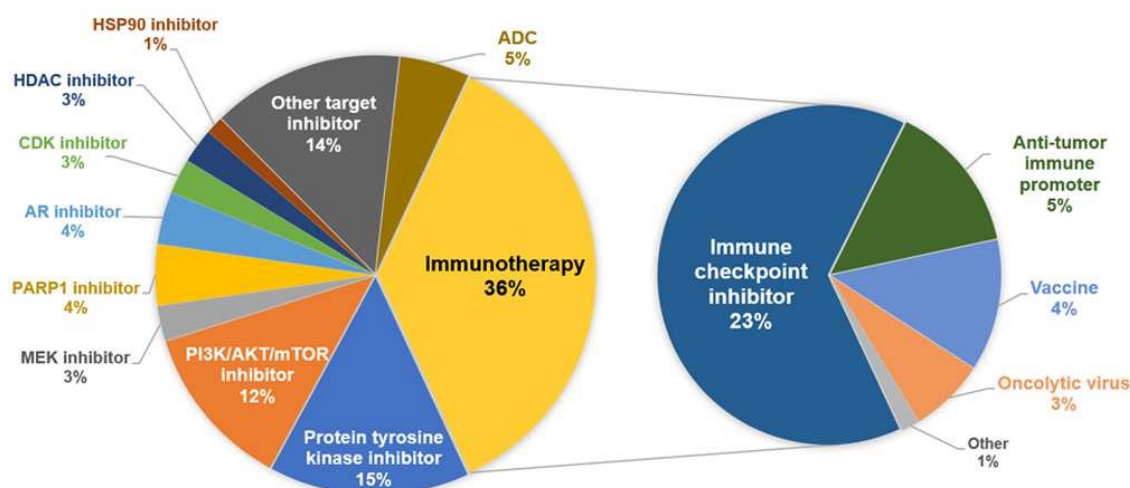


Figure 10 : Répartition des domaines de recherche et développement de médicaments ciblés pour le traitement du TNBC enregistré dans les essais cliniques. D'après Bai et al., 2021.

Bien que la recherche en oncologie soit nécessaire pour chacun des sous-types de cancer, le TNBC est peut-être le cancer dont la recherche de nouveau traitement spécifique est impérieuse. Comme le montre la figure 9 issue d'une récente publication qui a passé en revue environ 707 essais cliniques pour le traitement spécifique du TNBC enregistrés dans les bases de données (Bai et al., 2021) (Fig. 10).

Il y a plus d'hétérogénéité moléculaire dans le TNBC que dans les autres cancers mammaires et les cellules tumorales présentent un potentiel prolifératif élevé. La chimiothérapie, efficace sur les cellules à croissance rapide, est donc la thérapie à large spectre par défaut pour diminuer/contenir la croissance tumorale. La différenciation des cellules tumorales de TNBC est faible, avec une tendance précoce aux métastases et un taux de récurrence plus élevé. Les TNBC en rechute et métastatiques progressent généralement plus rapidement que la tumeur primaire d'origine, montrant une forte résistance aux traitements conventionnels. En raison du manque de traitements ciblés, les traitements alternatifs ne parviennent pas à améliorer le pronostic ni la qualité de vie de ces patients qui subissent des traitements très lourds. Trouver le(s) talon(s) d'Achille du TNBC est essentiel. Jusqu'à présent, seuls quatre médicaments ciblés sont approuvés par la FDA pour le traitement du TNBC : deux inhibiteurs de PARP1 (Olaparib et Talazoparib), un anti-PD-L1 (Atezolizumab), et un conjugué anticorps-médicament (ADC) (Sacituzumab-Govitecan). Le développement de traitements ciblant le

TNBC n'est pas simple, comme l'attestent des résultats décevants concernant l'utilisation de l'anticorps monoclonal cétuximab (anti-EGFR) ou encore les inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant l'EGFR comme le gefitinib et l'erlotinib (Baselga et al., 2013 ; Baselga et al., 2005 ; Dickler et al., 2008). De nombreux traitements prouvant leur efficacité dans d'autres types de cancer se heurtent à un manque d'efficacité contre le TNBC, notamment les inhibiteurs de signalisation PTK ou PI3K. Toutefois le potentiel de ces inhibiteurs est tel, qu'ils dominent toujours le total des médicaments ciblés en développement pour le TNBC (environ 59%) (Fig. 10). Il convient de noter que la recherche et le développement de médicaments immunothérapeutiques occupent environ 36% des traitements et les ADC ciblés occupent 5% des traitements (Bai et al., 2021).

Avant de détailler les principaux traitements ciblés existants ou potentiels dans l'arsenal thérapeutique destinés à soigner le cancer du sein, il convient d'évoquer la place de l'identification de biomarqueur dans la prise en charge de la maladie.

L'identification de biomarqueurs dans le TNBC

Plusieurs paramètres comme l'hétérogénéité tumorale ou l'échantillonnage lors de la biopsie, peuvent, en altérant le sous-typage des tumeurs, entraver la précision du diagnostic, conduisant à des résultats thérapeutiques inefficaces. L'identification de biomarqueurs spécifiques est donc primordiale.

Les biomarqueurs sont définis comme étant des variables biologiques quantifiables de manière reproductible. Dans la pratique de l'oncologie clinique, ils peuvent être mesurés en tant que paramètres de diagnostic précoce pour prédire la survie, la surveillance ou la réponse au traitement, tel que défini par les National Institutes of Health (FDA-NIH Biomarker Working Group, 2016). Dans le cadre des thérapies ciblées qui seront détaillées à la suite, l'éligibilité du patient au traitement est basée sur l'expression du biomarqueur ciblé. Par exemple, de nombreuses données suggèrent que l'activation d'Akt peut être utilisée comme biomarqueur prédictif potentiel pour l'administration d'inhibiteurs d'Akt. Comme c'est le cas pour les tumeurs PD-L1+ qui répondent mieux à l'immunothérapie que les PD-L1.

De nombreux biomarqueurs moléculaires sont explorés dans le but de guider le traitement et améliorer l'approche des patients atteints de TNBC (Andreopoulou et al., 2017), dont la fenêtre d'action est mince avant d'atteindre le point de non-retour, si tant est qu'il ne soit pas déjà atteint. Parmi les biomarqueurs donnant lieu à de potentielles thérapies ciblées, nous pouvons citer l'AR, le EGFR, le VEGF, c-Kit ou encore Notch (da Silva et al., 2019). La recherche de nouveaux biomarqueurs semble insatiable et ne cesse de progresser. Récemment, il a été mis en évidence que l'inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C (ITPKC), régulateur négatif de l'activation des lymphocytes T, pouvait servir de biomarqueur pronostique et prédictif dans le TNBC. De faibles taux d'ITPKC dans les TNBC, ont été corrélés à une augmentation de la survie après une chimiothérapie néoadjuvante, suggérant son utilité pour sélectionner les

patients susceptibles de répondre à la chimiothérapie (Oshi et al., 2020a). Par ailleurs, des études ont montré que les lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL pour *Tumor Infiltrating Lymphocytes*) dans le tissu tumoral pouvaient servir de facteurs pronostiques indépendants du TNBC. Le risque de récurrence locale est réduit de 14% ($p = 0,02$), les métastases à distance de 18% ($p = 0,04$) et le risque de décès de 19% ($p = 0,01$) pour chaque augmentation de 10% des TIL (Adams et al., 2014). L'infiltration lymphocytaire CD8+, dont la valeur du score traduit l'activité cytolytique immunitaire tumorale, peut également être utilisée comme un marqueur pronostic. Le score est corrélé à l'expression de plusieurs molécules de points de contrôles immunitaires ainsi qu'à la survie au sein des TNBC, et ce, d'autant plus en présence de lymphocytes CD4+, suggérant sa potentielle utilisation comme biomarqueur pour prédire la réponse à l'immunothérapie (Oshi et al., 2020b).

Dans la recherche de biomarqueurs, la biopsie liquide s'avère très informative. Le terme regroupe les techniques qui consistent à détecter et analyser de petites quantités de matériel, relarguées par les masses tumorales dans le sang périphérique (ou l'urine, le liquide céphalo-rachidien ou encore la salive) sous forme de cellules tumorales circulantes (CTC pour *Circulating Tumor Cells*), de fragments libres d'ADN (ctDNA pour *circulant Tumoral DNA*) d'ARN, de protéines ou encore d'exosomes (Siravegna et al., 2017). L'utilité pronostique des CTC pour la stratification des patients au stade métastatique de la maladie a été évaluée dans une cohorte de 358 TNBC. Les patients avec un score <5 CTC/7,5 ml avaient une survie globale médiane plus longue que ceux dont le score était supérieur (23,8 mois vs 9,0 mois, $p < 0,0001$) (Cristofanilli et al., 2019). L'analyse des ctDNA fournit des informations génétiques non seulement sur la tumeur primaire mais aussi sur la maladie métastatique (Diaz & Bardelli, 2014). En plus d'être une méthode non invasive (simple prise de sang), les ctDNA peuvent potentiellement fournir des informations opportunes et complètes, comme le suivi de la maladie en temps réel, une évaluation plus précise des pronostics ou encore une anticipation des changements de traitement (Olsson et al., 2015). Les attentes concernant cette pratique sont grandes, tant pour le guidage des traitements que pour le dépistage ou l'estimation du risque de rechute.

Pour finir, l'identification spécifique des locus de méthylation de l'ADN comme biomarqueur du TNBC apparaît comme un candidat non négligeable. Basés sur l'ADN, plus stable que l'ARN, ces locus de méthylation sont facilement détectables dans les échantillons de tissus et sanguins (How Kit et al., 2012). En utilisant l'analyse de méthylation de l'ADN du génome entier, une étude a proposé des signatures divisant le TNBC en trois sous-groupes pronostiques (Stirzaker et al., 2015).

I.2.4.5.1. L'hormonothérapie pour les cancers ER+

Environ 75% des cancers du sein expriment les récepteurs aux œstrogènes et/ou à la progestérone. Ces cancers sont dits hormono-dépendants ou hormono-sensibles, car le développement des cellules cancéreuses se fait, entre autres, sous le contrôle hormonal. Il s'agit du cancer mammaire le plus répandu et il est souvent associé à un meilleur pronostic par rapport aux autres sous-types. L'hormonothérapie consiste à cibler la production d'hormones et/ou à empêcher leur effet sur le développement du cancer par l'intermédiaire de différentes approches, parmi lesquelles :

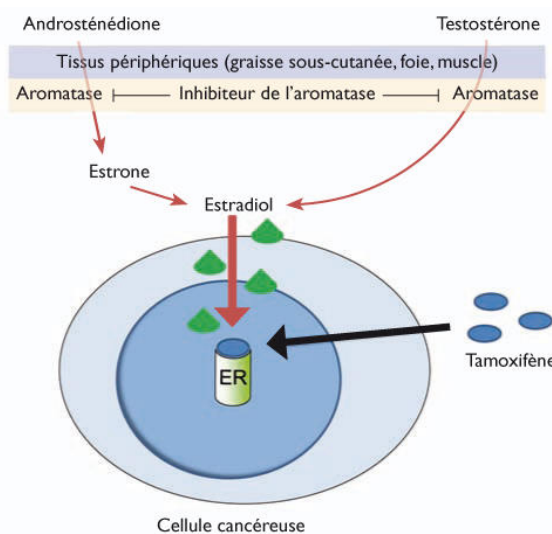


Figure 11 : Mécanisme d'action du tamoxifène et des inhibiteurs de l'aromatase.

D'après Odermatt et al., 2013.

- Les modulateurs sélectifs des récepteurs aux œstrogènes, tels que le tamoxifène, le torémifène ou encore le fulvestrant bloquent l'effet des œstrogènes (Fig. 11). Il s'agit d'un des traitements de référence utilisé depuis de nombreuses années dans le traitement du cancer du sein hormono-sensible. La thérapie endocrinienne est très efficace dans les tumeurs hormono-sensibles, cependant la résistance primaire et acquise peut limiter son bénéfice à long terme (Araki et al., 2018). Dans une étude récente, il a été mis en évidence que le jeûne périodique ou un régime imitant le jeûne (Brandhorst et al., 2015 ; Wei et al., 2017) améliorait l'activité des thérapies endocriniennes tamoxifène et fulvestrant en diminuant l'IGF1 circulant, l'insuline et la leptine et en inhibant la signalisation PI3K/AKT/mTOR via une régulation à la hausse de EGR1 et PTEN. Chez la souris, lorsque le fulvestrant était associé au palbociclib (un inhibiteur de la kinase CDK 4/6), l'ajout de cycles périodiques de jeûne favorisait l'activité anti-cancéreuse sur le long terme et diminuait la résistance acquise au traitement. Ces résultats appuient d'autres études cliniques sur les bénéfices d'un régime assimilé au jeûne comme adjuvant à l'œstrogénothérapie dans le cancer du sein hormono-dépendant (Caffa et al., 2020).

- Les inhibiteurs de l'aromatase, tels que l'anastrazol ou le letrozole, bloquent la synthèse d'œstrogène en inhibant l'activité enzymatique de l'aromatase (Fig. 11). L'aromatase agit en catalysant la conversion de la testostérone (un androgène) en estradiol (un œstrogène). Ils se voient prescrits uniquement chez la femme ménopausée.
- Les agonistes de la lutéinostimuline (LH-RH), tels que la goséréline ou la leuproréline, qui ont pour objectif de stopper, chez la femme non ménopausée, la fabrication des œstrogènes par les ovaires. L'hormone LH-RH, produite par l'hypothalamus, stimule l'hypophyse qui en réponse sécrète la LH (Lutéonostimuline) qui à son tour va stimuler les ovaires qui vont alors sécréter des œstrogènes. L'administration d'analogues de la LHRH a pour résultat d'hyperstimuler l'hypophyse. Hyperstimulée, l'hypophyse va devenir insensible et arrêter de stimuler à son tour les ovaires. À l'arrêt du traitement, si la femme n'est pas proche de la ménopause, les ovaires peuvent reprendre leur fonctionnement normal et produire de nouveau des œstrogènes. Cette suppression ovarienne peut aussi se faire de manière définitive, par exérèse chirurgicale des ovaires ou bien leur fonctionnement peut être arrêté par la radiothérapie. La suppression de l'activité ovarienne est alors définitive et provoque une ménopause précoce.

1.2.4.5.2. Les thérapies ciblant HER2 pour les cancers HER2+

Les femmes atteintes d'un cancer du sein dont les cellules tumorales surexpriment HER2 peuvent recevoir une thérapie ciblée visant HER2. L'utilisation de l'anticorps monoclonal humanisé trastuzumab (Herceptin®) a considérablement amélioré la survie des patientes sans récurrence et la survie globale dans le cancer du sein HER2+ au stade précoce (Slamon et al., 2011). Avec le trastuzumab, le pertuzumab, un inhibiteur de dimérisation de HER2, est également préconisé comme traitement de première intention. L'anticorps trastuzumab en association avec des taxanes (trastuzumab emtansine) apparaît comme un traitement de deuxième intention dans les cancers HER2+ avancés et le lapatinib ou le nératinib, inhibiteurs irréversibles de la tyrosine kinase qui ciblent HER1/HER2, seraient davantage employés en troisième intention en association avec des agents chimiothérapeutiques comme la capécitabine ou le paclitaxel (Gu et al., 2016). L'ajout d'un traitement hormonal n'est pas à exclure si le cancer HER2+ est également hormono-sensible (Giordano et al., 2014). Il a été mis en évidence dans l'étude CLEO-PATRA que l'association d'agents ciblant HER2 à la chimiothérapie prolongeait remarquablement la survie générale de 56,5 mois chez les patients métastatiques HER2+ (Swain et al., 2015).

Cependant les mécanismes de résistance aux thérapies ciblées HER2 mettent quelques fois en échec le traitement en parvenant à réactiver la signalisation HER2 ou des voies alternatives de survie (Rimawi et al., 2015). Notamment, pour les patients HER2+ et ER+, la thérapie ciblée HER2 seule apparaît insuffisante car la signalisation ER semble pouvoir contourner le traitement (Giuliano et al., 2015). En effet, des études précliniques rapportent que des niveaux de RE élevés sont associés à une mauvaise réponse aux thérapies ciblées HER2 en

raison de la diaphonie entre les voies dépendantes de HER2 et ER (Nahta & O'Regan, 2012). À l'inverse, l'expression de HER2 peut être bénéfique dans certaines tumeurs initialement HER2- au fil du temps, en particulier après une thérapie endocrinienne ciblant ER (Gutierrez et al., 2005). De surcroît, la résistance au trastuzumab a été corrélée à la présence des hétérodimères EGFR/HER2 et HER2/HER3 générant une signalisation compensatoire aberrante, rendant le traitement anti-HER2 inefficace (Pohlmann et al., 2009). Des altérations génétiques telles que la troncature ou les mutations de HER2, des mutations de PIK3CA (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*) en aval ou bien la perte de PTEN ont également été rapportées comme affectant la réponse aux traitements à la fois adjuvants ou néoadjuvants (Wang et al., 2013 ; Majewski et al., 2015).

I.2.4.5.3. Les thérapies ciblant l'angiogenèse

L'importance de l'angiogenèse dans le développement des tumeurs et dans la dissémination métastatique associée au cancer du sein est bien établie, et sera détaillée dans les chapitres suivants. Le ciblage de ce processus a été considérée comme une option thérapeutique très prometteuse (Fig. 12) avant que certaines limitations ne surviennent. La stratégie la plus étudiée dans le traitement anti-angiogénique consiste à bloquer le VEGF moyennant l'utilisation d'un anticorps monoclonal, tel que le Bevacizumab (Avastin®). En 2008, ce traitement en association avec de la chimiothérapie a reçu l'approbation de la FDA dans le traitement des cancers du sein métastatiques grâce à ses effets sur la survie sans récurrence comparé au traitement chimiothérapeutique seul. Cependant d'autres études en complétant les données disponibles sur ce traitement, ont mis en évidence que ses effets étaient bien modestes sur la survie sans récurrence et nul sur la survie globale, entraînant rapidement le retrait de l'approbation de la FDA (Aalders et al., 2017). Parmi les anticorps disponibles, le ramucirumab (Cyramza®) est un anticorps monoclonal recombinant ciblant le VEGFR-2, cependant son utilisation en association avec de la chimiothérapie ne semblent pas induire de bénéfice significatif sur la survie des patientes atteintes d'un cancer du sein localement avancé ou métastatique (Vahdat et al., 2017).

Une autre stratégie consiste à inhiber la transduction du signal induite par le VEGF en utilisant des inhibiteurs de récepteurs tyrosine kinase (RTK), tels que le sunitinib (Sutent®) ou le sorafénib (Nexavar®) (Gotink & Verheul, 2010). Le sunitinib et le sorafénib inhibent plusieurs RTK impliqués dans la croissance tumorale, la néo-angiogenèse pathologique et la progression métastatique du cancer. Le sunitinib a été identifié comme un inhibiteur des récepteurs aux facteurs de croissance plaquettaire PDGFR- α et PDGFR- β , des récepteurs VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3, du récepteur au facteur de cellule souche (KIT), du récepteur Fms-like tyrosine kinase-3 (FLT3) mais aussi du récepteur au facteur stimulant la formation de colonies (CSF-1R pour *Colony-Stimulating Factor 1 Receptor*). Le sorafénib, quant à lui, inhibe également l'activité du PDGFR- β , c-KIT, FLT-3, VEGFR-2, VEGFR-3 mais aussi CRAF et BRAF, des sérine/thréonine kinases de la famille RAF (Fig. 12).

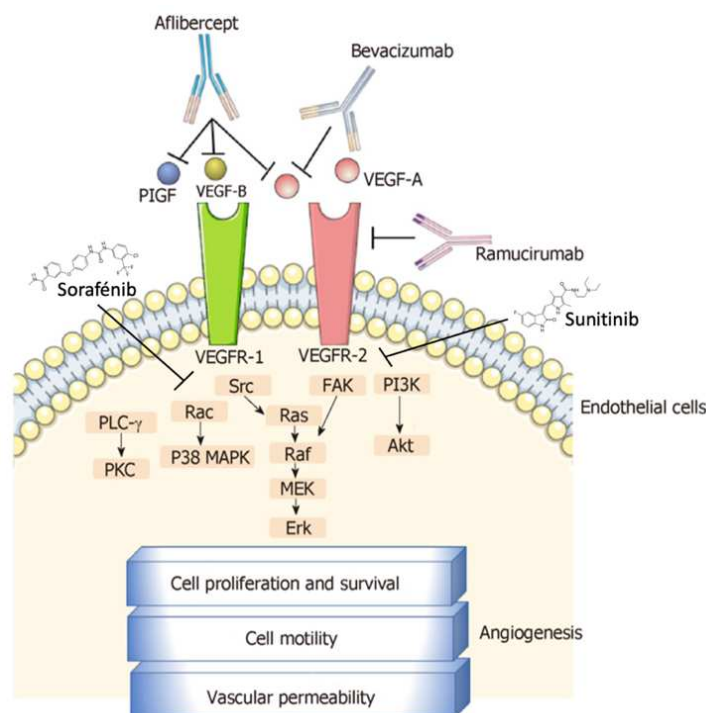


Figure 12 : Stratégies thérapeutiques ciblant la voie du VEGF.

Adapté d'après Kanat & Ertas, 2019.

L'évaluation de l'angiogenèse dans le cancer du sein peut être utilisée comme un facteur pronostique. Une expression accrue de VEGF par les tumeurs a également été corrélée avec une agressivité accrue (Linderholm et al., 1999) ainsi qu'une réponse atténuée aux traitements systémiques et à la radiothérapie (Foekens et al., 2001). Le pronostic sombre associé aux tumeurs HER2+ est lié à une angiogenèse accrue reflétant une forte expression du VEGF, cible en aval dans la voie de signalisation HER2 (Chung et al., 2013). Par ailleurs, le VEGF, en plus de contribuer à la tumorigenèse en stimulant l'angiogenèse, est capable d'inactiver le suppresseur de tumeur *TP53* (Linderholm et al., 2009) et d'entraver l'immunité anti-tumorale en inhibant la maturation des cellules dendritiques (Gardner et al., 2020). Dans la tumorigenèse et les métastases du cancer du sein, la régulation positive de l'axe VEGF/NRP-1 est associée à une augmentation de l'EMT, de la signalisation NF- κ B et β -caténine (Luo et al., 2016). L'axe VEGF/NRP-1, qui joue également un rôle dans la formation des cellules souches cancéreuses mammaires (Zhang et al., 2017) pourrait constituer une cible précieuse pour la conception de thérapies d'intervention contre le cancer du sein.

Les TNBC présentent une micro-densité vasculaire significativement plus élevée que les non-TNBC (Mohammed et al., 2011). De plus, le temps de survie des patientes s'est vu inversement corrélé aux taux de VEGF intra-tumoraux (Linderholm et al., 2009), soulignant l'important de l'angiogenèse dans l'évolution fatale de la maladie.

Toutefois, l'utilisation d'agents anti-angiogéniques, a été remis en cause, car l'hypoxie induite par ceux-ci augmentait *in fine* le potentiel invasif de la tumeur et favorisait la dissémination métastatique. Il a été mis en évidence que l'hypoxie engendrée *in vivo* dans un

modèle de xénogreffes par les agents anti-angiogénique sunitinib et bevacizumab promouvaient la stimulation des cellules souches cancéreuses via HIF-1 α , atténuant les bénéfices du traitement (Conley et al., 2012). L'utilisation d'un traitement au sunitinib bloque la croissance des vaisseaux dépendant de l'endothélium mais qu'il s'avère qu'il promeut le mimétisme vasculaire en parallèle (Sun et al., 2017). Parmi 174 cancers mammaires, les TNBC ont présenté davantage de mimétisme vasculaire (35,8% pour 67 tumeurs) comparés aux non-TNBC (17,8% pour 107 tumeurs) (Sun et al., 2017). Ces résultats suggèrent que l'évaluation du degré de mimétisme vasculaire présent dans les tumeurs semble utile pour prédire l'efficacité des traitements anti-angiogéniques, qui sont à proscrire chez les patientes TNBC sujettes à ce processus atypique d'angiogenèse.

Bien que la monothérapie anti-angiogénique ait des effets discutables sur le traitement TNBC, son association avec de l'immunothérapie s'est révélée pertinente. Notamment, des études précliniques ont démontré que la thérapie anti-angiogénique pouvait sensibiliser le cancer du sein au blocage PD-1/PD-L1 via la reprogrammation du microenvironnement tumoral. Liu et al ont mis en évidence que le traitement combiné de camrélizumab (anti-PD-1) et d'apatinib (inhibiteur de tyrosine kinase ciblant le VEGFR-2) présentait une activité anti-tumorale bénéfique et une bonne tolérance dans le cadre du traitement du TNBC avancé (Liu et al., 2020a).

Les anti-angiogéniques constituent un domaine d'investigation important pour l'avancement des thérapies ciblées dans les TNBC. En tant que traitement ciblé, ils nécessitent une utilisation fine et personnalisée ; cela s'appuie notamment sur une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'échec du traitement et l'identification de biomarqueurs prédictifs et de nouvelles cibles thérapeutiques.

I.2.4.5.4. Les thérapies ciblant les voies de réparation de l'ADN et les points de contrôle du cycle cellulaire

Les voies de réparation des dommages à l'ADN et les points de contrôle du cycle cellulaire sont impliqués dans presque toutes les voies de signalisation cellulaire, en particulier celles impliquant directement les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs. Les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN et les points de contrôles mitotiques servent principalement à prévenir les mutations, et éliminer les cellules dont les dommages sont irréversibles pour maintenir l'homéostasie.

Lorsque des cassures de l'ADN double brin (DSB pour *DNA Double Strand Breaks*) apparaissent, deux principales méthodes de réparation entrent en jeu : Le mécanisme de jointure d'extrémité non homologue (NHEJ pour *Non-Homologous End Joining*) et la recombinaison homologue (HR pour *Homologous Recombination*) (Ceccaldi et al., 2016). HR ne fonctionne que dans les phases S et G2, tandis que NHEJ, qui se veut être la voie principale de réparation dans presque toutes les phases du cycle cellulaire. La chimiothérapie est un traitement presque

inévitable dans le traitement des différents cancers mammaires, bien qu'il soit davantage privilégié dans le traitement des TNBC. Lorsque les systèmes de réparation des DSB ne sont pas altérés par des mutations ou aberrations quelconques empêchant leur fonctionnement, ils atténuent les effets de la chimiothérapie en permettant aux cellules tumorales de résister aux dommages engendrés par le traitement. Dans des lignées cellulaires de cancer du sein RE- (MDA-MB-468 et Hs578T), une étude a mis en évidence la co-translocation de l'IGFBP-3 avec la protéine kinase dépendante de l'ADN (ADN-PKcs) et de l'EGFR, vers le noyau des cellules cancéreuses en réponse aux dommages à l'ADN. Ces résultats soutiennent la possibilité d'une approche thérapeutique de sensibilisation du cancer du sein à la chimiothérapie ou à la radiothérapie en ciblant la fonction de réparation de l'ADN de l'IGFBP-3 (Lin et al., 2012). Dans des lignées cellulaires TNBC de type basal (HCC1806 et MDA-MB-468), il a été mis en évidence qu'IGFBP-3 interagissait avec NONO (*Non-POU domain-containing octamer-binding protein*) et SFPQ (*Splicing factor proline- and glutamine-rich*) de manière dépendante de PARP (*poly(ADP-ribose) polymérase*) dans la réparation des DSB. Ces résultats suggèrent que le ciblage de la fonction de réparation de l'ADN de l'IGFBP-3 pourrait favoriser la chimiosensibilité dans le TNBC de type basal, améliorant ainsi l'effet curatif de la chimiothérapie (De Silva et al., 2019).

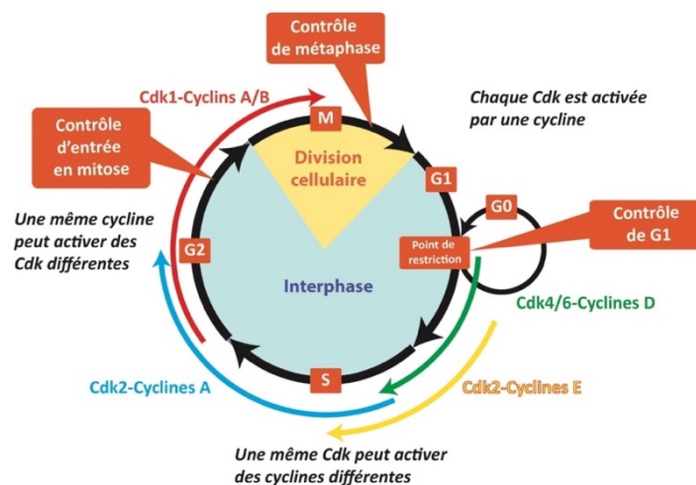


Figure 13 : Représentation schématique du cycle cellulaire et ses différents points de contrôle.

D'après www.rnbio.upmc.fr.

Les points de contrôle du cycle cellulaire jouent un rôle important pour permettre la réparation des dommages à l'ADN. En cas de mutations lors de la réplication de l'ADN ou de la ségrégation chromosomique, ils sont détectés et réparés grâce à l'arrêt du cycle au niveau de ces points de contrôle. Les cellules sont par la suite incitées à entrer dans le cycle cellulaire normal lorsque la réparation a abouti (Malumbres & Barbacid, 2009). Il existe trois points de contrôle du cycle cellulaire : le point de contrôle G1, le point de contrôle G2/M et le point de contrôle de la métaphase (Fig. 12). Ils sont tous étroitement liés à la réplication de l'ADN ou à la ségrégation chromosomique (Vermeulen et al., 2003). Lorsque des dommages à l'ADN se produisent, les kinases Chk2 et Chk1 (*Checkpoint kinase 1 et 2*) sont phosphorylées par les kinases ATM (*Ataxie Téléangiectasie Mutée*) et ATR (*Ataxie Téléangiectasie et liées à Rad3*), respectivement. Une fois activées, Chk2 et Chk1 phosphorylent Cdc25c pour bloquer le cycle cellulaire en phase

G2/M. En même temps, le suppresseur de tumeur p53 est phosphorylé par Chk2 ou Chk1, empêchant sa liaison avec l'ubiquitine ligase MDM2 et de se fait sa dégradation par le protéasome. D'autre part, p53, agissant comme un facteur de transcription, facilite l'expression de la cycline E-CDK2, régulatrice de p27^{Kip}, arrêtant ainsi le cycle cellulaire (Chang-Qing et al., 2020).

Le cisplatine est l'un des médicaments chimiothérapeutiques le plus couramment utilisé pour le traitement du cancer, mais son administration prolongée entraîne souvent une résistance. Il a été mis en évidence que la mutation (Y390C) de Chk2 était associée à une résistance des cellules de TNBC au cisplatine. Chk2 agit en induisant l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire via la régulation de l'activation de p53 et de la voie d'apoptose Chk2-p53 (Luo et al., 2018a). En réalisant un criblage à haut débit, une étude a pu mettre en évidence que le cisplatine activait les kinases ATR, Chk1 et Wee1. Ces dernières étant impliquées dans l'arrêt du cycle afin de réparer les dommages à l'ADN, leur activation contribue à l'atténuation de l'effet cytotoxique de la chimiothérapie. Les auteurs ont mis en évidence le bénéfice de l'utilisation d'inhibiteurs de Wee1 en association avec le cisplatine *in vivo* dans le traitement du TNBC. L'inhibition de Wee1 dans un tel contexte sensibilise les cellules à la chimiothérapie. En plus d'altérer le point de contrôle de réplication de l'ADN de manière plus pertinente que l'inhibition d'ATR ou de Chk1, l'inhibition de Wee1 entraîne des défauts au niveau du point de contrôle G2/M, augmentant le stress de réplication et induisant ainsi plus de dommages à l'ADN (Zheng et al., 2017a).

Le palbociclib, inhibiteur de CDK4/6, a obtenu l'approbation accélérée de la FDA comme traitement de première ligne pour les femmes ménopausées atteintes d'un cancer mammaire ER+ HER2-, sur la base des résultats de l'essai clinique en phase II PALOMA-1. L'administration combinée du palbociclib et du traitement endocrinien à base de létrozole permet de doubler la survie sans récurrence des patientes par rapport au létrozole seul (20,2 vs 10,2 mois) (Finn et al., 2015). Dans la phase III de l'essai PALOMA-3, une amélioration significative et constante de la survie sans récurrence a été mise en évidence en associant le palbociclib et fulvestrant comparé au traitement composé de fulvestrant seul (9,5 mois vs 4,6 mois) chez des patientes ER+ HER2- présentant une récurrence et ayant déjà reçu un traitement endocrinien au préalable (Cristofanilli et al., 2016). Il a été montré que les inhibiteurs de PI3K pouvaient prévenir la résistance adaptative au palbociclib et fulvestrant. De plus, l'inhibition de Cdk2 semble pouvoir inverser la résistance adaptative au palbociclib via l'amplification de la cycline E1 (Herrera-Abreu et al., 2016). Ces résultats et d'autres essais cliniques s'accordent pour dire que l'utilisation d'inhibiteurs de CDK4/6 devrait tenir une place de choix en association avec d'autres traitements comme l'immunothérapie dans le traitement de première intention des cancers du sein ER- HER2+ avancés (Rossi et al., 2019).

I.2.4.5.5. L'immunothérapie

De nombreuses études ont démontré le rôle central du système immunitaire dans le cancer. Les cellules tumorales peuvent échapper aux réponses immunitaires en régulant l'activité des lymphocytes T. La protéine 1 de mort cellulaire programmée (PD-1) est un récepteur exprimé à la surface des lymphocytes qui agit comme un point de contrôle immunitaire capable de supprimer l'activité des lymphocytes T effecteurs dans les tissus qui expriment la protéine PD-L1. Ainsi, PD-L1 exprimé par les cellules tumorales peut se lier au récepteur PD-1 (ou CD80) situé sur les cellules T et inhiber leur fonction. Lorsque la liaison entre PD-L1 et PD-1 est empêchée par un inhibiteur, les cellules T pourraient fonctionner normalement et s'attaquer aux cellules tumorales qui ne seraient plus en mesure d'échapper au contrôle immunitaire.

Parmi les anticorps disponibles, l'atezolizumab (Tecentriq®), le durvalumab et l'avélumab ciblent PD-L1; alors que le nivolumab, le pembrolizumab et le camrélizumab ciblent PD-1 (Katz & Alsharedi, 2017) (Fig. 14).

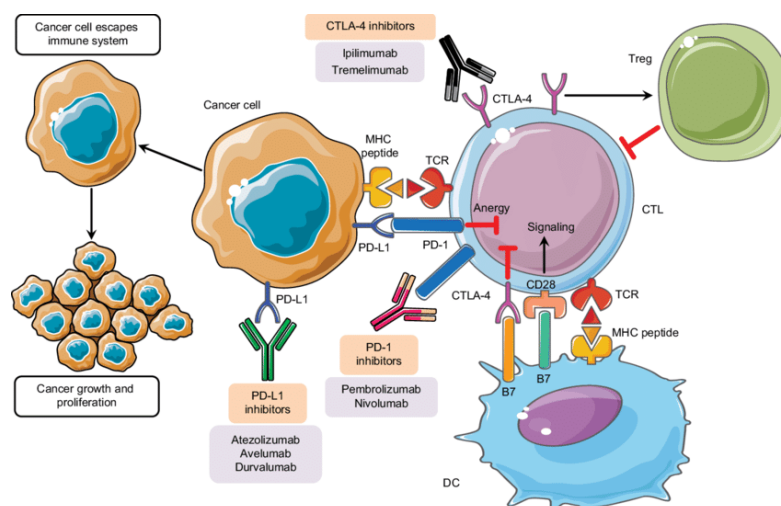


Figure 14 : Inhibiteurs des points de contrôle immunitaire dans le traitement du cancer.

D'après Ayoub et al., 2019.

La protéine 4 associée aux lymphocytes T cytotoxiques (CTLA-4) joue également un rôle important dans la modulation de l'activité des lymphocytes T. Exprimée constitutivement dans les lymphocytes T régulateurs, elle est inducible dans les lymphocytes T conventionnels – un phénomène exploité par les cancers. Elle agit comme un interrupteur en inhibant l'action du lymphocyte lorsqu'elle interagit avec B7 (CD80 ou CD86) à la surface d'une cellule présentatrice d'antigène, entraînant une diminution de la réponse immunitaire (Emens, 2018) (Fig. 14). Par conséquent, les cellules T activées après l'inhibition du CTLA-4 améliorent la réponse immunitaire (Pardoll, 2012). Le tremelimumab et l'ipilimumab sont des anticorps monoclonaux qui ciblent CTLA-4 (Katz & Alsharedi, 2017).

Outre les lymphocytes T cytotoxiques, les cellules T auxiliaires 1 (Th1) peuvent également inhiber la progression et la dissémination métastatique des cancers mammaires, tandis que la voie de la réponse immunitaire médiée par Th2 jouerait un rôle opposé (Liu et al.,

2012). Récemment, il a été mis en évidence que l'utilisation de la saikosaponine A, une plante utilisée en médecine traditionnelle chinoise, exerçait des activités anti-tumorale dans le cancer du sein en déplaçant l'équilibre Th1/Th2 vers Th1 par activation de la voie IL12/STAT4. Cette amélioration de l'activité anti-tumorale a été démontrée par une augmentation de l'infiltrat de cellules T CD8 + et T CD4 + au sein des tumeurs, ainsi qu'une augmentation sérique des taux d'IFN- γ et d'IL-12 et une diminution des taux d'IL-4 et d'IL-10 (Zhao et al., 2019).

L'immunothérapie appliquée au TNBC

L'immunothérapie s'avère très prometteuse dans le traitement du TNBC. Mittendorf et al. ont mis en évidence que les TNBC exprimaient significativement plus de PD-L1 que les tumeurs non-TNBC (Mittendorf et al., 2014). Selon les résultats de l'étude IMpassion130, la survie médiane sans progression a été prolongée de 2,5 mois et la survie globale médiane de 10 mois pour les patients atteints de tumeurs PD-L1+ en utilisant l'atezolizumab (anti-PD-L1) associé au nab-paclitaxel par rapport au traitement composé du nab-paclitaxel seul. Approuvé par la FDA, l'immunothérapie utilisant l'atezolizumab associée au nab-paclitaxel a montré des bénéfices pour les patients TNBC métastatiques PD-L1+ (Schmid et al., 2018). L'utilisation de l'atezolizumab en monothérapie fournit un bénéfice clinique durable chez les patientes atteintes de TNBC métastatique, notamment lorsque l'infiltration immunitaire est >10% et qu'au moins 1% des cellules immunitaires sont PD-L1+. L'effet du traitement se trouve amélioré lorsqu'il est administré en première ligne de traitement de la maladie métastatique (Emens et al., 2019).

Ainsi, pour augmenter le succès de l'immunothérapie anti-cancéreuse, il est plus que pertinent qu'elle soit associée à d'autres traitements conventionnels ou spécifiques, en voici quelques exemples :

- L'essai KEYNOTE 162 a évalué l'efficacité et l'innocuité du pembrolizumab (ciblant PD-1) combiné à niraparib (inhibiteur de PARP) dans le TNBC avancé. Le taux de réponse global était de 29% avec un taux de réponse particulièrement élevé pour les tumeurs présentant une mutation BRCA (67%). Sans surprise, les patients PD-L1+ ont mieux répondu au traitement que les PD-L1- (33% vs 15%) (Vinayak et al., 2019).
- L'utilisation de nanoparticules activant le système immunitaire adaptatif au moyen d'ARNm codant pour l'antigène tumoral MUC1, combiné avec un anticorps monoclonal ciblant CTLA-4 apparaît prometteuse dans le traitement du TNBC. Les résultats *in vivo* ont démontré que le vaccin induisait une forte réponse des lymphocytes T cytotoxiques, spécifique de l'antigène, contre les cellules murines de TNBC 4T1 ; et que l'immunothérapie combinée au vaccin améliorait significativement la réponse immunitaire anti-tumorale par rapport au vaccin ou à l'anticorps monoclonal seul (Liu et al., 2018b).

I.2.4.5.6. Les thérapies ciblant les voies de signalisation impliquée dans la cancérogenèse

- La voie **PI3K/AKT/mTOR** constitue une des voies de signalisation les plus importantes dans la cancérogenèse. La cascade de signalisation engendrée par les différents acteurs moléculaires joue un rôle central dans la prolifération, la survie, le métabolisme cellulaire, l'angiogenèse et la stabilité génomique. La signalisation PI3K/AKT/mTOR engendre une diminution d'expression des facteurs pro-apoptotiques et une augmentation de l'expression des facteurs anti-apoptotiques (Bauer et al., 2015). L'inhibition d'Akt par le GSK690693, un inhibiteur spécifique, diminue considérablement la prolifération cellulaire *in vitro* et le volume tumoral *in vivo* dans un modèle de TNBC (Chin et al., 2014). En outre, l'utilisation du SF1126, un inhibiteur de pan-PI3K, combiné avec du géfitinib (Iressa®), un inhibiteur de tyrosine kinase ciblant EGFR, facilite considérablement l'apoptose des cellules tumorales (Deng et al., 2015).

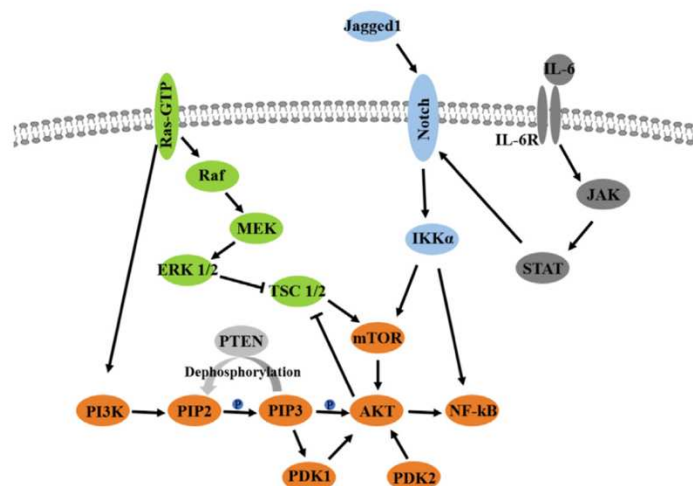


Figure 15 : Interaction entre les différentes voies de signalisation impliquées dans les TNBC.

D'après Chang-Qing et al., 2019.

- La voie **RAS/RAF/MEK/ERK** également connue sous le nom de la voie des MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) implique une cascade de RTK et des protéine kinase cytosolique. Cette voie de signalisation joue un rôle important dans la prolifération et la différenciation cellulaire. La surexpression de la protéine Ras est retrouvée dans environ 30% des cancers humains et apparaît comme une cible thérapeutique potentielle (Ripple et al., 2013). De Luca et al. ont montré que la voie de signalisation RAF/MEK/ERK, de concert avec la voie PI3K/AKT/mTOR jouait un rôle important dans la croissance et la survie des cellules tumorales mammaires. Des boucles compensatoires ont été mises en évidence et permettent l'activation d'une voie de signalisation à la suite du blocage de l'autre. Par conséquent, le blocage de ces deux voies avec des combinaisons d'inhibiteurs de signalisation pourrait entraîner un effet anti-tumoral plus efficace par rapport à l'utilisation d'un seul agent (De Luca et al., 2012). Une étude récente a démontré que l'utilisation du couplage de l'ADT-OH, un donneur de sulfure d'hydrogène (H₂S) couramment utilisé, avec

l'acide hyaluronique (HA) serait à l'origine d'un effet inhibiteur plus puissant que le NaHS et le GYY4137 sur la prolifération, la viabilité, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses du sein humaines *in vitro* et *in vivo*. Les effets médiés par HA-ADT sont liés à l'inhibition des voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MEK/ERK (Dong et al., 2019).

- La **voie JAK/STAT** est impliquée dans de nombreux processus biologiques importants tels que la prolifération cellulaire, la différenciation, l'apoptose et l'immunité. Cette voie comprend les récepteurs liés à la tyrosine kinase, la tyrosine kinase JAK et le facteur de transcription STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) qui médie la régulation de l'expression de gènes cibles (Aaronson & Horvath, 2002). Il a été montré que JAK1, JAK2 et JAK3 étaient surexprimés chez les patients TNBC, et qu'ils pouvaient agir comme activateurs pour favoriser la prolifération des cellules tumorales et la vasculogénèse (Shields et al., 2013). Barbie et al. ont montré que l'inhibition des JAK seules ne saurait être efficace pour le traitement du TNBC, mais qu'en association de l'inhibition de la kinase I8Be (IKBKE), la stratégie thérapeutique se révélait intéressante (Barbie et al., 2014). Par ailleurs, il a été montré que la voie de signalisation JAK/STAT pouvait réguler l'expression dynamique de PD-L1 et induire une réponse inflammatoire (Chen et al., 2018 (b)).

- La **voie Notch**, composée de quatre récepteurs (Notch1-4) et de cinq ligands (Jagged1, Jagged2, DLL1, DLL3 et DLL4), joue un rôle important dans le développement embryonnaire, mais également dans la progression de plusieurs cancers, dont le cancer mammaire (Guo et al., 2011). Cette voie est décrite comme étant impliquée dans l'apoptose, l'angiogénèse et l'EMT (Krishna et al., 2019). L'expression de Notch1 et celle de son ligand, Jagged1, sont négativement corrélées à la survie des patients (Reedijk et al., 2005). De surcroît, une corrélation significative entre l'expression de Notch1 et l'oncogène H-Ras dans des carcinomes canalaux primaires a été mise en évidence (Mittal et al., 2014). En induisant la signalisation Akt de manière autocrine ou par la régulation négative de l'expression de PTEN, Notch est capable d'inhiber l'apoptose des cellules épithéliales du sein (Dang, 2012). Par ailleurs, l'inhibition de Notch1 entraîne une régulation négative de l'EMT ainsi qu'un arrêt de la croissance des CSC (*Cancer Stem Cells*), suggérant son implication dans le maintien des propriétés souches comme l'auto-renouvellement et le potentiel prolifératif des CSC du sein (Suman et al., 2013). Celles-ci jouent un rôle important dans la progression du cancer mammaire et semblent contribuer à la résistance aux traitements (McCubrey et al., 2014). D'autre part, des niveaux élevés de Notch2 sont associés à une augmentation de la survie sans récidence (Parr et al., 2004). Similairement, Notch3 semble jouer un rôle suppresseur de tumeur, en conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire au niveau du point de contrôle G1 (Chen et al., 2016). Inversement, l'inhibition de Notch4 dans des cellules de TNBC affecte la prolifération cellulaire, l'invasion et la tumorigénicité, soulignant son rôle pro-tumoral. Plusieurs études ont établi que les effets de la voie Notch dans la tumorigénèse de la glande mammaire étaient liés à ses interactions avec d'autres voies de signalisation, telles que Ras,

TGF- β et Wnt (Guo et al., 2011). Dans le cadre du TNBC métastatique, les inhibiteurs de la γ -sécrétase, qui bloquent la signalisation Notch en empêchant son clivage à la surface cellulaire, présentent un grand intérêt. Notamment, l'inhibiteur PF-03084014 présente une activité synergique avec le docétaxel et a démontré une activité anti-tumorale significative chez les patientes (Locatelli et al., 2017b). Par ailleurs, des études ont révélé un rôle clé de Notch dans l'immunothérapie du cancer du sein. La déplétion de Notch1 semble améliorer l'efficacité des médicaments anti-tumoraux, nivolumab (anti-PD-1) et ipilimumab (anti-CTLA-4) (Liu et al., 2020). Avec un rôle établi dans l'angiogenèse développementale mais également pathologique, Notch fait aussi l'objet de thérapies pour inhiber l'angiogenèse (Wu et al., 2010 ; Locatelli et al., 2017a). Bien que de nombreux médicaments soient en cours de développement, les problèmes de toxicité doivent être résolus, avant qu'une stratégie thérapeutique ciblée puisse être appliquée cliniquement.

De nombreux essais précliniques sont actuellement encore cours et pourraient donner naissance à de nouvelles stratégies thérapeutiques (Traina et al., 2018). Le fait que la plupart de ces cibles d'intérêt soient interconnectées (Fig. 15) nous laisse à penser qu'une combinaison de ces inhibiteurs assortie d'un traitement conventionnel pourrait donner des résultats satisfaisants dans le traitement du TNBC.

I.2.4.5.7. La thérapie ciblant PARP

La famille des poly ADP-ribose polymérase (PARP) est constituée de ribozymes qui catalysent la ribosylation de l'ADP. Ces protéines sont engagées dans la résection et la réparation des bases, exerçant ainsi un rôle crucial dans la réparation des dommages à l'ADN simple brin (Anwar et al., 2015). Il a été mis en évidence que les cellules déficientes en BRCA2 étaient particulièrement sensibles aux inhibiteurs de PARP (PARPi pour *PARP inhibitor*) (Bryant et al., 2005). L'utilisation de PARPi dans les cellules mutées *BRCA1/2* entraînent un blocage des deux voies de réparations de l'ADN, simple et double brin, et constitue une thérapie de choix dans les cancers mammaires présentant cette mutation. L'interaction entre BRCA et PARP se conforme au concept de « létalité synthétique », selon lequel il n'y a aucun effet lorsqu'il y a un défaut dans l'un des deux gènes. Cependant, une combinaison de deux gènes déficients entraîne la mort cellulaire (Ashworth & Lord, 2018). La létalité synthétique est en principe un défaut des gènes suppresseurs de tumeur et est spécifiquement létale pour les cellules tumorales, mais elle n'a aucun effet sur les cellules normales (Lord et al., 2015). Il a été démontré dans des études précliniques que certains PARPi inhibent la croissance cellulaire et favorisent la mort des cellules cancéreuses du sein dépourvues de mutations dans BRCA1/2. Il a été mis en évidence que 5 des 8 lignées cellulaires de TNBC testées étaient sensibles aux PARPi et ce, indépendamment du statut BRCA. En revanche, la lignée triple négative HCC1937, porteuse de la mutation *BRCA*, s'est révélée moins sensible au talazoparib, au niraparib, au rucaparib et ne répond pas à l'olaparib, suggérant que la thérapie PARPi ne peut pas systématiquement être associée à la mutation *BRCA* car la réponse au traitement est indépendante de la mutation *BRCA* (Keung et al., 2020).

Actuellement, seuls l'olaparib (Lynparza®), un inhibiteur de PARP1/2/3, et le talazoparib (Talzenna®), un inhibiteur sélectif de PARP1/2, sont approuvés dans le traitement du cancer mammaire HER2- porteur de la mutation germinale (Shi et al., 2020). Malgré des taux de réponse d'environ 60%, l'allongement de la survie sans progression avec un PARPi est modeste, suggérant l'émergence d'une résistance. Plusieurs études rapportent que les RTK tels que c-MET, sont impliqués dans la résistance à divers agents antinéoplasiques, y compris les PARPi. Des résultats récents suggèrent que l'inhibition combinée de c-MET et l'EGFR pourrait potentiellement sensibiliser les TNBC aux effets cytotoxiques de PARPi après une résistance acquise (Chu et al., 2020).

I.2.4.5.8. La thérapie ciblant les récepteurs aux androgènes

Le récepteur aux androgènes (AR pour *Androgen Receptor*) est un membre de la famille des récepteurs nucléaires aux hormones stéroïdiennes, retrouvé dans environ 60 à 70% des cancers mammaire et en particulier dans 20 à 40% des TNBC (Rahim & O'Regan, 2017). Les tumeurs qui l'expriment sont associées à un meilleur pronostic que les tumeurs qui ne l'expriment pas (Vera-Badillo et al., 2014). Au sein des TNBC, l'ARNm du AR est fortement exprimé dans le sous type LAR où il est en moyenne 9 fois plus élevé que dans les autres sous-types. La croissance des tumeurs LAR est considérée comme étant dirigée par la voie de signalisation AR (Lehmann et al., 2011). De plus, le sous-type LAR présente des mutations activatrices touchant PIK3CA, engendrant une sensibilité aux inhibiteurs de PI3K/Akt/mTOR (Lehmann et al., 2014), ce qui pourrait présenter un bénéfice en association avec des antagonistes de AR.

Parmi l'arsenal thérapeutique disponible pour cibler l'AR, il est possible de citer l'enzalutamide (Xtandi®) et le bicalutamide (Casodex®) ou encore l'acétate d'abiratéron (Zytiga®). Une étude clinique de phase II a évalué l'activité anti-tumorale et l'innocuité de l'enzalutamide (antagoniste d'AR) chez des patientes atteintes d'un TNBC AR+ avancé ou métastatique. L'enzalutamide démontre une bonne tolérance chez les patientes avec une activité clinique bénéfique de 33% à 16 semaines (Traina et al., 2018). Le bicalutamide est un inhibiteur non stéroïdien de l'AR initialement utilisé pour le traitement du cancer métastatique de la prostate. Récemment, le bicalutamide a montré une activité anti-tumorale dans le traitement du cancer mammaire ER/PR- AR+ avec un bénéfice clinique de 19% et une survie sans progression médiane à 3 mois. Il a été mis en évidence que le bicalutamide, en ciblant la signalisation AR, inhibait *in vitro* la prolifération et l'invasion des cellules MDA-MB-231 de manière dose dépendante, notamment en diminuant l'expression de la MMP-2 et -9. De plus, le traitement pourrait conduire à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 en inhibant la cycline D (Kong et al., 2020). Par ailleurs, l'inhibition du AR pourrait être une stratégie de radiosensibilisation efficace. Il a été mis en évidence que l'utilisation de sévitéronel (INO-464), un nouvel inhibiteur de la lyase CYP17 et antagoniste du AR, est capable de radiosensibiliser des cellules de TNBC AR+, suggérant le rôle médiateur du AR dans l'acquisition de la radiorésistance. *In vivo*, le sévitéronel associé à la radiothérapie retarde la croissance des

xénogreffes TNBC chez la souris (Michmerhuizen et al., 2020). L'ensemble de ces résultats apparaissent encourageants mais encore limités et plaident en faveur de l'identification de facteurs de réponse prédictifs et de combinaisons thérapeutiques pour améliorer les taux de réponse.

I.2.4.5.9. La thérapie ciblant Hsp90

La protéine Hsp90 (*Heat Shock Protein 90*) joue un rôle critique dans le maintien conformationnel de nombreuses protéines impliquées dans le développement des cellules initiatrices de tumeur (TIC pour *Tumor Initiating Cells*). Semblables aux cellules souches, ces TIC conduisent à l'invasion et aux métastases dans de nombreux cancers y compris le TNBC. Il a été mis en évidence que le traitement des cellules de TNBC (MDA-MB-468LN, MDA-MB-231) avec des inhibiteurs de Hsp90 entraîne une diminution de 50 à 80% des marqueurs de TIC, CD44 et de l'aldéhyde déshydrogénase. De plus, le traitement porte atteinte à la capacité d'auto-renouvellement, d'invasion et de migration des cellules. En réponse à l'hypoxie, les cellules de TNBC sécrètent Hsp90 α pour promouvoir leur motilité, et cette réponse est médiée de manière autocrine par le récepteur LRP-1 (Zhao et al., 2010). *In vivo*, les inhibiteurs C-terminaux de Hsp90 conduisent à une action anti-tumorale, soutenant leur utilisation prometteuse contre les TNBC (Subramanian et al., 2020).

Cependant, la résistance intrinsèque et acquise aux inhibiteurs de Hsp90 limite leur efficacité chez les patients. Le profil d'expression génique et l'analyse des voies de signalisation enrichies dans les cellules résistantes à l'inhibition de Hsp90 indiquent une activation significative de la voie de signalisation JAK/STAT médiée par l'IL-6. De plus, les cellules résistantes présentaient une sensibilité sélective à l'inhibition de JAK2, conduisant à une augmentation de l'induction de l'apoptose. Ces données suggèrent qu'une inhibition combinée de la voie de signalisation JAK-STAT et Hsp90 pourrait surmonter cette résistance (Mumin et al., 2019).

I.2.5. La résistance aux traitements

La résistance acquise chez les patients représente un défi important, d'autant plus face aux options limitées de traitements disponibles pour le TNBC.

(A) **L'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)** induite par les traitements endommage la membrane mitochondriale, conduisant à la libération du cytochrome c et finalement à l'apoptose dépendante de la caspase (principe de la radiothérapie pour tuer les cellules tumorales). La résistance peut se manifester par une augmentation de la capacité antioxydante (A, Fig. 16), médiée par Nrf2 (*Nuclear factor (erythroid-derived 2) -like 2*), qui déclenche l'expression protéique de gènes antioxydants tels que NQO1 (*NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1*), HO-1 (*Heme oxygenase-1*) et γ -GCL (*γ glutamate-cystéine ligase*), et augmente le niveau intracellulaire de GSH (*Glutathion*) pour réduire les effets délétères induit par ROS

(Bai et al., 2021). La signalisation antioxydante dans les cellules TNBC résistantes au traitement est généralement activée de manière constitutive. En effet, une stimulation persistante de la voie ROS dote les cellules d'une capacité antioxydante plus forte qui confère aux cellules tumorales résiduelles un avantage sélectif lors d'une forte augmentation de ROS (Sarmiento-Salinas et al., 2019), suggérant que le ciblage des signaux antioxydants pourrait suffire à rendre les TNBC vulnérable.

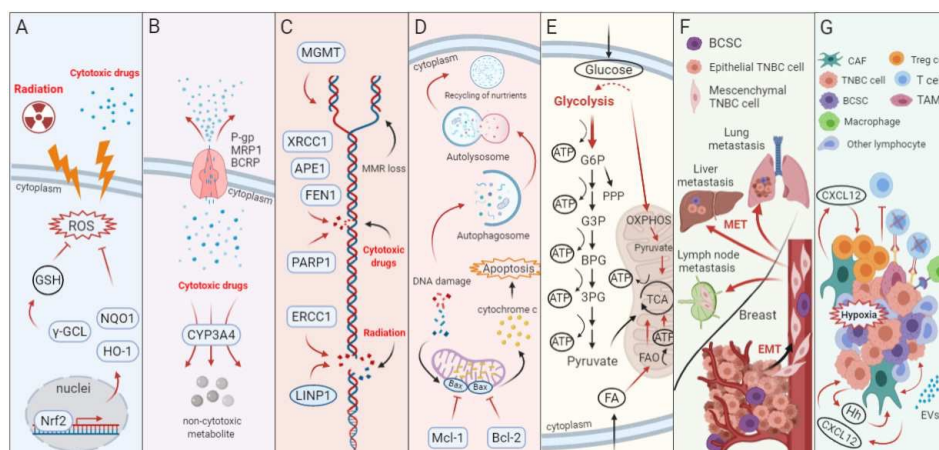


Figure 16 : Mécanismes sous-jacents à la résistance thérapeutique des TNBC. D'après Bai et al., 2021.

(A) Accumulation de ROS ; (B) Efflux et métabolisme des médicaments ; (C) Mécanismes de réparation de l'ADN ; (D) Signalisation anti-apoptotique et autophagie ; (E) Adaptation métabolique (Effet Warburg) ; (F) EMT et CSC ; (G) Hypoxie et microenvironnement tumoral

- (B) Le rôle de l'**augmentation de l'efflux et du métabolisme des médicaments** dans la chimiorésistance est aujourd'hui bien établi, avec la contribution de la P-glycoprotéine (P-gp), de la protéine 1 multi-résistante (MRP1) et de la protéine de résistance au cancer du sein (BCRP) (Nedeljković & Damjanović, 2019). Cependant l'inhibition de ces protéines ne semble pas être une solution idéale. Au lieu de bloquer les transporteurs médiant l'efflux, les recherches se concentrent sur l'amélioration de la rétention des médicaments en jouant avec leurs propriétés. Par exemple, l'utilisation de nanodiamants pour délivrer du méthotrexate dans les cellules MDA-MB-231 surexprimant la P-gp a montré une amélioration de la rétention du médicament tout en retardant la croissance tumorale (Toh et al., 2014). De plus, ces nanotechnologies offrent un potentiel de ciblage spécifique non négligeable. Par ailleurs, les enzymes métabolisant les xénobiotiques dans les cellules cancéreuses, telles que le cytochrome P450 3A4 (CYP3A4), peuvent également inactiver les médicaments cytotoxiques via le métabolisme de phase I et faciliter l'apparition de la chimiorésistance. Exprimé dans 20 à 55% des cancers mammaires, il a été mis en évidence qu'il jouait un rôle dans la détoxification intracellulaire à la suite de l'administration de taxanes (Van Eijk et al., 2019).
- (C) Parmi les mécanismes liés à la résistance, il est important d'évoquer l'**augmentation des mécanismes de réparation de l'ADN** (C, Fig. 16) atténuant les effets délétères des traitements entraînant des dommages à l'ADN, comme les alkylants ou encore les

radiations. Après une exposition aux agents thérapeutiques, les cellules tumorales vont surexprimer des gènes régulant la radiosensibilité. Notamment, une augmentation de l'EGFR médiée par la voie PI3K/AKT/mTOR promeut la prolifération cellulaire et la réparation aux dommages causés à l'ADN tout en réduisant l'apoptose, conduisant donc à une radiorésistance (He et al., 2018). La surexpression et l'amplification du gène EGFR est observée dans 45% à 70% de TNBC, ainsi certains TNBC peuvent bénéficier d'un traitement anti-EGFR pour palier à la résistance radio-thérapeutique. Par exemple, l'inhibiteur ZR-BA1, peut être utilisé car en plus de bloquer le domaine TK de l'EGFR, il est capable d'induire des lésions alkylantes de l'ADN.

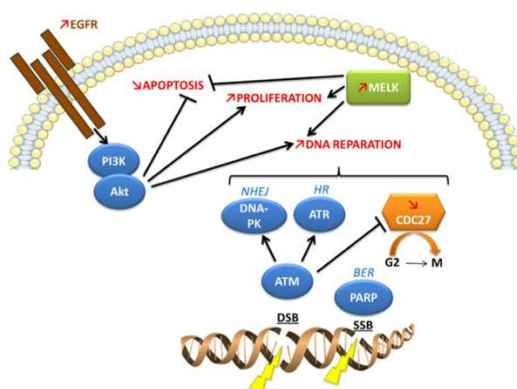


Figure 17 : Radiorésistance intrinsèque des TNBC. D'après He et al., 2018.

De la même manière, d'autres régulations génétiques telles que la régulation positive de MELK (*Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase*) ou la régulation négative de CDC27, entraînant l'arrêt du cycle en phase G2/M, participent au mécanisme de radiorésistance des cellules cancéreuses TNBC (Fig. 17). L'inhibition génétique ou pharmacologique de MELK induit une sensibilité aux radiations *in vitro* et retarde significativement la croissance tumorale *in vivo* dans de multiples modèles (Speers et al., 2016). Par ailleurs, la régulation à la hausse de nombreuses enzymes comme MGMT (*O⁶-alkylguanine DNA alkyltransferase*), XRCC1 (*X-ray Repair Cross-Complementing protein 1*), APE1 (*Apurinic/aPyrimidinic Endonuclease*), FEN1 (*Flap EndoNuclease 1*), ERCC1 (*Excision Repair Cross-Complementation 1*) ou encore LINP1 (*LncRNA In Non-homologous end joining Pathway 1*), contribuent à une augmentation des mécanismes de réparation de l'ADN dans les cellules TNBC.

- (D) Pour ne pas subir l'apoptose engendrée par le traitement, la **régulation aberrante de la signalisation anti-apoptotique** (Fig. 16) est une solution adoptée par les cellules tumorales pour induire une chimiorésistance (Bai et al., 2021). Le vénétoclax (inhibiteur de Bcl-2) fait l'objet de plusieurs essais cliniques dans le cadre du cancer du sein (Stravodimou & Voutsadakis, 2020). L'**autophagie** (Fig. 16) contribue également à la résistance thérapeutique par le recyclage des nutriments et est associée à un mauvais pronostic (Lefort et al., 2014). L'inhibition de l'autophagie par la chloroquine a potentialisé l'efficacité chimiothérapeutique de l'adriamycine et de la cyclophosphamide dans des modèles de xénogreffe dérivés de patients de TNBC, suggérant que l'inhibition de l'autophagie en tant

qu'une approche complémentaire à la chimiothérapie s'avère prometteuse dans le traitement du TNBC résistant.

- (E) Les cellules cancéreuses démontrent des capacités métaboliques plus robustes que les cellules saines pour satisfaire les besoins d'une croissance rapide. Un niveau basal plus élevé de phosphorylation oxydative (OXPHOS) et de β -oxydation des acides gras (FAO) produit une énergie considérable pour surmonter le stress. D'autre part, les cellules cancéreuses s'engagent dans une **adaptation métabolique** (Fig. 16) en fonction des changements micro-environnementaux. L'effet Warburg, qui favorise le métabolisme anabolique, est une adaptation critique contribuant à la résistance aux traitements. Elle permet aux cellules de TNBC de survivre dans un environnement hypoxique et dans la circulation vasculaire, tout en favorisant l'échappement immunitaire via l'excrétion de l'acide lactique immunosuppresseur (Lim et al., 2016). Ces données suggèrent que cette adaptation tient un rôle important lors de la formation de métastases vers des sites distants. En effet, il a été mis en évidence que l'inversion de l'effet Warburg était suffisant pour supprimer le potentiel métastatique du TNBC (Tseng et al., 2018). Cependant, cibler la reprogrammation métabolique pour induire une vulnérabilité n'est pas simple, car la plasticité métabolique peut s'avérer être un problème lors de l'utilisation d'inhibiteurs métaboliques.
- (F) **L'EMT** (Fig. 16) favorise la dissémination métastatique en modifiant le phénotype ainsi que de nombreuses propriétés des cellules tumorales comme l'adhésion. Comparé aux autres sous-types, le TNBC est plus susceptible de métastaser, notamment en raison d'une EMT particulièrement active. La signalisation du TGF- β est la voie centrale impliquée dans l'activation EMT via la régulation de Smad2-4 et de certains gènes en aval comme Snail, ZEB et bHLH. Il a été mis en évidence que l'inhibition du TGF- β empêchait non seulement la formation de métastases dans le TNBC, mais augmentait également la chimiosensibilité (Bhola et al., 2013). **Les cellules souches cancéreuses (CSC)** (Fig. 16), faiblement différenciées, sont résistantes aux traitements conventionnels et sont considérées comme responsables de la récurrence du cancer (Bai et al., 2018). L'EMT-MET (*Mesenchymal–Epithelial Transition*) séquentielle est utilisée par les CSC dans le mécanisme de récurrence métastatique après un traitement, ce qui peut expliquer, entre autres, pourquoi les TNBC sans réponse complète ont un potentiel élevé de récurrence métastatique (Mani et al., 2008).
- (G) La prolifération rapide des cellules cancéreuses et les anomalies de la microcirculation vasculaire provoquent une hypoxie dans certaines parties de la tumeur, qui conditionne l'agressivité tumorale. **L'hypoxie et l'hétérogénéité du microenvironnement tumorale** (Fig. 16) contribuent au maintien de la tumeur ainsi qu'à son invasivité et son échappement immunitaire. Les fibroblastes associés au cancer (CAF) peuvent sécréter CXCL12 pour promouvoir un phénotype résistant des cellules de TNBC et recruter des cellules T régulatrices (Treg) pour supprimer la réponse immunitaire des cellules T effectrices. Les cellules tumorales peuvent sécréter du G-CSF qui induit un phénotype anti-inflammatoire des macrophages associés à la tumeur (TAM), engendrant alors des propriétés

immunosuppressives. De plus, les cellules tumorales et les TAM peuvent exprimer PD-L1 pour inhiber la réponse immunitaire des cellules T effectrices via son interaction avec PD-1. Récemment, il a été mis en évidence que les cellules de TNBC CD24+ étaient capables d'échapper la clairance des macrophages en bloquant Siglec-10 à leur surface. La perturbation de l'interaction CD24/Siglec-10 présente ainsi une efficacité prometteuse *in vivo* sur la suppression tumorale par les macrophages (Barkal et al., 2019). En tant que vecteur de communication intercellulaire dans le microenvironnement tumoral, les vésicules extracellulaires (EV pour *Extracellular vesicles*) peuvent transférer les caractéristiques de la cellule d'origine à d'autres cellules en leur fournissant des protéines fonctionnelles et des acides nucléiques. Par exemple, les exosomes des TNBC stimulent la migration et l'extravasation des cellules tumorales receveuses en délivrant l'ubiquitine c-terminal hydrolase L1 (UCHL1), essentielle dans la dissémination métastatique médiée par la voie du TGF- β (Liu et al., 2020). Ce transfert d'informations est important dans la réponse adaptative des cellules au stress engendré par le microenvironnement tumoral. Il a été constaté que l'activation induite par la signalisation HIF-RAB22A dans les cellules de TNBC augmentait l'excrétion d'EV, favorisant la formation d'adhérences focales entre les cellules tumorales et la matrice, et ainsi l'invasion et la dissémination métastatique (Wang et al., 2014). Ces données ont été corrélées à la modification stromale induite par les exosomes, qui favoriserait l'EMT du TNBC en délivrant l'intégrine $\beta 4$ aux CAF, suggérant un rôle des EV dans la progression et la résistance tumorale (Sung et al., 2020). Les miARN exosomaux peuvent également prendre part à ces effets, c'est le cas de miR-423-5p, miR-10b, miR-105, miR-122 ou encore hsa-miR-940 (Bai et al., 2021). Une étude récente a déterminé une signature miARN exosomale spécifique contenant 9 miARNs détectables dans le plasma de patients TNBC. Le miR-155 exosomal pourrait être utilisé comme marqueur prédictif de la réponse complète au traitement dans le cadre du TNBC ayant reçu un traitement néoadjuvant à base de platine (Stevic et al., 2018). Ces études soulignent le potentiel des EV en tant que marqueur de surveillance du traitement TNBC.

I.2.6. Le suivi des patientes atteintes d'un cancer mammaire

La place de l'imagerie dans le suivi des patientes tient un rôle crucial, notamment pour contrôler l'efficacité des traitements et adapter si besoin la suite du protocole. Dans le cas d'un traitement néo-adjuvant, en plus de surveiller la réponse au traitement, l'imagerie permet une planification chirurgicale précise. Lors du suivi du patient, s'appuyer sur l'imagerie moléculaire de biomarqueurs dont la valeur pronostic est reconnue peut s'avérer crucial, notamment pour prédire l'évolution de la maladie et la réponse aux futurs traitements.

Après traitement et éradication d'un cancer mammaire primaire unilatéral sporadique, la prévention d'une rechute passe par un suivi méticuleux de la patiente par le biais d'imageries. Les directives cliniques actuelles soutiennent une mammographie annuelle des femmes après le traitement du cancer du sein primaire. Une variabilité existe dans les recommandations des lignes directrices pour le début, l'intervalle et l'arrêt de la surveillance. La plupart des lignes

directrices ne soutiennent pas l'utilisation de l'échographie dans la surveillance du cancer du sein et, des études supplémentaires sont nécessaires pour définir les caractéristiques des femmes qui pourraient bénéficier d'une surveillance par IRM. Les nouvelles données probantes sur les résultats de l'imagerie de surveillance suggèrent que des facteurs supplémentaires, y compris le profil clinique de la patiente (la biologie de la tumeur et le profil d'expression génique) ainsi que les traitements utilisés, méritent d'être pris en considération dans le choix des schémas de surveillance d'imagerie personnalisés après le traitement (Lam et al., 2017 ; Swinnen et al., 2018).

Parallèlement à la surveillance du sein traité, le sein controlatéral doit faire l'objet d'une surveillance attentive, puisque l'on se trouve dans une situation de dépistage typique, mais avec un facteur de risque extrêmement important constitué par le premier cancer. Ce risque étant durable, cette recherche doit être poursuivie indéfiniment, de façon à pouvoir, si possible, saisir ce deuxième cancer au stade infraclinique, même si ce n'était pas le cas pour le premier

I.2.6.1. La mammographie de suivi et les techniques associées

Pour suppléer la mammographie numérique standard, la mammographie 3D est la modalité au potentiel la plus prometteuse en tant que test de surveillance de première ligne ; Il a été démontré que son utilisation entraînait une diminution significative des taux de rappel par rapport à la seule utilisation de la mammographie numérique standard (Marionovich et al., 2018).

La mammographie spectrale avec rehaussement de contraste (CESM pour *Contrast Enhancement Spectral Mammography*) ou angio-mammographie à double énergie est une technique combinant la mammographie numérique standard à une imagerie du flux associé à la vascularisation. Après une injection de produit de contraste iodé, deux clichés sont réalisés : un cliché de haute énergie, au-delà du coefficient d'atténuation de l'iode (33,2 KeV), permettant d'obtenir les informations sur les structures vascularisées (prise de contraste iodée), et un cliché de basse énergie (comparable à celui d'une mammographie classique) pour les informations morphologiques. La soustraction numérique permet de mettre en évidence les structures hypervascularisées (James & Tennant, 2018). L'analyse des images permet d'étudier la morphologie et la distribution du rehaussement de contraste dans le sein. L'avantage de la technique est la possibilité de réaliser les clichés sur plusieurs incidences et sur les deux seins (possibilité de comparaison). Cependant, l'analyse de la cinétique de rehaussement n'est pas possible et la dose de rayonnement est augmentée (Phillips et al., 2018a ; 2018b).

I.2.6.2. L'IRM dans l'évaluation de la réponse au traitement

L'IRM s'avère plus précise que la mammographie ou l'échographie pour évaluer la réponse au traitement (Fig. 16). Cependant, l'IRM peut à la fois surestimer et sous-estimer la maladie résiduelle. La précision de l'IRM dépend de la morphologie de la tumeur, de l'histologie et du sous-type moléculaire. Les techniques d'IRM qui combinent des informations

fonctionnelles telles que la diffusion (DWI pour *Diffusion Weighted Images*), la perfusion (DCE pour *Dynamic Contrast Enhancement*) et l'hypoxie (BOLD pour *Blood Oxygen Level-Dependent*) permettent d'améliorer la spécificité de l'IRM, et tiennent une place importante dans l'évaluation de l'efficacité du traitement par le monitoring des changements fonctionnels intra-tumoraux.

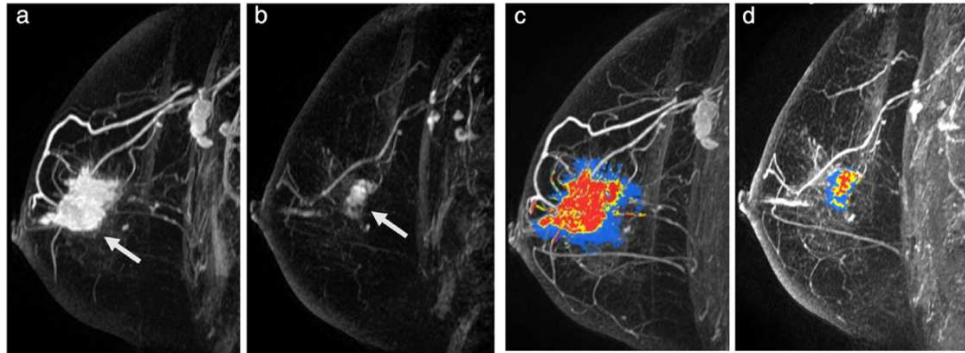


Figure 18 : Exemple de suivi d'un traitement par IRM. (a) Image de projection d'intensité maximale (MIP) du sein d'une femme de 57 ans atteinte d'un carcinome canalaire invasif avant chimiothérapie (b) Image MIP post chimiothérapie. Les mesures effectuées indiquent une réduction de 62% du diamètre initial de la tumeur, suggérant une réponse partielle. La volumétrie assistée par ordinateur (couleur rouge et jaune) montre une réduction de volume de 95% de 27,4 cm³ (c) à 1,5 cm³ (d). D'après Reig et al., 2020.

L'imagerie DWI est une méthode de caractérisation des tissus basée sur les libertés de diffusion des molécules d'eau dans les différents tissus quantifiées via la mesure de la diffusivité moyenne et du coefficient de diffusion apparent (ADC pour *Apparent Diffusion Coefficient*). Les tissus mammaires malins présentent une diffusion restreinte et des valeurs de l'ADC significativement plus faibles que celles des tissus mammaires normaux et bénins. L'avantage de l'imagerie DWI est qu'elle ne nécessite pas d'administration de produit de contraste. Là où il a été démontré que l'utilisation de gadolinium provoque un dépôt de gadolinium dans les tissus cérébraux, il y a un grand intérêt à réaliser une imagerie par résonance magnétique, qui se veut sensible, sans contraste. Dans une étude préclinique sur réalisée avec des souris porteuses d'un modèle de cancer du sein humain (MX-1) et traitées au cyclophosphamide, l'IRM DWI s'est avéré être un outil de choix pour le suivi tumoral dans un contexte néo-adjuvant. En corrélation avec les mesures standard de la réponse tumorale ainsi que le résultat global après analyse IHC, l'IRM DWI s'est avérée pertinente pour détecter les changements précoces dans le microenvironnement tumoral mammaire et évaluer la réponse au traitement (Lee et al., 2007), comme c'est également le cas pour l'IRM DCE (Yankeelov et al., 2007).

Malgré une sensibilité élevée dans le diagnostic du cancer du sein, l'imagerie DCE a une spécificité plus faible, ce qui laisse de la place pour de futurs développements. De plus, cette méthode d'imagerie fournit une visualisation volumétrique haute résolution des lésions ainsi que des schémas de rehaussement temporel en son sein, information qui a une valeur clinique pour la prise en charge de la maladie. L'amélioration du diagnostic et du pronostic grâce à l'utilisation de l'IRM DCE conduit à une utilisation en constante augmentation. Cependant, les

longs temps d'acquisition et le fait que les interprétations ne soient maîtrisées que par un faible nombre d'experts en font une procédure clinique coûteuse. En utilisant les données générées par l'IRM DCE chez 132 femmes atteintes d'un cancer mammaire localement avancé (Essai clinique I-SPY1, 2010-2026), une étude a pu mettre en évidence que l'utilisation de l'IRM DCE permettait d'améliorer la prédiction précoce de la pCR et la survie sans récurrence (RFS) après une chimiothérapie néoadjuvante par rapport aux modèles basés sur des caractéristiques d'imagerie agrégées analogues (Jahani et al., 2019).

Pinker et al. ont eu la possibilité d'étudier les bénéfices de l'imagerie DWI en pour la détection du cancer du sein en la comparant à l'imagerie DCE et en l'utilisant en complément de l'imagerie DCE. Sur les 110 tumeurs du sein détectées, 42 étaient bénignes et 58 étaient malignes. L'imagerie DCE s'est avérée être la plus sensible avec une sensibilité de détection de 100%. L'imagerie DWI, en tant que séquence autonome, était significativement moins sensible avec 80%, mais plus spécifique par rapport à l'imagerie DCE (78,6% vs 66,7%). Lorsque les deux séquences étaient utilisées de manière complémentaire en imagerie multiparamétrique, la sensibilité était de 96,7% avec une spécificité de 76,2%, traduisant une précision diagnostique de 88%, contre 86% et 80% pour l'imagerie DCE et DWI seule, respectivement (Pinker et al., 2018).

L'IRM BOLD, quant à elle, utilise la désoxyhémoglobine comme agent de contraste paramagnétique, ce qui crée des variations de sensibilité dans le champ magnétique et diminue ainsi le taux de relaxation transversale ($R2^*$) du sang et des tissus entourant les vaisseaux sanguins. L'augmentation de $R2^*$ reflète des niveaux de désoxyhémoglobine plus élevés, traduisant la présence d'hypoxie. Des séquences BOLD quantitatives ont été utilisées pour mettre en évidence le taux métabolique d'oxygène et la densité microvasculaire plus élevée dans les cancers du sein par rapport aux masses bénignes, confirmant que les cancers du sein consomment plus d'oxygène, sont plus hypoxiques et plus néo-vascularisés (Stadlbauer et al., 2019). Il existe peu d'études utilisant l'IRM BOLD dans l'évaluation de la réponse à la thérapie, mais une étude portant sur sept patients a révélé que des changements plus élevés de l'oxygène intra-tumoral lorsque le patient respirait à 100% de l'oxygène prédisaient une meilleure réponse au traitement (Jiang et al., 2013).

I.2.6.3. L'imagerie moléculaire

Par rapport aux modalités précédemment citées, l'imagerie moléculaire offre l'avantage d'être indépendante des changements anatomiques. Les changements physiologiques s'observent précocement lors de l'apparition d'un cancer. Ainsi, les radiotraceurs, non affectés par la densité mammaire, peuvent diffuser dans l'espace interstitiel et être absorbés par les cellules anormales avant l'apparition d'une masse distincte ou la mise en place d'une néovascularisation. Cependant cette technique de médecine nucléaire est réservée pour le suivi de la maladie, comprenant le bilan d'extension initial.

L'imagerie moléculaire du sein (MBI pour *Molecular Breast Imaging*/BSGI pour *Breast-Specific Gamma Imaging*) utilise des caméras γ à semi-conducteurs dans une configuration mammographique pour fournir des images fonctionnelles à haute résolution du sein. Cette technique se base sur l'utilisation d'une scintigraphie MIBI (*methoxy-isobutyl-isonitrile*) au ^{99m}Tc (*Technétium 99m*), un émetteur gamma unique de 140 keV avec une demi-vie de 6 heures. Utilisé en imagerie oncologique par Hassan et al. dans le cancer du poumon en 1989 (Hassan et al., 1989), ce traceur a longtemps été mis de côté avant d'être de nouveau utilisé. La limitation la plus importante de la MBI/BSGI est sa faible sensibilité pour les petites lésions. Avec une spécificité de 85,7%, l'utilisation de la MBI/BSGI est dotée d'une sensibilité de 90,7% pour les tumeurs de plus de 1 cm. Cependant, pour les tumeurs inférieures à 1 cm, sa sensibilité se voit chuter à 55,6% (Park et al., 2014).

L'imagerie PET (*Positron Emission Tomography*), extrêmement sensible, est utilisée pour le suivi de nombreux cancers, y compris les cancers du sein. Plusieurs radiotraceurs sont disponibles en imagerie PET, comme le ^{18}F FDG (Fluorodésoxyglucose), un analogue du glucose. L'imagerie moléculaire du cancer du sein avec le ^{18}F FDG discrimine les différences d'activité métabolique entre la tumeur et le tissu normal. Par conséquent, il améliore la détection du cancer, notamment dans le cadre de seins denses à la mammographie et permet de prévenir les récurrences (Kamel et al., 2003). Les premières données concernant le bénéfice du ^{18}F -FDG/PET dans la détection des cancers du sein ont montré une faible sensibilité en raison de la distance entre les seins des patientes et les collimateurs destinés à l'imagerie du corps entier. La mammographie par émission de positrons (PEM) a ainsi été développée ; Elle améliore la résolution spatiale (1 à 2 mm) par rapport à la TEP corps entier (4 à 6 mm) en mettant les seins en contact direct avec les détecteurs. Les limitations majeures de la PEM sont liées à la dose de rayonnement très élevée, les temps de jeûne et la durée de l'examen. Les progrès technologiques de ces dernières années ont conduit au développement de systèmes d'imagerie multimodaux comme la TEP/IRM. Cette double modalité combine la spécificité des données fonctionnelles de la TEP avec les informations anatomiques de l'IRM et améliore la précision du diagnostic/pronostic. Cette double technique diminue le nombre total d'examens d'imagerie séparés et réduit l'exposition aux rayonnements ionisants du scanner. Grueneisen et al. ont comparé l'imagerie intégrée TEP/IRM, la TEP/TDM et l'IRM seule du sein dans le cadre de la détection de lésions et de la stadification tumorale locale de patientes atteintes d'un cancer du sein primaire (Grueneisen et al., 2015). L'imagerie intégrée TEP/IRM et l'IRM ont identifié 47 des 49 (96%) patientes atteintes d'un cancer du sein, tandis que la TEP/TDM a identifié 46 des 49 (94%) patientes. Ces résultats soulignent, dans un contexte de diagnostic, le manque d'avantages de l'imagerie intégrée TEP/IRM pour la stadification tumorale locale des patientes atteintes d'un cancer du sein par rapport à l'utilisation de l'IRM seule. D'autres traceurs disponibles se sont avérés utiles pour détecter certains sous-types de cancer, parmi lesquels nous pouvons citer : le ^{18}F -fluciclovine, utilisé pour visualiser les cancers canaux et lobulaires invasifs du sein, souvent peu avides de ^{18}F -FDG (Ulaner et al., 2016) ; le 6a- ^{18}F fluoro-17b-œstradiol (^{18}F FES) utilisé en TEP/TDM pour localiser les tumeurs exprimant les récepteurs

aux œstrogènes (Chae et al., 2019) ; et le ^{18}F -fluoromisonidazole (FMISO) pour la détection d'une glycolyse accrue et d'une hypoxie tumorale (Xu et al., 2017).

Les nanotechnologies “théranostiques” appliquées à l'imagerie tumorale apparaissent prometteuses dans les études précliniques pour l'identification précoce des tumeurs primaires et des métastases tout en apportant une solution thérapeutique. En effet, les nanoparticules sont capables de cibler spécifiquement les métastases dans divers organes en s'y accumulant, permettant ainsi leur visualisation précise, tout en y délivrant des agents thérapeutiques. Fonctionnalisables, les nanoparticules peuvent être recouvertes de différents types de plusieurs constituants aux grés des besoins d'imagerie et des objectifs thérapeutiques échafaudés par les chercheurs. Par exemple, l'immobilisation de fluorophores organiques proche infrarouge (NIF pour *Near Infrared*) Cy5-NH₂ (dérivé aminé de cyanine 5) sur des nanoparticules d'or préalablement revêtues de polyaminocarboxylate, Au@DTDTPA et Au@TADOTAGA, confère à ces radiosensibilisateurs des propriétés de fluorescence qui peuvent être exploitées pour suivre leur internalisation dans les cellules cancéreuses, déterminer leur localisation cellulaire par microscopie à fluorescence, et pour le suivi de leur accumulation dans les tumeurs après injection intraveineuse (Jiménez Sánchez et al., 2019). En ciblant les cellules souches cancéreuses par exemple, les nanoparticules traitent les tumeurs résistantes avec une toxicité minimale pour les tissus/organes sains. Les nanoparticules peuvent également activer les cellules immunitaires pour initier une réponse immunitaire anti-tumorale. En raison de leurs caractéristiques multifonctionnelles, contrôlables et traçables, l'imagerie et la thérapie basées sur les nanotechnologies constituent une approche prometteuse pour la recherche et le traitement du cancer, notamment pour les cancers qui se sont disséminés (Mu et al., 2017 ; Şen et al., 2021). Il a été mis en évidence que certaines nanoparticules aux caractéristiques spécifiques (par exemple les nanoparticules d'or (Au) comprises entre 10 et 30nm) étaient capables de créer des espaces micrométriques entre les cellules endothéliales. Cet effet appelé fuite endothéliale induite par les nanoparticules (NanoEL) engendre une accessibilité à la tumeur même en l'absence d'effet EPR (*Enhanced Permeability and Retention*) (Setyawati et al., 2017). Néanmoins, le NanoEL pourrait favoriser l'intravasation de certaines cellules cancéreuses dans le système vasculaire environnant, puis l'extravasation, accélérant ainsi les métastases (Peng et al., 2019). Il a été montré que les nanoparticules de dioxyde de titane, de silice et d'or injectées par voie intraveineuse induisaient une fuite endothéliale par perturbation des interactions homophiles VE-cadhérine/VE-cadhérine au niveau des jonctions adhérentes. L'utilisation de ces nanoparticules induit l'intravasation et l'extravasation des cellules cancéreuses du sein dans des modèles animaux, augmentant l'étendue des métastases existantes et favorisant l'apparition de nouveaux sites métastatiques (Peng et al., 2019). Il convient de chercher à détourner ces effets à notre avantage, en contrôlant finement l'application de ces nanomatériaux. Par exemple, cet effet pourrait permettre l'accès aux tumeurs dans leur premiers stades de développement en l'absence d'effet EPR. Toutefois, une compréhension des mécanismes impliquant l'effet NanoEL et le comportement des cellules endothéliales dans ce contexte doit advenir afin de minimiser les conséquences pathologiques de cet effet et maximiser son potentiel (Setyawati et al., 2014).

II. Le microenvironnement tumoral, acteur crucial de la progression tumorale.

L'étude du microenvironnement tumoral a pris ces dernières années une place primordiale dans le domaine de la recherche sur le cancer. En effet, il est désormais admis que le caractère invasif d'un cancer primitif est déterminé non seulement par le génotype des cellules tumorales, mais aussi par leurs interactions avec l'environnement extracellulaire. Sachant que le pronostic de la maladie cancéreuse est lié au caractère invasif de la tumeur primitive et à ses éventuelles métastases, l'acquisition de connaissances fondamentales sur le rôle du microenvironnement tumoral dans l'oncogenèse est essentiel pour l'amélioration des thérapies actuelles et le développement de nouvelles approches thérapeutiques.

II.1. La progression tumorale

II.1.1. L'état précancéreux

Tous les épithéliums reposent sur une membrane basale (MB) qui sépare les cellules épithéliales du tissu conjonctivo-vasculaire sous-jacent. Les étapes du développement d'un carcinome avant la phase d'invasion correspondent aux étapes strictement intra-épithéliales de la carcinogenèse. Un état dit précancéreux est associé à un risque significativement élevé de survenue du cancer, mais n'est pas à cet instant défini comme tel. Ce déterminant permet simplement de qualifier des populations à risque avéré pour un cancer en particulier. On parle de lésions précancéreuses lorsqu'il existe des anomalies histopathologiques qui peuvent évoluer en cancer (exemple des lésions précancéreuses dues au HPV (Cubie, 2013)). Certaines lésions précancéreuses peuvent être dysplasiques. Les dysplasies, décrites uniquement dans les épithéliums, sont des troubles acquis de la multiplication cellulaire résultants d'anomalies génétiques altérant le contrôle de la prolifération cellulaire. Inconstamment et dans un délai très variable, ces lésions peuvent se transformer en tumeurs par accumulation d'anomalies génétiques supplémentaires et décisives. Le grade de la lésion, déterminée par un anatomo-pathologiste, permettra d'en évaluer le risque de transformation maligne.

Quelle est l'origine du cancer ?

Le concept selon lequel presque toutes les tumeurs humaines ont pour origine une succession d'expansions clonales aberrantes est bien établi (Friedman & Fialkow, 1976). À l'image de la théorie de l'évolution des espèces selon Darwin, le développement d'une tumeur maligne est un processus de sélection de cellules ayant acquis des anomalies leur conférant un avantage de croissance. Bien qu'il soit probable que les cellules issues d'un premier clone muté gardent une trace des premiers changements génétiques ou épigénétiques qui ont conduit à son expansion dérégulée, il est important de se rappeler qu'au moment où un cancer est détectable pour la première fois, il contiendra déjà plusieurs millions, voire des milliards de cellules produites par des dizaines de divisions amplificatrices. Au cours de ces processus, une diversification et une évolution génétiques supplémentaires apparaissent du fait de taux normaux de réplication incorrecte de l'ADN (estimés à $2,3 \times 10^{-8}$ mutations par nucléotide et

par génération de cellules) et d'un contrôle potentiellement altéré de la stabilité de l'ADN et des processus de réparation (Nachman & Crowell, 2000). D'autres mécanismes comme l'âge de l'individu et les différents facteurs environnementaux auxquels il est exposé ou encore la spécificité du tissu entrent en jeu (Whiteman & Wilson, 2016).

Par ailleurs, la théorie des CSC, postule que la hiérarchie de la différenciation cellulaire est maintenue ou mimée dans les cancers (Pradeu et al., 2016). Historiquement, le premier modèle de progression tumorale proposé a été le modèle stochastique d'évolution clonale qui suppose que chaque cellule cancéreuse a la capacité de former un clone tumorigène (Nowell, 1976). Depuis la fin des années 1990, ce modèle est défié par une vision hiérarchique de la tumeur dans laquelle toutes les cellules tumorales ne sont fonctionnellement pas équivalentes. A l'origine une seule cellule souche cancéreuse possédant des propriétés souches, serait tumorigénique face aux autres non-CSC, incapables d'initier et de propager la tumeur. Les CSC s'auto-renouvèleraient afin de maintenir le réservoir de CSC et se différencieraient en donnant naissance à l'ensemble des cellules tumorales de manière unidirectionnelle. Dans ce modèle hiérarchique, les propriétés fonctionnelles des CSC seraient à l'origine de l'hétérogénéité intra-tumorale. Les cellules cancéreuses pourraient ainsi être initiées puis entretenues par une sous-population de CSC au sein d'une tumeur donnée (Valent et al, 2012). Les traitements conventionnels cibleraient la masse tumorale composée de non-CSC et épargneraient les rares CSC. Ainsi, les CSC seraient les seules responsables de la résistance, de la rechute et de la progression de la maladie (Visvader & Lindeman, 2008). Par conséquent et théoriquement, les thérapies anti-CSC permettraient d'éliminer la racine du cancer.

II.1.2. Le cancer et ses caractéristiques distinctives

Pour organiser le volume croissant de connaissances concernant la biologie caractérisant les cellules cancéreuses et orienter les futures études sur la biologie du cancer, Hanahan et Weinberg ont d'abord proposé les marques de fabrique du cancer ou *Hallmarks of Cancer* en 2000 (Hanahan & Weinberg, 2000) (avec une mise à jour en 2011 (Hanahan & Weinberg, 2011)).

La proposition des *Hallmarks of Cancer* unifie les voies moléculaires qui contribuent aux propriétés fondamentales des cellules cancéreuses (Fig. 19). La version publiée en 2000 comprenait : (1) l'autosuffisance en signaux de croissance ; (2) l'insensibilité aux signaux anti-prolifératifs soit la soustraction des gènes suppresseurs de tumeur ; (3) l'invasion tissulaire et la dissémination métastatique ; (4) l'acquisition d'une immortalité répliative ; (5) l'induction d'une angiogenèse soutenue ; et (6) le fait d'éluder l'apoptose. En 2011, deux caractéristiques émergentes – (7) la dérégulation du métabolisme énergétique cellulaire et (8) l'échappement à la surveillance immunitaire - et deux caractéristiques habilitantes – (9) l'instabilité et les mutations du génome et (10) l'inflammation tumorale - ont été ajoutées à ce cadre. (Ryan & Faupel-Badger, 2016). Nous allons détailler ces caractéristiques pour tenter de définir ce qu'est le cancer.

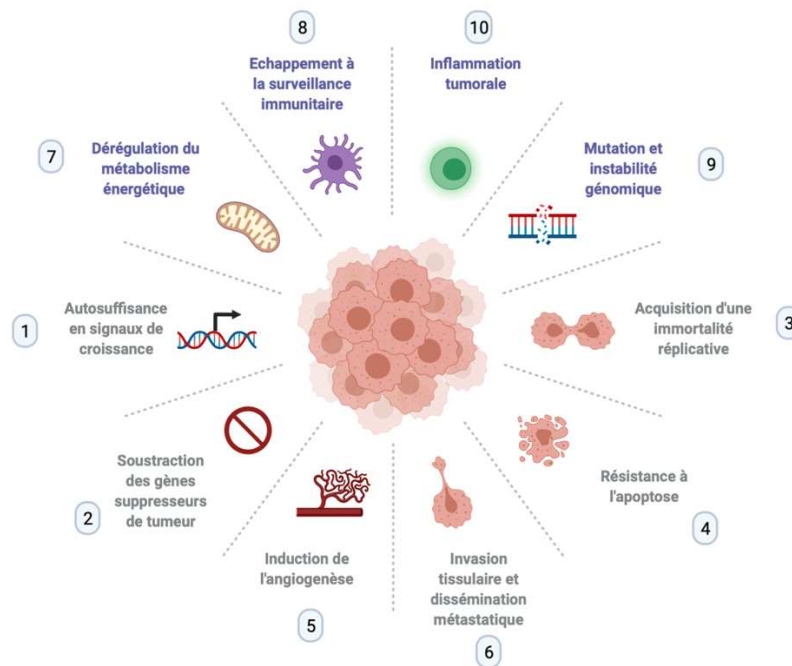


Figure 19 : Caractéristiques du cancer selon Hanahan & Weinberg.
Créée sur BioRender.com.

(1) L'auto-suffisance en signaux de croissance

La capacité à maintenir un état de prolifération continu et illimité est une des caractéristiques fondamentales des cellules cancéreuses. Les cellules normales ont besoin de signaux de croissance mitogénique pour passer d'un état de repos à un état de prolifération active. Ces signaux sont transmis dans la cellule par des récepteurs transmembranaires qui se lient à diverses classes de molécules de signalisation, comme des facteurs de croissance diffusibles, des composants de la matrice extracellulaire (MEC) ou encore des molécules d'adhésion. Les tissus normaux peuvent ainsi réguler avec précision l'équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire programmée. En ce qui concerne les cellules tumorales, elles sont capables de générer leurs propres signaux de croissance, réduisant ainsi leur dépendance à la stimulation de leur microenvironnement tissulaire normal. Cette non-dépendance des signaux exogènes perturbe l'homéostasie cellulaire qui assure la congruence du comportement de divers types de cellules dans un tissu. Pour atteindre cette autonomie, les cellules tumorales acquièrent la capacité de stimulation autocrine c'est-à-dire qu'elles synthétisent les facteurs de croissance auxquels elles répondent, créant leur propre boucle de signalisation rétroactive. De plus, elles sont en mesure de stimuler la sécrétion de facteurs de croissance par les cellules saines qui deviendront rapidement subverties et d'augmenter leur expression membranaire de récepteurs aux facteurs de croissance pour devenir plus sensibles à leurs niveaux environnants (Hanahan & Weinberg, 2000).

Par exemple, le facteur de transcription STAT3 est induit par des récepteurs ayant une activité kinase intrinsèque tels que l'EGFR et le VEGFR. Dans 40% des cancers du sein, STAT3

est activé de manière constitutive et sa signalisation guide l'oncogenèse du cancer du sein. Notamment, l'activation de la voie IL-6/JAK/STAT3 initiée par la liaison de la famille des cytokines incluant l'IL-6 à leurs récepteurs est impliquée dans le développement du cancer du sein. La signalisation STAT3 aberrante favorise la progression tumorale mammaire par dérégulation de l'expression de gènes cibles en aval qui contrôlent la prolifération cellulaire (Bcl-2, Bcl-xL, Survivin, Cycline D1, c-Myc, Mcl-1), l'angiogenèse (HIF1- α , VEGF), ou encore l'EMT (Vimentine, TWIST, MMP-9, MMP-7) (Banerjee et Resat, 2016).

D'autre part, l'activation incontrôlée de la voie MEK/ERK qui survient de manière autocrine ou par suractivation des récepteurs membranaires, est un événement fréquemment retrouvé dans les cellules cancéreuses. Cette voie peut aussi être activée après une ou plusieurs mutations des gènes RAS, B-RAF ou MEK. La voie RAS-RAF-MEK-ERK est altérée dans environ 40% des cancers humains, principalement en raison de mutations dans BRAF (10%) et son activateur en amont RAS (30%) (Santarpia et al., 2012).

Une signalisation indépendante du ligand peut également être obtenue par une modification structurale des récepteurs ; par exemple, des versions tronquées du récepteur EGF dépourvues d'une grande partie de son domaine cytoplasmique s'activent de manière constitutive.

Les cellules cancéreuses peuvent également changer l'expression de certains récepteurs matriciels (notamment les intégrines), en favorisant ceux qui transmettent des signaux de croissance (Lukashev & Werb, 1998 ; Giancotti & Ruoslahti, 1999). Ces récepteurs de surface cellulaire hétérodimériques bifonctionnels lient physiquement les cellules à la MEC et permettent la transduction de signaux intracellulaires qui influencent le comportement cellulaire, allant de la quiescence dans les tissus normaux à la motilité ou la prolifération dans les tissus tumoraux. Inversement, l'échec des intégrines à forger ces liens extracellulaires peut altérer la motilité cellulaire, induire l'apoptose ou provoquer l'arrêt du cycle cellulaire (Giancotti & Ruoslahti, 1999).

(2) L'insensibilité aux signaux anti-prolifératifs

Dans un tissu normal, de multiples signaux anti-prolifératifs solubles immobilisés dans la MEC et sur les surfaces des cellules voisines agissent pour maintenir la quiescence cellulaire et l'homéostasie tissulaire. Lors de la phase G1 du cycle cellulaire, les cellules s'imprègnent de leur environnement extracellulaire, intègrent les signaux pro ou anti-mitogéniques, et décident de proliférer, d'être au repos ou d'entrer dans un état post-mitotique. Les cellules cancéreuses naissantes doivent échapper aux éventuels signaux anti-prolifératifs pour se multiplier. Ainsi, en plus de leur capacité à activer constitutivement des voies de signalisation promouvant la prolifération cellulaire, elles parviennent à se soustraire aux signaux anti-prolifératifs, potentialisant d'autant plus leur survie et leur prolifération. Ces signaux inhibiteurs de croissance issus des gènes suppresseurs de tumeur sont perçus par des récepteurs transmembranaires qui activent des voies de signalisation intracellulaires.

Des dizaines de gènes suppresseurs de tumeurs ont pu être mis en évidence tels que, la protéine pRB (*RB*) et la protéine p53 (*TP53*). Le gène suppresseur de tumeur *TP53* réagit en fonction du stress ou d'anomalies provenant du milieu intracellulaire. Notamment, à la suite d'une accumulation des dommages de l'ADN ou d'un manque de nutriments essentiels (nucléotides, glucose, oxygène), p53 induit un blocage transitoire du cycle cellulaire au niveau des phases G1 et G2. Cet arrêt de la division cellulaire est mis à profit par la cellule pour induire une réponse de type SOS, permettant la réparation des lésions. Dans d'autres cas, si des dégâts irréparables sont détectés, p53 induit l'apoptose des cellules (Yonish-Rouach et al, 1991). Malheureusement, la fonction de *TP53* est altérée dans plus de 50% des cancers humains (Bérout & Soussi, 1998), conduisant à une prolifération incontrôlée des cellules malignes (Olivier et al., 2010). Concernant le gène *RB*, il intègre des signaux provenant de la MEC permettant une régulation négative du cycle cellulaire. Lorsque pRB est dans un état hypophosphorylé, elle bloque la prolifération en séquestrant et en modifiant la fonction des facteurs de transcription E2F essentiels pour la progression de la phase G1 et le passage de la transition G1/S. De ce fait, les cellules cancéreuses présentant une anomalie dans la signalisation associée à pRB se soustraient d'un point de contrôle du cycle cellulaire, menant à une prolifération non contrôlée (Burkhart & Sage, 2008).

(3) L'acquisition d'une immortalité répllicative

Les cellules normales de l'organisme ne peuvent réaliser qu'un nombre limité de cycles de croissance et de division. À chaque cycle cellulaire, les télomères qui protègent l'extrémité des chromosomes (Blasco, 2005), se raccourcissent un peu plus. Au bout d'un certain nombre de cycles cellulaires, les télomères sont tellement raccourcis qu'il y a un risque de perdre de l'information génétique. La cellule entre alors en crise télomérique. Deux issues sont alors possibles : (1) la cellule entre en sénescence, bloquant définitivement sa capacité à proliférer ; (2) elle déclenche sa mort par apoptose. Le nombre de cycles cellulaires pouvant être effectués par la cellule se voit donc limité par la longueur de ses télomères.

Dans de rares cas, certaines cellules s'individualisent d'une population en état de crise et échappent au programme de mort cellulaire au profit d'un potentiel réplicatif illimité. Cette transition, nommée l'immortalisation, est caractéristique des lignées cellulaires (utilisées en culture *in vitro* par exemple) et correspond à une capacité à proliférer sans s'orienter vers un état de sénescence ou de mort cellulaire. Depuis de nombreuses années, il est largement admis que les cellules cancéreuses déjouent cette barrière imposée par le raccourcissement des télomères. La télomérase, polymérase à ADN spécialisée dans l'ajout de répétitions hexanucléotidiques aux extrémités télomériques des chromosomes, est exprimée et fonctionnelle dans environ 90% des cellules immortalisées, y compris dans les cellules tumorales humaines, alors qu'elle est absente ou très faiblement exprimée dans les cellules saines. Les seules cellules humaines qui normalement possèdent cette protéine sont les cellules souches puisque leur rôle est de permettre le maintien et la régénération des tissus chez l'adulte. En permettant l'ajout de répétitions hexanucléotidiques au niveau des télomères, cette enzyme évite leur érosion

progressive et naturelle. Les dernières avancées dans ce domaine s'intéressent à la sous-unité TERT (*TElomerase Reverse Transcriptase*) de la télomerase dont l'activation est une étape critique dans la plupart des cancers humains. Des mutations génétiques de la séquence TERT sont très fréquemment observées dans les cellules cancéreuses et permettent son expression constitutive, conduisant à une activité télomérase continue. Toutefois, l'activité moléculaire de cette sous-unité dans la tumorigenèse reste encore aujourd'hui mal comprise (Akincilar et al., 2016).

(4) La résistance à l'apoptose

En 2012, des programmes génétiques de mort cellulaire ancestraux ont été identifiés chez les métazoaires (Bender et al. 2012). Depuis, de nombreuses voies génétiquement programmées différents de mort cellulaire ont été mis en exergue, notamment l'apoptose, l'anoïkose (Frisch & Screaton, 2001), la nécroptose (Zhou & Yuan 2014) et la ferroptose (Green & Llambi 2015). Les nombreux événements caractéristiques de la cancérogenèse, incluant l'activation constitutive d'oncogènes, la croissance indépendante des facteurs de croissance, l'invasion locale et la dissémination métastatique, engendrent inévitablement une signalisation apoptotique à un moment donnée. Pour survivre, les cellules malignes doivent d'une manière ou d'une autre se soustraire de ce stress apoptotique. Elles développent ainsi diverses stratégies pour échapper à l'apoptose.

La perte de fonction de suppresseurs de tumeur (comme *TP53* ou *RB*) reste encore un des mécanismes les plus décrits. Toutefois, les cellules tumorales peuvent également surexprimer des signaux anti-apoptotiques (comme Bcl-2 et Bcl-xL), inhiber l'expression de facteurs pro-apoptotiques (comme Bax, Bim et Puma) ou encore court-circuiter le programme apoptotique extrinsèque (Hanahan & Weinberg, 2011). Une atténuation de l'apoptose a été mise en évidence dans les tumeurs les plus agressives ou ayant acquis des résistances aux traitements anti-cancéreux (Lowe et al., 2004). Notamment, il semble que la chimiosensibilité soit dépendante de la voie apoptotique mitochondriale. Bien qu'il existe sans aucun doute d'autres facteurs pertinents spécifiques aux médicaments et aux cellules, les auteurs ont montré que l'amorçage mitochondrial pouvait prédire la sensibilité au schéma de chimiothérapie. Ces données ébauchent une explication quant aux variations de l'indice thérapeutique dans la chimiothérapie anti-cancéreuse (David & De vos, 2012, Ni Chonghaile et al., 2011).

Par ailleurs, il semble intéressant d'évoquer l'anoïkis, qui se définit comme une mort cellulaire programmée induite par une perte d'adhérence cellulaire à la matrice (Frisch & Screaton, 2001). Ce mécanisme est critique dans le cadre de l'invasion et la dissémination métastatique, pour empêcher la croissance cellulaire indépendante de l'adhérence, l'attachement à une matrice inappropriée, et ainsi la potentielle colonisation d'un site secondaire (Taddei et al., 2012). Les cellules cancéreuses développent une résistance à l'anoïkis par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes, tels que la modification de leur répertoire d'intégrines ou la mutation/régulation positive d'enzymes clés impliquées dans leur signalisation, l'activation de signaux favorisant la survie cellulaire via des boucles autocrines, l'activation d'oncogènes ou la

surexpression de récepteurs aux facteurs de croissance. L'exemple de la modulation de l'expression de l'intégrine $\alpha v \beta 3$ dans ce contexte est intéressant car son inhibition permet l'acquisition d'une résistance à l'anoïkis dans les carcinomes intestinaux; alors que sa surexpression dans les mélanomes aboutira au même rôle (Morozevich et al., 2003), favorisant ainsi les processus d'invasion et de dissémination métastatique (Felding-Habermann et al., 2002). De nombreux travaux ont mis en évidence des miARN (ARN non codants, régulant l'expression de gènes au niveau post-transcriptionnel) dans la régulation de la composition de la MEC et dans l'acquisition d'une résistance à l'anoïkis (Malagobadan et al., 2015). En outre, le microenvironnement tumoral est également impliqué dans la résistance à l'anoïkis des cellules tumorales voisines, en modulant la rigidité matricielle, en augmentant le stress oxydatif, en produisant des facteurs solubles de survie, en déclenchant l'EMT, en soutenant la capacité d'auto-renouvellement ainsi qu'en contribuant aux dérégulations métaboliques des cellules cancéreuses. Tous ces événements aident à l'inhibition de l'apoptose et le maintien des signaux de survie après le détachement cellulaire, empêchant l'anoïkis de se produire (Paoli et al, 2013).

(5) L'induction de l'angiogenèse

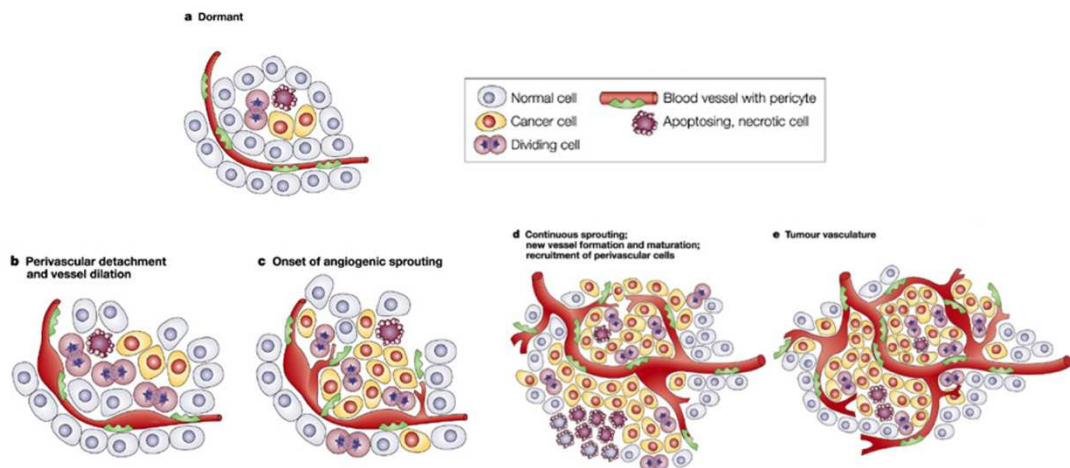


Figure 20 : Induction de l'angiogenèse tumorale. D'après Bergers & Benjamin, 2003.

Un des mécanismes essentiels, impliqué dans la progression tumorale est l'induction de l'angiogenèse, qu'il convient, selon moi, de présenter avant l'invasion tissulaire et la dissémination métastatique, caractéristique qui ne saurait exister sans elle. En 1971, Folkman publie l'hypothèse selon laquelle une tumeur ne peut pas excéder 1 à 2 mm³ sans recruter de nouveaux vaisseaux sanguins (Folkman, 1971). Il introduit la dépendance du cancer à l'angiogenèse. Effectivement, il arrive un moment au cours de la tumorigenèse où la masse tumorale en croissance ne peut plus se satisfaire des apports nutritifs dont elle dispose. Pour que sa croissance perdure, une tumeur doit bénéficier d'un apport en nutriments et en oxygène mais elle doit aussi pouvoir évacuer ses déchets métaboliques. Pour pallier ces besoins exacerbés, une commutation médiée par l'hypoxie se produit au sein de la masse tumorale non irriguée en activant les cellules endothéliales (EC pour *Endothelial Cell*) des vaisseaux environnants. On parle du *switch angiogenic* (Bergers & Benjamin, 2003).

Le manque d'oxygène induit la stabilisation du facteur 1 inductible par l'oxygène (HIF-1) au sein des tissus tumoraux conduisant à la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques associée à une dégradation localisée de la MEC et de la MB (Liao & Johnson., 2007). Ces événements permettent et encouragent la migration des EC recrutées au sein du stroma tumoral. La néo-angiogenèse fait intervenir de nombreux processus, des plus classiques au plus élaborés, associés à l'intervention de multiples acteurs moléculaires pour parvenir à ses fins (Carmeliet et al., 2011). Malheureusement ou heureusement, l'angiogenèse tumorale se veut chaotique et le remodelage perpétuel qui la caractérise conduit souvent à une perfusion capillaire intra-tumorale inopérante. Le système vasculaire des tumeurs solides est morphologiquement aberrant et caractérisé par des vaisseaux perméants et fragiles. Par ailleurs, le remodelage constant des vaisseaux entraîne des hémorragies spontanées et une augmentation de la pression du liquide interstitiel dans l'environnement tumoral (Hlushchuk et al., 2016). Outre l'influence des cellules tumorales, le microenvironnement joue également un rôle crucial dans le développement et la modulation de l'angiogenèse tout au long de ses différentes étapes (Jiang et al., 2020). Les cellules endothéliales tumorales, dont les caractéristiques seront détaillées dans le chapitre suivant, interagissent continuellement avec les cellules tumorales ainsi qu'avec les cellules stromales, telles que les fibroblastes, les adipocytes ou encore les cellules immunitaires infiltrantes. A leur tour, ces différents types cellulaires sont capables de contribuer à l'angiogenèse tumorale en agissant directement ou indirectement sur les cellules du compartiment vasculaire.

(6) L'invasion tissulaire et la dissémination métastatique

Une fois que les cellules tumorales acquièrent la capacité de se détacher de la tumeur primaire via l'EMT, elles sont en mesure de pénétrer les tissus environnants. Phénomène physiologique de développement et de cicatrisation des plaies, l'EMT se voit également associée à la malignité, à l'invasion et aux métastases.

Les voies de signalisation activées lors de l'EMT des carcinomes présentent des similitudes avec celles engagées au cours du développement embryonnaire. Les médiateurs phares de l'EMT constituent la signalisation du TGF- β (*Transforming Growth Factor β*), de Notch et de Wnt ; mais l'EMT se voit également influencée par le microenvironnement tumoral, notamment par l'hypoxie ou encore l'expression différentielle de miARN (Taylor et al., 2010) (Fig. 21). L'activation des facteurs transcriptionnels Snail, Zeb et Twist, dont l'expression différentielle conduit à l'EMT, est commune à toutes ces voies. En effet, la signalisation à la fois canonique et non canonique du TGF- β conduit à des changements dans l'expression génique de ces facteurs (Taylor et al., 2010). De même, la signalisation Notch agit sur NF- κ B, induisant la transcription de SNAI1, SNAI2 (Slug), Twist et Zeb1/2 ; ainsi que l'augmentation de la production de cytokines et de la survie cellulaire. La voie Wnt, souvent dérégulée dans les cancers, conduit à l'induction de l'expression de SNAI1 entraînant une régulation négative de la E-cadhérine/ β -caténine. Un stimulus externe, comme l'induction de l'hypoxie, conduit à des changements dans la fonction mitochondriale, induisant l'expression de Zeb1 via HIF-1 (Felipe Lima et al., 2016).

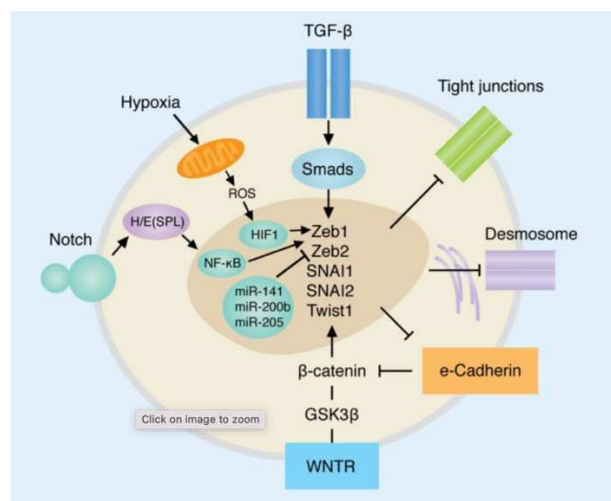


Figure 21 : Induction de l'EMT par la signalisation du TGF- β , Notch et WNT.

D'après Felipe Lima et al., 2016.

Morphologiquement, l'EMT est caractérisée par la dédifférenciation d'un phénotype épithélial à mésenchymateux, marquée par une diminution de l'expression de la E-cadhérine au profit de la N-cadhérine, de la vimentine et de certaines protéases cellulaires (Fig. 22). Aujourd'hui, des preuves suggèrent que le programme dynamique et plastique de l'EMT génère un spectre d'états cellulaires intermédiaires entre les états cellulaires distincts épithéliaux et mésenchymateux. L'EMT des carcinomes est également associée à l'acquisition de propriétés souches malignes par reprogrammation de cellules progénitrices en cellules souches, ainsi qu'à l'acquisition de la résistance à la chimiothérapie et aux thérapies ciblées. Par ailleurs, plusieurs études démontrent l'implication de la surveillance du système immunitaire dans l'EMT.

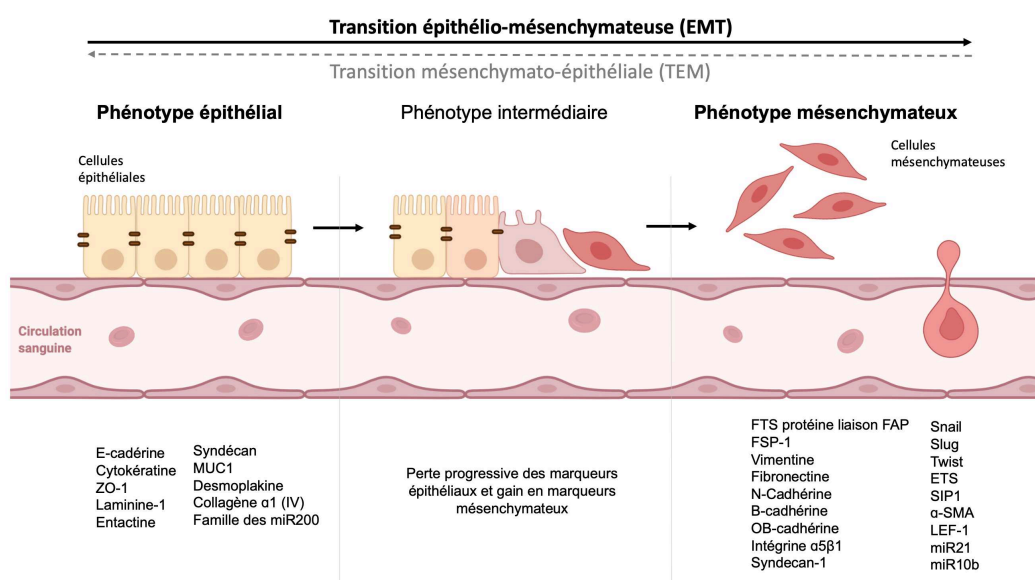


Figure 22 : La transition épithélio-mésenchymateuse.

Adaptée d'après Kalluri et al., 2009, créée sur BioRender.com.

Une fois initiée, la cascade métastatique peut être divisée en 4 processus principaux : L'invasion, l'intravasation, l'extravasation et la colonisation d'un site distant. L'invasion débute par une prolifération intra-épithéliale, puis, l'acquisition de nouvelles propriétés biologiques

permettant à certaines cellules tumorales de dégrader la lame basale puis d'envahir le tissu conjonctif sous-jacent (Martin et al., 2013). Dès que la MB est rompue, le cancer est dit invasif. Les cellules progressent dans la MEC, jusqu'à l'étape fatidique de la dissémination : l'intravasation, qui correspond à leur pénétration dans la circulation sanguine ou lymphatique systémique. La diaphonie stromale associée à une angiogenèse et lymphogenèse accrues contribuent à la dissémination métastatique en fournissant aux cellules mobiles les moyens et de nombreuses opportunités d'entrer dans la circulation (Paduch, 2016). Une fois dans la circulation, les cellules cancéreuses naviguent à travers le système circulatoire jusqu'à s'immobiliser à proximité d'un site secondaire pour procéder à leur extravasation, à la dégradation de la MB vasculaire et puis de la MEC pour s'inviter dans le tissu sous-jacent distant du site primaire et tenter de s'y développer.

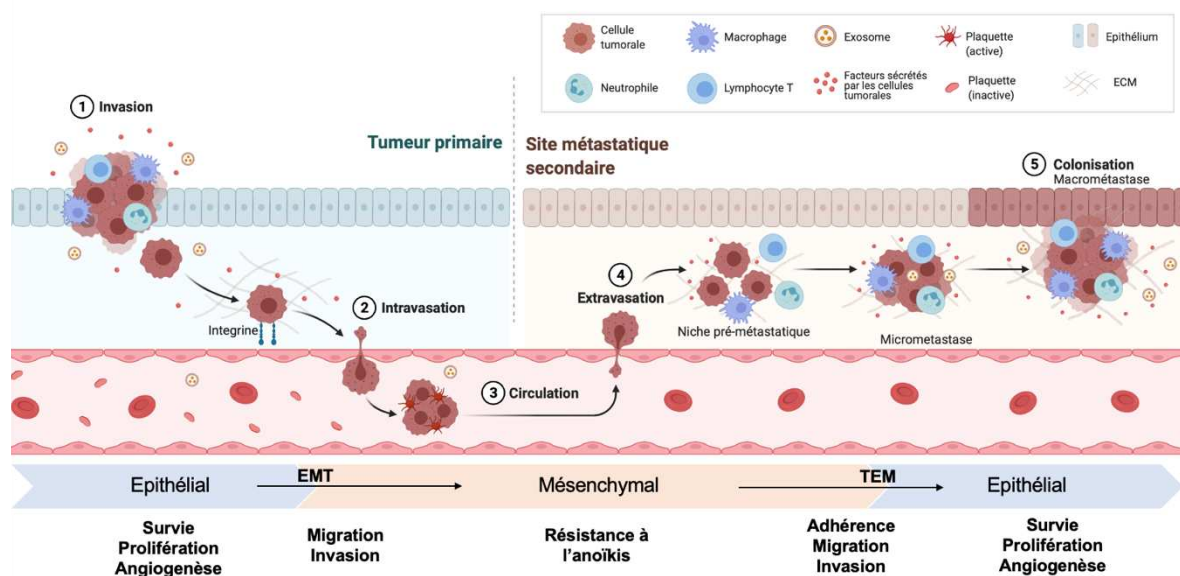


Figure 23 : La cascade métastatique.

Adaptée d'après Chan & Wang, 2015, créée avec BioRender.com.

Dans la circulation les cellules cancéreuses ne prolifèrent pas et doivent résister à de nombreuses agressions mécaniques : pression sanguine, élévation et friction dans les capillaires, c'est pourquoi elles ont tendance à s'agréger ; le terme d'embolies néoplasiques est alors employé. Au sein des vaisseaux, les cellules cancéreuses se retrouvent en contact direct avec des cellules immunitaires circulantes qui parviennent à lyser certaines d'entre elles. L'agrégation plaquettaire qui peut être induite au contact des cellules tumorales pourrait les protéger des agressions mécaniques, les isoler des cellules cytotoxiques et favoriser leur adhérence aux parois vasculaires. Une étude récente révèle qu'une agrégation plaquettaire accrue est associée au statut métastatique du cancer du sein, mais pas au sous-type (Singla et al., 2020). Lorsque les cellules tumorales circulantes se préparent à l'extravasation, leurs interactions avec les EC, notamment via la E-cadhérine (Na et al., 2020), la E-selectine (Zhong et al., 2017), CD44 (Offeddu et al., 2021) et les intégrines (Sökeland et al., 2019), sont primordiales, et les mécanismes impliqués apparaissent proches de ceux mis en jeu lors de l'extravasation des leucocytes vers les sites inflammatoires.

L'invasion du site secondaire est un phénomène actif complexe qui nécessite un écosystème favorable à la survie et la prolifération des cellules tumorales. Les cellules ont besoin de s'ancrer dans le tissu via une régulation fine de leurs propriétés d'adhérence et de bénéficier d'un apport en facteurs de croissance pour survivre et proliférer. De plus, elles doivent échapper à la réponse immunitaire anti-tumorale et induire l'angiogenèse lorsque la métastase dépasse 3 mm de diamètre. À ce stade, beaucoup de cellules cancéreuses meurent par apoptose ; certaines restent en dormance ou donnent des micrométastases indétectables (à l'équilibre entre la prolifération et l'apoptose). Seule une minorité de cellules donnera naissance à des métastases actives cliniquement détectables, à la suite de la réacquisition partielle ou complète d'un phénotype épithélial (transition mésenchymo-épithéliale (MET pour *Mesenchymal-Epithelial Transition*) (Klein-Goldberg et al., 2014).

En 1889, Paget a comparé les cellules tumorales métastatiques à des graines largement disséminées, qui ne poussent que sur des sols fertiles (Paget, 1989). La distribution des métastases vers certains organes est un processus non aléatoire appelé « organotropisme métastatique » (Lu & Kang, 2007) dépendant de multiples facteurs tels que les sous-types de cancer, les caractéristiques moléculaires des cellules cancéreuses, le microenvironnement immunitaire de l'hôte et la diaphonie avec les cellules locales. Les tumeurs primaires sont en mesure de créer un microenvironnement favorable, appelée niche pré-métastatique, dans les organes secondaires et les sites tissulaires pour l'induction de métastases ultérieures. La niche pré-métastatique peut être amorcée et établie par une interaction complexe entre les facteurs primaires dérivés de la tumeur comme les exosomes contenant des miARN (Wong et al., 2020), la mobilisation de cellules dérivées de la moelle osseuse et les composants du stroma local (Liu & Cao, 2016).

Pour illustrer ce concept, le cancer du sein a tendance à métastaser à distance dans les os (70%), le cerveau (10 à 30%), le foie (30%), les poumons et les ganglions lymphatiques (Liu & Cao, 2016). Il a été mis en évidence que cette répartition était cependant dépendante du sous-type. Par exemple, tous les sous-types sont sujets aux métastases osseuses, mais les sous-types luminaux et HER2+ le sont en particulier. Cette étude a également révélé que les patientes atteintes d'un TNBC présentaient principalement des métastases pulmonaires, mais qu'elles étaient aussi sujettes aux métastases cérébrales et ganglionnaires. Les tumeurs basales, quant à elles, sont associées à un faible taux de métastases hépatiques et osseuses (Wu et al., 2017 ; Kennecke et al., 2010).

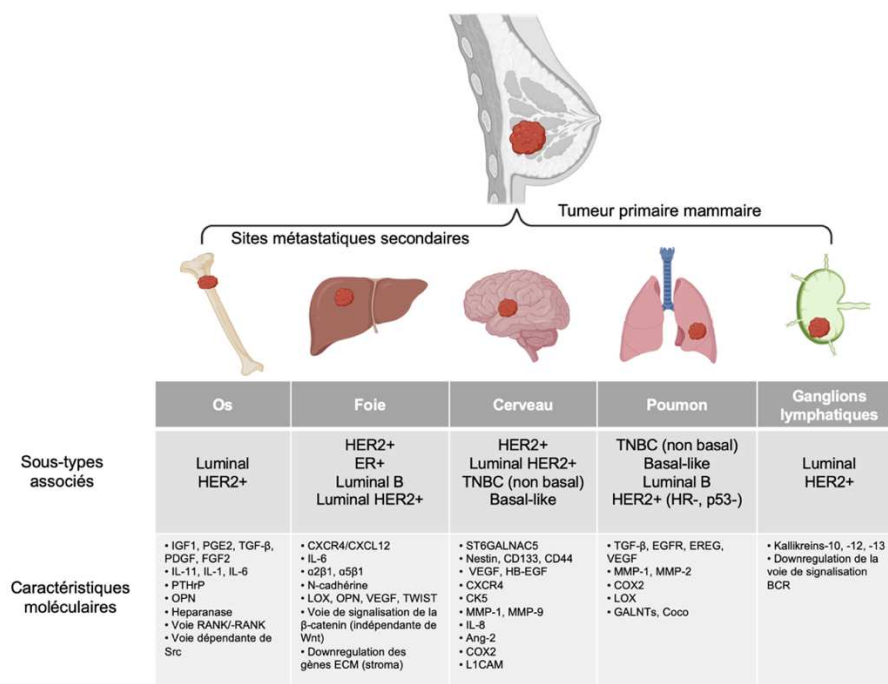


Figure 24 : Organotropisme des métastases mammaires en fonction du sous-type de cancer.

Adaptée d'après Chen et al., 2018 (c), créée avec BioRender.com.

Malgré les progrès réalisés dans le traitement du cancer du sein primitif, il n'existe toujours pas de traitement efficace pour le cancer du sein métastatique. Par conséquent, le cancer du sein métastatique est responsable de 90% des décès liés au cancer du sein alors qu'il ne représente qu'environ un tiers de tous les cas de cancer du sein. Pour aider à développer des traitements efficaces contre le cancer métastatique, il est important d'acquérir une compréhension plus approfondie des mécanismes par lesquels le cancer métastase, en particulier, les mécanismes sous-jacents à l'organotropisme.

(7) La dérégulation du métabolisme énergétique cellulaire

Les observations d'une consommation tumorale accrue en glucose par rapport aux tissus normaux non proliférants ont été faites pour la première fois il y a plus de 90 ans par le physiologiste allemand Otto Warburg. Dès les années 1930, Warburg a mis en évidence la capacité des cellules tumorales à reprogrammer leur métabolisme énergétique en se limitant à la glycolyse même en présence d'oxygène. Cette observation a été confirmée dans divers contextes tumoraux et s'avère corrélée à un mauvais pronostic tumoral. Cette caractéristique du cancer est devenue un sujet d'intérêt croissant au cours de la dernière décennie (Otto, 2016). La reprogrammation métabolique au sein des cellules tumorales a des conséquences sur l'expression des gènes, la différenciation cellulaire et le microenvironnement tumoral (Pavlova & Thompson, 2016). Pavlova & Thompson ont regroupés les changements métaboliques associés au cancer en six caractéristiques : (1) l'absorption dérégulée de glucose et d'acides aminés, (2) l'utilisation de modes opportunistes d'acquisition de nutriments, (3) l'utilisation d'intermédiaires du cycle glycolyse/TCA pour la biosynthèse et la production de NADPH, (4) une demande accrue d'azote, (5) des modifications de la régulation des gènes induite par les

métabolites et (6) des interactions métaboliques avec le microenvironnement. Alors que peu de tumeurs présentent les six signes distinctifs, la plupart en présentent plusieurs (Pavlova & Thompson, 2016).

Malgré l'avidité avec laquelle les cellules tumorales absorbent le glucose et les acides aminés, elles rencontrent des conditions de pénurie *in vivo* en raison de l'augmentation de leur consommation et de l'apport vasculaire insuffisant (Vaupel et al., 1989). Pour répondre à ces besoins, certains cancers acquièrent la capacité cellulaire d'utiliser d'autres moyens pour se fournir en nutriments. Par exemple, le plasma et le liquide interstitiel des tissus sont riches en protéines solubles, mais ces protéines ne sont généralement pas utilisées comme source d'acides aminés. Remarquablement, l'expression de mutants RAS ou c-Src fournit aux cellules tumorales la possibilité de récupérer des acides aminés libres grâce à la dégradation lysosomale de protéines extracellulaires (Commisso et al., 2013). Contrairement à l'absorption de nutriments de faible poids moléculaire, qui pénètrent dans la cellule par des transporteurs dédiés, la capture des macromolécules extracellulaires se produit par macropinocytose. Ce processus, régulé par Ras et c-Src et stimulé par le remodelage du cytosquelette d'actine, entraîne l'absorption de fluide extracellulaire dans des vésicules géantes (Kerr & Teasdale, 2009). La supplémentation en albumine dans un milieu de culture dépourvu de tous acides aminés libres est en mesure de restaurer la prolifération d'une lignée de cancer du pancréas de souris induite par l'oncogène KRAS^{G12D} (Kamphorst et al., 2015).

L'émergence de zones hypoxiques liées au manque d'apport nutritif dans les tumeurs en croissance engendre la suppression d'un certain nombre de réactions biosynthétiques dépendantes de l'oxygène moléculaire comme accepteur d'électrons (Kamphorst et al., 2013). Cela peut engendrer un déficit d'acides gras insaturés, que les cellules hypoxiques contrecarrent par l'import de lysophospholipides « prêts à l'emploi » du milieu environnant (Kamphorst et al., 2013). En conséquence, ce mécanisme déclenche un stress du réticulum endoplasmique ou l'apoptose.

Enfin, si certaines tumeurs développent des adaptations qui leur permettent de récupérer les acides gras directement du plasma, d'autres induisent la libération de lipides stockés à partir des cellules normales voisines. Par exemple, l'augmentation de l'expression de la protéine de liaison aux acides gras à longue chaîne FABP4 à la surface des cellules cancéreuses de l'ovaire métastatique leur permet d'acquérir directement des acides gras à partir des adipocytes de la graisse omentale (Nieman et al., 2011). Même en l'absence de nutriments extracellulaires disponibles, il a été démontré que les cellules cancéreuses pouvaient utiliser des voies métaboliques adaptatives pour maintenir leur viabilité. Le processus auto-catabolique de macroautophagie, qui permet aux cellules privées de nutriments ou de facteurs de croissance de maintenir leur viabilité pendant des semaines en culture (Lum et al., 2005), illustre bien cette adaptation (Boya et al., 2013). Toutefois, l'autophagie ne peut pas fournir aux cellules une nouvelle biomasse ; elle ne peut donc pas soutenir indéfiniment la prolifération dans des conditions pauvres en nutriments.

Même avec ces adaptations, les cellules en prolifération accumulent souvent un flux de transport d'électrons qui dépasse la capacité de l'ATP synthase, entraînant la formation d'espèces oxygénées réactives en excès (ROS pour *Reactive Oxygen Species*). Alors que la surproduction de ROS est préjudiciable à la croissance et à la survie des cellules, des niveaux modérés de ROS, qui sont générés soit pendant la respiration, soit de manière ciblée par une classe de NADPH oxydases, constituent une signalisation importante contribuant au maintien de l'état tumorigénique (Sullivan & Chandel, 2014). À cette fin, les ROS agissent comme des inhibiteurs de protéines phosphatases telles que PTEN et PTP1B, ou encore comme des activateurs des kinases de la famille Src et des MAPK (Kamata et al., 2005). En outre, l'augmentation des niveaux de ROS facilite l'activation des facteurs de transcription HIF-1 α et NRF2 ainsi que les programmes transcriptionnels impliqués dans la tumorigénèse (Sporn & Liby, 2012).

Les cellules tumorales utilisent des modes opportunistes pour acquérir des nutriments, qui leur permettent de survivre et de proliférer dans des conditions métaboliquement défavorables. Les caractéristiques spécifiques de la dérégulation du métabolisme énergétique d'une tumeur permettent une meilleure classification de la tumeur et apporte des informations quant au traitement à proposer. Notamment, l'imagerie par tomographie par émission de positrons (TEP) au ^{18}F -fluorodésoxyglucose (^{18}F -FDG), déjà évoquée, est utilisée avec succès en clinique pour le diagnostic et la stadification des tumeurs, ainsi que dans l'évaluation de la réponse au traitement (Almuhaideb et al., 2011).

(8) L'échappement à la surveillance immunitaire

Le système immunitaire surveille en permanence les cellules et les tissus de l'organisme afin d'éliminer les éléments étrangers ou anormaux qui menacent l'homéostasie et l'intégrité de l'être vivant.

Des études précliniques ont mis en évidence que le système immunitaire jouait un rôle non négligeable dans le développement tumoral. L'inoculation tumorale chez des souris immunodéficientes permet le développement d'une tumeur bien plus rapidement que chez des souris immunocompétentes, soulignant le rôle anti-tumoral du système immunitaire. Notamment, de nombreuses études cliniques décrivent des réponses immunitaires anti-tumorales dans certains types de cancers, qui se traduisent par une infiltration de lymphocytes T cytotoxiques et de cellules tueuses (NK pour *Natural Killer*) au sein de la tumeur (Bindea et al., 2010). Néanmoins, les cellules tumorales sont capables d'inactiver ce système de surveillance pour contrer ses effets anti-tumoraux. Cela se traduit, entre autres, par une modification d'expression de leurs antigènes de surface (les plus décrits étant PD-1, CTLA-4) et *in fine* une mise en échec de leur reconnaissance en tant que cellule anormale par les cellules immunitaires (Buchbinder and Desai, 2016).

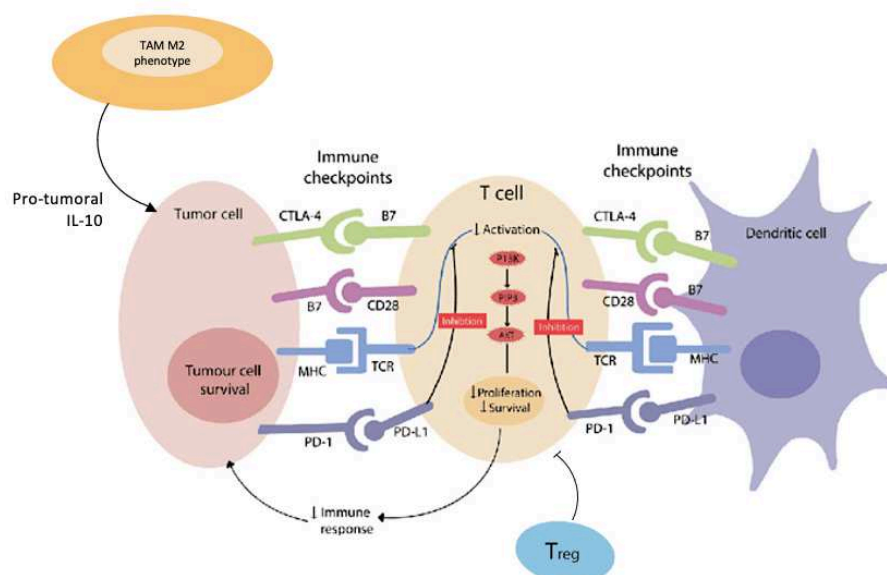


Figure 25 : Points de contrôle à la surface des cellules T et des cellules dendritiques immatures.

Adaptée d'après Naoum et al., 2018.

Notamment, les cellules cancéreuses sécrètent des facteurs immunosuppresseurs comme le TGF- β qui bloquent l'action des LTC et des NK (Yang et al., 2010). De plus, les cellules tumorales peuvent recruter des cellules immunitaires comme les lymphocytes T régulateurs (Treg), capables d'inhiber l'action des LTC (Mougiakakos et al., 2010). L'immunothérapie (Cf. Chap. I, p. 35) regroupent l'ensemble des stratégies thérapeutiques reposant sur les différentes caractéristiques d'échappement à la surveillance immunitaire dans le but de permettre au système immunitaire de déjouer les pièges des cellules tumorales et de les éliminer.

(9) L'instabilité et les mutations du génome

Au cours de la tumorigénèse, les cellules tumorales accumulent des mutations (Negrini et al., 2010). Cette instabilité génétique se manifeste à différents niveaux allant d'une simple mutation ponctuelle de l'ADN à des anomalies structurales au niveau chromosomique (Ferguson et al., 2015). Cela se traduit par une augmentation de leur sensibilité aux agents mutagènes, une déficience de la machinerie de maintenance génomique et/ou une déficience du système de surveillance de l'intégrité du génome médié par *TP53* ou *ATM* (Jackson & Bartek, 2009). L'instabilité génomique établi du cancer contribue à l'hétérogénéité intra-tumorale, fournit la diversité génétique nécessaire à la sélection naturelle et engendre la grande diversité phénotypique fréquemment observée chez les patients atteints d'un « même » cancer (Andor et al., 2017).

Dans les cancers héréditaires, l'instabilité génomique initiale résulte de mutations dans les oncogènes et/ou les suppresseurs de tumeur permissives à la tumorigénèse, comme le prédit « l'hypothèse du mutateur » (Negrini et al., 2010). Cette hypothèse suggère que l'instabilité génomique présente dans les cellules pré-cancéreuses favorise le développement de la tumeur

en élevant progressivement le taux de mutation spontanée. Par exemple, les patientes présentant la mutation *BRCA1* et *BRCA2*, qui sont physiologiquement des gènes suppresseurs de tumeur, ont une prédisposition génétique aux cancers mammaires et ovariens (Petrucelli et al., 1998). En fait, pour divers cancers héréditaires, les mutations des gènes de réparation de l'ADN de la lignée germinale sont souvent accompagnées de la perte secondaire de la copie du gène de type sauvage. Cette perte de la « bonne copie du gène » restante semble être une étape obligatoire pour le développement de la tumeur (Moon et al., 2018).

Dans les cancers sporadiques (non héréditaires), la base moléculaire de l'instabilité génomique reste incertaine, mais des études de séquençage à haut débit suggèrent que les mutations dans les gènes de réparation de l'ADN sont peu fréquentes avant un traitement, ce qui va à l'encontre de l'hypothèse du mutateur pour ces cancers (Negrini et al., 2010). Bien que de nombreuses études ont eu pour but d'identifier les « gènes gardien classiques » mutés dans les cancers sporadiques, la découverte de ces gènes en tant qu'inducteur majeur des cancers humains s'est montrée décevante. Par exemple, une analyse du séquençage de 100 gènes de réparations et de point de contrôle du cycle cellulaire dans des lignées cellulaires de cancer colorectal humain à un stade précoce, n'a permis d'identifier que très peu de mutations (Wang et al., 2004), soulignant que l'instabilité génomique retrouvée dans de nombreux cancers humains sporadiques n'est pas due à l'inactivation de gènes gardien du génome. Il a été démontré que plus de 69% des cancers ne portaient pas de mutations dans ces gènes. Il semblerait que différents mutateurs, survenant stochastiquement contrairement aux gènes mutés retrouvés dans les cancers héréditaires, puissent jouer un rôle important dans la tumorigenèse, de son initiation à l'évolution de la maladie (Moon et al., 2019). La question est de savoir comment l'accumulation de mutations peut induire une instabilité génomique telle qu'elle conduit au développement d'un cancer à part entière. Le modèle de « stress de réplication de l'ADN induit par un oncogène » (Halazonetis et al., 2008) est aujourd'hui défini comme un des mécanismes responsables de la présence d'une instabilité génomique dans les cancers sporadiques. Ce modèle est basé sur l'hypothèse que les oncogènes activés, comme *MYC* par exemple (Wade et al., 2006), induisent une instabilité génomique en provoquant un stress de réplication de l'ADN engendrant des DSB. Ce stress se produit lorsque la réplication cellulaire est considérablement accrue, entraînant des mutations au niveau de sites génomiques spécifiques, décrits comme des sites fragiles communs (Durkin & Glover, 2007). Ces erreurs de réplication sont étroitement liées aux mutations fréquemment retrouvées dans les suppresseurs de tumeur, comme *TP53*, *ATM*, *CDKN2A*, ou encore *PTEN*, qui contribue par leurs altérations à l'instabilité génomique et la promotion tumorale. Par ailleurs, les mécanismes de régulation génétiques et épigénétiques de l'expression génique, et plus largement les modifications de protéines oncogènes connues telles que par phosphorylation ou acétylation, ne sont pas à ignorer quant à l'explication de l'instabilité génomique menant au développement du cancer sporadique.

L'instabilité génomique a longtemps été associée à un mauvais pronostic. Cependant, il a été prouvé que les tumeurs solides d'origine épithéliale, présentant des niveaux extrêmes d'instabilité génomique, où plus de 75% du génome était soumis à des altérations du nombre

de copies somatiques, étaient associées à un pronostic potentiellement meilleur par rapport aux niveaux intermédiaires inférieurs à ce seuil. Cela a été observé dans des sous-populations clonales de plus grande taille, en particulier lorsque l'instabilité génomique est partagée entre un nombre limité de clones. L'hypothèse émise est la suivante : Dans ces tumeurs, l'instabilité altère une si grande partie du génome que les cellules ne se répliquent que rarement avec succès, limitant ainsi la progression (Andor et al., 2017). Ces résultats soulignent l'importance de la compréhension des mécanismes d'instabilité génétique dans la détection précoce et la prise en charge thérapeutique des patientes en vue de diminuer, si ce n'est d'éradiquer, l'issue fatale de cette maladie.

(10) L'inflammation tumorale

La présence d'une infiltration leucocytaire dans les tumeurs, observée au XIX^e siècle par Rudolf Virchow, a fourni la première indication d'un lien possible entre l'inflammation et le cancer. Pourtant, ce n'est qu'au cours de la dernière décennie que des preuves claires que l'inflammation jouait un rôle critique dans la tumorigenèse ont été obtenues (Karin, 2006). Il est important de rappeler que la grande majorité (90%) des cancers est liée à des mutations somatiques et à des facteurs environnementaux.

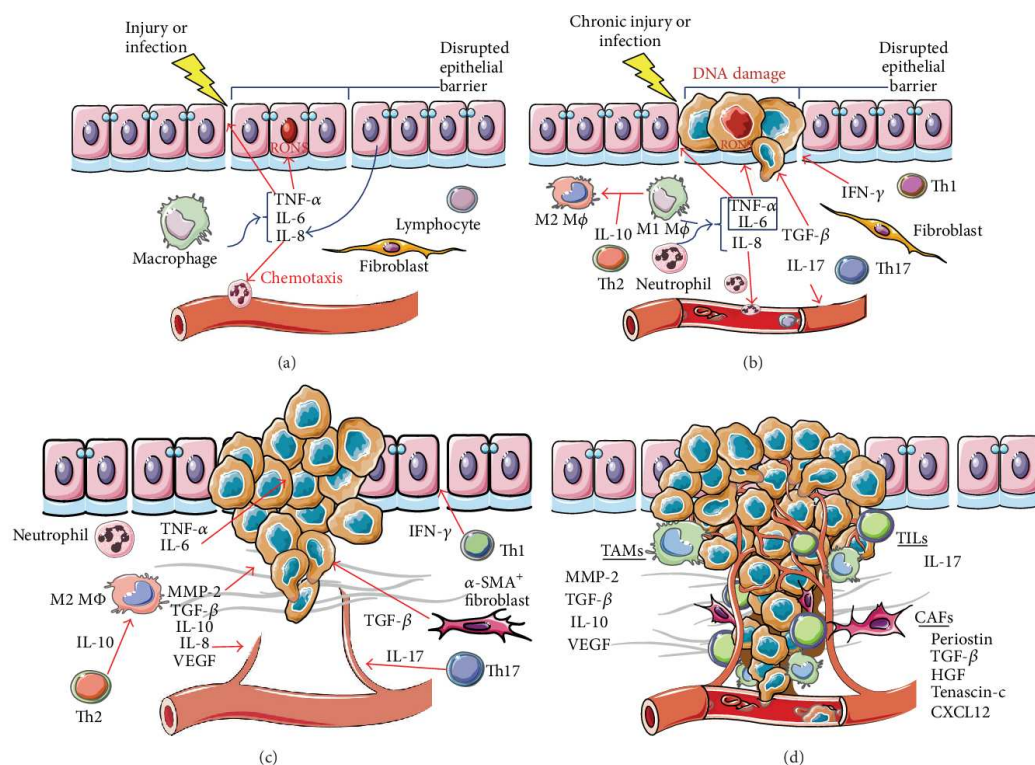


Figure 26 : Rôle de l'inflammation dans la carcinogenèse.

D'après Landskron et al., 2014.

L'inflammation est une réaction indispensable pour le fonctionnement d'un organisme qui lui permet de se défendre de façon ponctuelle contre une agression. L'inflammation chronique est au cœur d'une grande variété de maladies, y compris les maladies cardiovasculaires, le cancer

(jusqu'à 20%), le diabète, l'arthrite, la maladie d'Alzheimer, les maladies pulmonaires et les maladies auto-immunes. L'inflammation chronique est liée à diverses étapes de la tumorigenèse, y compris la transformation cellulaire, la promotion, la survie, la prolifération, l'invasion, l'angiogenèse et la dissémination métastatique (Mantovani, 2005). Deux voies moléculaires et cellulaires reliant l'inflammation et le cancer ont été schématiquement identifiées, et impliquent des cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines, des molécules d'adhésion et des enzymes inflammatoires. Dans la voie intrinsèque, les événements génétiques à l'origine des néoplasies initient l'expression de programmes liés à l'inflammation, guidant la construction d'un microenvironnement inflammatoire. Dans la voie extrinsèque, les conditions inflammatoires facilitent le développement du cancer (Aggarwal et al., 2009 ; Singh et al., 2019).

L'inflammation systémique est mesurée au sein d'une tumeur par le ratio neutrophile/lymphocyte périphérique (NLR pour *Neutrophile/Lymphocyte Ratio*). Un ratio élevé se voit corrélé à un mauvais pronostic dans les tumeurs mammaires, en particulier celles n'exprimant pas ER et HER2 (Ethier et al., 2017).

Le microenvironnement inflammatoire des tumeurs est caractérisé par la présence de leucocytes hôtes à la fois dans le stroma de soutien et dans les zones tumorales, parmi lesquels on retrouve les macrophages associés aux tumeurs (TAM pour *Tumor Associated Macrophages*), des cellules dendritiques associées aux tumeurs (TADC pour *Tumor Associated Dendritic Cells*) et des lymphocytes (Negus et al., 1997). Les TAM, composante majeure de l'infiltrat de la plupart des tumeurs, dérivent de précurseurs monocytaires circulants et sont recrutés dans la tumeur par des chimiokines. De nombreuses cellules tumorales produisent des cytokines appelées facteurs de stimulation des colonies (CSF pour *Colonies Stimulating Factors*) qui prolongent la survie des TAM. Activée de manière appropriée, les macrophages pourraient tuer des cellules tumorales ou provoquer des réactions de destruction tissulaire centrées sur l'endothélium vasculaire. Cependant, les TAM, subvertis aux tumeurs, produisent également des facteurs de croissance et des facteurs pro-angiogéniques ainsi que des protéases matricielles, promouvant ainsi la progression tumorale (Mantovani et al., 1992). Au fur et à mesure que les cellules cancéreuses subissent des transformations malignes, elles acquièrent des antigènes associés à la tumeur (TAA pour *Tumor Associated Antigens*), qui proviennent soit d'altérations génétiques mutations (création des néoantigènes), soit d'altérations épigénétiques (expression ectopique d'antigènes généralement exprimés lors du développement embryonnaire ou dans le placenta). La fréquence des mutations, et donc la néoantigénicité potentielle des tumeurs, diffère considérablement entre les types de cancers (Schumacher & Schreiber, 2015). Dans les tumeurs exprimant des néoantigènes, l'inflammation aiguë favorise le recrutement et l'activation à la fois des lymphocytes T et des lymphocytes B, qui sont amorcés en réponse aux TAA dans les ganglions lymphatiques drainants ou les structures lymphoïdes tertiaires de la tumeur (Dieu-Nosjean et al., 2008 ; 2016). L'amorçage de la chaîne réactionnelle nécessite des cellules dendritiques, qui absorbent les TAA et mûrissent en réponse aux motifs moléculaires associés aux dégâts (DAMP pour *Damage Associated Molecular Pattern*) ou aux cytokines produites localement. Les TAA sont présentés sous forme de peptides liés aux molécules de complexe

majeur d'histocompatibilité de classe I (MHC I) et/ou de classe II (MHC II) créant des lymphocytes T avec une activité anti-tumorale spécifique. Les cellules dendritiques (CD) activent principalement les cellules T auxiliaires CD4+ de type 1 (Th1), qui activent ensuite les LTC CD8+ de type Tc1 (Becht et al., 2016). Cependant les TADC présentent généralement un phénotype immature avec une capacité défectueuse à stimuler les cellules T (Allavena et al., 2000). L'immaturité des TADC peut refléter l'absence de signaux de maturation efficaces, une migration rapide des cellules matures vers les ganglions lymphatiques ou la présence d'inhibiteurs de maturation. Le rôle des cellules immunitaires comme entité à part entière au sein du microenvironnement sera détaillé en fin de ce chapitre.

Pour finir, l'inflammation dans le contexte du cancer est liée à l'instabilité génétique (Mantovani et al., 2008). En effet, les macrophages, ainsi que d'autres leucocytes, omniprésents dans le microenvironnement tumoral, génèrent des niveaux persistants de ROS et d'azote pour combattre l'infection (Maeda & Akaike, 1998). Ces agents peuvent produire des agents mutagènes, tels que le peroxy-nitrite, qui réagissent avec l'ADN et provoquent des mutations dans les cellules épithéliales et stromales proliférantes (Pollard, 2004 ; Grivennikov et al., 2010).

II.2. La composition du microenvironnement tumoral

Le microenvironnement tumoral est composé d'un certain nombre de cellules s'articulant autour d'une MEC. Physiologiquement, l'échange permanent et réciproque entre les cellules et leur environnement permet le maintien de l'architecture et l'organisation fonctionnelle des tissus et des organes. Le microenvironnement apparaît ainsi spécifique du tissu et de l'organe qui le contient (Arneth, 2019). Le microenvironnement tumoral diffère du microenvironnement « normal » tout d'abord par sa composition biochimique et surtout par le fait que les populations cellulaires du stroma (fibroblastes, EC, cellules immunes, etc...) soient subverties et contrôlées par les cellules tumorales pour répondre à leurs propres besoins. L'étude du microenvironnement tumoral prend ainsi en considération les interactions structurales et fonctionnelles entre ces différents partenaires.

Dans cette seconde partie du chapitre II, nous allons nous intéresser en détails à la composition du microenvironnement tumoral, en commençant par la composition de la MEC et sa dégradation puis nous achèverons cette partie en détaillant les différentes cellules présentes dans le microenvironnement de la tumeur et leur(s) rôle(s) établis à ce jour, et les propriétés physico-chimique qui caractérisent l'ensemble de ce microenvironnement tumoral.

II.2.1. La Matrice Extracellulaire

La MEC fournit non seulement un échafaudage physique dans lequel les cellules sont intégrées, mais régule également de nombreux processus cellulaires, comme la croissance, la migration, la différenciation, la survie, l'homéostasie et la morphogenèse cellulaire. La MEC est constituée d'une grande variété de macromolécules matricielles dont la composition précise et

les structures spécifiques varient d'un tissu à l'autre. Il convient de distinguer deux types de MEC dont la composition et la structure varient : les matrices interstitielles et péricellulaires. La matrice dite interstitielle entoure les cellules, tandis que la matrice péricellulaire est en contact étroit avec les cellules, comme c'est le cas de la MB.

Les principaux constituants de la MEC sont des protéines impliquées dans la formation de fibres, telles que les collagènes, l'élastine, des glycoprotéines comme les laminines (LA) et la fibronectine (FN) mais également des glycosaminoglycanes (GAG) et des protéoglycanes (PG).

II.2.1.1. La composition de la MEC

II.2.1.1.1. Les collagènes

Le collagène est la protéine fibreuse la plus abondante dans la MEC interstitielle mais se trouve également dans la matrice péricellulaire, notamment dans les membranes basales (Kadler et al., 2007). Le collagène constitue jusqu'à 30% des protéines totales chez l'homme et qu'il est synthétisé et sécrété dans la MEC principalement par les fibroblastes.

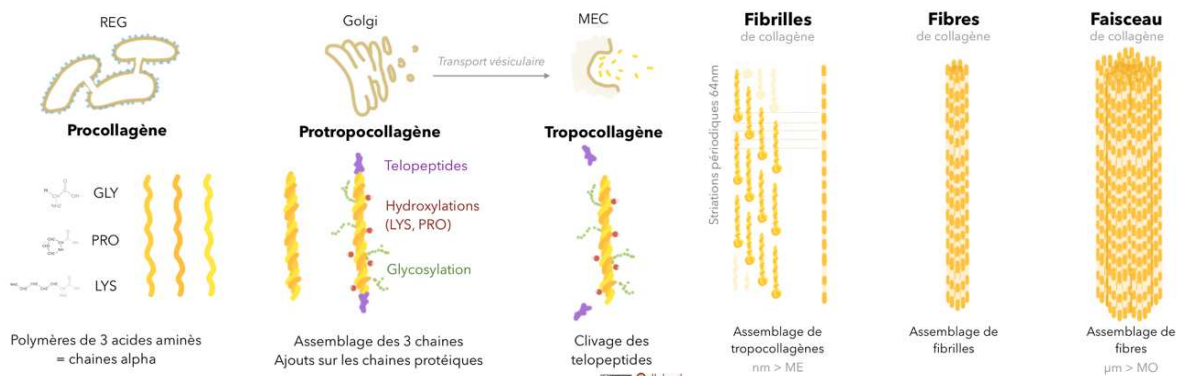


Figure 27 : Représentation schématique de la synthèse et de l'assemblage des fibres de collagène. © Celluloyd

La superfamille du collagène comprend 28 types de collagène différents qui sont formés par au moins 46 chaînes polypeptidiques distinctes (chaînes α) chez les vertébrés. Les collagènes peuvent être classés selon leur homologie de domaine commun et leurs fonctions en 7 catégories qui sont : Les collagènes fibrillaires, ceux formant un réseau, les collagènes associés aux fibrilles avec des triples hélices interrompues (FACIT pour *Fibril Associated Collagen with Interrupted Triple helices*), les collagènes associés à la membrane avec des triples hélices interrompues (MACIT pour *Membrane Associated Collagens with Interrupted Triple helices*), le collagène composant les fibrilles d'ancrage, les collagènes formant des filaments perlés et les multiplexes (présence de multiples interruptions non collagènes dans leur triple hélice centrale) / collagènes producteurs d'endostatine (Shoulders & Raines, 2009). Les différents collagènes peuvent interagir avec divers composants de la matrice créant ainsi des complexes multimoléculaires.

Classe de collagène	Type*	Gène	Remarques
Fibrillaire	I	COL1A1, COL1A2	Fibrilles principalement dans la matrice stromale fibreuse (exemple : peau, os, tendons et ligaments) Les collagènes fibrillaires de types I et III sont les principaux composants de la MEC cardiaque
	II	COL2A1	
	III	COL3A1	
	V	COL5A1, COL5A2, COL5A3	
	XI	COL11A1, COL11A2, COL11A3	
	XXIV	COL24A1	
	XXVII	COL27A1	
Formant un réseau	IV	COL4A1, COL4A2, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6	Composant majoritaire des membranes basales
	VIII	COL8A1	Structure en treillage hexagonal dans le stroma cornéen et les matrices sous-endothéliales vasculaires
	X	COL10A1	Zone hypertrophique du cartilage de la plaque de croissance
FACIT	IX	COL9A1, COL9A2, COL9A3	"Ponts moléculaires" associés aux fibrilles de collagène de type I (XII, XVI, XIX, XXI) et de type II (IX, XVI, XIX)
	XII	COL12A1	
	XIV	COL14A1	
	XVI	COL16A1	
	XIX	COL19A1	
	XX	COL20A1	
	XXI	COL21A1	
MACIT	XXII	COL22A1	Molécules de surface de la cellule avec des domaines extracellulaires, membranaires et intracellulaires
	XIII	COL13A1	
	XVII	COL17A1	
Composant les fibrilles d'ancrage	XXIII	COL23A1	Chaines longues associées à la MB qui relie la lamina densa aux plaques d'ancrage
	VII	COL7A13	
Filamenteux "microfibrilles" "perlées"	VI	COL6A1, COL6A2, COL6A3, COL6A5, COL6A6	Localisé dans les tissus conjonctifs, il s'associe au type I
	XXVI	COL26A1	Spécifiquement exprimé dans les testicules et les ovaires des tissus adultes
	XXVIII	COL28A1	Ressemble étroitement au type VI
Multiplexines	XV	COL15A1	Domaines à triple hélice multiples avec des interruptions contenant des glycosaminoglycanes (sulfate de chondroïtine et sulfate d'héparine)
	XVIII	COL18A1	
	XVII	COL17A1	
	XXIII	COL23A1	

Tableau 5 : Les différents types de collagène. Adapté de Mouw et al., 2014.

Le clivage protéolytique des collagènes, libérant des fragments bioactifs, régulent un certain nombre de processus physiologiques et pathologiques tels que le développement, l'angiogenèse, la croissance tumorale, les métastases et la réparation tissulaire (Ricard-Blum & Ballut, 2011). Ces fragments, appelés matricryptines, augmentent la diversité fonctionnelle des collagènes car la plupart d'entre eux possèdent des activités biologiques différentes de leur molécule de provenance. Un seul type de collagène peut donner naissance à plusieurs matricryptines (comme c'est le cas du collagène de type IV). La plupart des matricryptines de collagène sont dérivées de collagènes de la MB (collagènes de type IV, VIII et XVIII) ou des

collagènes qui y sont associés (collagènes de type XV et XIX) et présentent des propriétés anti-angiogéniques et anti-tumorales (Nyberg et al., 2005 ; Ricard-Blum & Ballut, 2011) que nous évoquerons, en même temps que les matrikines dites « naturelles ».

(A) Collagène fibrillaire - Les collagènes fibrillaires comprennent les collagènes de type I, II, III, V, XI, XXIV et XXVII. Outre sa fonction d'élément principal de traction des tissus, les échafaudages de collagène fournissent des signaux cellulaires affectant diverses fonctions cellulaires, y compris la migration cellulaire, l'adhésion, l'angiogenèse, le développement et la réparation des tissus (Frantz et al, 2010 ; Kadler et al, 2007). Il a été démontré que le collagène de type I sécrété par les fibroblastes était capable de stimuler l'angiogenèse *in vitro* (Twardowski et al., 2007). Son inhibition *in vivo* dans un modèle de mélanome permet de réduire son développement en limitant significativement le développement d'un système vasculaire tumoral efficace (Van Kempen et al., 2008).

(B) Collagène formant un réseau - La catégorie des collagènes qui s'organisent en réseau comprend les collagènes non fibrillaires de types IV, VIII et X. Le collagène X est localisé dans la zone hypertrophique du cartilage de la plaque de croissance (Kadler et al., 2007), alors que le collagène de type VII se trouve dans le stroma cornéen et les matrices sous-endothéliales vasculaires.

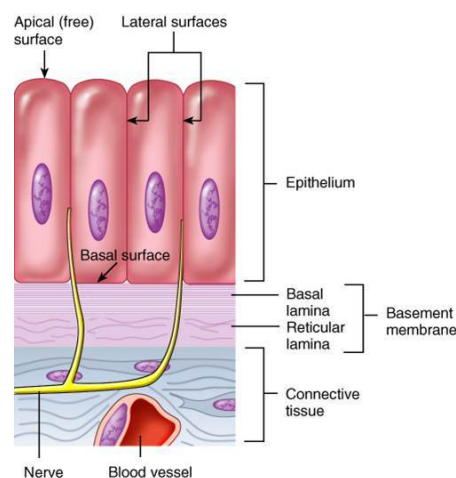


Figure 28 : La membrane basale. Principles of human anatomy and physiology, 11e.

Les membranes basales (MB) sont majoritairement composées de collagène de type IV en association avec d'autres collagènes tels que les collagènes XVIII, XV ou encore XIX, des laminines, des nidogènes et des PG comme le perlécan (LeBleu et al, 2007). La laminine fournit principalement les sites d'adhésion aux cellules épithéliales et le réseau de collagène de type IV stabilise la structure globale. Les deux réseaux interagissent avec d'autres composants, comme le perlécan. Bien que les MB présentent une ultrastructure symétrique avec une lamina densa placée entre deux structures lamina rarae, elles présentent une asymétrie biochimique et mécanique qui permet l'agencement alterné de l'épithélium et du tissu conjonctif. La laminine se trouve du côté épithélial fournissant le substrat pour la

liaison des cellules épithéliales, tandis que le collagène de type IV est localisé du côté stromal. Les cellules épithéliales sont ancrées dans la MB via des hémidesmosomes, qui se forment lorsque les intégrines interagissent avec les laminines au niveau extracellulaire et intracellulaire avec les filaments intermédiaires. La MB rentre également dans la composition structurale et fonctionnelle des vaisseaux sanguins et se retrouve inévitablement dégradée lors du remodelage vasculaire nécessaire à l'angiogenèse tumorale (Kalluri, 2003).

Le collagène de type IV est capable d'induire la prolifération et la migration des cellules endothéliale en se liant à leurs intégrines $\alpha 1\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$. Lorsque le collagène IV est dégradé, la liaison avec les intégrines précédemment citées n'est plus possible ; des liaisons avec les intégrines $\alpha v\beta 3$ peuvent survenir, provoquant à contrario une inhibition de la migration et la prolifération des EC (Kalluri, 2003 ; Rundhaug, 2005). Le collagène de type IV est composé de trois chaînes α (IV), sur six possibles [$\alpha 1$ (IV) - $\alpha 6$ (IV)] (Wu & Ge, 2019). Des propriétés biologiques anti-angiogéniques ont été démontrées pour les 6 domaines (matrikines) : $\alpha 1$ (IV) NC1 (Arresten), $\alpha 2$ (IV) NC1 (Canstatin), $\alpha 3$ (IV) NC1 (Tumstatin), $\alpha 4$ (IV) NC1 (Tetrastatin) ; $\alpha 5$ (IV) NC1 (Penstatin) et $\alpha 6$ (IV) NC1 (Petitclerc et al., 2000 ; Brassart-Pasco et al., 2012 ; Monboisse et al., 2014 ; Vautrin-Glabik et al., 2020)

(C) Les FACIT - La famille des collagènes associés aux fibrilles à hélices interrompues (FACIT) comprend les collagènes de type IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII (Shoulders & Raines, 2009). Les FACIT interagissent avec les collagènes fibrillaires à leur surface et relient les fibres de collagène entre elles et avec d'autres molécules de la matrice. Il a été montré que le domaine NC1 du collagène de type XIX exerçait une activité anti-tumorale par le biais d'une forte inhibition des capacités invasives des cellules tumorales et des effets anti-angiogéniques (Ramont et al., 2007).

(D) Les MACITs - La catégorie des MACITs comprend les collagènes de types XIII, XVII, XXIII, XXV, qui sont exprimés par de nombreuses cellules, y compris des cellules malignes. Ces collagènes agissent comme des récepteurs de surface cellulaire affectant l'adhésion. Lors d'un éventuel clivage protéolytique, ils s'échappent de la surface cellulaire générant ainsi des collagènes solubles dans la matrice. Les domaines extracellulaires des collagènes membranaires libérés par excrétion en raison des proprotéines convertases de type furine (collagènes XIII, XXIII, XXV), ou ADAM-9 et ADAM-10 (collagène XVII) (Franzke et al., 2009) présentent des activités paracrines et pourraient être considérés comme des matricryptines. En effet, le clivage de l'ectodomaine du collagène de type XVII module la motilité cellulaire (Franzke et al., 2002). Dans les cancers mammaires, l'hyperméthylation du promoteur du gène *COL17A1* induit une sous-expression du collagène XVII, ce qui modifie les capacités invasives des cellules tumorales (Thangavelu et al., 2016).

(E) Collagène composant les fibrilles d'ancrage - Le collagène de type VII est le principal composant des fibrilles d'ancrage, qui sont essentielles à l'intégrité fonctionnelle de la

jonction dermo-épidermique (Keene et al., 1987). Les microfilaments de collagène VII relie la lamina densa à des structures denses du derme superficiel appelées plaques d'ancrage.

(F) Collagène formant des filaments de perle - La famille des collagènes formant des filaments en perles est constituée des collagènes de type VI, XXVI et XXVIII. Le collagène de type VI est le plus étudié de cette catégorie. Il est exprimé dans différents tissus où il interagit avec des protéines de la matrice, l'acide hyaluronique, des protéoglycanes, ainsi que le collagène de type IV dans les MB. Récemment, le collagène VI, surexprimé dans la MEC tumorale et chez les patients obèses, a été identifié comme un acteur de l'invasion des cellules de TNBC via sa liaison au protéoglycan NG2, activant ainsi la voie de signalisation de EGFR/MAPK (Wishart et al, 2020).

(G) Les multiplexines/collagènes producteur d'endostatine - La famille des multiplexines représentée par les collagènes de types XV et XVIII a été nommée ainsi en raison de la présence de multiples interruptions non collagéniques dans la triple hélice centrale des collagènes qui la compose. Ces deux types de collagènes sont exprimés de manière ubiquitaire dans toutes les MB vasculaires et épithéliales des tissus humains. Les collagènes de type XVIII et XV contiennent tous les deux un domaine C-terminal NC1. Le clivage du domaine NC1 du collagène de type XVIII libère de l'endostatine, capable d'interagir avec de nombreux récepteurs dont les intégrines $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ et $\alpha v\beta 5$ et le VEGFR2. Parallèlement, cela conduit à une stimulation de puissants composants angiostatiques, comme la thrombospondine (Iozzo & Schaefer, 2015). Le clivage du domaine NC1 du collagène de type XV sur sa chaîne $\alpha 1$ conduit à la production de la restine, un facteur anti-angiogénique de 22 kDa similaire à l'endostatine (Ramchandran et al, 1999).

La biosynthèse et la structure des collagènes sont nettement modifiées lors du remodelage de la MEC dans plusieurs pathologies dont la tumorigenèse. Notamment, l'élasticité de la matrice, induit par un dépôt et une réticulation accrus de collagènes, perturbe la morphogénèse tissulaire et contribue à la progression maligne. La réticulation accrue du collagène est médiée par les enzymes LOX et LOX-like et favorise la signalisation via les récepteurs de surface cellulaire de liaison au collagène, tels que les intégrines et les DDR, favorisant ainsi la progression tumorale (Bonnans et al., 2014).

II.2.1.1.2. L'élastine et les glycoprotéines associées

L'élastine, l'un des principaux constituant du tissu conjonctif, est présente dans la majorité des tissus du corps humain. Les fibres élastiques sont de grandes structures qui fournissent une résilience aux tissus subissant des forces d'étirement, tels que les gros vaisseaux sanguins ou encore la peau. Ce composé ne représente pondéralement qu'un faible pourcentage de la MEC, mais son rôle n'en est pas moins primordial au cours des changements dynamiques. L'élastine, avec une demi-vie de 70 ans, est très difficilement dégradable et fait partie des

protéines les plus résistantes de l'organisme. Chez l'adulte, les fibres élastiques endommagées sont souvent mal réparées et ne fonctionnent pas normalement (Wagenseil & Mecham, 2007). Lors du photo-vieillessement de la peau, l'élastine est altérée et intégrée dans du matériel élastotique caractéristique de l'élastose solaire. Les fibres élastiques sont présentes dans les tissus sous la forme d'un grand réseau composé de deux composants discrets, le constituant principal qui est l'élastine, et les microfibrilles composées de fibrillines et de glycoprotéines (Fig. 29).

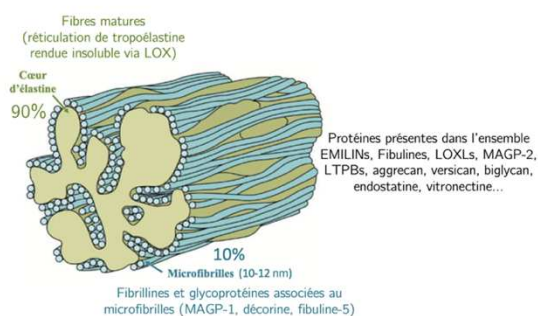


Figure 29 : Représentation schématique d'une fibre élastique mature. Les microfibrilles entourent le cœur d'élastine insoluble et réticulée. Adaptée d'après Gartner & Hiatt, chapter 4 Color Textbook of Histology, 3rd ed, 2007.

L'élastine est un polymère insoluble synthétisé à partir d'un précurseur soluble de 50 à 70 kDa appelé la tropoélastine par réticulation de résidus lysine grâce aux lysyl oxydases (LOX) (Muiznieks et al, 2010). Les microfibrilles, à la périphérie de la fibre dans les tissus adultes, fournissent un échafaudage qui aide à l'alignement et à la réticulation des molécules d'élastine (Wagenseil & Mecham, 2007). Elles contiennent de nombreuses protéines, qui jouent des rôles aussi bien structurels que régulateurs (Sengle & Sakai, 2015).

Les fibres élastiques sont dégradées par diverses enzymes élastolytiques, y compris les protéases aspartiques, les cystéine protéases, les sérine protéases et les MMPs dans des processus pathologiques avec une défaillance consécutive du tissu/organe. La libération accrue de peptides bioactifs, faisant partie des matrikines, peut avoir des conséquences pathologiques. Par exemple, Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly (VGVAPG) est un fragment peptidique d'élastine chimiotactique pour les monocytes et les fibroblastes (Wells et al., 2015). VGVAPG entraîne une migration des muscles lisses, conduisant à un épaississement vasculaire intimal et au développement de maladies vasculaires, comme l'athérosclérose et a également des implications dans la progression du cancer à travers plusieurs mécanismes (Wells et al., 2015).

II.2.1.1.3. Les autres glycoprotéines

II.2.1.1.3.1. La laminine

Les laminines sont des glycoprotéines de poids moléculaire élevé allant de 400 à 900 kDas constituées par l'assemblage de trois polypeptides liés par des points disulfures, les chaînes α , β et γ (Aumailley et al., 2005). Structuellement, les 11 chaînes de laminine existant dans le génome humain diffèrent par le nombre, la taille et l'organisation des domaines constitutifs,

dotant les différents membres de la famille de fonctions importantes communes et uniques. En raison de ses rôles critiques dans le développement embryonnaire, la plupart des mutants de la laminine sont létaux pour l'embryon, limitant l'étude de ses fonctions à des stades ultérieurs (Yao, 2017). La laminine est un constituant majeur de la MB, contribuant à son architecture et à sa physiologie. Une fonction commune et importante des laminines est d'interagir via leur domaine C-terminal avec les récepteurs ancrés des cellules adjacentes dans les MB, relayant ainsi les signaux biochimiques et mécaniques entre les réseaux moléculaires extracellulaires et intracellulaires (Aumailley, 2013). Les laminines sont également capables d'interagir avec des facteurs de croissance ou des cytokines. Cette fonction apparaît importante pour la séquestration et ainsi la régulation de la distribution de ces molécules, leur activation et leur mise à disposition pour les cellules.

Les laminines 1 forment avec le collagène IV un réseau qui constitue la charpente de la MB. Les laminines 5, 6 et 7, situées au niveau des hémidesmosomes, jonctions adhésives, participent à la cohésion des cellules épithéliales au niveau de leurs faces basales (caudales) et permettent ainsi de déterminer leur polarité.

L'expression de la laminine-332 a été inversement corrélée à la survie chez des patientes de TNBC, suggérant qu'elle contribue, par son implication dans la réaction desmoplastique (Kim et al., 2011), au phénotype agressif de certains cancers du sein (Carpenter et al., 2018).

II.2.1.1.3.2. La fibronectine

Exprimée de manière ubiquitaire, la fibronectine (FN) se trouve à la fois dans la MEC et dans le plasma sanguin. La FN plasmatique est une protéine soluble produite par les hépatocytes, qui joue un rôle dans la formation et la stabilisation des caillots de fibrine et la réparation tissulaire précoce (Wang et al, 2014 ; To & Midwood, 2011). La FN résidant dans la MEC, est une glycoprotéine insoluble synthétisée par une grande variété de cellules, tels que les fibroblastes et les EC (Pearlstein et al., 1980).

La FN se compose de deux sous-unités de 230 à 270 kDas connectées de manière covalente par l'intermédiaire de ponts disulfures à leurs extrémités C-terminales. Ces sous-unités sont composées de trois types de modules différents : les répétitions de type I, II et III. *In vivo*, la forme fonctionnelle de la FN nécessite un état fibrillaire. Ainsi, les molécules de FN sont assemblées en fibres supermoléculaires qui englobe les tissus dont le diamètre varie de 10 nm à 1 µm, et la longueur de plusieurs dizaines de micromètres (Davidson et al., 2004 ; Larsen et al., 2006). Essentielle au cours du développement embryonnaire (Georges-Labouesse et al., 1996 ; Astrof & Hynes, 2009), la FN est synthétisée et assemblée lors du remodelage matriciel, de la formation ou de la réparation dynamique des tissus. La FN se lie aux cellules principalement par le biais des intégrines, parmi lesquels sont retrouvées les intégrines $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 6$ et $\alpha v\beta 8$ (Astrof & Hynes, 2009). La FN cellulaire fonctionne comme un mécanotransducteur, permettant à la MEC de répondre aux différents stimuli en

promouvant ou en inhibant les acteurs de son remodelage (Smith et al., 2007). En soutenant la réorganisation du cytosquelette (et notamment des microfilaments d'actine) et le dépôt de collagène pour lequel elle a une forte affinité, la FN contribue aux activités cellulaires comme la migration et l'adhérence tout en assurant l'intégrité de la MEC. Elle joue un rôle crucial dans la cicatrisation par sa liaison à certains facteurs comme l'héparane sulfate et l'acide hyaluronique (Jakhu et al, 2018).

Exprimée autour de la vascularisation tumorale (Neri & Bicknell, 2005), la FN contribue à l'angiogenèse, plus particulièrement à la migration directionnelle des *tip cells* en interagissant avec le VEGF et l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ (Stenzel et al., 2011).

II.2.1.1.3.3. Les thrombospondines

Les thrombospondines (THBS) constituent une famille de glycoprotéines de liaison au calcium hautement conservées. Les THBS sont des composants non structuraux de la MEC qui contribuent à son assemblage et à son organisation appropriée. Elles influencent le comportement cellulaire par le biais d'interactions avec leurs récepteurs de surface cellulaire, les collagènes ou encore les protéases ou en séquestrant des facteurs de croissance. Les THBS présentent un intérêt particulier en raison de leur rôle dans la modulation de l'angiogenèse, la fibrillogenèse du collagène et la coagulation (Murphy-Ullrich & Iozzo, 2012). Les propriétés de la THBS1 liées à l'angiogenèse seront évoquées dans le chapitre suivant.

Les THBS regroupent cinq membres qui se subdivisent en deux sous-groupes A et B structurellement différents : le sous-groupe A composé de la THBS-1 et -2 qui forment des homotrimères, et le sous-groupe B composé de la THBS-3, -4 et -5, qui forment des pentamères. (Kazerounian et al., 2008). L'expression des THBS-A apparaît ubiquitaire, alors que les THBS-B ont une distribution plus restreinte. De nouvelles familles ont été identifiées ; Elles sont désignées méga-THBS, sushi-THBS et poriférane-THBS et partagent le même domaine C-terminale mais chacune avec une distribution phylogénétique distincte (Shoemark et al., 2019).

Les THBS A sont les plus étudiés de la famille des thrombospondines. Elles possèdent une homologie de séquence élevée mais une sécrétion et des fonctions distinctes. Les souris THBS-1 KO présentent une densité vasculaire accrue, une cyphose thoracique et une inflammation pulmonaire. Au contraire, les souris THBS-2 KO présentent un phénotype caractérisé par une diathèse hémorragique (une défaillance dans le mécanisme de coagulation), une augmentation de la densité vasculaire et des troubles du tissu conjonctif associés à des fibrilles de collagène irrégulières avec une distribution non homogène de forme, de taille et d'organisation (Kyriakides et al., 1998). Collectivement, ces changements entraînent une augmentation de la laxité cutanée et une diminution de la résistance à la traction. Outre le collagène, la THBS-2 influence également d'autres protéines dans l'environnement extracellulaire, en particulier dans le contexte du remodelage matriciel où elle contribue à l'intégrité optimale de la MEC (Calabro et al., 2019).

Parmi les THBS B, la THBS-4 possède des fonctions nouvellement attribuées, qui la distingue des autres THBS, dans les systèmes cardiovasculaire et nerveux, l'inflammation, le cancer et l'unité motrice (Stenina-Adognravi & Plow, 2019).

Compte tenu des divers rôles des THBS dans le microenvironnement tumoral, de nombreuses stratégies thérapeutiques tentent d'utiliser des peptides mimétiques de THBS ou leur blocage par l'utilisation d'anticorps comme approches anti-métastatiques (Ramchandani & Mittal, 2020).

II.2.1.1.4. Les glycosaminoglycanes et les protéoglycanes

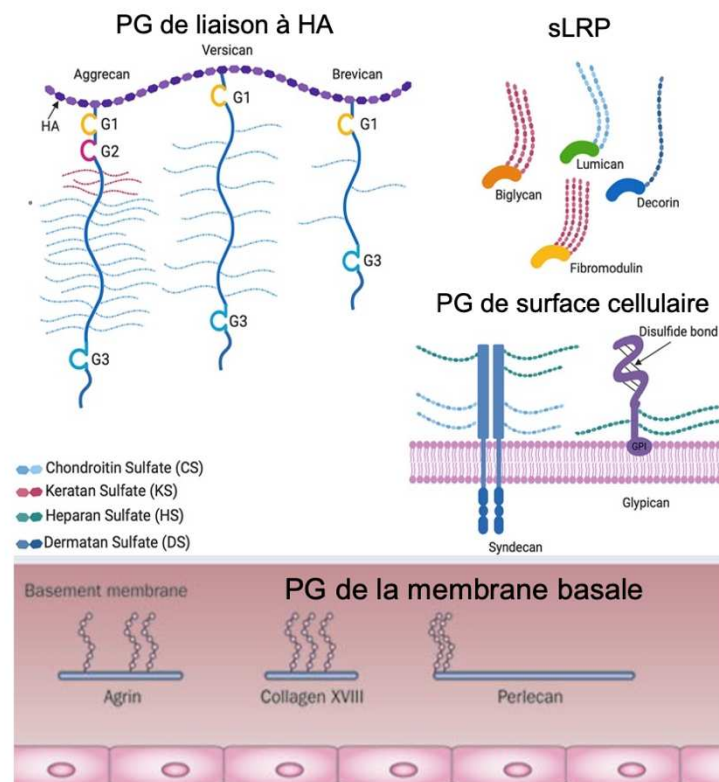


Figure 30 : Diversité et structures des protéoglycanes.

Adaptée d'après Walimbe & Panitch, 2020 et Edwards, 2012.

Les protéoglycanes (PG) sont des molécules à localisation extracellulaire, membranaire ou intracellulaire, constituées d'une protéine de corps sur laquelle sont greffées des chaînes polysidiques : les glycosaminoglycanes (GAG). La diversité structurale des PG permet la constitution de sites protéiques et/ou osidiques interagissant spécifiquement avec d'autres composants matriciels ou cellulaires, ainsi qu'avec des médiateurs solubles. Cette très grande capacité interactive permet aux PG de participer à l'assemblage de la matrice tout en lui conférant de nombreuses propriétés rhéologiques (hydratation, résistance aux forces compressives, capacité de filtration, transparence). Les PG régulent aussi de nombreuses activités cellulaires (prolifération, différenciation, adhérence, migration) et participent au contrôle de l'activité, de la biodisponibilité et de la stabilité de cytokines par crinopexie, modèle

décrivant les mécanismes qui régissent la biodisponibilité des facteurs de croissance. Ces multiples fonctions peuvent être exploitées à des fins thérapeutiques, comme c'est le cas pour l'héparine. Dans cette sous-partie, nous évoquerons trois PG, que sont le versican, le biglycan, le syndécan et le perlecan qui appartenant à trois familles de PG différentes. Toutefois, cette liste n'est pas exhaustive. Il existe également des PG intracellulaires (Kolset et al., 2004), comme le serglycan présent dans les granules de sécrétion.

Les PG de liaison à l'acide hyaluronique (Hyalectanes) : Exemple du versican

Le versican est un grand protéoglycane chondroïtine-sulfate (CS) de la MEC faisant partie de la famille des hyalectanes, comprenant également l'agrécan, le brévican et le neurocan (Iozz, 1998). Le versican, avec cinq isoformes d'épissage, est composé de nombreux domaines d'interaction regroupés sous un domaine N-terminal G1, un domaine C-terminal G3 et des régions de liaison à la chaîne CS. Ces différents domaines lui permettent d'interagir avec de nombreux composants de la matrice. L'interaction médiée par son domaine G1 avec l'acide hyaluronique (HA pour *Hyaluronic Acid*) reste la plus étudiée, mais il interagit également avec la fibuline-2, la fibrilline-1, la fibronectine ou encore le collagène de type I (Papadas et al., 2020). Par ses interactions, le versican joue un rôle important dans l'inflammation tissulaire causée par une infection et/ou une lésion (Zhang et al., 2012).

Le versican joue un rôle clé dans de multiples facettes de la tumorigenèse, allant de la prolifération, à l'échappement des voies médiées par les suppresseurs de tumeur, à la régulation de l'apoptose, à la promotion de la néo-angiogenèse, à l'invasion tissulaire et aux métastases (Papadas et al., 2020).

Les PG sLRP (*small Leucine-rich Repeat Proteoglycan*) : Exemple du biglycane

Le biglycan fait partie de la famille de classe I des petits protéoglycanes riches en leucine (sLRP) (Schaefer & Iozzo 2008), découvert dans le développement osseux il y a près de 30 ans. Il code pour une protéine de 42 kDa contenant des répétitions riches en leucine, auxquelles une ou deux chaînes latérales glycosaminoglycane (GAG) sont liées de manière covalente. Les chaînes GAG de chondroïtine ou de dermatane-sulfate spécifiques du tissu sont attachées à des résidus d'acides aminés à l'extrémité N-terminale de la protéine centrale (Schaefer & Schaefer 2010). Le biglycane, exprimé de manière ubiquitaire (Bianco et al., 1990), est synthétisé comme un précurseur qui doit être clivé par BMP-1 afin d'être activé (Scott et al., 2000). Le biglycane sécrété interagit avec de nombreux composants de la MEC, incluant l'élastine et le collagène de type I, II, III et VI mais également des facteurs de croissance et cytokines, tels que le TGF- β ou encore le TNF- α . De ce fait, il influence de nombreux processus biologique, notamment en tant que partie du système immunitaire inné, régulateur de l'ostéogenèse ou encore régulateur de l'intégrité musculaire (Nastase et al., 2012).

L'implication du biglycane en tant qu'acteur pro-angiogénique a été rapportée. Notamment, la stimulation des EC par du biglycan entraîne une augmentation de leur potentiel angiogénique, engendré par l'augmentation de l'activité de HIF-1 α , aboutissant à l'expression du VEGF. Ces effets médiés par la voie de signalisation des TLR ont été attribués à l'activation des récepteurs TLR2 et TLR4 par le biglycan (Hu et al., 2016).

Les PG de surface cellulaire : Exemple du syndécan-1

Le Syndécan-1 (Sdc-1) est un protéoglycane héparane sulfate (HS) transmembranaire, qui fait partie d'une famille de quatre membres. Les différences les plus évidentes entre les syndécans incluent (ainsi que des différences de distribution) la sous-classification de la famille en fonction de l'existence de sites de liaison aux GAG : soit aux deux extrémités de l'ectodomaine (syndécan-1 et -3) soit à la partie distale seulement (syndécan-2 et -4). Le Sdc-1 est exprimé de manière ubiquitaire sur les cellules épithéliales et fonctionne comme corécepteur pour une myriade de chimiokines, de cytokines et de facteurs de croissance.

Sdc-1 est impliqué dans l'adhésion cellulaire, la prolifération, la migration, l'invasion et les métastases (Szatmári et al., 2015). La co-expression du Sdc, de la E-cadhérine et de c-Met constitue une signature associée à des facteurs liés à l'angiogenèse et la lymphogenèse dans le carcinome canalaire du sein *in situ* (Götte et al., 2007). Sdc-1 est physiquement associé au VEGFR-2 et facilite la signalisation VEGF/VEGFR-2 dans les EC glomérulaires (Jing et al., 2016). Une étude récente a mis en évidence que le Sdc soutenait l'angiogenèse en favorisant la voie du facteur tissulaire, impactée lorsque le Sdc est réprimé. De plus, l'activation de cette voie de signalisation a été corrélée avec le pronostic des patientes TNBC, ouvrant la voie à de potentielles applications thérapeutiques (Nassar et al., 2021).

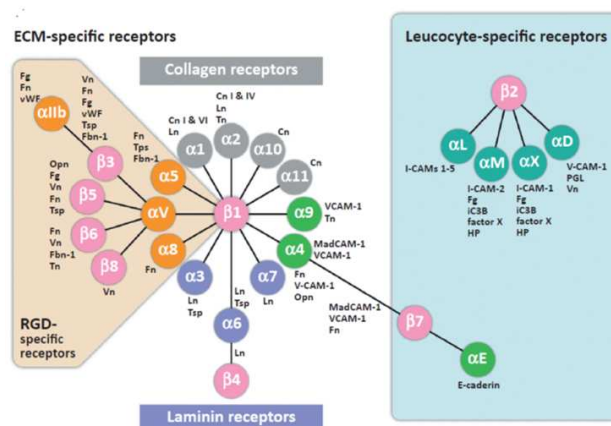
Les PG de la membrane basale : Exemple du perlecan

Le perlécan est l'un des plus grands protéoglycanes découverts. Il possède un noyau protéique d'environ 500 kDa qui peut être modifié par l'ajout au niveau N-terminal de chaînes latérales de HS, mesurant ~65 kDa chacune (Murdoch et al., 1992). Son noyau protéique est divisé en cinq domaines, chaque domaine étant impliqué dans la liaison à divers partenaires, lui conférant une diversité biofonctionnelle distincte (Farach-Carson et al., 2014). La complexité et la taille même de la protéine de base n'ont d'égal que la nature modulaire et la régulation complexe du gène codant pour ce protéoglycane clé, HSPG2. Bien qu'il soit principalement présent dans la MB de la plupart des cellules endothéliales et épithéliales, le perlécan peut également s'associer à la surface cellulaire via une interaction avec l'intégrine $\alpha 2 \beta 1$. Il est capable de réguler l'homéostasie dans une vaste gamme de processus cellulaires, y compris l'adhésion cellulaire, l'endocytose, la formation osseuse, le métabolisme lipidique, l'assemblage des nœuds périphériques, inflammation et cicatrisation des plaies, la thrombose, l'angiogenèse tumorale, le développement cardiovasculaire ou encore l'autophagie (Gubbiotti et al., 2017).

Physiologiquement, le perlécane coordonne intrinsèquement l'angiogenèse en hébergeant des propriétés pro et anti-angiogéniques au sein de sa propre molécule. En tant que molécule intégrale, le perlécane agit principalement de manière pro-angiogénique sur l'axe de signalisation VEGF-A/VEGFR-2. Le perlécane renforce la phosphorylation du VEGFR-2 médiée par le VEGF-A (Zoeller et al., 2009), qui peut lui-même stimuler la synthèse de perlécane (Kaji et al., 2006), soulevant l'existence d'une boucle de rétroaction positive. De plus, les chaînes latérales HS en N-terminal du perlécane agissent comme un réservoir pour les facteurs de croissance, qui peuvent alors être présentés dans l'agencement approprié à leurs récepteurs de surface cellulaire respectifs (Gubbiotti et al., 2017). Compte tenu du rôle susmentionné du perlécane dans l'angiogenèse physiologique, il ne serait pas surprenant que, dans le cadre de la tumorigenèse, le perlécane soit au service de la tumorigenèse.

Le perlécane favorise l'angiogenèse pathologique via des interactions directes avec une multitude d'angiokines se liant à HS telles que la progranuline (GRN), le VEGF-A et le PDGF, ainsi que plusieurs membres de la superfamille du FGF. Contrairement à son N-terminal, le domaine V C-terminal du perlécane, l'endorepelline, joue un rôle opposé au perlécane dont elle résulte après clivage protéolytique. Elle inhibe l'angiogenèse, la morphogenèse capillaire et la migration des EC. Une expression élevée du perlécane a été corrélée à un faible taux de survie dans les TNBC. L'utilisation d'un anticorps ciblant le perlécane a montré des effets inhibiteurs significatifs sur la croissance de xénogreffes de TNBC chez la souris (Kalscheuer et al., 2019), suggérant son potentiel ciblage dans le traitement du TNBC.

II.2.1.1.5. Les intégrines



(Fig. 31). La plupart des intégrines se lient aux protéines contenant la séquence RGD, qui favorise la spécificité de liaison (Hynes, 2002). Ainsi, elles assurent la médiation de l'adhésion cellulaire en liant le cytosquelette d'actine des cellules aux composants de la matrice, tout en étant capable de fournir une entrée sensorielle via la mécanotransduction au travers de nombreuses voies de signalisation.

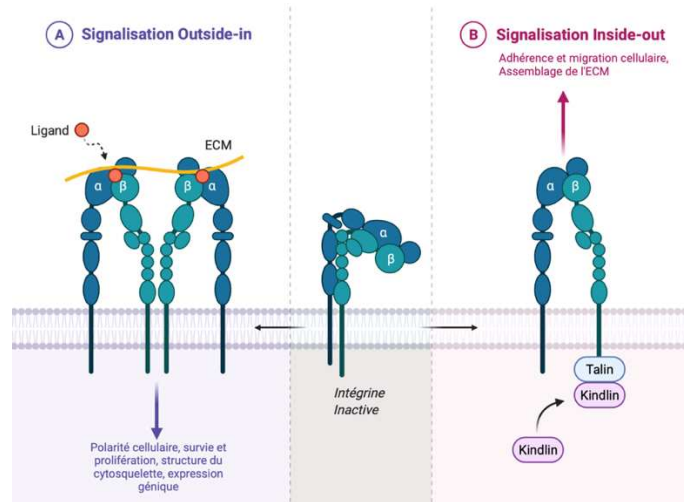


Figure 32 : Voies de signalisation des intégrines Outside-in et Inside-out.
Créée sur BioRender.com.

Les intégrines coopèrent avec différents récepteurs de surface cellulaire, y compris les récepteurs du facteur de croissance et les récepteurs couplés aux protéines G, mais aussi des molécules de liaison intracellulaire, telles que les TK FAK ou Src, pour médier leur effet de signalisation cellulaire agissant sur la polarisation cellulaire, la propagation, la migration, la survie ou encore l'expression des gènes (Signalisation Outside-in, Fig. 32 (A)). Inversement, des signaux intracellulaires peuvent être transmis à l'extérieur de la cellule avec pour but de modifier l'affinité de l'intégrine pour les ligands de la matrice affectant ainsi l'assemblage de la MEC, la migration cellulaire ou encore les processus d'adhésion (Signalisation Inside-out, Fig. 32 (B)). La signalisation bidirectionnelle des intégrines est cruciale pour l'apparition et la progression du cancer. Plusieurs études ont identifié les intégrines impliquées dans la promotion des tumeurs. Par exemple, l'expression et la signalisation élevées des intégrines $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha v\beta 6$ par les cellules tumorales sont corrélées à la progression de la maladie dans divers types de tumeurs, telles que les tumeurs du sein (Levental et al., 2009). Plusieurs études ont rapporté le rôle important des intégrines de liaison à la laminine $\alpha 3\beta 1$ et $\alpha 6\beta 4$, dans le développement et la progression de la tumeur (Yazlovitskaya et al., 2019). Notamment, il a été montré dans un modèle de cancer rénal que l'inhibition des sous-unités $\alpha 3$ et $\alpha 6$ altérerait l'adhésion cellulaire et la migration cellulaire, plus que la suppression de l'une ou l'autre des sous-unités seules, suggérant des fonctions distinctes et complémentaires indépendante de la signalisation PI3K mais nécessitant une polyubiquitination d'Akt liée à K63 par l'enzyme de modification de l'ubiquitine TRAF6, qui facilite le recrutement d'Akt qui pourra exercer ses fonctions biologiques (Yazlovitskaya et al., 2019).

II.2.1.1.6. SPARC

La protéine sécrétée acide et riche en cystéine (SPARC) est une glycoprotéine de 32 kDa, également connue sous le nom d'ostéonectine. SPARC possède trois domaines spécifiques, qui lui permette d'assurer de nombreuses interactions intra- et inter-cellulaires. Elle est impliquée dans l'organisation physiologique de la matrice, en particulier dans l'arrangement du collagène. S'opposant à l'attachement cellulaire, SPARC est considérée comme ayant des propriétés anti-adhérentes. Bien que nous pourrions penser qu'elle favorise de ce fait la migration cellulaire en entraînant un état adhésif intermédiaire des cellules, il a été mis évidence que la chimiotaxie des EC en réponse au FGF-2 était inhibée par SPARC (Rosset et al., 2017). De multiples facteurs apparaissaient contrôlés par SPARC, c'est notamment le cas du FGF-2, du VEGF, du PDGF ou encore du TGF- β . En plus de moduler les interactions cellules/matrice, SPARC inhibe l'adipogenèse et contribue à l'homéostasie du tissu adipeux blanc (Nagaraju & Sharma, 2011). La progression tumorale est favorisée par la libération de cytokines et de métalloprotéases en réponse à la sécrétion SPARC (Nagaraju et al., 2014). SPARC est surexprimée dans de nombreux cancers, y compris le cancer du sein où elle intervient dans nombres d'interactions des cellules cancéreuses avec leur microenvironnement en modulant la prolifération cellulaire, l'adhésion, la migration, l'invasion, l'angiogenèse, l'apoptose (Kim et al., 2017).

II.2.1.1.7. Les matrikines et les matricryptines

Maquart et al. ont défini les matrikines en 1999 comme des « peptides dérivés de la MEC capables de réguler l'activité cellulaire » (Maquart et al., 1999). Ces ligands (par exemple, les répétitions de type EGF de la ténascine C) sont cryptés dans les composants de la matrice et modulent les réponses cellulaires médiées par les récepteurs du facteur de croissance. Le nom matricryptine a été proposé par Davis et al. pour désigner les « fragments enzymatiques de la MEC contenant des sites matricryptiques exposés » (Davis et al., 2000). Ce terme était limité aux fragments biologiquement actifs de la MEC exposant des sites matricryptiques fonctionnels qui ne sont normalement pas exposés dans les molécules de pleine longueur. Tran et al. distinguent les « matrikines naturelles, qui signalent directement depuis le milieu extracellulaire, et les matrikines cryptiques ou matricryptines qui nécessitent une protéolyse limitée pour agir en tant que ligands et remplir leurs rôles biologiques » (Tran et al., 2005).

Les collagènes et les PG, l'élastine et les laminines sont des sources majeures de matricryptines ou de fragments bioactifs. Les protéines matricellulaires (par exemple SPARC) sont des sources supplémentaires de peptides bioactifs. Certaines protéines matricielles sont clivées en plusieurs fragments avec des activités similaires (par exemple le collagène IV) ou opposées (par exemple SPARC (Clark & sage, 2008)).

II.2.1.2. La dégradation de la matrice extracellulaire

La contribution des protéases dans la tumorigénèse est incommensurable du fait de leur capacité à réguler le devenir, la localisation et l'activité de protéines, mais également les interactions protéine-protéine et la genèse de nouvelles molécules bioactives (López-Otín & Bond, 2008). Les protéases (également appelées protéinases, peptidases ou encore enzymes protéolytiques) représentent une grande famille d'enzymes qui catalysent le clivage des protéines en peptides ou en acides aminés par hydrolyse de liaisons peptidiques à leurs extrémités terminales (exopeptidases) ou à l'intérieur de la chaîne peptidique (endopeptidases). Le dégradome humain contiendrait au moins 569 protéinases réparties intracellulairement, extracellulairement, et à la surface cellulaire, et se décompose en cinq familles de protéases : (1) les métalloprotéases, (2) les sérine protéases, (3) les cystéine protéases, (4) les protéases d'acide aspartique, et (5) les thréonine protéases, basée sur la fraction chimique qui participe à l'hydrolyse (Rawlings et al., 2010).

- La **famille des métalloprotéases metzincine** constitue la plus grande classe de protéases, est ainsi nommée pour la présence d'un motif de liaison au zinc conservé au site actif. La fonction catalytique et l'intégrité structurale des métzincines dépendent de l'utilisation de l'ion zinc pendant la réaction enzymatique. Les MMPs, les ADAMs et les ADAMTS représentent certains des membres les plus étudiés de la famille des metrizines (Shimoda et al., 2020).
- Les **MMPs** sont classés en six groupes ; collagénases, gélatinases, stromélysines, matrilysines, MT-MMP et autres MMPs. Ceci est basé sur des caractéristiques communes telles que la spécificité du substrat, la similarité de séquence et l'organisation des domaines (Visse & Nagase, 2003). Les métalloprotéases sont des enzymes multidomaines qui partagent des caractéristiques structurales communes. Les MT-MMP sont ancrées à la membrane cellulaire par une ancre GPI ou contiennent un domaine transmembranaire suivi d'une courte queue cytoplasmique. Pour médier leurs activités protéolytiques, les MMP doivent être activées par clivage de leur pro-domaine. Cette activation peut se faire dans le milieu extracellulaire, à la surface cellulaire ou encore dans le cytoplasme. Plusieurs protéases comme la plasmine et les MMPs elles-mêmes sont capables d'activer certaines MMPs en clivant leur pro-peptide. Par exemple, la MMP-1 est activée par la plasmine ou la MMP-3. La forme inactive de la MMP-2 peut se lier à MT-1-MMP, en formant un complexe trimoléculaire avec l'inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases-2 (TIMP-2). La formation de ce complexe à la surface de la cellule permet à une seconde molécule de MT1-MMP de couper le peptide N-terminal de la pro-MMP-2 et d'activer ainsi la protéase. Dans ce mécanisme d'activation, TIMP-2, agissant comme une molécule adaptatrice, joue un rôle d'activateur et non d'inhibiteur et MT-1MMP joue un double rôle de molécule réceptrice et activatrice. Certaines MMP peuvent aussi être activées à l'intérieur de la cellule, avant leur sécrétion. C'est en particulier le cas de plusieurs MT-MMP qui ont une séquence spécifique (RRKR) dans leur pro-domaine, reconnue par les sérines protéases furines convertases (Chantrain & DeClerck, 2002). Le domaine catalytique des MMPs, contient un motif de trois résidus histidine qui chélate l'ion zinc du site catalytique. Celui-

ci, est suivi d'un domaine de type hémopexine C-terminal, qui est responsable, à l'exception de MMP-7, de la spécificité du substrat et des fonctions non protéolytiques, telles que les interactions avec les différentes MMPs et TIMPs (Gomis-Rüth, 2009).

Enzymes	Substrats MEC	Substrats non-MEC
Collagénase		
MMP-1 (collagénase-1 interstitielle)	Collagènes de type I, II, III, VII, et X, gélatines, aggrecan, protéine de liaison, entactine, tenascine, perlecan	α 2-macroglobuline, inhibiteur de l' α 1-protéinase, α 1-antichymotrypsine, IGFBP-2,-3,-5, proIL-1 β , CTGF
MMP-8 (collagénase-2)	Collagènes de type I, II et III, gélatines, aggrecan, protéine de liaison	Inhibiteur de l' α 1-protéinase
MMP-13 (collagénase-3)	Collagènes de type I, II, III, IV, IX, X et XIV, aggrecan, fibronectine, tenascine, osteonectine, laminine, perlecan	CTGF, pro-TGF- β , MCP-3, α 1-antichymotrypsine
Stromélysine		
MMP-3 (stromélysine-1)	Aggrecan, decorine, gélatines, fibronectine, laminine, collagènes de type III, IV, IX et X, tenascine, protéines de liaison, perlecan	IGFBP-3, proIL-1 β , HB-EGF, CTGF, cadhérine E, α 1-antichymotrypsine, inhibiteur de l' α 1-protéinase, α 2-macroglobuline, plasminogène, uPA, proMMP-1, -7, -8, -9, -13
MMP-10 (stromélysine-2)	Aggrecan, fibronectine, laminine, collagènes de type III, IV, et V, protéine de liaison	Pro-MMP-1, -7, -8, -9
Matrylisine		
MMP-7 (matrylisine-1)	Aggrecan, gélatines, fibronectine, laminine, syndécan-1, élastine, entactine, collagène de type IV, tenascine, decorine, protéine de liaison	Pro- α -defensine, Fas, Fas-L, β 4 integrine, cadhérine E, pro-TNF α , CTGF, HB-EGF, RANKL, IGFBP-3, plasminogène
MMP-26 (matrylisine-2)	Gélatine, collagène de type IV, fibronectine, fibrinogène, vitronectine	ProMMP-9, inhibiteur de l' α 1-protéinase
Gélatinase		
MMP-2 (gélatinase A)	Gélatines, collagènes de type I, IV, V, VII, X et XI, laminine, fibronectine, élastine, aggrecan, decorine, protéine de liaison	Pro-TGF- β , pro-HGF, Récepteur I au FGF, MCP-3, IGFBP-5, proIL-1 β , galectine-3, FGF1, plasminogène
MMP-9 (gélatinase B)	Gélatines, collagènes de type III, IV et V, aggrecan, élastine, entactine, protéine de liaison, vitronectine	Pro-TGF- β , récepteur α à l'IL-2, ligand de kit, IGFBP-3, proIL-1 β , ICAM-1, inhibiteur de l' α 1-protéinase, galectine-3, plasminogène, CCL7, CCL11, CXCL12, RECK
MMP activés par la Furine		
MMP-11 (stromélysine-3)	Fibronectine, laminine, aggrecan, gélatines	Inhibiteur de l' α 1-protéinase, α 2-macroglobuline, IGFBP-1
MMP-28 (epilysin)	-	Caséine
Les autres MMPs de type sécrétées		
MMP-12 (metalloelastase)	Elastine, aggrecan, fibronectine, collagène de type IV, ostéonectine, laminine, nidogène	Plasminogène, apolipoprotéine
MMP-19 (RASI-1)	Collagène de type IV, gélatine, fibronectine, tenascine, aggrecan, COMP, laminine, nidogène	IGFBP-3
MMP-20 (enamélysine)	Amélogénine, aggrecan, gélatine, COMP	-
MMP-21 (XMMP)	Aggrecan	-
MMP-27 (Epilysine)	-	-

Tableau 6 : Les MMPs. D'après Shimoda et al., 2020.

De plus, l'activation allostérique des métalloprotéases est coordonnée par leurs substrats ou d'autres partenaires de liaison comme les PG, soit par leur noyau, soit par leurs chaînes de GAG attachées. Il a été mis en évidence que la MMP-2 et la MMP-9 étaient fortement exprimés dans les cellules de cancers mammaires comparé aux tissus sains, et cette hausse d'expression est corrélée à la présence de métastases ganglionnaires et la stadification de la tumeur, suggérant leur utilité en tant que facteurs pronostic dans ce type de cancer (Li

et al., 2017). Bien que la MMP-2 et MMP-9 soient fortement régulées à la hausse dans de nombreux types de cancer, l'expression accrue des MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-11, MMP-13 et MMP-14 (MT1-MMP) est corrélée à une diminution de la survie dans de nombreux cancers (Vihinen & Kähäri, 2002). La MMP-13 promeut la libération de VEGF par les fibroblastes et les cellules endothéliales et favorise l'angiogenèse et les capacités invasives des cellules tumorales (Kudo et al., 2012).

Enzymes	Substrats MEC	Substrats non-MEC
MT-MMP DE TYPE I		
MMP-14 (MT1-MMP)	Collagène de type I, II et III, gélatines, aggrecan, fibronectine, laminine, fibrine, syndécan-1, testican-1	Pro-MMP-2 et -13, CD44, MCP-3, transglutaminase tissulaire, CCL7, CXCL12
MMP-15 (MT2-MMP)	Fibronectine, tenascine, nidogène, aggrecan, perlecan, laminine	Pro-MMP-2, transglutaminase tissulaire
MMP-16 (MT3-MMP)	Collagène de type III, fibronectine, gélatine	Pro-MMP-2, transglutaminase tissulaire
MMP-24 (MT5-MMP)	Protéoglycanes	Pro-MMP-2
MMP à ancre GPI		
MMP-17 (MT4-MMP)	Gélatine, fibrinogène	-
MMP-25 (MT6-MMP)	Gélatine, collagène de type IV, fibrine, fibronectine, laminine	Pro-MMP-2
MT-MMP DE TYPE II		
MMP-23	Gélatine	-

Tableau 7 : Les MT-MMPs. D'après Shimoda et al., 2020.

- Une famille de protéases dépendante du zinc et comprenant un domaine de fixation aux intégrines (Bridges & Bowditch, 2005) est celle composée des **ADAMs** (*A Disintegrin And Metalloproteinase*). Cette famille comprenant les ADAMs liés à la membrane et les ADAMTS (*A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs*) sécrétés qui sont caractérisés par des motifs de désadhésion/adhésion cellulaire et de fusion. Dans la majorité des ADAMs transmembranaires de type I, le domaine hémopexine MMP est remplacé par des domaines désintégrines, riches en cystéine et en EGF (Fig. 33). Les ADAMTS, quant à elles, ne contiennent pas de domaine EGF ni de domaine transmembranaire/intracellulaire, mais elles possèdent des motifs THBS de type I associés à leur domaine riche en cystéine (Van Goor et al., 2009).

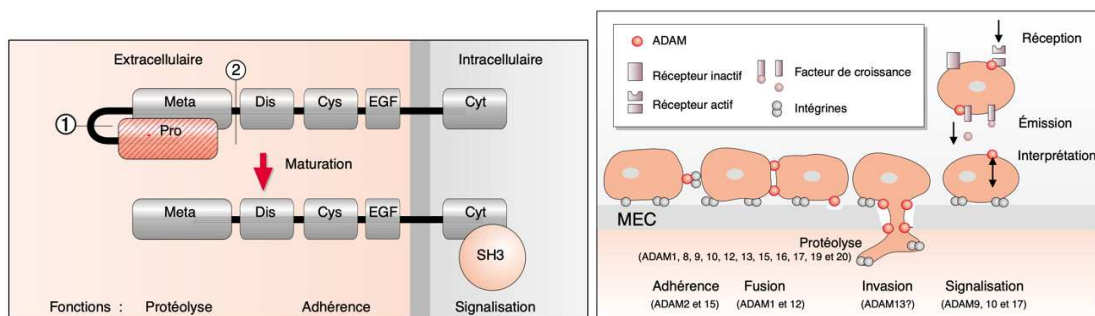


Figure 33 : Structure et fonction des protéines ADAM. D'après Alfandari et al., 1999.

Enzymes	P/NP	Fonctions
ADAM		
ADAM-1 (Fertilin-a)	NP	Liaison et fusion spermatozoïdes et ovules; Liaison aux intégrines $\alpha 6\beta 1$ et $\alpha 9\beta 1$
ADAM-2 (Fertilin-b)	NP	Liaison et fusion spermatozoïdes et ovules; Liaison aux intégrines $\alpha 6\beta 1$ et $\alpha 9\beta 1$
ADAM-8	P	Shedding de CD23
ADAM-9 (Meltrin-y)	P	Shedding/digestion de bAPP, fibronectine et gélatine ; Liaison aux intégrines $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 9\beta 1$ et $\alpha V\beta 5$
ADAM-10 (Kuzbanian)	P	Shedding/digestion de DLL1, bAPP, CD23, CD40, L1-CAM, CD44, protéine basic de myeline, aggrecan, collagène de type IV et gélatine
ADAM-12 (Meltrin-a)	P	Shedding/digestion de HB-EGF, IGFBP-3, IGFBP-5, aggrecan, collagène de type IV, gélatine et fibronectine ; développement/ régénération musculaire ; Liaison aux intégrines $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$ et $\alpha 9\beta 1$
ADAM-15 (Metargidin)	P	Digestion du collagène de type IV et de la gélatine ; Liaison aux intégrines $\alpha V\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha 9\beta 1$
ADAM-17 (TACE)	P	Shedding/digestion de TNF-a, TGF-a, TNFRI, TNFRII, M-CSFR, l'amphiréguline, IL6-R, HB-EGF, b-APP, Notch, L-sélectine, RANKL, L1-CAM, CD30 et CD44
ADAM-19 (Meltrin-b)	P	Shedding/digestion de la neurégliline ; Liaison aux intégrines $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 5\beta 1$
ADAM-28	P	Shedding/digestion de la protéine basique de méyéline, CD23, le facteur vW et IGFBP-3 ; liaison aux intégrines $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$ et $\alpha 9\beta 1$
ADAM-33	P	Shedding/digestion du peptide Kit-L, CD23, RANKL et la chaine b de l'insuline ; mutation chez les patients atteints d'asthme bronchique ; Liaison aux intégrines $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha 9\beta 1$
ADAMTS		
ADAMTS-1	P	Digestion de l'aggrecan et le versican ; Liaison à l'héparine
ADAMTS-2	P	Traitement des N-propeptides de collagène
ADAMTS-3	P	Traitement des N-propeptides de collagène
ADAMTS-4 (aggrecanase-1)	P	Digestion de l'aggrecan, de la fibronectine, du brevican et du versican
ADAMTS-5 (aggrecanase-2)	P	Digestion de l'aggrecan
ADAMTS-8	P	Digestion de l'aggrecan ; inhibition de l'angiogenèse
ADAMTS-9	P	Digestion de l'aggrecan
ADAMTS-13	P	Digestion du facteur vW
ADAMTS-14	P	Traitement des N-propeptides de collagène
ADAMTS-15	P	Digestion de l'aggrecan

Tableau 8 : Les ADAMs et ADAMTs. (P pour Protéinase, NP pour non-protéinases).

D'après Shimoda et al., 2020.

Physiologiquement, la régulation fine des métalloprotéines dépend en autres, de l'intervention des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMP pour *Tissue Inhibitors of MetalloProteinases*). Cette famille comprend 4 membres largement distribués. Les TIMPs possèdent une gamme d'activités très large, et peuvent inhiber les MMPs, les ADAMs et les ADAMTs. Récemment, il a été mis en évidence que le TIMP-3 facilite la liaison des métalloprotéinases cibles, telles que la MMP-1, au récepteur d'endocytose LRP-1, facilitant ainsi leur piégeage (Carreca et al., 2020). Les TIMPs ont également des activités biologiques indépendantes des métalloprotéinases; ceux-ci incluent des effets sur la croissance, la différenciation et la migration cellulaires, l'angiogenèse, l'apoptose ou encore la plasticité synaptique (Brew & Nagase, 2010). Par exemple, le TIMP-3, en plus de son rôle anti-angiogénique, possède des propriétés pro-apoptotiques, anti-métastatiques et

anti-tumorigéniques, expliquant en partie le fait que son expression soit réduite dans de nombreux cancers agressifs (Rai & Baird, 2020).

TIMPs	Inhibition des MMPs	Inhibition des ADAMs
TIMP-1	Inhibition faible des MT-MMPs (MMP-14, -16 et -24) MMP-19	ADAM-10
TIMP-2	Toutes les MMPs	ADAM-12
TIMP-3	Toutes les MMPs	ADAM-10, -12, -17, -28 et -33 ADAMTS-1, -2, -4 et -5
TIMP-4	La plupart	ADAM-17, -28 et -33

Tableau 9 : Les TIMPs. D'après Shimoda et al., 2020.

Les métalloprotéases sont produites par différents types cellulaires incluant les fibroblastes, les cellules épithéliales, inflammatoires, endothéliales et cancéreuses (Fig. 34). Les MMPs sont responsables du catabolisme de presque toutes les protéines de la matrice, ainsi que des régulateurs cellulaires non-MEC (Rodríguez & Morrison, 2010). Par exemple, CTGF (*Connective Tissue Growth Factor* ou CCN2) peut être dégradée par les MMP-1/-3/-7/-13, l'IGFBP-3 par les MMP-1/-3/-7/-9 et la galectine-3 par les MMP-2/-9 (Lu et al., 2011). Les cellules du microenvironnement tumoral collaborent entre elles pour activer des cascades protéolytiques interconnectées. Outre leur capacité de dégradation, les MMPs, les ADAMs et les ADAMTS dégradent de nombreux facteurs de croissance et cytokines retrouvés dans la MEC.

L'implication physiologique et pathologique des MMPs est bien caractérisée dans la littérature et de nombreuses études se sont intéressées à leur ciblage. Les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* suggèrent que le ciblage des MMPs peut supprimer l'invasion des cellules tumorales et les métastases. Toutefois, les inhibiteurs développés jusqu'ici n'ont pas montré de bénéfice thérapeutique suffisant dans les essais cliniques. Ces échecs pourraient être liés au fait que certains membres de la famille MMPs exercent des rôles contradictoires à différents stades de la progression du cancer, en fonction entre autres facteurs du stade tumoral, du site tumoral, de la localisation enzymatique et du profil du substrat (Gialeli et al., 2011).

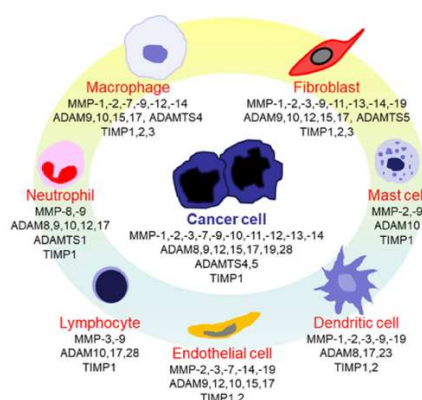


Figure 34 : Profil d'expression des métalloprotéases et leur(s) inhibiteur(s) physiologique(s) dans les cellules tumorales et stromales. D'après Shimoda et al., 2020.

- Le **système protéolytique plasminogène/plasmine (PP)** contribue à divers processus physiologiques et pathologiques par sa capacité à exercer une activité protéolytique, associée à la régulation de la dégradation de la fibrine, au renouvellement de la MEC et à la migration cellulaire (Law et al., 2013). Outre les caractéristiques structurales de base communes aux protéases telles qu'un peptide signal, un propeptide lié à un domaine catalytique, les protéases fibrinolytiques présentent de grandes régions fonctionnellement autonomes. Elles possèdent notamment des domaines kringle, responsables des interactions PP avec des substrats, des inhibiteurs et des régulateurs de l'activation du système (Castellino & McCance, 1997), un domaine EGF-like et un domaine en doigt à son extrémité N-terminale, permettant la liaison à la fibrine et d'autres récepteurs (LRP, Annexin II). Les enzymes composant le système PP sont des sérine protéinases dotées d'un site actif constituée de sérine, d'acide aspartique et d'histidine (Hébert et al., 2016). Les activateurs du plasminogène de type urokinase (uPA) et de type tissulaire (tPA) sont les sérine protéases qui constituent les principaux acteurs de l'activation de la plasmine à partir du plasminogène, forme zymogène de la plasmine.

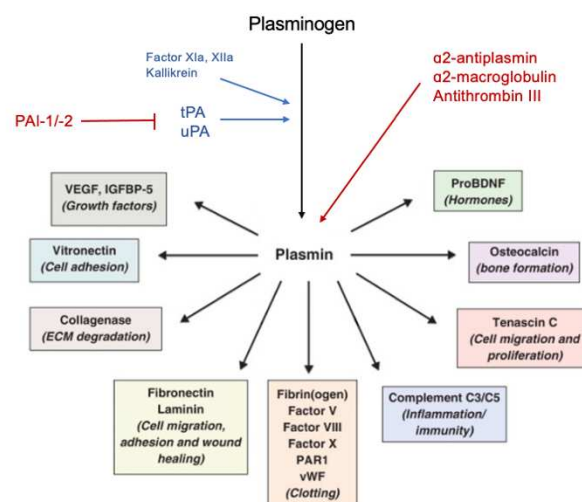


Figure 35 : Régulation du système Plasminogène/plasmine et ses rôles fonctionnels. Adaptée d'après Law et al., 2013.

- L'**uPA** est synthétisé par les cellules endothéliales et épithéliales, les leucocytes, les monocytes, les fibroblastes et les cellules cancéreuses (Hildenbrand et al., 2010). L'uPA déclenche la génération de plasmine pendant la migration et l'invasion cellulaires dans des conditions physiologiques et pathologiques. Il est synthétisé sous forme d'une molécule zymogène à chaîne unique. La maturation de ce précurseur conduit à la formation d'une protéase à deux chaînes lors de son activation protéolytique par de nombreuses protéases comme les cathepsines B et L, la trypsine, l'élastase ou la thrombine (Schmitt et al., 1991). L'uPA sous sa forme active, qui fonctionne avec son récepteur spécifique uPAR, est principalement présente dans les espaces extravasculaires (lors du remodelage tissulaire, de l'angiogenèse et l'invasion tumorale) (Urano et al., 2018). La liaison d'uPA à son récepteur active la protéase,

mais peut également initier une signalisation transmembranaire de réponses biologiques, incluant la croissance cellulaire, l'adhésion et la migration. L'activation d'uPA est ainsi dépendante de la biodisponibilité de son récepteur spécifique. Ce dernier dépend à son tour du récepteur LRP-1, qui médie l'endocytose du complexe uPAR/uPA/PAI-1 via des vésicules recouvertes de clathrine vers les lysosomes (Gonias & Gaultier, 2011).

- Le **tPA** est principalement synthétisé par les cellules endothéliales vasculaires, les kératinocytes, les mélanocytes et les neurones et est associé au contrôle de la dégradation intravasculaire de la fibrine (Hébert et al., 2016). Après conversion en sa forme active, le tPA acquiert une activité environ 10 fois plus élevée et joue un rôle central dans la fibrinolyse intravasculaire (Urano et al., 2018). Outre son activité protéolytique, le tPA endothélial et son récepteur l'Annexine II régulent le dépôt intravasculaire de fibrine.

La liaison peptidique entre Arg560 et Val561 constitue une petite boucle de pont disulfure dans le plasminogène, qui, clivée après être reconnue par uPA et tPA, génère de la plasmine. Cette cascade enzymatique peut être contrecarrée irréversiblement par l'action d'inhibiteurs de protéases à sérines (SERPINS) comme PAI-1, -2 (SERPINE1, E2), l' α 2-antiplasmine et l'antithrombine III (SERPINC1). L' α 2-macroglobuline, inhibiteur de protéase de très grande taille, est également capable d'inhiber la cascade fibrinolytique.

II.2.2. Les différentes cellules du microenvironnement tumoral

Les cellules communiquent entre elles et avec le stroma environnant de manière dynamique. Cette communication se fait parfois de manière directe, par le biais de complexes jonctionnels, et le plus souvent par des facteurs sécrétés dans le milieu extracellulaire (hormones, facteurs de croissance, chemokines, etc...) qui agissent sur des récepteurs spécifiques à la surface de leurs cibles cellulaires. Le dialogue complexe entre les cellules tumorales et les cellules stromales qui composent le microenvironnement joue un rôle déterminant dans l'initiation, la progression et l'évolution maligne de la maladie cancéreuse.

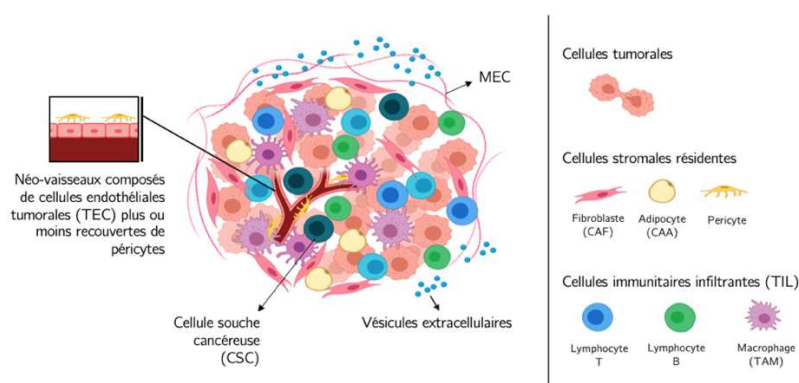


Figure 36 : Représentation schématique du microenvironnement tumoral et ses composants.

Adaptée d'après Osman et al., 2020.

II.2.2.1. Les adipocytes associés au cancer (CAA)

Les adipocytes représentent le composant cellulaire majoritaire du microenvironnement du cancer du sein. En effet, le tissu mammaire est composé à 90% de tissus adipeux blanc (WAT pour *White Adipose Tissue*) interagissant de manière permanente avec les cellules épithéliales (Vandeweyer & Hertens, 2002). Le WAT est histologiquement caractérisé comme un tissu conjonctif mou au sein duquel les adipocytes s'organisent en forme polyédrique. Ils sont séparés par des fibres de réticuline et de nombreux capillaires sanguins ainsi que par des fibres nerveuses amyéliniques (fibres sympathiques noradrénergiques). Les adipocytes sont groupés en petits lobules, séparés par de fines cloisons conjonctives contenant des fibroblastes, des macrophages, des mastocytes et des fibrilles de collagène. En plus de fournir une source d'énergie, le WAT est un organe endocrinien à part entière, caractérisé par la production de métabolites, d'hormones et de cytokines (adipokines), les rendant hautement susceptibles d'influencer l'agressivité tumorale (Guaita-Esteruelas et al., 2018). Lorsqu'ils sont co-cultivés avec des cellules tumorales mammaires, les adipocytes arborent un phénotype spécifique. Par analogie aux CAF et aux TAM, ces cellules adipocytaires péri-tumorales, dont le phénotype, le métabolisme et les sécrétions diffèrent des adipocytes « naïfs » ont été nommées les CAA pour *Cancer-Associated Adipocytes* (Dirat et al., 2010).

Ainsi, les CAA sont caractérisés à la fois par : une altération du métabolisme lipidique se traduisant par une délipidation et une diminution de l'expression des marqueurs adipocytaires ; la surexpression de molécules pro-inflammatoires comme l'IL-6 ; et la surexpression de protéines de la MEC ou impliquées dans son remodelage (Dirat et al., 2011 ; Abramczyk et al., 2015). Les composants de la MEC sécrétés par les CAA, nécessaires au soutien mécanique, jouent également un rôle décisif dans la progression du cancer (Ojima & Nakajima et al., 2016). Les adipocytes sont entourés d'une MB composée de collagène de type VI et laminine comme principaux constituants (Mariman & Wang, 2010). Le collagène de type VI, très exprimé par les adipocytes péri-tumoraux, favorise la croissance et la survie des cellules tumorales mammaires via les récepteurs de protéoglycane NG2/chondroïtine sulfate (Iyengar et al., 2005). Les CAA sécrètent également les MMP-1, -7, -10, -11 et -14 qui contribuent au remodelage de la MEC (Chavey et al., 2003). La MMP-11, dont l'expression favorise la croissance tumorale mammaire pourrait jouer un rôle dans l'apparition des matrikines issues du collagène de type VI (Motrescu et al., 2008). Présents au niveau du front invasif des tumeurs mammaires (Dirat et al., 2011), les CAA induisent l'expression de marqueurs mésenchymateux et favorisent l'invasivité des cellules tumorales mammaires (Lee et al., 2015).

Considérant l'ensemble de ces données, l'obésité apparaît comme un facteur de risque non-négligeable de développer un cancer. Notamment, il est prouvé que les femmes obèses pré-ménopausées (dont l'Indice de Masse Corporelle (IMC) est supérieur à 30) sont plus à risque de développer un TNBC que les femmes dont l'IMC est compris entre 19 et 25 (Pierobon & Frankenfeld, 2013). Il est cependant important de distinguer le tissu adipeux sous-cutané du tissu adipeux viscéral. En effet, ce dernier est métaboliquement plus actif, et riche en cellules

inflammatoires et cytokines. Les femmes atteintes d'obésité viscérale ont donc un risque plus élevé de survenue d'un cancer mammaire que les femmes atteintes d'obésité sous-cutanée (Donohoe et al., 2011).

Jusqu'à présent, nous n'avons évoqué que l'implication du WAT dans la cadre du cancer, mais il faut savoir que le tissu adipeux brun (BAT pour *Brown Adipose Tissue*), bien que peu présent chez l'Homme adulte, pourrait bien avoir un rôle à jouer. Le BAT, primordial chez le fœtus et le nouveau-né, est un organe thermorégulateur impliqué dans la thermogenèse sans frisson et joue un rôle dans les processus métaboliques de la clairance des lipides à la tolérance du glucose (Bauwens et al., 2014). Chez des patientes atteintes d'un cancer du sein, Cao et al. ont mis en évidence une fréquence trois fois plus élevée de BAT par rapport aux témoins atteints d'autres cancers (Cao et al., 2014). Au moyen d'une étude rétrospective, l'activation des BAT a été corrélée avec une prévalence plus faible d'avoir des métastases par rapport aux patientes sans adipocytes bruns actifs (Pace et al., 2020).

II.2.2.2. Les fibroblastes associés au cancer (CAF)

Dans le stroma tumoral, les fibroblastes peuvent atteindre jusqu'à 80% de la masse tumorale de certaines tumeurs solides caractérisées par une réaction desmoplastique. Elle se caractérise par production excessive de tissus connectifs fibreux accompagnée d'une activation de chacun des composants cellulaires du stroma. Les fibroblastes sont responsables de la synthèse de la majorité des composants extracellulaires du microenvironnement tumoral, tels que la matrice et les facteurs solubles.

À partir d'un état basal, les fibroblastes peuvent être activés de manière réversible ou irréversible pour former des myofibroblastes en réponse à différents stimuli. En condition physiologique, les myofibroblastes induits par la signalisation du TGF- β , prolifèrent, acquièrent des propriétés contractiles et déclenchent une réponse de blessure pour réparer les dommages cellulaires afin de restaurer l'homéostasie tissulaire. Lorsque l'activation des fibroblastes persiste même en l'absence de lésion initiale (par exemple, dans les lésions chroniques du tissu ou la fibrose), un remodelage pathologique se produit, en partie dépendant de la régulation épigénétique (Zeisberg & Zeisberg, 2013). Le stroma dans les tumeurs solides contient une variété de phénotypes cellulaires et de voies de signalisation associés à la cicatrisation des plaies, valant aux tumeurs d'être considérées comme des « plaies qui ne guérissent pas » (Dvorak, 1986).

En soutenant la tumorigenèse à tous ses stades, les fibroblastes activés acquièrent des propriétés prolifératives augmentées et constituent une population fonctionnellement diversifiée, appelée fibroblastes associés au cancer (CAF pour *Cancer-Associated Fibroblastes*) (Zeisberg & Kalluri, 2013). Ces CAF diffèrent des fibroblastes « normaux » par une production accrue de collagènes, de protéines de la matrice et la sécrétion de facteurs pro-tumoraux (Liu et al., 2019). Près de 80% des fibroblastes acquièrent un phénotype activé dans le cancer du sein (Kalluri & Zeisberg, 2006). Plusieurs sources de CAF sont actuellement proposées notamment

: (A) le recrutement et l'activation de fibroblastes résidents ; (B) l'EMT de cellules épithéliales résidentes ; (C) la transition endothéliale à mésenchymateuse des cellules endothéliales résidentes et (D) la différenciation de cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse (Liu et al., 2019) (Fig. 37). Selon leur origine, la fonction de ces fibroblastes activés peut être diverse et unique. Une grande partie des CAF partagent des caractéristiques similaires à celles des myofibroblastes exprimant α -SMA (Shiga et al., 2015), bien que des sous-populations de CAF n'exprimant pas α -SMA aient été signalées, notamment dans le cancer du pancréas (Ohlund et al., 2017). Les médiateurs de la transformation des CAF sont des facteurs de croissance (comme le TGF- β , le PDGF, le FGF-2) ou des cytokines (comme l'IL-1 β). Les miARN dérivant des cellules tumorales et des cellules stromales peuvent également intervenir, soit comme facteurs solubles, soit transportés via des exosomes dans le milieu tissulaire. Ces miARN modulent la réponse cellulaire à travers une variété de mécanismes moléculaires. Par ailleurs, la rigidité de la MEC constitue un facteur physique supplémentaire entretenant l'activation des CAF, à travers une boucle de rétroaction impliquant l'activation de YAP (*Yes-Associated Protein*) et de la voie de signalisation de la protéine kinase associée à la Rho (ROCK) (Calvo et al., 2013).

Les CAF sont caractérisés par une expression accrue de certains biomarqueurs parmi lesquels se trouvent FAP (protéine d'activation des fibroblastes), FSP1 (protéine 1 spécifique des fibroblastes ou S100A4), la vimentine ou encore les PDGFR α et β . Les protéines LRRC15 (répétitions riches en leucine contenant la protéine membranaire 15), CD10 et GRP77 (récepteur couplé à la protéine G 77) sont également exprimées par les CAF de nombreuses tumeurs solides. Malheureusement, aucun des marqueurs identifiés n'est actuellement capable de sélectionner les CAF avec un haut degré de spécificité, en raison de la grande hétérogénéité caractéristique de cette population cellulaire (Alkasalias et al., 2018).

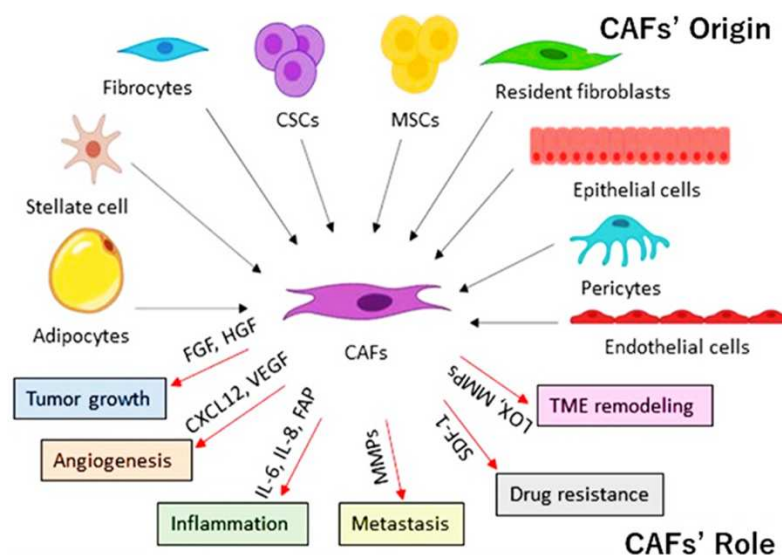


Figure 37 : Représentation schématique des différentes origines et des différents rôles des CAFs.

D'après Osman et al., 2020

Les effets des CAF sont médiés par une stimulation paracrine et autocrine des cellules environnantes via divers facteurs de croissance et cytokines, dont le TGF- β , le SDF-1 (facteur-

1 α dérivé du stroma), le bFGF, le VEGF, l'IGF-1 (facteur de croissance analogue à l'insuline 1), le PDGF et des interleukines (Truffi et al., 2018). Une étude a révélé que l'expression concomitante du TGF- β et de SDF-1 par les CAF, favorisait le minétisme vasculaire des cellules tumorales en augmentant l'expression de la VE-cadhérine, de la MMP-2 et la laminin5y2 via l'interaction entre le TGF- β R1 et CXCR-4 (récepteur de CXCL-12) dans les cellules tumorales (Yang et al., 2016a).

La capacité à contrôler le remodelage local de la MEC est une autre fonction critique du CAF. Les fibroblastes activés constituent une source inépuisable de protéases facilitant la migration et l'invasion des cellules cancéreuses, ainsi que l'angiogenèse (Lugo-Cintrón et al., 2020). Les CAF du sein favorisaient l'angiogenèse tumorale dépendante de l'hypoxie d'une manière dépendante de HIF-1 α /GPER (récepteur d'œstrogène couplé aux protéines G) via l'expression du VEGF (De Francesco et al., 2013).

En général, les CAF exercent un rôle immunosuppresseur sur le microenvironnement tumoral en influençant la mobilisation des cellules immunitaires par nombres de leur sécrétion immunomodulatrices, incluant l'IFN- γ , l'IL-6, le CCL2 et le TNF- α . Le remodelage de la matrice, notamment la réaction desmoplastique, orchestré par les CAF restreint l'accès des cellules immunitaires, en générant une barrière physique à l'infiltration tumorale, pouvant limiter le potentiel de certaines thérapies (Harper & Sainson, 2014).

Les multiples fonctions des CAF, jouent un rôle pivot dans la progression tumorale. Leur nature hétérogène fait l'objet de recherches actives car ils pourraient bien représenter des cibles prometteuses pour des approches thérapeutiques de pointe du cancer et du microenvironnement tumoral.

II.2.2.3. Les cellules du système immunitaire

L'intérêt d'étudier le rôle de la réponse immunitaire dans le cancer est apparu alors que des approches plus ciblées de la modulation immunitaire commençaient à montrer des résultats. Après la démonstration initiale en 1996 que le blocage du CTLA-4 pouvait induire le rejet d'une tumeur primaire transplantée et empêcher la récurrence (Leach et al., 1996), les immunothérapies ont progressivement été implantées en clinique. De nombreuses approches immunothérapeutiques dans le traitement du cancer ont montré de très bonnes réponses chez certains patients, validant ces stratégies thérapeutiques, notamment via le blocage des points de contrôle ciblant CTLA-4 et PD-1. L'utilisation de cellules T du récepteur d'antigène chimérique (CAR) pour cibler le stroma tumoral s'est également avéré prometteur (Sharma & Allison, 2015 ; Rosenberg & Restifo, 2015). Il est maintenant admis qu'un large éventail de cellules immunitaires réside au sein des tumeurs, telles que les cellules dendritiques, les macrophages, les neutrophiles, les NK, les mastocytes, les cellules B, les cellules T CD8+ et les CD4+ (et leurs nombreux sous-ensembles) ainsi que les cellules Treg. Ces cellules exercent de multiples rôles, à la fois pro et anti-tumoraux, au sein de la tumeur et leurs effets sont le résultat d'interactions

complexes entre les cellules tumorales et les cellules stromales. L'inflammation, médiée par les cellules immunitaires, joue un rôle plus ou moins important dans la tumorigénèse, comme nous l'avons déjà évoquée.

II.2.2.4. Les cellules endothéliales et les péricytes

Le microenvironnement tumoral est caractérisé par la présence de cellules endothéliales (EC) et péricytaires. En plus de répondre aux besoins exacerbés des tumeurs en croissance en leur fournissant un apport vasculaire riche en nutriment et oxygène, l'endothélium joue un rôle dans la dissémination métastatique en fournissant un ancrage pour les cellules invasives. Les étapes fondamentales de la dissémination que sont l'intravasation et l'extravasation mettent en exergue les interactions et la communication indispensable entre les EC et les cellules tumorales. Comme la plupart des cellules du microenvironnement, les cellules endothéliales associées aux tumeurs (TEC pour *Tumor Endothelial Cells*) diffèrent des EC normales, non seulement sur le plan morphologique, mais aussi dans leur profil génétique et par extension sur le plan fonctionnel (*Chap. III p.134*). Outre leur implication directe dans le développement du cancer, les EC constituent l'une des principales sources de CAF (Sobierajska et al., 2020). Par ailleurs, l'endothélium tumoral peut également favoriser la tolérance immunitaire, en libérant des facteurs solubles qui restreignent la fonction des lymphocytes T et induisent l'apoptose. De plus, les leucocytes interagissent directement avec les EC lorsqu'ils sont recrutés dans les tissus périphériques. Les tumeurs exploitent spécifiquement ces mécanismes de régulation, tels que l'expression endothéliale de sélectines, de molécules d'adhésion, de chimiokines, ainsi que les propriétés de la circulation sanguine et le stress de cisaillement pour établir un dysfonctionnement endothélial. Ceci ayant pour but de générer un microenvironnement tumoral caractérisé par un statut immunitaire favorable à la progression tumorale (De Sanctis et al., 2018).

Parmi les cellules stromales résidant dans les tissus, les péricytes, apparaissent également comme des acteurs importants. En entourant physiquement les vaisseaux sanguins, ils jouent un rôle crucial dans la régulation de la prolifération et la survie endothéliale ainsi que dans l'établissement des jonctions serrées, qui leur sont propres (Ribatti et al., 2011). Cependant, les péricytes polarisés cancéreux favorisent la survie des vaisseaux sanguins tumoraux. Cette notion est illustrée par le ciblage du PDGFR, en association avec des inhibiteurs de TK, ciblant les récepteurs du VEGF, qui résulte d'une efficacité de traitement améliorée par rapport à l'utilisation d'inhibiteurs de l'angiogénèse seuls (Bergers et al., 2003). Cependant, le recrutement des péricytes, leur identification et leurs interactions avec les cellules néoplasiques ou stromales, est moins connu, que d'autres acteurs du microenvironnement. Néanmoins, il a été mis en évidence que les péricytes présentaient, au même titre que les EC, un rôle dans la régulation du trafic leucocytaire (Proebstl et al., 2012), et donc plus largement dans l'immunité tumorale. Comme les cellules immunitaires innées et acquises coexistent dans les tumeurs, les leucocytes constituent une grande partie du stroma. Malgré une forte corrélation entre l'accumulation de LTC et un meilleur résultat clinique, les tumeurs peuvent échapper à la surveillance immunitaire

grâce à d'autres mécanismes, notamment via le recrutement de cellules myéloïdes suppressives (MDSC pour *Myeloid-Derived Suppressor Cells*). La couverture péricytaire a été inversement corrélée aux nombres de MDSC. Alors que les vaisseaux sanguins tumoraux sont caractérisés par une couverture péricytaire défectueuse, celle-ci entraînerait en plus d'une instabilité vasculaire, l'échappement immunitaire par le biais des MDSC, qui inhibent de la réactivité anti-tumorale des LTC (Hong et al., 2015).

L'angiogenèse, résultant de la contribution entre les cellules tumorales, endothéliales, péricyitaires et bien d'autres cellules ou éléments du microenvironnement tumoral, soutient la croissance tumorale et conditionne l'agressivité du cancer. Elle peut également constituer un obstacle majeur à la migration des cellules effectrices immunitaires dans le parenchyme tumoral établi comme nous venons de l'évoquer, suggérant l'importance de prendre en compte les cellules qui l'orchestrent pour le succès de nombreuses thérapies, et notamment l'immunothérapie.

II.2.2.5. Les cellules souches

II.2.2.5.1. Les cellules souches tumorales

Comme cela a été précédemment évoqué, plusieurs modèles de progression tumorale ont été proposés, jusqu'à ce que le modèle hiérarchique d'évolution clonale (Kreso & Dick, 2014) fasse foi. Il est maintenant admis que les CSC, identifiées dans la plupart des cancers, dotées de propriétés d'auto-renouvellement et capables de se différencier en cellules tumorales matures, constituent une population hétérogène de cellules présentant une diversité génétique responsable de l'organisation oligoclonale de la tumeur. Le maintien de l'auto-renouvellement des CSC implique des voies de signalisation telle que la voie Wnt/ β -caténine, celle du TGF- β , de Hedgehog ou encore de Notch (Najafi et al., 2019). Par ailleurs, les CSC peuvent acquérir de nouvelles mutations qui favorisent l'auto-renouvellement et/ou altèrent leur pouvoir différenciant, susceptibles d'influencer le devenir tumoral. Si l'hétérogénéité des CSC peut s'expliquer par leur évolution clonale, il est également possible qu'elle dépende d'événements reprogrammant des non-CSC (Vermeulen et al., 2012). Cette notion correspond à la plasticité cellulaire qui définit les CSC et les non-CSC comme deux états cellulaires. En effet, une cellule tumorale mature n'est pas forcément figée dans son état cellulaire. Ainsi, à la suite d'un stress environnemental ou de traitements, les non-CSC pourraient servir de réservoir et réalimenter la population de CSC via une reprogrammation cellulaire (Kreso & Dick, 2014). Les CAF sont parmi les cellules les plus influentes pour stimuler à la fois la différenciation des CSC et la dédifférenciation des non-CSC en vue d'un changement de phénotypique vers un phénotype CSC (Najafi et al., 2019). L'impact thérapeutique n'est donc pas mince, car contrairement à la majorité des cellules tumorales, les CSC pourraient être celles qui s'opposent à l'éradication définitive de la maladie. Cependant, l'origine des CSC se veut inconstante, leur nombre est variable et leur plasticité divergente, ce qui ne manque pas d'alimenter le challenge thérapeutique qui consiste à les cibler.

II.2.2.5.2. Les cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses (MSC pour *Mesenchymal Stem Cells*), également appelées cellules stromales mésenchymateuses multipotentes, sont des cellules souches stromales multipotentes non hématopoïétiques qui peuvent être trouvées dans une variété de tissus. Elles peuvent se différencier en de multiples lignées cellulaires, telles que les fibroblastes, les adipocytes, les ostéocytes ou encore les chondrocytes. Ces propriétés multipotentes attribuent un rôle clé aux MSC dans la régulation des composants du microenvironnement tumoral. De nombreux rapports ont démontré que les MSC se différenciaient en CAF et en CAA en présence de cellules tumorales. Les MSC se distinguent par un profil d'expression marqué pour les marqueurs de cellules stromales (CD73, CD105, CD44, CD29 et CD90) mais négatif pour les marqueurs endothéliaux (CD34, CD31 et vWF) et les marqueurs hématopoïétiques (CD45 et CD14) (Dominici et al., 2006). Compte tenu de l'absence d'un marqueur spécifique et du fait qu'elles soient étroitement liées à des cellules stromales davantage différenciées, l'identification des MSC peut s'avérer délicate. La définition hétérogène de ce type cellulaire, leur source et les différentes méthodes d'étude dont elles font l'objet, ont pu mettre en évidence des fonctions divergentes à la fois tumorigénique et anti-tumorigénique.

Les MSC jouent un rôle dans la guérison des tissus endommagés, s'engageant dans une diaphonie directe et paracrine avec les cellules immunitaires (Le blanc, 2006) à visée immuno-suppressive (Atiya et al., 2020). En outre, les MSC sécrètent de nombreux facteurs pro-angiogéniques, comme le M-CSF, le VEGF, l'IFN- γ et le TNF- α et favorisent la néo-vascularisation tumorale *in vivo* (Karnoub et al., 2007). En contribuant à l'enrichissement des CSC (Liu et al., 2011b ; Maffey et al., 2017), notamment par la sécrétion TGF- β (Rodini et al., 2018), les MSC favorisent la dissémination métastatique (Kabashima-Niibe et al., 2013). Des fonctions anti-tumorigènes des MSCs ont déjà été rapportées. Toutefois, ces effets suppressifs ont été observés lorsque les MSC étaient utilisées dans des rapports supérieurs aux cellules tumorales (Qiao et al., 2008 ; Otsu et al., 2009 ; Zheng et al., 2016), ce qui apparait loin d'être représentatif de la réalité *in vivo*.

II.3. Les propriétés physicochimiques du microenvironnement tumoral

Il est aujourd'hui admis que le développement du cancer est associé aux propriétés physiques et chimiques du microenvironnement tumoral. Les tumeurs sont des pseudo-organes dynamiques qui contiennent en leur sein de nombreux types de cellules, tels qu'ils ont pu être décrits, interagissant pour créer une physiologie qui leur est propre. Malgré l'hétérogénéité inter et intra-tumorale existante, la tumorigenèse entraîne des caractéristiques communes à tous les cancers épithéliaux, comme une hyperplasie, une résistance à l'apoptose et une croissance incontrôlée, mais également un dérèglement métabolique. Ces différents événements propres à l'initiation tumorale déclenchent une hypoxie, un stress oxydatif et une acidose dans l'environnement proche de la tumeur et engendrent des stimuli physiques conduisant à un remodelage profond de la MEC. L'ensemble de ces événements accompagnés de la réponse

subversive des cellules stromales entraîne une adaptation du microenvironnement pour soutenir la progression tumorale et la dissémination métastatique. Les exosomes sécrétées par les cellules du microenvironnement sont également des acteurs centraux dans tous ces événements (Roma-Rodrigues et al., 2019).

II.3.1. Les propriétés chimiques

II.3.1.1. L'hypoxie

L'adaptation cellulaire à l'hypoxie est principalement médiée par une famille de régulateurs transcriptionnels, les facteurs inductibles par l'hypoxie (HIF pour *Hypoxia Inducible Factors*). Cette famille est composée d'hétérodimères constitués d'une sous-unité α dépendante de l'oxygène (HIF- α) et d'une sous-unité β indépendante de l'oxygène (HIF- β). HIF- α possède trois isoformes, HIF-1 α , HIF-2 α et HIF-3 α . HIF-1 α , exprimé de manière ubiquitaire dans tous les tissus et types de cellules de mammifères, constitue l'acteur moléculaire principal. Il est responsable de l'activation des réponses transcriptionnelles sous hypoxie. En revanche, HIF-2 α est exprimée de façon tissu-spécifique incluant notamment l'endothélium vasculaire mais aussi l'épithélium pulmonaire et rénal (Kaelin, 2008a). Le degré d'hypoxie nécessaire pour les induire diffère. Il semble important de préciser que la concentration d'oxygène normale dans la plupart des tissus varie de 6 à 15% et peut diminuer jusqu'à 1% lors de l'hypoxie dans de nombreux cancers, bien en dessous du niveau d'oxygène (21%) conventionnellement appliqués dans les incubateurs de culture cellulaire. HIF-2 α est induit à des concentrations d'oxygène plus élevées et pendant des durées plus longues que HIF-1 α , leur conférant des fonctions complémentaires dans la réponse transcriptionnelle coordonnée à l'hypoxie/au stress. Bien que les structures de HIF-1 α et HIF-2 α soient similaires, les protéines activent des gènes cibles distincts. Alors que certains gènes sont activés de manière robuste à la fois par HIF-1 et HIF-2, d'autres gènes sont préférentiellement activés par un des deux facteurs (Downes et al., 2018).

La stabilisation d'HIF-1 α induite par l'hypoxie favorise la régulation positive de nombreux gènes pro-angiogéniques dont le VEGF, le FGF et le PDGF (Liao & Johnson, 2007). En plus de l'angiogenèse, les HIF jouent un rôle important dans tous les aspects de la biologie du cancer, y compris la survie cellulaire, le métabolisme, l'invasion et la dissémination métastatique (Semenza, 2010). La plupart des cancers humains présentent des niveaux accrus d'expression des sous-types de HIF par rapport aux niveaux physiologiques (Talks et al., 2000), avec des régions tumorales plus fortement touchées que d'autres, dans lesquelles les valeurs de pO_2 sont <10 mmHg (Brown & Wilson, 2004). Un grand nombre de données expérimentales indique que les manipulations qui augmentent l'expression de HIF-1 α s'accompagnent d'une augmentation de la croissance tumorale, de la vascularisation et des métastases. La perte d'activité liée à HIF, quant à elle, montre des effets inverses (Semenza, 2010). En accord avec ces données, les niveaux d'expression de HIF se voient corrélés avec la mortalité (Semenza, 2014).

Une adaptation majeure à l'hypoxie est le passage à la glycolyse anaérobie. HIF-1 α est impliqué dans ce changement en favorisant l'expression de transporteurs du glucose et des enzymes glycolytiques. En cas d'hypoxie chronique, HIF-1 médie une transition du métabolisme oxydatif au métabolisme glycolytique en régulant des gènes qui interviennent dans l'autophagie mitochondriale. Dans les cellules soumises à une hypoxie prolongée, l'autophagie mitochondriale apparaît comme une réponse métabolique adaptative nécessaire pour empêcher l'augmentation des niveaux de ROS et la mort cellulaire (Semenza, 2012). Malgré la mise en place d'une réponse transcriptionnelle à l'hypoxie, le microenvironnement des tumeurs solides reste généralement hypoxique. En effet, l'angiogenèse engendrée ne fait souvent qu'accentuer la perméabilité et la tortuosité du système vasculaire tumoral dont l'inefficacité est à l'origine même de l'hypoxie (Hashimoto & Shibasaki, 2015). La perte de HIF-1 α dans l'endothélium s'est vu inhiber la croissance des vaisseaux sanguins tumoraux (Tang et al., 2004). Les nombreux changements induits par l'hypoxie sont essentiels pour promouvoir la tumorigénèse.

L'hypoxie présente au sein des tumeurs peut s'avérer intermittente, autrement dit la tumeur est perfusée de manière transitoire. L'hypoxie intermittente s'explique par la structure même des réseaux vasculaires tumoraux, souvent tortueux et dilatés, avec des ramifications excessives et de nombreuses impasses (Chen et al., 2018 (a)). Par ailleurs, la compression des vaisseaux immatures par des cellules tumorales, caractérisés par une absence ou une association lâche de cellules murales (péricytes et cellules musculaires lisses vasculaires), semble également jouer un rôle dans l'hétérogénéité du flux sanguin. La périodicité d'arrêt du flux sanguin, en fonction de la complexité architecturale et du niveau de maturation du réseau vasculaire tumoral, est très variable d'une tumeur à l'autre, et également au sein d'une même tumeur (Toffoli & Michiels, 2008). Cette hypoxie épisodique intra-tumorale confère aux cellules cancéreuses du sein un plus grand potentiel métastatique, comparé à l'hypoxie chronique. En effet, l'exposition des cellules tumorales mammaires à une hypoxie intermittente favorise la diversité clonale et induit un profil de sécrétion pro-tumorigène. De plus, l'expression génique associée aux métastases et aux marqueurs de CSC se voit augmentée. Cela favorise également la naissance de cellules initiatrices de tumeurs (TIC pour *Tumor-Initiating Cells*) à une fréquence relativement plus élevée, comparé aux cellules soumises à une hypoxie chronique. Ainsi, l'hypoxie intermittente structure un microenvironnement plus permissif à l'agressivité tumorale, ce qui lui vaut d'être proposé comme un facteur déterminant dans la promotion de l'incidence et de la progression du cancer (Almendros & Gozal, 2018).

II.3.1.2. L'acidose

L'acidification du microenvironnement tumoral est fortement considérée comme une conséquence importante de l'effet de Warburg. La reprogrammation métabolique qui en découle engendre une augmentation de la glycolyse et la production de lactate à partir du pyruvate même en présence d'oxygène. Les taux de glucose intra-tumoraux sont estimés dans une proportion de 1:40 par rapport aux taux plasmatiques. Le lactate peut également être

produit à partir du métabolisme de la glutamine par glutaminolyse (Romero-Garcia et al., 2011). Le lactate peut être exporté hors de la cellule à l'aide du transporteur monocarboxylate-4 (MCT4), tandis que MCT1 peut faciliter à la fois son importation et son exportation en fonction du gradient de pH (Eilertsen et al., 2014). Dans les tumeurs solides, les concentrations de lactate varient de 3 à 40 mM et le pH intratumoral peut être aussi bas que 6,0 (Dai et al., 2013). En effet, une activité glycolytique élevée des cellules tumorales combinée à une clairance insuffisante des métabolites, y compris le CO_2 , conduit à un microenvironnement tumoral plus acide (pH $\sim 7,4$ dans les tissus normaux) (Stubbs et al., 2000).

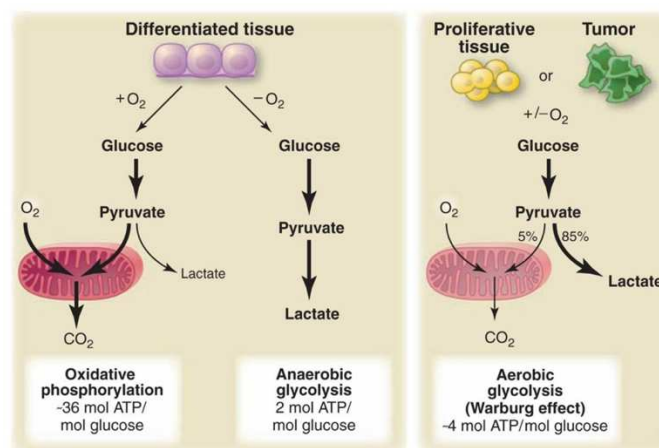


Figure 38 : L'effet Warburg. D'après Vander Heiden et al., 2009.

L'acidose lactique joue un rôle clé dans le développement malin par différents mécanismes. L'un de ces mécanismes consiste à soutenir le changement métabolique ; par exemple, sous acidose lactique, les cellules tumorales mammaires 4T1 diminuent leur glycolyse aérobie et présentent un phénotype non glycolytique, caractérisé par un taux de consommation d'oxygène élevé. En revanche, en l'absence d'acidose lactique, ces mêmes cellules présentent un taux glycolytique élevé (effet Warburg) (Xie et al., 2014). Un autre rapport indique que différentes lignées cellulaires tumorales sont capables de passer de l'effet Warburg à l'OXPPOS lorsqu'elles sont exposées à une acidose lactique (20 mM et pH 6,7). Le changement métabolique a été prouvé en déterminant la quantité d'ATP produite par les cellules tumorales en utilisant les deux voies. Il semble que cet effet soit médié par une forte activation de la protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate (AMPK), capable de métabolisme énergétique (Prado-Garcia et al., 2020).

La symbiose métabolique tumorale se voit favoriser par ce changement métabolique en présence d'acidose lactique. Dans ce phénomène, les cellules tumorales localisées au voisinage des vaisseaux sanguins déplacent leur métabolisme vers un métabolisme plus oxydatif et utilisent le lactate pour alimenter le cycle de Krebs malgré la présence de glucose. Ce comportement permet aux cellules tumorales localisées loin des vaisseaux sanguins d'avoir accès au glucose et de produire du lactate (Pisarsky et al., 2016). Lorsque la symbiose métabolique tumorale a été décrite dans le cancer du sein, il a été montré que les cellules normoxiques exprimaient MCT1 pour importer du lactate et effectuer l'OXPPOS. De plus, la quantité

d'absorption de glucose était plus faible dans les cellules MCT1-positives que dans les cellules hypoxiques MCT4-positives qui consommaient plus de glucose et produisaient du lactate (Sonveaux et al., 2008). Dans ce contexte, l'expression des transporteurs de glucose et de lactate dans les cellules tumorales sous acidose lactique devient cruciale dans la symbiose métabolique tumorale. Il a été rapporté que l'expression du transporteur de glucose (GLUT1) était régulée à la hausse dans les cellules tumorales sous hypoxie, mais l'acidose lactique supprime l'induction hypoxique du transporteur (Giatromanolaki et al., 2017). Toutefois, malgré la diminution d'expression des transporteurs au glucose, il a été montré que les cellules continuaient à consommer du glucose en phase exponentielle, si elles en disposaient (Prado-Garcia et al., 2020).

II.3.1.3. Le stress oxydatif

Parmi les nombreux facteurs influençant le développement, la progression et les métastases, le stress oxydatif joue également un rôle prédominant dans l'initiation et la préservation de la progression du cancer du sein. Le stress oxydatif résulte d'un déséquilibre entre des espèces réactives instables dépourvues d'un ou plusieurs électrons non appariés (anion superoxyde, peroxyde d'hydrogène, radical hydroxyle, espèces réactives azotées) et des antioxydants. Le stress oxydatif peut être généré par une exposition aux UV, un rayonnement ionisant ou une exposition à des agents cancérigènes. Les ROS impactent la signalisation cellulaire par leur accumulation localisée, qui se traduit par la présence de sous-produits ROS de la chaîne de transport d'électrons dans les mitochondries ou l'activation des oxydases NADPH (NOX). La surexpression de NOX4 dans les cellules épithéliales normales du sein entraîne une sénescence cellulaire, une résistance à l'apoptose et une transformation tumorigène, ainsi qu'une augmentation de l'agressivité des cellules cancéreuses du sein (Graham et al., 2010). Les ROS, y compris le peroxyde d'hydrogène, sont capables à eux seuls de conduire la différenciation des fibroblastes normaux en myofibroblastes, alors capables de générer de grandes quantités de peroxyde d'hydrogène et provoquant une augmentation du stress oxydatif dans le microenvironnement (Comito et al., 2012). Activée par le stress oxydatif, les MMPs telles que la MMP-2, -3 et -9 participent à la dégradation de la MEC et contribuent au remodelage du tissu conjonctif, influençant de ce fait la croissance, le développement et l'invasion des cellules cancéreuses du sein (Provenzano et al., 2008). De nombreux facteurs de croissance, capable de stimuler les cellules stromales et tumorales tels que le TGF- β , l'IGF, le TNF- α ou le PDGF stimulent également la production de ROS par le biais de NOX (Jezierska-Drutel et al., 2013). Une fois activé, le microenvironnement tumoral agit comme un container de ROS, soutenant la croissance tumorale. Notamment, une étude a mis en évidence l'association entre la sévérité clinique et les niveaux de peroxyde d'hydrogène dans les condensats respiratoires expirés de patientes atteintes d'un cancer mammaire (Stolarek et al., 2010).

II.3.2. Les propriétés physiques

Actuellement, de plus en plus de preuves soutiennent le fait que les propriétés physiques telle que la rigidité du microenvironnement jouent un rôle primordial dans la progression tumorale (Jonietz, 2012). Depuis longtemps, il est rapporté que les tumeurs sont beaucoup plus rigides que le tissu sain environnant. Cette rigidité accrue est la raison pour laquelle la palpation reste un outil important pour la détection du cancer. De surcroît, les examens d'imagerie, comme la mammographie par exemple, se basent sur la densité accrue des lésions cancéreuses comparés aux tissus environnants pour les révéler aisément. Ceci est une conséquence d'un dépôt accru de protéines de la MEC accompagné d'un remodelage et d'une rigidité tissulaire qui s'avère souvent associés à un mauvais pronostic. Pour exemple, dans le cadre du cancer mammaire, Acerbi et al. ont constaté que la transformation maligne était accompagnée d'un dépôt et d'un remodelage accrus du collagène de type I, notamment au niveau du front invasif des tumeurs. De plus, cette rigidité était à corrélérer avec le sous-type de tumeur : Les tumeurs de type basal et enrichies en HER2 présentaient une rigidité accrue par rapport aux sous-types Luminal A et B, potentiellement moins agressives (Acerbi et al., 2015). Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre précédent, la densité du tissu mammaire sain est corrélée au risque de développer un cancer mammaire et réduit la probabilité/spécificité de détection d'une lésion par mammographie notamment, soutenant que l'idée que la densité changeante du microenvironnement tumoral soutiendrait la tumorigenèse.

Notamment, la rigidité matricielle influence le comportement et la morphologie cellulaire. L'existence d'un microenvironnement avec des propriétés mécaniques modifiées auquel les cellules, à la fois normales et transformées, sont exposées peut conduire à des événements de signalisation intracellulaire modifiés et contribuer à la carcinogenèse (Nagelkerke et al., 2015). Il est important de soulever le fait que la culture cellulaire classique est bien loin d'être fidèle au large spectre de rigidité des tissus du corps humain. Pour exemple, le tissu cérébral est très mou (<1 kPa), alors qu'à l'autre extrémité du spectre, l'os est le tissu le plus dur (~ 100 kPa). Ainsi les surfaces de culture cellulaire en verre ou en polystyrène possèdent des rigidités environ un million de fois plus élevées que les tissus à partir desquels les cellules ont été isolées à l'origine. Ainsi, ces substrats extrêmement rigides ne soutiennent pas la morphogenèse tissulaire normale et influencent profondément le comportement cellulaire. Par exemple, lorsqu'elles sont cultivées sur des surfaces en polystyrène, les cellules épithéliales mammaires normales se développent en formant une monocouche régulière. Lorsque ces mêmes cellules sont cultivées sur des substrats plus mous, elles s'organisent en structures acineuses bien différenciées caractéristiques, quiescentes, polarisées, forment une lumière et engendrent la formation d'une membrane basale (Petersen et al., 1992). Par ailleurs, il a été montré que les fibroblastes cultivés sur des gels de polyacrylamide revêtus de collagène de différentes raideurs ont pu s'étirer davantage sur les substrats rigides (70 kPa) que sur les substrats mous (~ 5 kPa), mais semblaient moins mobiles. En effet, les fibroblastes semblent préférer les substrats rigides (30 kPa vs 14 kPa pour les substrats mous), un phénomène appelé durotaxis

(Lo et al., 2000). En plus des différences de motilité des cellules individuelles, la rigidité du substrat affecte également le contact cellule-cellule et l'interaction qui en découle. Il a été mis en évidence que sur des substrats rigides (~ 12 kPa), les fibroblastes s'éloignent les uns des autres et adoptent une morphologie étirée. En revanche, sur des substrats mous (~ 4 kPa), les cellules se regroupent et forment des structures s'apparentant aux tissus, dans lesquelles les cellules ont tendance à s'arrondir (Guo et al., 2006). Outre la morphologie et la migration cellulaire, la rigidité du substrat influence également profondément la régulation de la croissance cellulaire et de l'apoptose (Wang et al., 2000). Néanmoins, il a été mis en évidence que les fibroblastes, après transformation maligne par l'oncogène H-Ras, semblaient en mesure de surmonter toute difficulté de croissance sur des substrats de rigidité variable, suggérant une modification profonde de leurs voies de signalisation intrinsèques face aux stimuli physiques extérieurs. Ainsi, les propriétés mécaniques du microenvironnement contribuent à l'acquisition de la malignité, à l'évolution de la maladie et la réponse aux traitements en tant que déterminant important du comportement cellulaire, notamment en contrôlant l'état phénotypique des cellules.

Dans le cadre du cancer mammaire, il a été mis en évidence que les cellules s'organisent en acini dans les substrats mous (30 Pa) alors qu'elles sortaient de leur état quiescent, perdaient leur polarisation et envahissaient la matrice dans les substrats présentant une rigidité accrue (300 Pa) (Chaudhuri et al., 2014). Toutefois, la rigidité seule ne semble pas dicter l'acquisition du phénotype malin. Les matériaux biologiques qui composent le microenvironnement intracellulaire (comme l'actine et la vimentine) et extracellulaire (comme le collagène ou encore la fibrine), avec leurs propriétés mécaniques dynamiques propres, y sont également pour beaucoup. Les propriétés mécaniques non linéaires de ces protéines font qu'elles deviennent de plus en plus rigides au fur et à mesure de leur sollicitation ; un phénomène appelé raidissement par déformation ou contrainte (Storm et al., 2005). Il est suggéré que ce raidissement induit protège l'intégrité des tissus en empêchant une déformation excessive. Les cellules sondent et détectent la rigidité de leur environnement extracellulaire en exerçant des forces sur celui-ci. Si elles se mettent à exercer une force suffisamment grande, la matrice deviendra d'autant plus rigide dans le but de résister à la déformation (Nagelkerke et al., 2015). Les forces générées par les cellules se propagent non sans mal à travers la MEC, permettant des communications cellulaires déclenchées mécaniquement sur de grande distance (Winer et al., 2009). Cela contribue à la formation de motifs multicellulaires particuliers. Les cellules sont capables de percevoir les stimulus mécaniques de leur environnement et de traduire ces informations en message électrique, biochimique ou génétique, on parle de mécanotransduction. Le voyage des signaux mécaniques de la matrice dans la cellule, conduisant à une réponse cellulaire réelle, est complexe et implique une multitude de molécules de signalisation et d'événements, fonctionnant à la fois séquentiellement et parallèlement les uns aux autres (Nagelkerke et al., 2015). En outre, la MEC et les interactions cellule-matrice possèdent un contrôle étendu sur l'autophagie, permettant aux cellules de recycler leur propre matériel cytoplasmique et d'assurer la disponibilité en nutriments. Plusieurs composants de la MEC (tels que la décorine ou la laminine) apparaissent capables de réguler l'autophagie (Neill et al., 2014). Elle apparaît

également influencée par les propriétés mécaniques de la matrice, comme cela a été mis en évidence dans les cellules musculaires lisses. Ainsi, l'autophagie favorise-t-elle peut être la tumorigénèse en contribuant à l'établissement du phénotype malin dans un microenvironnement caractérisé par une rigidité accrue.

Il est aujourd'hui admis que les propriétés physiques du microenvironnement ont des effets considérables sur la sensibilité thérapeutique en tant que constituant indissociable de la tumeur. Il semble que la rigidité des substrats confère une résistance à certains agents chimiothérapeutiques. Par exemple, le sorafénib, un inhibiteur de la kinase Raf, s'est avéré beaucoup plus efficace dans les cellules cancéreuses du sein SKBR-3, MDA-MB-231 et BT-549 sur des substrats mous que sur des substrats rigides de gels fonctionnalisés par PEG avec une rigidité allant de 6 à 400 kPa (Nguyen et al., 2014). Toutefois, les données disponibles apparaissent parfois contradictoires en fonction du type cellulaire. Ainsi, il ne convient pas de trancher quant à l'effet mais plutôt d'affirmer la contribution du microenvironnement mécanique dans la réponse thérapeutique dont le soutien ou la répression se veut dépendant du contexte.

III. L'angiogenèse tumorale.

III.1. L'État physiologique / L'anatomie des vaisseaux sanguins

Le système vasculaire périphérique comprend l'ensemble des vaisseaux sanguins qui existent à l'extérieur du cœur. Il comprend à la fois les voies afférentes constituées par les artères, vaisseaux sanguins de gros calibre qui distribuent le sang (et les nutriments) depuis le cœur vers les organes et les voies efférentes constituées par les veines qui transportent, quant à elles, le sang depuis les organes vers le cœur, en passant par les poumons et les reins pour éliminer les déchets métaboliques. Le système vasculaire périphérique est un réseau complexe comportant plusieurs ramifications. La fonction et la structure de chaque segment du système vasculaire périphérique varient en fonction de l'organe qu'il alimente. Mis à part les capillaires, les vaisseaux sanguins sont tous composés de trois couches (Adams and Alitalo, 2007). Dans chaque couche, la quantité de fibrilles musculaires et de collagène varie en fonction de la taille et de l'emplacement du vaisseau. La couche interne ou intima est un endothélium en contact avec le sang. La couche intermédiaire ou média est recouverte de cellules musculaires lisses qui lui confère son élasticité. Cette zone peut se dilater et se contracter pour adapter la pression du flux sanguin. La troisième couche périphérique rigide ou adventice est constituée de collagène (Fig. 39)

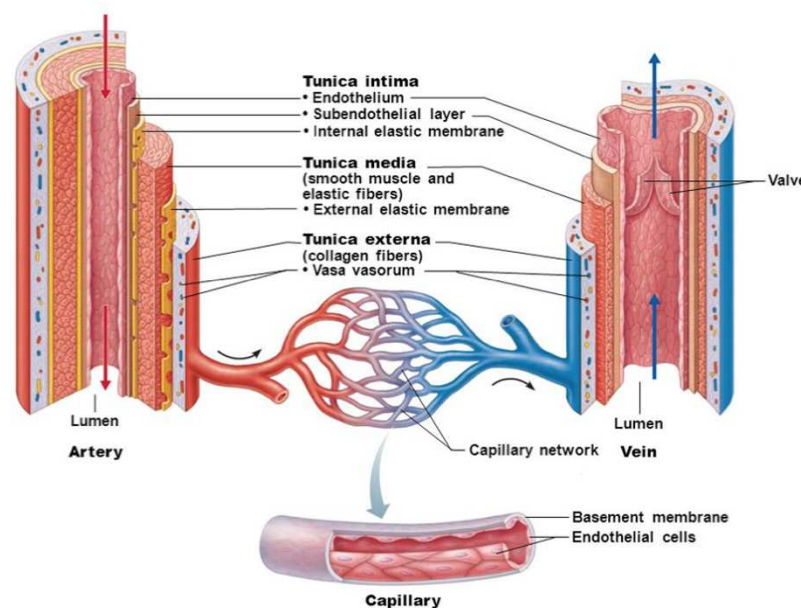


Figure 39 : Organisation générale du système vasculaire. © 2013 Pearson Education, Inc.

Les **artères**, toujours sous haute pression, jouent un rôle majeur dans l'apport sanguin des organes. Pour absorber le stress physique permanent engendré par la pression, les artères possèdent une composante développée de tissu élastique et une moins développée de muscle lisse. La présence d'élastine dans les gros vaisseaux sanguins leur permet d'adapter leur diamètre en fonction du flux. Lorsqu'une artère atteint un organe particulier, elle subit une division en vaisseaux plus petits possédant davantage de muscles lisses et moins de tissu élastique. Environ 10% à 15% du volume sanguin total est contenu dans le système artériel. Il existe deux principaux types d'artères présentes dans le corps : les artères élastiques et les musculaires.

- Les artères musculaires comprennent les artères anatomiquement nommées comme l'artère brachiale, l'artère radiale et l'artère fémorale, par exemple. Les artères musculaires contiennent plus de cellules musculaires lisses dans la couche médiane de la tunique que les artères élastiques.
- Les artères élastiques sont celles les plus proches du cœur (aorte et artères pulmonaires) qui contiennent beaucoup plus de tissu élastique dans la tunique moyenne que les artères musculaires. Cette caractéristique des artères élastiques leur permet de maintenir un gradient de pression relativement constant malgré l'action de pompage constante du cœur.

Les **artérioles** fournissent du sang aux organes et sont principalement composées de muscles lisses. Le système nerveux autonome influence le diamètre et la forme des artérioles. Ils répondent au besoin des tissus de plus de nutriments/oxygène. Les artérioles jouent un rôle important dans la résistance vasculaire systémique en raison du manque de tissu élastique important dans les parois. Les artérioles varient de 8 à 60 μm et se subdivisent en méta-artérioles.

Les **capillaires** sont des vaisseaux à parois minces composés d'une seule couche d'EC. En raison des parois minces du capillaire, l'échange de nutriments et de métabolites se produit principalement par diffusion. La lumière artériolaire régule le flux sanguin à travers les capillaires.

Les **veinules** sont les plus petites veines qui collectent le sang à l'issue du système capillaire. Le sang navigue des veinules aux veines les plus grosses. Tout comme le système artériel, trois couches composent les parois veineuses. Mais contrairement aux artères, la pression veineuse est plus faible.

Les **veines** contiennent environ 70% du volume sanguin total, dont 25% dans les veinules. Moins élastiques, les veines possèdent des parois minces. Cette caractéristique leur permet de retenir une quantité très élevée du sang en circulation. Le système veineux est muni d'un dispositif anti-reflux. En effet, des valvules unidirectionnelles, intercalées à différents niveaux à l'intérieur de toutes les veines, contribuent au retour veineux en dirigeant le sang dans la bonne direction lors de la contraction musculaire. Lors de la relaxation musculaire, elles se ferment et empêchent le sang de refluer.

En plus d'apporter les nutriments et d'éliminer les déchets, la fonction principale du système vasculaire est sa participation à l'oxygénation du corps (Alkadhim et al., 2015). Le sang désoxygéné des veines périphériques est transporté à partir des capillaires, vers les veinules, vers les veines, vers le côté droit du cœur, puis vers les poumons. Le sang oxygéné des poumons est transporté vers le côté gauche du cœur dans l'aorte, puis vers les artères, les artérioles et enfin les capillaires où se produit l'échange de nutriments. Le chargement et le déchargement de l'oxygène et des nutriments se produisent principalement dans les capillaires.

Les vaisseaux sanguins proviennent de la couche embryonnaire mésodermique. Le développement embryonnaire des vaisseaux et du cœur commence au milieu de la troisième semaine de vie. La circulation fœtale commence vers la huitième semaine de développement. La formation des vaisseaux sanguins se produit via deux mécanismes principaux : La vasculogenèse et l'angiogenèse.

- La vasculogenèse est le processus par lequel les vaisseaux sanguins se forment dans l'embryon. Les interactions entre les cellules précurseurs et divers facteurs de croissance déterminent la différenciation cellulaire observée pendant la vasculogenèse (Reyes et al., 2008). Les cellules mésodermiques précurseurs et leurs récepteurs répondent au FGF2 pour devenir des hémangioblastes. Les récepteurs des hémangioblastes répondent alors au VEGF, induisant une différenciation supplémentaire en EC (Takahashi et al., 2015). La fusion des vacuoles endothéliales conduit à la formation de la lumière. Les premiers vaisseaux sanguins formés par vasculogenèse comprennent l'aorte dorsale et les veines cardinales. Tous les autres systèmes vasculaires du corps humain se forment par angiogenèse.
- L'angiogenèse se définit comme étant la formation de néo-vaisseaux à partir d'un réseau vasculaire préexistant (Risau, 1997). Si l'angiogenèse est un phénomène très actif au cours du développement, c'est un événement rare chez l'adulte où l'endothélium est quiescent. Mais le processus angiogénique peut être réactivé sous l'effet de facteurs pro-angiogéniques. De manière physiologique, c'est ce qui est observé pendant le cycle menstruel chez la femme, au cours des processus de cicatrisation, de réparation cellulaire (ischémie tissulaire, cardiaque ou des membres inférieurs) ou encore pendant la grossesse. Mais dans un contexte pathologique, l'angiogenèse peut contribuer à l'évolution de nombreuses maladies comme les cancers, les maladies inflammatoires chroniques, le diabète, le psoriasis mais aussi dans certaines pathologies oculaires telles que la dégénérescence maculaire liée à l'âge et dans des pathologies auto-immunes. Dans ces conditions, les vaisseaux néoformés présentent généralement des défauts d'organisation structurelle et fonctionnelle.

III.2. Les processus d'angiogenèse tumorale

Comme il l'a été évoqué, à l'état physiologique chez l'adulte, les EC sont quiescentes. Elles tapissent la paroi des vaisseaux et sont étroitement reliées entre elles par des jonctions cellule-cellule serrées (occludines, ZO1, 2 (*Zonula Occludens 1, 2*), claudines, JAM (*Junctional Adhesion Molecule*)) et des jonctions adhérentes impliquant la VE-Cadhérine (*Vascular Endothelial Cadherin*) et PECAM-1 (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*). Elles forment, en interaction avec les péricytes et la lame basale, une barrière qui régule finement le passage des fluides et des macromolécules (Azzi & Gavard, 2014). Lors de l'évolution du cancer, cet état de quiescence se voit perturbé par les besoins exacerbés de la tumeur en nutriment, comme évoqué précédemment. Il existe plusieurs mécanismes, classiques ou plus élaborés, engendrant la formation de nouveaux vaisseaux au sein d'une tumeur. Parmi eux, sont retrouvés l'angiogenèse

par bourgeonnement, l'angiogenèse par intussusception, la co-option des vaisseaux pré-existant, la mimétisme vasculaire (*vascular mimicry*) et l'angiogenèse à partir de cellules souches endothéliales.

III.2.1. L'Angiogenèse par bourgeonnement

La première description de l'angiogenèse par bourgeonnement dans la croissance tumorale a été rapportée par Ausprunk et Folkman, en 1977, qui faisait déjà état de différentes étapes avec beaucoup d'exactitude : (1) La MB est localement dégradée à proximité du stimulus angiogénique ; (2) Les contacts inter-endothéliaux sont affaiblis et les EC migrent dans le tissu conjonctif; (3) Un cordon solide de EC se forme; (4) La formation de lumière se produit à proximité du front de migration, les pousses tubulaires contiguës s'anastomosent pour former des boucles fonctionnellement capillaires, parallèlement à la synthèse de la nouvelle membrane basale et au recrutement des péricytes.

Ces différents points d'observation sont à l'image des différentes étapes de l'angiogenèse par bourgeonnement. La première étape consiste en l'activation des EC résultant de l'intégration d'un stimuli extrinsèque. Au cours de cette phase, les EC concernées sortent de leur état de quiescence, prolifèrent et/ou migrent en réponse aux signaux pro-angiogéniques induit par un gradient environnant selon le concept des *tip/stalk cells* qui sera détaillé par la suite. Cette phase d'expansion du système vasculaire naissant comprend la croissance et le guidage des bourgeons pour finir par leur fusion et la formation d'une lumière. La seconde phase, dite de maturation, qui vise à stabiliser le vaisseau et à le rendre fonctionnel, implique le recrutement des péricytes et la stabilisation des jonctions cellulaires.

III.2.1.1. Concept des *tip/stalk cells* : Voie Notch

L'initiation du bourgeonnement nécessite l'activation et la spécification des EC en cellules de front (*tip cell*) et de soutien (*stalk cell*), interchangeables, portant différentes morphologies et propriétés fonctionnelles, qui conditionnent le déroulement de l'élongation (Ribatti & Crivellato, 2012). Bien que plus de 99 % des EC soient quiescentes, état lié aux voies de signalisation BMP et FGF-2, ces cellules n'en demeurent pas moins extrêmement plastiques et réactives aux facteurs environnementaux. Parmi ces facteurs, la balance entre les signaux pro- et anti-angiogéniques gouverne leur devenir, pouvant alors les entraîner rapidement vers un phénotype angiogénique et l'acquisition de propriétés migratoires ou prolifératives (Treppe & Gavard, 2015). Les *tip cells* qui bourgeonnent à partir d'un vaisseaux pré-existant, migrent principalement mais ne prolifèrent que rarement, contrairement aux *stalk cells*, qui permettent l'allongement du vaisseau en proliférant. C'est en 2003 que le concept de phénotype cellulaire *tip/stalk cells* a été décrit (Gerhardt et al., 2003), même si les prémisses de ce concept avaient déjà été amorcées avant ce travail (Kurz et al., 1996 ; Ruhrberg et al., 2002).

D'un point de vue moléculaire, deux voies de signalisation sont largement impliquées dans ce processus, impliquant le récepteur DLL4 (*Delta-Like Ligand 4*), un ligand de Notch, et les récepteurs du VEGF (VEGFR1/2).

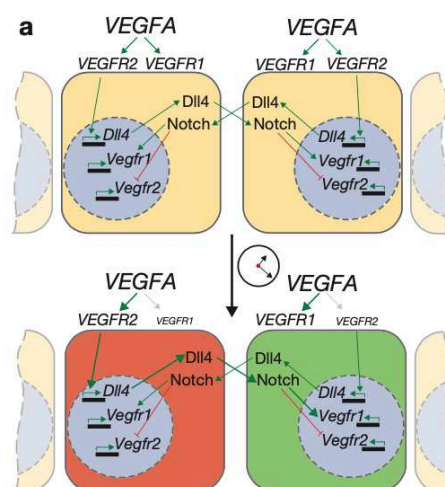


Figure 40 : Signalisation de VEGF/VEGFR – DLL4/Notch permettant aux cellules endothéliales (en jaune) d'acquies le phénotype « tip cell » (en rouge) ou « stalk cell » (en vert).

D'après Jakobsson et al., 2010.

Une concentration optimale en VEGF induit, en interagissant avec son récepteur VEGFR2, l'augmentation de la transcription du gène codant pour DLL4 dans la *tip cell*. DLL4 interagit alors avec son récepteur Notch dans les EC situées au voisinage. L'activation de cette voie dans les cellules de soutien diminue l'expression du VEGFR-2 et augmente celle du VEGFR1, par l'intermédiaire des facteurs de transcription Hes et Hey1 (Hellstrom et al., 2007 ; Suchting et al., 2007) (Fig. 40). Bien que dépourvu d'activité transductionnelle, le VEGFR1 et le sVEGFR1 entrent en compétition avec le VEGFR2, s'opposant à sa signalisation induite par VEGF. Ainsi, ce mécanisme assure que la *tip cell*, préalablement sélectionnée, qui exprime à sa surface les récepteurs DLL4 et VEGFR2, puisse répondre aux signaux pro-angiogéniques induit par le gradient environnant de VEGF (Treppe & Gavard, 2015). Ces deux voies s'intègrent dans une boucle de rétroaction intercellulaire. En utilisant un modèle informatique, il a été mis en évidence que cette boucle de rétroaction VEGF/VEGFR – DLL4/Notch était suffisante pour structurer les cellules endothéliales de manière stable en *tip/stalk cells* sous une stimulation adéquate de VEGF-A (Bentley et al., 2008).

Toutefois, l'interaction entre les voies Notch et VEGF est sensible ; de nombreuses cellules voisines rivalisent dynamiquement pour adopter la position de *tip cell*, mais une seule d'entre elle y parvient (Jakobsson et al., 2010). La signalisation médiée par Notch/Jagged régule cette induction latérale, c'est-à-dire la propagation du même destin cellulaire dans les cellules adjacentes. Elle permet de réguler la distance entre deux *tip cells* (Boareto et al., 2015). Il a été mis en évidence qu'une expression accrue de Jagged entraînait davantage de tip cells (Benedito et al., 2009), là où Delta agit comme un frein sur l'angiogenèse par bourgeonnement (Suchting et al., 2007). Ainsi, il a été démontré que les cellules pouvaient atteindre la position de *tip cell* par

inhibition latérale (grâce à des niveaux élevés de Delta dans les *stalk cells*) et par induction latérale (grâce à des niveaux élevés de Jagged dans les *tip cells* voisines) (Fig. 41).

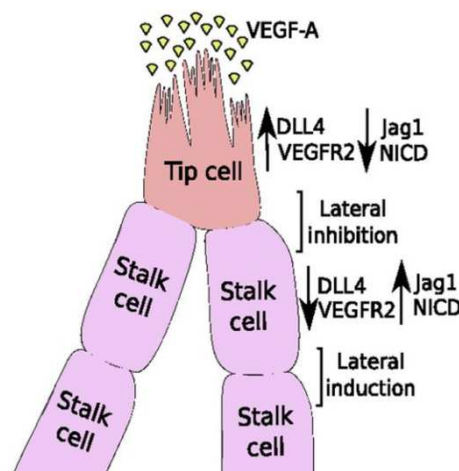


Figure 41 : Rôle de la signalisation Delta Jagged Notch dans la régulation de la distance entre deux tip cells. D'après Boareto et al., 2015.

Cependant, Delta et Jagged ont des rôles opposés dans la stabilisation de la position de *tip cell* : alors qu'une expression élevée de Jagged contraint la *tip cell* à perdre plus facilement sa position au profit d'une *stalk cell* voisine, une expression élevée de Delta diminue la compétition dynamique entre les deux positions cellulaires et stabilise par conséquent leur destin de *tip* ou *stalk cells*. Il existerait également un phénotype intermédiaire lorsque Jagged est surexprimé par rapport à Delta. Les cellules engendrées présentent des capacités migratoires compromises par rapport aux tip cells ; par conséquent, ce phénotype peut être critique dans l'émergence d'un réseau vasculaire chaotique comme il est observé dans l'angiogenèse tumorale (Boareto et al., 2015).

III.2.1.2. Expansion du système vasculaire naissant

L'expansion du système vasculaire débute par une phase d'activation qui se déclenche lorsque les facteurs pro-angiogéniques produits par l'environnement tumoral atteignent leur cible endothéliale. L'hypoxie joue un rôle prépondérant dans ce mécanisme d'activation en induisant la production de facteurs pro-angiogéniques conduisant à une formation accrue, rapide et souvent anarchique de vaisseaux sanguins. Ces signaux de prolifération, migration et survie sont captés par les EC et les péricytes des vaisseaux les plus proches. Du fait de la fonction même du vaisseau (le transport du sang oxygéné), les EC expriment des senseurs de l'oxygène et répondent à l'hypoxie par de profondes modifications cellulaires et transcriptionnelles. L'augmentation de la perméabilité vasculaire induite par l'action du VEGF et de NO conduit à la dégradation des jonctions serrées et la libération de MMPs. De plus, le VEGF initie la protéolyse par activation de la pro-uPA via le VEGFR-2 (Prager et al., 2004) conduisant à une dégradation locale de la MB (Paku & Paweletz, 1991).

En réponse à l'angiopoïétine-2 (Ang-2), les péricytes, intégrés dans la MB vasculaire (van Dijk et al., 2015) se détachent de la paroi vasculaire et favorise ainsi la migration des EC dans la MEC environnante (Carmeliet & Jain, 2011) (Fig. 42).

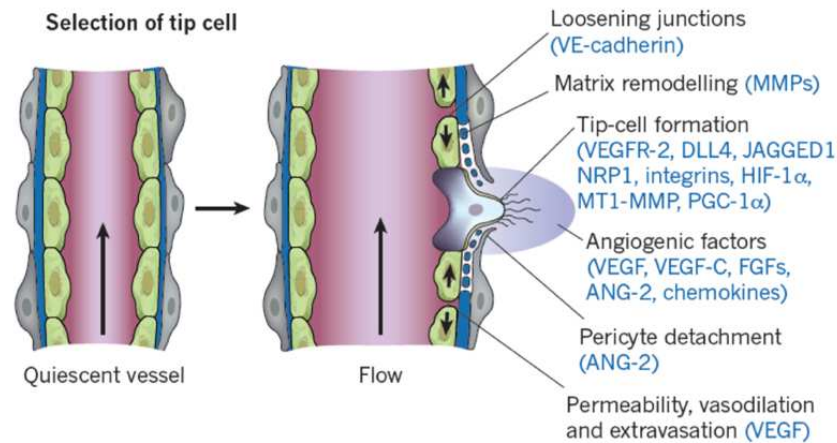


Figure 42 : Étapes de sélection de la *tip cell*. D'après Carmeliet et al., 2011.

En réponse à l'hypoxie, le VEGF constitue un médiateur critique de la dissociation péricyte/EC, via une boucle paracrine de VEGF sécrété par les péricytes qui stimule l'activation des EC (Raza et al., 2010). Après la déstabilisation des vaisseaux, les péricytes participent à l'angiogenèse en dirigeant l'expression de la MT1-MMP à l'extrémité migratoire des vaisseaux endothéliaux nouvellement formés. Via l'expression sélective de TIMPs (Lafleur et al., 2001), les péricytes engendrent la suppression de l'expression de la MT1-MMP dans les *stalk cells*, tout en leur signalant d'augmenter le dépôt de collagène de type IV (Yana et al., 2007). Les péricytes augmentent également la motilité des EC et l'angiogenèse du cordon par l'expression du protéoglycane NG2 (Fukushi et al., 2004). Lors de la dégradation de la MEC, des facteurs de croissance pro-angiogéniques et des cytokines se retrouvent libérés et contribuent à la stimulation de l'angiogenèse. Les contacts inter-endothéliaux se retrouvent modulés et les EC compétentes sont libres de migrer dans le tissu conjonctif en suivant le gradient de VEGF.

III.2.1.2.1. Croissance et guidage des bourgeons par les *tip cells*

Bien que toutes les EC soient activées par le VEGF-A environnant, seules certaines d'entre elles migreront de manière orientée en suivant le gradient de VEGF selon le concept des *tip/stalk cells*.

Grâce à ses lamellipodes et ses filopodes, la *tip cell* est libre de migrer (De Smet et al. 2009). Ils peuvent naître à partir de la membrane cellulaire en quelques minutes après avoir intégré des signaux environnants décisifs. Les lamellipodes sont des structures courtes riches en réseau d'actine ramifié, qui favorisent le mouvement de la membrane dans le sens de la migration (Ridley et al. 2003). Les filopodes, quant à eux, sont composés d'une longue membrane plasmique épineuse. Ils contiennent des faisceaux serrés d'actine filamenteuse (F-actine). Les

filopodes s'étendent généralement à partir de lamellipodes et intègrent les signaux locaux (Lebrand et al. 2004) (Fig. 43)

Les *stalk cells*, quant à elles, sont les cellules de soutien impliquées dans la croissance et l'élongation du bourgeon endothélial tout en conservant un contact avec la membrane basale du vaisseau d'origine (Fig. 43). Des signaux attractifs induisent la polymérisation de la F-actine et l'extension des filopodes des *tip cells*. Les filopodes et les lamellipodes peuvent également adhérer à la MEC et former des adhérences focales, qui relient le cytosquelette et la matrice, comme des points d'ancrage, qui permettent aux fibres de stress des filaments d'actine/myosine de tirer la cellule vers eux, entraînant la motilité cellulaire (Lamallice et al. 2007).

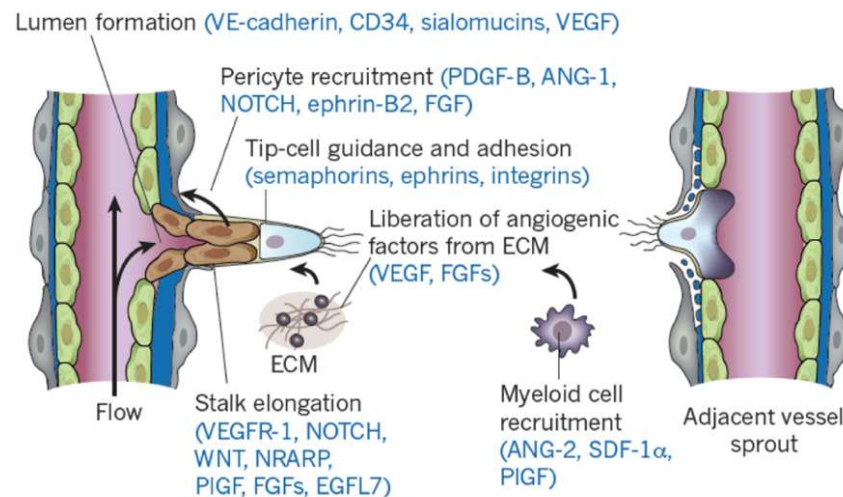


Figure 43 : Élongation et guidage du bourgeon. D'après Carmeliet et al., 2011.

Il a été montré que le VEGFR3 contrôlait la conversion des *tip cells* en *stalk cells* sur les sites de fusion des vaisseaux en renforçant la signalisation Notch. Notamment, l'inactivation du VEGFR3 dans les EC entraîne une augmentation du nombre de *tip cells* et une hyperplasie des vaisseaux (Tammela et al., 2011).

Le mécanisme de rétroaction VEGF/VEGFR - DLL4/Notch qui modélise le comportement des *tip/stalk cells* semble également contrôler l'adhérence différentielle en régulant le renouvellement de la VE-cadhérine. Les cellules avec une activité Notch plus élevée se caractérisent par un nombre réduit de VE-cadhérine à leurs jonctions. La VE-cadhérine est essentielle pour maintenir la cohésion des bourgeons ; car lorsqu'elle n'est pas exprimée, les cellules de front ne parvenaient pas à rester attachées aux cellules de soutien (Gordon et al., 2016). Lors de la migration du bourgeon angiogénique, la contractilité du cytosquelette jonctionnel d'actomyosine doit également être étroitement contrôlée. Une faible contractilité entraînera une impossible stabilisation des jonctions alors qu'à l'opposé une importante contractilité ne permettra pas la plasticité nécessaire au bourgeonnement (Szymborska & Gerhardt, 2018).

III.2.1.2.2. Fusions des bourgeons et formation d'une lumière

La croissance des bourgeons se termine lorsque deux bourgeons se rencontrent et fusionnent pour former une ramification du réseau vasculaire. Les filopodes, décorés de protéines jonctionnelles telles que VE-cadhérine et ZO-1 (Blum et al. 2008), jouent un rôle important dans l'augmentation des rencontres fortuites des cellules de front voisines pour établir l'adhésion cellulaire et l'anastomose des vaisseaux. Lors de la formation du contact entre deux *tip cells*, un point d'ancrage médié par la VE-cadhérine est déposé au site de contact qui se voit ensuite devenir une jonction en forme d'anneau (Lenard et al. 2013) pour créer une petite poche luminale en son site (Blum et al. 2008), s'accompagnant d'une polymérisation accrue de l'actine (Phng et al. 2013). La VE-cadhérine facilite non seulement l'adhésion initiale, mais aussi la coordination des premières étapes de l'anastomose (Lenard et al., 2013 ; Sauteur et al., 2017). Notamment, elle est responsable de la reconnaissance de l'événement de fusion. Elle déclenche alors un signal pour arrêter l'activité de bourgeonnement en limitant la formation de connexions multiples et en cessant la formation de filopodes. Ce signal n'est pas dépendant du VEGFR2. La VE-cadhérine coopérerait avec la protéine transmembranaire associée aux jonctions serrées ESAM1 (*Endothelial cell-Selective Adhesion Molecule 1*) pour établir et renforcer les contacts anastomotiques (Sauteur et al., 2017).

La formation de la lumière s'accompagne de réarrangements dynamiques (Herwig et al., 2011 ; Lenard et al., 2013). L'établissement de la polarité est une étape critique dans la formation de la lumière à la fois *de novo* dans la vasculogenèse mais aussi dans les bourgeons angiogéniques, car il a été montré que l'inhibition des marqueurs apicaux moesin et podocalyxin conduisait à un échec de la luménisation. Par ailleurs, il a été démontré que l'inhibition de la VE-cadhérine entraîne une mauvaise localisation de ces deux marqueurs apicaux. Ainsi, les jonctions jouent également un rôle central dans le renforcement de la polarité (Wang et al., 2010). Notamment, la régulation dynamique de l'actine jonctionnelle permet des réarrangements cellulaires et des changements de forme cellulaire nécessaires à la formation de lumières ouvertes stables. *In vivo*, la perturbation de la liaison VE-cadhérine/actine par l'expression d'une VE-cadhérine tronquée conduit à des défauts dans la formation et le maintien de la lumière (Sauteur et al., 2014).

Trois mécanismes de formation de lumière *de novo* ont été décrits : le *cord hollowing* littéralement le creusage du cordon, le *cell hollowing* ou le creusage cellulaire et la cavitation (Bryant & Mostov, 2008). Puis un quatrième a été ajouté à la liste, nommé l'invagination de la membrane plasmique (Sigurbjörnsdóttir et al., 2014). Le creusage du cordon est l'apparition d'un espace creux entre deux ou plusieurs cellules initialement apposées. La création d'une lumière à l'intérieur d'une cellule à partir de vacuoles intracellulaires est décrite comme le *cell hollowing*. La cavitation est le processus par lequel la mort des cellules centrales d'un complexe multicellulaire crée un espace creux. L'invagination de la membrane plasmique désigne le processus selon lequel une seule cellule peut créer une lumière interne lorsqu'un patch de membrane apicale prédéterminée s'invagine et crée un tube subcellulaire.

La manière dont les tubes vasculaires se construisent, s'entretiennent et adaptent les lumières perfusées en continu pour répondre aux besoins métaboliques locaux reste encore mal compris. Des études récentes ont montré que le flux sanguin lui-même jouait un rôle essentiel dans le remodelage des réseaux vasculaires. Ces données suggèrent notamment qu'il était nécessaire pour la luménisation de nouvelles connexions vasculaires. En effet, le flux sanguin entraîne l'expansion de la lumière pendant l'angiogenèse par bourgeonnement *in vivo* en induisant des déformations sphériques de la membrane apicale des EC. Il a été mis en évidence que les EC réagissaient à ces intrusions membranaires par le recrutement local et la contraction de l'actomyosine. Ce mécanisme s'avère nécessaire pour l'expansion de la lumière unique et unidirectionnelle dans les germes angiogéniques (Gebala et al., 2016).

III.2.1.2.3. Maturation des vaisseaux sanguins nouvellement formés

Lors de la phase de maturation des vaisseaux, la sous-unité d'intégrine $\beta 1$ est indispensable à la localisation correcte de la VE-cadhérine et contribue ainsi à l'intégrité des jonctions cellule-cellule (Yamamoto et al., 2015). Une étude a mis en évidence que l'expression de la Ve-ptp (*Vascular Endothelial-Protein Tyrosine Phosphatase*), protéine transmembranaire présente au niveau des jonctions endothéliales adhérentes, n'était exprimée *in vivo* que dans le système vasculaire en développement et que son inhibition conduisait à des défauts de perméabilité endothéliale. Une analyse ultrastructurale a révélé une réduction significative des complexes jonctionnels et la présence de jonctions d'adhérences immatures suite à son inhibition (Carra et al., 2012).

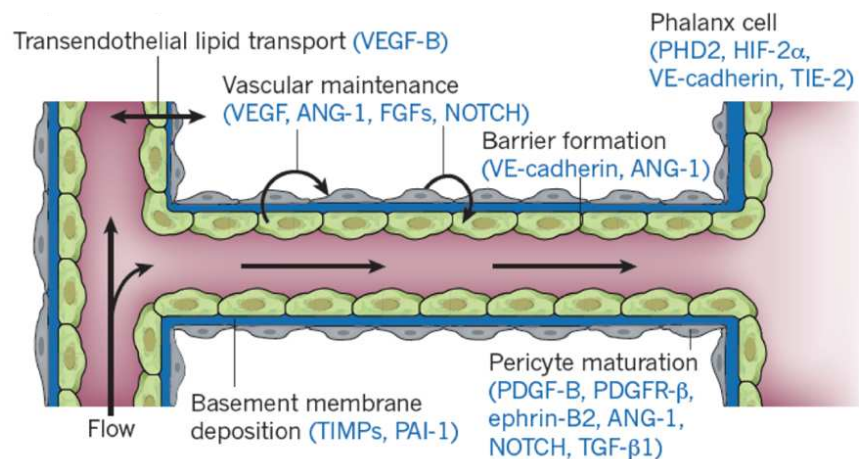


Figure 44 : Rétablissement de la quiescence endothéliale. D'après Carmeliet et al., 2011.

Au cours de la transition du bourgeonnement actif à la quiescence des cellules endothéliales, la *tip cell* adopte un phénotype dit de phalange (*phalanx cell*), qui se caractérise par des cellules non proliférantes et immobiles, favorisant l'intégrité des vaisseaux et stabilisant la vasculature par augmentation de l'adhérence cellulaire, du dépôt de MB et du recouvrement péricytaire (Ribatti & Crivellato, 2012) (Fig. 44).

L'adhésion des péricytes aux capillaires natifs et l'enveloppement des EC par les péricytes environnants constituent des événements essentiels dans la stabilisation et la maturation des vaisseaux sanguins nouvellement formés (Fig. 44). Cette étape tardive est indispensable au fonctionnement optimal du vaisseau car un défaut peut conduire à l'apoptose des EC et à la régression du néo-vaisseau. Le rôle des cellules murales dans le maintien de l'intégrité vasculaire a été démontré par plusieurs études réalisées sur l'inhibition des gènes codant pour les récepteurs spécifiques endothéliaux Tie-1 et Tie-2 (Puri et al., 1995), l'Angiopoïétine-1 (Ang-1) (Suri et al., 1996), le système de facteur tissulaire (TF) (Carmeliet et al., 1996) ou encore la voie du PDGF- β (Lindahl et al., 1997). Les souris déficientes en ces gènes présentent un phénotype hémorragique souvent associé à un nombre réduit de cellules périvasculaires positives à l' α -SMA et à la formation de micro-anévrysmes. Les souris déficientes en Ang-1 et TF présentent également des défauts dans le remodelage du plexus vasculaire homogène du sac vitellin, indiquant l'importance de ces acteurs dans les phases tardives de l'angiogenèse. La vulnérabilité des vaisseaux sanguins nouvellement formés est souvent attribuée à l'absence de péricytes. Différentes molécules ont été proposées comme marqueurs péricytaires, dont font partis le PDGFR- β , NG2, l' α -SMA, la desmine et CD248. Cependant, l'expression de ces marqueurs dépend du tissu, du type de vaisseau et de son état de maturation. Certaines études indiquent qu'aucun péricyte n'est retrouvé autour des capillaires tumoraux, alors que d'autres, rapportent que les péricytes sont toujours présents, à des degrés bien différents néanmoins. On ne sait pas dans quelle mesure ces variations d'observations sont liées à des différences inter-tissulaires ou dépendent des tumeurs étudiées. En outre, l'expression du PDGF-BB par les EC qui se veut hétérogène (Hellstrom et al. 1999), pourrait expliquer une couverture péricytaire inégale des vaisseaux sanguins tumoraux.

III.2.2. Les processus alternatifs de néovascularisation dans les tumeurs

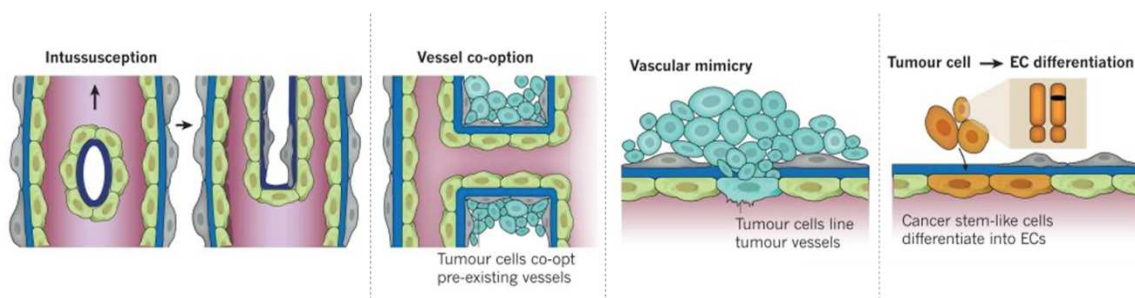


Figure 45 : Processus alternatifs d'angiogenèse dans les tumeurs. D'après Carmeliet et al., 2011.

III.2.2.1. Angiogenèse par intussusception

L'angiogenèse par intussusception a été reconnue en tant que telle dans les années 1980 et implique l'expansion de la microvascularisation par la formation de piliers intraluminaux, aboutissant finalement à une division capillaire dans le sens de la longueur (Fig. 45). Il s'agit d'un processus dynamique, rapide et métaboliquement peu exigeant qui implique peu de prolifération des EC (Burri et al., 2004). La première étape de ce processus s'effectue lorsque des EC de bords opposés du vaisseau s'invaginent et entrent en contact. Les jonctions

endothéliales sont alors remaniées pour créer un espace qui sera colonisé par des fibroblastes et des péricytes impliqués dans la synthèse de MEC. Les cellules murales stabiliseront ensuite l'ensemble. Ce remodelage du plexus vasculaire peut se dérouler de manière symétrique ou non. Ce type d'angiogenèse permet le développement de ramifications de l'arbre vasculaire préexistant.

Impliquée dans le développement embryonnaire et le remodelage vasculaire postnatal (Djonov et al., 2000), l'angiogenèse par intussusception intervient également dans le contexte tumoral (Hlushchuk et al., 2008), où elle coexiste avec l'angiogenèse par bourgeonnement (Karthik et al., 2018). Les vaisseaux sanguins sont en permanence soumis à des forces de cisaillement associées à la pression artérielle, aux pulsations, et au flux sanguin. Toute variation de ces contraintes est perçue localement au niveau des cellules vasculaires et se traduit par des modifications fonctionnelles et structurales des vaisseaux qui leur permettent de s'adapter à leur environnement mécanique. L'angiogenèse intussusceptive est stimulée par une augmentation persistante du flux sanguin et vise à la restaurer dans les vaisseaux une fois séparés (Styp-Rekowska et al., 2011). Il a également été démontré que l'eNOS, le NO et la neuropiline-1 (Nrp1) pouvaient jouer un rôle dans cette voie d'induction (Williams et al., 2006 ; Vimalraj et al., 2018). Par ailleurs, les techniques de microscopie avancées et l'enrichissement des connaissances sur les réponses des EC au flux sanguin ont permis la caractérisation de modulateurs tels que l'endogline et l'EphrinB2/B4 dans l'angiogenèse intussusceptive (Groppa et al., 2018). Dans le cadre des maladies inflammatoires chroniques intestinales, l'implication de la protéase MT1-MMP, surexprimée par les EC en réponse aux cytokines pro-inflammatoires TNF- α et l'IL-1, a été mise en évidence dans l'angiogenèse par intussusception. L'activité catalytique de MT1-MMP se voit essentielle pour la vasodilatation et la production de NO médiée par la voie impliquant MT1-MMP/THBS1/intégrine $\alpha v \beta 3$ /eNOS. Dans le cadre du cancer, l'expression de la MT1-MMP, nécessaire pour la transmigration des cellules tumorales à travers l'endothélium et l'invasion de la MB (Voura et al., 2013), est associée à un pronostic sombre dans un grand nombre de cancers (Knapinska & Fields, 2019). Bien que le rôle de la MT1-MMP dans l'angiogenèse intussusceptive associée au cancer ne soit pas proprement décrit, tout porte à croire qu'elle pourrait être en mesure de jouer un rôle similaire dans un tel contexte.

III.2.2.2. Mimicrie vasculaire / Mimétique vasculogénique

Le mimétisme vasculaire a été décrit dans les mélanomes agressifs (Zhang et al., 2019), les cancers du sein (Shirakawa et al., 2001), de l'ovaire (Sood et al., 2001), de la prostate (Sharma et al., 2002), du poumon (Passalidou et al., 2002), du foie (Sun et al., 2006) et aussi du glioblastome (Yue & Chen, 2005). Dans ce processus, les cellules tumorales sont capables de générer des réseaux très riches en matrices similaires à ceux développés au cours de la vasculogenèse embryonnaire (Maniotis et al., 1999) (Fig. 45). Les structures ne contiennent pas de marqueurs de cellules endothéliales (CD31/PECAM-1) et s'apparentent à des tubes creux. Les cellules cancéreuses reposent sur une structure semblable à une MB mais non continue, créée par des dépôts denses de glycoprotéines de la MEC entourant la lumière centrale (Valdivia

et al., 2019). La norme clinique pour caractériser l'implication du mimétisme vasculaire dans les tumeurs repose sur l'identification de structures PAS (*Periodic Acid Schiff*)+/CD31- (Clemente et al., 2010). Le mimétisme vasculaire est corrélé à la stadification de la tumeur (Lin et al., 2012) et, sans surprise, à un mauvais pronostic (Yang et al., 2016b). Lors de la formation de vaisseaux vasculaires mimétiques, les cellules tumorales sont adjacentes au flux sanguin, ce qui favorise le détachement et l'intravasation de ces cellules. En effet, l'activation du mimétisme vasculaire semble associée à la présence de métastases, comme le révèle plusieurs études (Liu et al., 2012).

Le mimétisme vasculaire implique des cellules tumorales compétentes pour l'activation de voies de signalisation associées à l'angiogenèse, aux oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs et à l'hypoxie. Dans ce processus, le clivage de la Laminin5γ2 en fragments pro-migratoires (5γ2x et 5γ2') par la MMP-2 entraînent un dépôt dense de protéines de la MEC prédisposant à la formation d'une MB, formant ainsi des vaisseaux sanguins *de novo* dans les tumeurs solides (Liu et al., 2012). Bien que le mimétisme vasculaire se produise fréquemment dans les microenvironnements de tumeurs avasculaires et hypoxiques, le mécanisme semble également pouvoir se produire en normoxie *in vitro*. Les trois principales voies de signalisation induisant le mimétisme vasculaire comprennent les voies de signalisation VE-Cadhérine/EphA2 ; HIF-1α/Stat3 ; et Nodal/Notch.

III.2.2.3. Co-optation des vaisseaux existants

Les premières observations de la co-optation des vaisseaux remontent au XIX^e siècle. La principale caractéristique de la co-optation des vaisseaux s'appuie sur le fait qu'une tumeur en croissance peut être capable de préserver l'échafaudage vasculaire du tissu normal environnant au lieu d'induire une création *de novo* (Kuczynski et al., 2019) (Fig. 45). La co-optation des vaisseaux peut être identifiée histologiquement en utilisant la présence de caractéristiques morphologiques spécifiques mais ne peut être distinguée de l'angiogenèse en examinant la densité des microvaisseaux seuls.

Dans ce processus, cellules cancéreuses migrent le long de la surface abluminale de vaisseaux préexistants et/ou les cellules cancéreuses infiltrent l'espace entre les vaisseaux préexistants, conduisant finalement à l'incorporation de vaisseaux préexistants dans la tumeur. Il en résulte des tumeurs bien perfusées comparable à un tissu normal. La question de savoir pourquoi certaines tumeurs préservent l'architecture tissulaire de l'hôte et d'autres non, reste une question non résolue. Elle pourrait être liée à plusieurs événements : une évasion immunitaire, une résistance au traitement induite par la niche périvasculaire, une augmentation de la motilité et de la migration des cellules cancéreuses le long des vaisseaux sanguins ou des métastases migratoires extravasculaires (Latacz et al., 2020). Les cellules cancéreuses doivent évidemment être réceptives aux signaux instructifs du microenvironnement de l'hôte, se développer le long des membranes basales existantes (via la co-optation adhésive ou la croissance *in situ* révertante) et entrer en compétition avec les cellules (épithéliales) normales de l'hôte sans provoquer de réponse immunitaire (Li & Stanger, 2019). De nombreuses études

indiquent que ce type de croissance en particulier est de mauvais pronostic. La co-optation des vaisseaux préexistants, facilite la dissémination métastatique (Enderling et al., 2009 ; Winkler, 2017). Elle est adoptée par de nombreuses tumeurs humaines, notamment dans les métastases du cancer mammaire au niveau pulmonaire (Bridgeman et al., 2017). Cette prévalence de la co-optation des vaisseaux dans le cancer métastatique pourrait fournir une explication convaincante de l'échec de certaines thérapies anti-angiogéniques (Donnem et al., 2013 ; Bridgeman et al., 2017). Ainsi, la co-optation des vaisseaux apparaît comme un mécanisme fréquemment négligé de vascularisation tumorale pouvant influencer la progression de la maladie mais aussi et surtout la réponse au traitement.

III.2.2.4. Cellules endothéliales précurseurs / Cellules souches cancéreuses

La formation de nouveaux vaisseaux au sein d'une tumeur dépend de la prolifération et de la migration des EC, qui peuvent provenir de deux sources : (1) le bourgeonnement et la co-optation des EC des parois vasculaires préexistantes ou (2) le recrutement des cellules précurseurs endothéliales (EPC pour *Endothelial Progenitor Cells*) dérivées de la moelle osseuse (Botelho & Alves, 2016).

Dans ce second schéma, les EPC mobilisées, sont transportées à travers la circulation sanguine jusqu'à la tumeur où elles se différencient en EC matures pour former des bourgeons vasculaires et des réseaux cellulaires, avant l'incorporation dans une microvascularisation fonctionnelle. Depuis de nombreuses années déjà, les études sur les EPC ont montré qu'elles pouvaient être recrutées et impliquées dans l'angiogenèse (Mancuso et al., 2006). Initialement identifiées et isolées à partir du sang de donneurs sains en 1997 (Asahara et al., 1997), les EPC possèdent un potentiel hautement prolifératif (Lin et al., 2000). Elles coexpriment à la fois le VEGFR2 et CD34, et se différencient en EC matures en culture. En 1999, Asahara et al. montrent que, lors d'ischémies, le nombre de EPC augmente, suggérant leur rôle dans la néovascularisation. Bien que le nombre d'EC incorporées apparaisse faible (moins de 10% des EC formant les néo-vaisseaux proviennent de cellules circulantes hématopoïétiques (Crosby et al., 2000)), leur importance résiderait dans leur activité de stimulation paracrine de l'angiogenèse (Urbich et al., 2005). La majorité des EPC circulants réside dans la moelle osseuse en association étroite avec les cellules souches hématopoïétiques et le stroma de la moelle osseuse qui fournit un microenvironnement optimal. Ainsi, les EC et les cellules souches hématopoïétiques partagent de nombreux marqueurs de surface cellulaire, notamment CD45, CD34, CD133, CD146, CD31, CD105, CD144, VEGFR2 et le facteur de von Willebrand (vWF) (Bertolini et al., 2006). Le terme d'EPC englobe les hémangioblastes primitifs relatifs à des EC plus différenciées. Cependant, il est admis que les EPC précoces (localisées dans la moelle osseuse ou immédiatement après la migration dans la circulation) soient CD133⁺/CD34⁺/VEGFR2⁺/CD45⁻, tandis que les EPC circulants sont caractérisés par un profil CD133^{low}/CD34⁺/VEGFR2⁺/CD45⁻ et commencent à exprimer des marqueurs de surface cellulaire typiques de EC matures, y compris CD31 et vWF (Le Bourhis et al., 2010).

Chez des patientes atteintes d'un cancer du sein, les taux plasmatiques de VEGF ont été corrélés à la présence d'EPC circulants AC133+/KDR+ (Botelho et al., 2005 ; Tawada et al., 2014), qui étaient, par ailleurs, retrouvés dans le sang périphérique de 16,7 % des patientes (Botelho et al., 2005 ; Botelho & Alves, 2016). SDF-1 α , régulé à la hausse par le VEGF (Schattelman et al., 2007), joue un rôle clé dans la libération et dans le processus de référencement des EPC. Présent à des concentrations élevées dans la moelle osseuse, SDF-1 α maintient les cellules souches dans leur niche. En réponse à différents facteurs pro-angiogéniques, tels que le VEGF, le niveau de SDF-1 α diminue dans la moelle osseuse, conduisant à l'entrée des cellules souches dans la circulation ; en revanche, la concentration de SDF-1 α augmente dans la tumeur, invitant les cellules progénitrices à y rester (Grunewald et al., 2006). D'autres chimiokines, comme CCL2 et CCL5, ont été signalées comme étant produites par les cellules tumorales pour attirer les cellules progénitrices de la circulation (Spring et al., 2005). En 2007, Guy et al. ont examiné la contribution des EPC dans progression tumorale mammaire en utilisant des souris transgéniques MMTV-PyMT, dans lesquelles l'oncogène PyMT était exprimé sous le contrôle transcriptionnel du promoteur du virus de la tumeur mammaire de souris (MMTV) (Guy et al., 1992). Le transgène PyMT active des voies similaires à celle induite par ErbB2, et surtout, ce modèle de tumeur murine modélise la progression du cancer du sein humain depuis l'hyperplasie non maligne précoce (6 semaines d'âge) à l'adénome (8–9 semaines d'âge) jusqu'à l'adénocarcinome malin tardif (8–12 semaines d'âge) (Lin et al., 2003). Ils ont découvert que les adénomes précoces contenaient des foyers de cellules dérivées de la moelle osseuse, comprenant des EPC et présentaient une densité de vaisseaux accrue. 5 à 10% des vaisseaux de ces foyers vasculaires avaient incorporé des EC provenant de la moelle osseuse. Ainsi, ces résultats suggèrent que les EPC dérivés de la moelle osseuse apportent leur contribution lors de la néovascularisation aux premiers stades de la progression tumorale mammaire (Nolan et al., 2007). De surcroît, il a été mis en évidence que les EPC n'étaient pas seulement impliqués dans le développement de la tumeur primaire, mais également dans la formation des métastases (Gao et al., 2008).

III.3. La vascularisation tumorale

Alors que la formation de vaisseaux sanguins physiologiques se produit ponctuellement pendant le développement, le cycle menstruel chez la femme ou encore la cicatrisation des plaies en tant que processus contrôlé, l'angiogenèse tumorale est, quant à elle, dérégulée en raison d'une persistance de facteurs pro-angiogéniques dans le microenvironnement tumoral.

Une circulation qui distribue de manière optimale le flux sanguin dépend d'une division ordonnée de l'arbre vasculaire en artères, artérioles, capillaires, veinules et veines. L'endothélium possède la capacité de se remodeler infiniment en réponse à son environnement. En présence d'une signalisation pro-angiogénique aberrante, les réseaux vasculaires nouvellement formés ne parviennent pas à atteindre une maturation optimale ; la division en artérioles, capillaires et veinules fait défaut (Baluk et al., 2005 ; McDonald et al., 2005). L'hétérogénéité morphologique

engendre un flux sanguin irrégulier dans le parenchyme tumoral, résultant de zones hypoxiques persistantes ou intermittentes (Kimura et al., 1996).

III.3.1. Caractéristiques des vaisseaux sanguins tumoraux

III.3.1.1. Anomalies morphologiques et fonctionnelles des cellules endothéliales tumorales

Les vaisseaux sanguins tumoraux présentent une morphologie distincte par rapport aux vaisseaux sanguins normaux. En premier lieu, la structure de la paroi des vaisseaux tumoraux est anormale et hétérogène au sein de la tumeur composée d'EC pouvant présenter de larges fenestrations, un alignement vasculaire irrégulier, un manque de couche musculaire lisse ou d'innervation, une large lumière et des récepteurs fonctionnels altérés pour l'angiotensine II (Maeda et al., 2003 ; Hori et al., 1991). N'étant pas en mesure de former une monocouche régulière, les cellules endothéliales tumorales (TEC pour *Tumor Endothelial Cells*) ne parviennent donc pas à honorer leur fonction première de barrière qui les caractérisent normalement (Hashizume et al., 2000).

Dans les vaisseaux sanguins tumoraux en comparaison avec les vaisseaux normaux, les membranes basales sous-jacentes apparaissent moins réticulées et ainsi plus sensibles à la protéolyse et au remodelage (Kalluri, 2003). Outre les composants de la paroi contractile, le compartiment périvasculaire est souvent dépourvu de péricytes, ce qui rend les vaisseaux tumoraux vulnérables et fuyants (Baluk et al., 2005).

La notion d'hyperperméabilité est une caractéristique majeure des vaisseaux sanguins tumoraux. Il semble important de rappeler, qu'en condition basale, le système vasculaire est perméable aux solutés et aux petites molécules ayant un poids moléculaire inférieure à 40kDa. Son intégrité permet de limiter l'extravasation de molécules plus grosses et de cellules, qui nécessitent un processus actif et déclenché. Cette filtration constante du soluté permet de maintenir la pression interstitielle et soutient la fonction de surveillance immunitaire. Dans le cadre du cancer, l'augmentation de la perméabilité rompt cet équilibre. La fuite de plus ou moins grosses molécules devient passive et sa chronicité peut conduire à la formation d'œdème local et une coagulation plasmatique extravasculaire. Un gel de fibrine réticulée peut être déposé en conséquence et sert alors de matrice provisoire pour la migration cellulaire, l'angiogenèse et la formation ultérieure de stroma (Dvorak, 2003). Il existe deux mécanismes impliqués dans la fuite vasculaire, l'un dépend de la formation de canaux transendothéliaux à partir de vésicules ou de vacuoles, de l'organite vésiculo-vacuolaire ; l'autre implique la dissolution transitoire des jonctions endothéliales pour permettre l'extravasation. Les régulateurs moléculaires de la perméabilité vasculaire comprennent des facteurs de croissance (comme le VEGF, le PDGF et le FGF) et des cytokines inflammatoires (notamment, l'histamine et la bradykinine) (Claesson-Welsh, 2015). L'augmentation de la perméabilité vasculaire engendre de nouvelles propriétés tel que l'effet de perméabilité et de rétention améliorés (EPR pour *Enhanced Permeability and Retention*). Il s'agit d'un phénomène propre aux tumeurs solides qui facilite le transport des

macromolécules de plus de 40 kDa dans les tissus tumoraux par leur extravasation sélective et leur rétention, notamment en raison d'un faible drainage lymphatique. L'effet EPR a été décrit pour la première fois par Matsumura et Maeda en 1986 avant d'être approfondi quelques années plus tard (Matsumura & Maeda, 1986 ; Maeda, 2001, Nakamura et al., 2015). Le potentiel de cet effet dans le cadre de la thérapie du cancer a rapidement été reconnu, promettant l'accumulation massive de molécules thérapeutiques dans les tissus tumoraux.

Outre une perméabilité accrue, le réseau vasculaire tumoral est caractérisé par un drainage lymphatique inefficace. Le réseau lymphatique intervient dans les échanges entre les cellules tumorales et le milieu environnant en constituant une interface entre les cellules et le sang. En effet, l'approvisionnement des cellules en nutriments, qu'elles soient tumorales ou non, ne se fait pas directement par le sang : du plasma s'infiltre continuellement entre les cellules, constituant la lymphe interstitielle qui baigne les tissus et assure le transport intermédiaire des nutriments jusqu'aux cellules. Ces échanges sont bidirectionnels et permettent également l'évacuation des déchets du métabolisme cellulaire. Cette détoxification du milieu péri-tumoral est indispensable à la croissance optimale des tissus dont le métabolisme augmenté produit une grande quantité de résidus dénaturés, canalisés dans les voies lymphatiques avant leur élimination via la circulation sanguine (Saharinen et al., 2004). Bien que le système lymphatique ne fonctionne pas correctement dans les tissus tumoraux, il apparaît comme une voie privilégiée pour les métastases (Fang et al., 2011).

Un autre type d'anomalie associée au réseau vasculaire tumoral concerne le comportement du flux sanguin (Hori et al., 1991). Suzuki et al. ont décrit la non-réponse des vaisseaux sanguins tumoraux à l'angiotensine II, impliquée dans la maintenance du volume et de la pression artérielle (Suzuki et al., 1981), et Hori et al. ont pu mettre en évidence dans un modèle expérimental que le flux sanguin tumoral circulait fréquemment dans la direction opposée (Hori et al., 1991 ; Hori et al., 2000). Les anomalies architecturales augmentent collectivement la résistance au flux sanguin, qui, associée à une densité hétérogène des vaisseaux, engendre un flux sanguin instable (Hlushchuk et al., 2016). La vitesse du flux est également impliquée dans l'évolution de la maladie et particulièrement la formation des métastases. Une étude a montré que la vitesse de déplacement des cellules tumorales circulantes était ralentie au niveau des zones fortement ramifiées comportant virages et bifurcations, là où le flux sanguin était lui-même ralenti. Les cellules adhèrent préférentiellement à ces endroits via l'intégrine $\beta 1$. En inhibant l'expression de cette intégrine, comme en jouant sur la force du flux, il apparaît possible de modifier ces points d'arrêt *in vitro* (Follain et al., 2018).

Comme il l'a été évoqué dans le chapitre précédent, les TEC diffèrent des cellules endothéliales normales, non seulement sur le plan morphologique, mais aussi dans leur profil génétique et par extension sur le plan fonctionnel. Des études comparant les profils d'expression génique entre les EC et les TEC ont pu mettre en évidence la présence de 25 transcrits surexprimés dans l'endothélium tumoral par rapport à la condition normale, dont 13 non impliqués dans l'angiogenèse physiologique. La plupart des gènes surexprimés intervenant dans

l'angiogenèse physiologique arborent des rôles dans le contrôle du cycle cellulaire (comme Ckap2 et Top2a). Les gènes spécifiques de l'endothélium tumoral désignés comme des marqueurs endothéliaux tumoraux correspondent principalement à des molécules de surface cellulaire de fonction incertaine (le plus exprimé étant CD276, suivi par CD137) (Seaman et al., 2007). D'autres études ont montré que les TEC différaient des EC par leur réactivité à l'EGF (Amin et al., 2006), à l'adrénomédulline (Tsuchiya et al., 2010) et au VEGF (Matsuda et al., 2010), contribuant grandement à leur phénotype pro-angiogénique. Notamment, la mise en place d'une boucle autocrine de signalisation du VEGF leur confèrent une résistance partielle à la privation de sérum (Matsuda et al., 2010). Les TEC se voient aussi attribuer l'expression de marqueurs embryonnaires, une caractéristique générale aux cellules tumorales (Bussolati et al., 2003 ; Bussolati et al., 2006), qui leur confèrent une résistance à l'apoptose et des propriétés pro-angiogéniques (Fonsato et al., 2006).

L'hétérogénéité parmi les TEC a été observée dans de nombreuses études (Bussolati et al., 2003), à différents stades de progression (Molema, 2010). Notamment, des différences entre les tumeurs hautement métastatiques et faiblement métastatiques ont été mises en évidence. Les TEC isolées de tumeurs hautement métastatiques présentent un indice de prolifération et de migration plus élevé, accompagné d'une couverture péricytaire moindre et d'une sensibilité accrue au VEGF. Elles sont plus à même d'envahir l'espace extracellulaire par rapport aux TEC isolées de tumeurs à faible potentiel métastatique (Ohga et al., 2012). De plus, dans les TEC dérivées des tumeurs métastatiques, plusieurs gènes de la voie de signalisation PI3K/Akt, comme le VEGFR-1, le VEGFR-2 et le VEGF et, liés à l'angiogenèse étaient régulés à la hausse (Bussolati et al., 2006). Par ailleurs, il a été mis en évidence que les TEC issues du microenvironnement tumoral pouvaient présenter plusieurs anomalies cytogénétiques (Hida et al., 2004).

L'ensemble de ces caractéristiques morphologiques et fonctionnelles illustre l'étendu de la subversion du système vasculaire au profit de la tumeur ; elles illustrent à quel point les TEC sont foncièrement différentes des cellules endothéliales normales et le rôle central que le système vasculaire joue dans l'évolution maligne de la maladie.

III.3.1.2. Les péricytes tumoraux et les voies de signalisation associées

Alors que les péricytes normaux sont en contact étroit avec l'endothélium et résident dans la MB, les péricytes tumoraux sont souvent associés de manière lâche à l'endothélium et peuvent s'étendre dans la MEC. Les péricytes associés aux tumeurs expriment constamment des marqueurs de remodelage vasculaire et arborent une morphologie anormale (Baluk et al., 2005). Les conséquences fonctionnelles d'un attachement lâche peuvent engendrer un affaiblissement de la paroi vasculaire, un risque accru d'hémorragie intra-tumorale ou encore une modification du tonus vasomoteur (Baluk et al., 2005).

L'hétérogénéité concernant les péricytes au sein d'une même tumeur a pu être mise en évidence (Hlushchuk et al., 2008). Alors qu'il est décrit que les péricytes présents localement pourraient migrer le long des bourgeons angiogéniques en réponse au PDGF-BB exprimé par les EC (Hellberg et al., 2010), l'incorporation de progéniteurs de péricytes circulants dérivés de la moelle osseuse dans les tumeurs a également été décrit (Song et al., 2005). Une autre possibilité est que les composants du microenvironnement tumoral induisent la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes par l'intermédiaire du TGF- β ou du PDGF. L'importance relative de ces différentes sources de péricytes reste à déterminer.

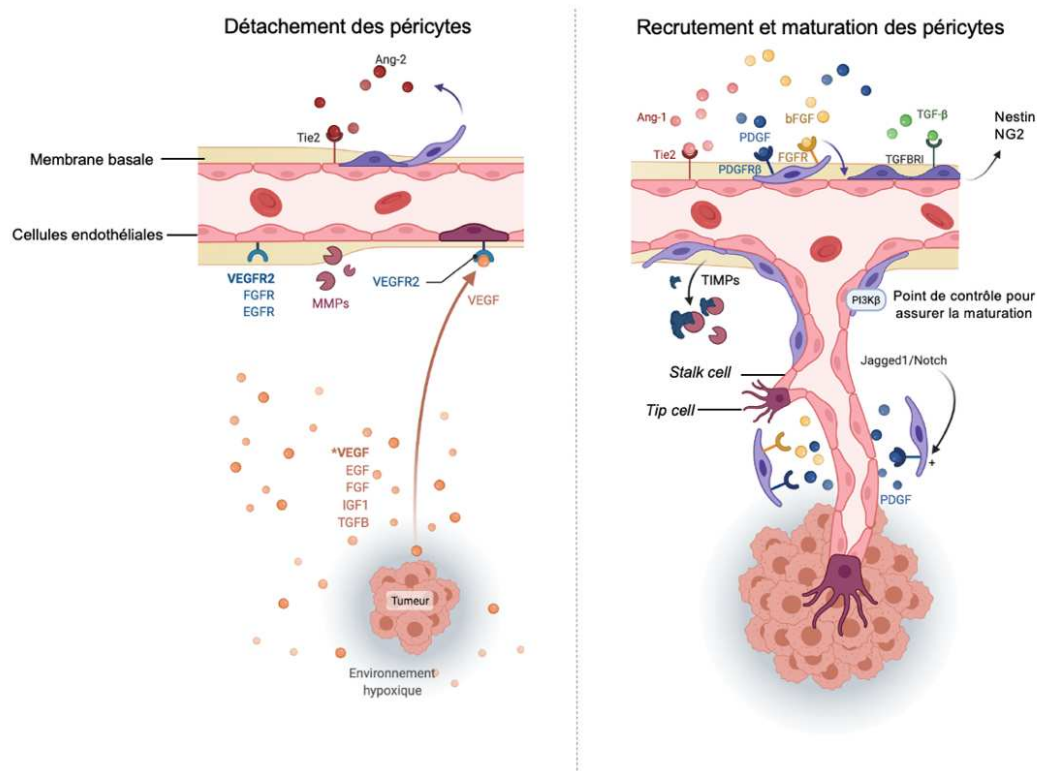


Figure 46 : Détachement, recrutement et maturation des péricytes tumoraux. Créée sur Biorender.com

Parmi les facteurs clés dans la régulation des péricytes figure le FGF-2. Mécanistiquement, le FGF-2 se lie au FGFR2 pour stimuler leur prolifération et orchestrer la signalisation du PDGFR β pour le recrutement vasculaire. Le FGF-2 améliore la sensibilisation pour cette voie de signalisation en augmentant les niveaux de PDGFR β à la surface des péricytes. Par le FGFR1, le FGF-2 induit l'expression de deux ligands du PDGFR β (PDGF-BB et PDGF-DD) dans les EC angiogéniques pour assurer l'activation du PDGFR β et ainsi l'activation des péricytes (Hosaka et al., 2018).

La signalisation médiée par les angiopoïétines (Ang) et Tie-2 contrôle de manière similaire l'association des EC et des péricytes, bien que son mécanisme d'action moléculaire soit moins bien compris (Augustin et al., 2009). Cette voie sera décrite par la suite. Par ailleurs, il a été mis en évidence que HGF était nécessaire au recrutement des cellules musculaires lisses induite par l'Ang-1 et que l'Ang-2, antagoniste de Ang-1, était en mesure d'inhiber la production d'HGF induite par Ang-1 ainsi que la migration cellulaire associée. *In vivo*, la suppression de

Tie2 chez des souris transgéniques impacte la production de HGF, suggérant qu'HGF joue un rôle clé en aval de l'axe Ang/Tie2 en induisant le recrutement des péricytes et la maturation vasculaire (Kobayashi et al., 2006).

Grace à un modèle de co-culture *in vitro*, une étude a mis en évidence que l'expression de Jagged1 et la signalisation Notch étaient essentielles pour la croissance des péricytes, en plus de celles des EC. De plus, ils ont pu observer que la combinaison d'EC avec des macrophages et des péricytes dans un même environnement induisait une multiplication des effets respectifs sur le bourgeonnement endothélial (Tattersall et al., 2016), les auteurs parlent d'angiotrophisme. La perte de la signalisation de Notch au niveau des péricytes entraîne une diminution des niveaux de PDGFR et conduit à leur l'apoptose. Dans les vaisseaux rétiniens de souris, une déficience périvasculaire de la signalisation Noth entraîne des malformations artério-veineuses sévères associée à une réduction significative de la couverture péricytaire, soutenant le rôle critique de Notch dans la survie des péricytes (Nadeem et al., 2020).

La voie du TGF- β se voit également associée au recrutement des péricytes dans la phase de maturation de l'angiogenèse. Il a été mis en évidence que la signalisation du TGF- β était associée à la différenciation des péricytes via l'augmentation de l'expression des marqueurs Nestin et NG2 (Tsukada et al., 2018). De surcroît, il a été mis en évidence que la diaphonie entre les cellules tumorales et les CAF dans un modèle de cancer du sein améliorait la vascularisation tumorale en augmentant l'association des péricytes avec l'endothélium via un mécanisme impliquant l'axe TGF- β /TGFBR1. Dépendante de SMAD, cette voie s'avère réguler à la hausse l'expression de la fibronectine, qui apparait comme un régulateur de premier plan dans les interactions entre les péricytes et l'endothélium (Zonneville et al., 2018). De plus, le blocage de l'activité kinase du TGFBR1 a engendré des vaisseaux sanguins fragiles conduisant à des hémorragies au sein des tumeurs, soulignant l'importance de cette voie plus largement nécessaire à l'efficacité du réseau vasculaire.

Les MMPs semblent également jouer un rôle dans le recrutement des péricytes à plusieurs niveaux, notamment par la promotion directe de leur invasion. Elles jouent également un rôle dans l'activation des péricytes par la libération de facteurs de croissance séquestrés, par la transactivation de récepteurs de surface angiogénique ou encore par le recrutement de cellules souches dérivées de la moelle osseuse (Chantrain et al., 2006). Une fois recrutés, les péricytes stabilisent les vaisseaux en libérant des TIMPs qui vont pouvoir inhiber les MMPs.

Une étude récente a mis en évidence l'implication de la voie PI3K β , mais pas PI3K α , dans la régulation de la prolifération et la maturation des péricytes. L'inactivation de l'expression de PI3K β dans les péricytes déclenche leur maturation précoce alors que l'activation de la signalisation PI3K induite par le biais de la suppression du régulateur négatif PTEN retarde leur maturation. Ainsi, la signalisation PI3K β pourrait agir comme point de contrôle pour assurer la formation appropriée des vaisseaux sanguins (Figueiredo et al., 2020).

Après le recrutement des cellules péricytaires, l'endothélium est quiescent et stable. L'expression du VEGFR-2 des EC couvertes de péricytes est réprimée par la signalisation Notch. Le VEGF n'a donc plus d'effet sur les cellules endothéliales. En plus d'inhiber la réponse angiogénique des EC, les péricytes pourraient contrôler la contractilité et le diamètre des vaisseaux, tout en sécrétant les facteurs nécessaires à la survie et à la prolifération endothéliales (Brudno et al., 2013). Finalement, les péricytes et les EC agissent comme une unité fonctionnelle par l'établissement de contacts hétérotypiques cellule-cellule, et par la synthèse et la sécrétion de facteurs de croissance qui favorisent leur survie mutuelle.

Si des signaux pro-angiogéniques venaient à apparaître de nouveau, une nouvelle ramification pourrait s'initier. Ce remodelage vasculaire constant qui se produit dans les tumeurs conduit à l'apparition et la régression de certains vaisseaux, alimentant, selon le rapprochement de ses événements, un peu plus le chaos caractéristique du système vasculaire tumoral.

III.3.2. Mécanismes moléculaires impliqués dans la formation des vaisseaux sanguins tumoraux

III.3.2.1. Le *switch angiogenic*

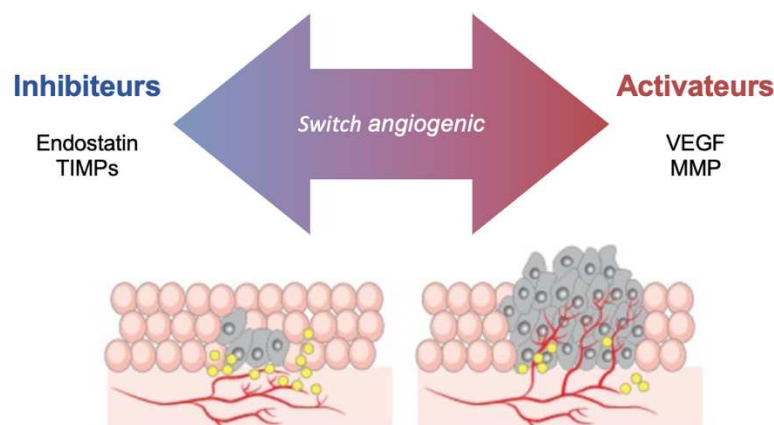


Figure 47 : Le *Switch angiogenic*.

Un large éventail de facteurs et de mécanismes cellulaires a été décrit pouvant initier la formation de vaisseaux dans les tumeurs. L'hypoxie ou les altérations génétiques conduisant à la stabilisation du facteur HIF sont, notamment, à l'origine de cette commutation. L'hyperprolifération des cellules tumorales entraîne une augmentation de la consommation en oxygène. Lorsque l'apport sanguin fourni par les vaisseaux environnants ne suffit plus à irriguer la masse tumorale en croissance, la tumeur (ou seulement certaines zones de la tumeur) devient hypoxique. L'hypoxie induit la production de facteurs pro-angiogéniques dont le VEGF, le FGF et le PDGF (Liao & Johnson, 2007) conduisant à une recrudescence des facteurs pro-angiogéniques dans l'équilibre des facteurs orchestrant la quiescence. Ce *switch angiogenic* conduit à la formation accrue, rapide et chaotique de vaisseaux sanguins. En plus de l'angiogenèse, les HIF jouent un rôle important dans tous les aspects de la biologie du cancer, y compris la survie cellulaire, le métabolisme, l'invasion et la dissémination métastatique (Semenza, 2010).

Les altérations génétiques de la voie de signalisation de l'oxygène peuvent influencer l'activation du HIF dans des conditions normoxiques. La protéine de von Hippel-Lindau (vHL) joue un rôle central dans la voie de détection de l'oxygène favorisant la dégradation de HIF-1 α médiée par le protéosome pendant la normoxie. Des mutations dans ce gène, entraînant la stabilisation de HIF-1 α et l'activation des gènes pro-angiogéniques cibles, se retrouvent dans de nombreuses tumeurs et sont associées à une progression tumorale ainsi qu'à un mauvais pronostic pour les patients (Miller et al., 2005). Des mutations dans la voie de signalisation Wnt/ β -caténine dans le cancer du côlon et d'autres événements oncogènes, ont été rapportées pour provoquer une stabilisation HIF-1 α (Kaelin & Ratcliffe, 2008) et ainsi induire le *switch angiogenic* au sein des tumeurs.

III.3.2.2. La régulation de l'angiogenèse tumorale

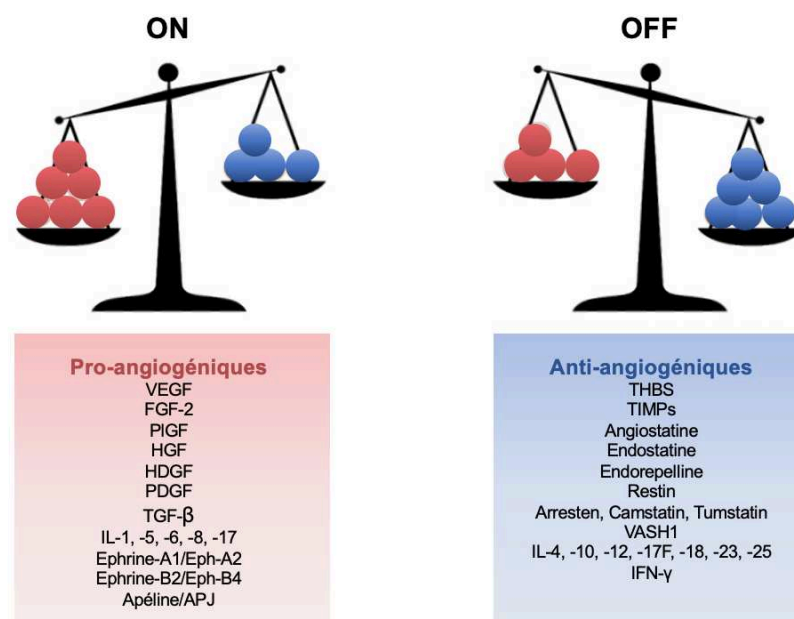


Figure 48 : Les différents acteurs du *switch angiogenic*. Adapté d'après Madu et al., 2020.

Le corps contient un certain nombre de stimulateurs et d'inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse, et l'équilibre local entre eux régule le processus de formation des vaisseaux sanguins. Dans un premier temps, nous allons détailler les principaux régulateurs positifs de l'angiogenèse, puis les inhibiteurs endogènes avant de détailler certaines voies de signalisation faisant intervenir différents acteurs impliqués dans la régulation fine de l'angiogenèse.

III.3.2.2.1. Les régulateurs positifs de l'angiogenèse

Les régulateurs positifs de l'angiogenèse et par extension de la progression tumorale, sont nombreux et cette liste ne saurait être exhaustive. Quoiqu'il en soit certains facteurs de croissance et leur voie de signalisation associée seront détaillés dans cette partie.

III.3.2.2.1.1. Le VEGF

La découverte du facteur de croissance dérivé de l'endothélium vasculaire (VEGF) a révolutionné la compréhension de la vasculogénèse et de l'angiogénèse au cours du développement et de l'homéostasie physiologique. Le VEGF, identifié à l'origine comme un facteur de perméabilité vasculaire (VPF), est l'un des inducteurs les plus puissants de l'angiogénèse (Ferrara et al., 2003). Dans le cancer, le VEGF est sécrété par les cellules tumorales et le stroma environnant. Il est associé à la progression tumorale, à l'augmentation de la densité des vaisseaux, au caractère invasif, aux métastases et à la récurrence tumorale (Apte et al., 2019).

La famille des facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire comprend 5 protéines sécrétées, le VEGF (VEGF-A), le VEGF-B, le VEGF-C, le VEGF-D et le facteur de croissance placentaire (PlGF) (Ferrara et al., 2003).

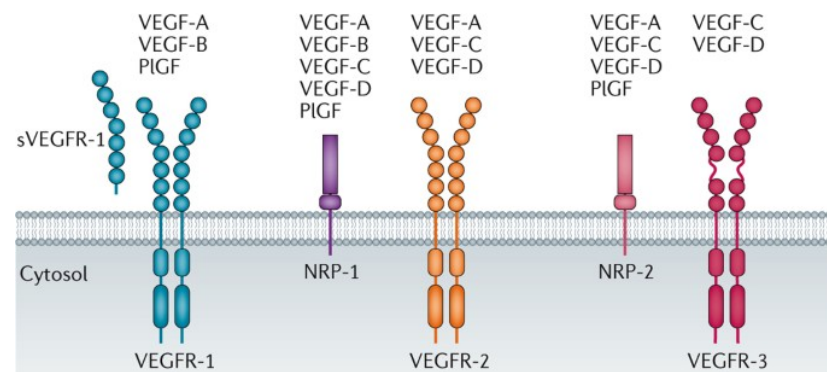


Figure 49 : La famille du VEGF et ses récepteurs. Adapté d'après Lange et al., 2016.

- Le VEGF-A est une glycoprotéine homodimérique de 45 kDa qui subit un épissage alternatif conduisant à la production de différents variants protéiques. Actuellement, 9 isoformes sont décrites : VEGF111, VEGF121, VEGF145, VEGF148, VEGF162, VEGF165, VEGF183, VEGF189 et VEGF206. En plus, de ces formes nommées VEGF_{xxxxa}, on distingue également des formes VEGF_{xxxxb} liées à l'épissage alternatif de l'exon 8 (Keyt et al., 1996). Ces isoformes posséderaient activité anti-angiogénique (Merdzhanova et al., 2010) en se liant au VEGFR-2 avec la même affinité que les isoformes VEGF_{xxxxa} mais elles empêcheraient le recrutement du co-récepteur NRP-1 (*Neuropilin-1*). La présence d'une autre isoforme nommée VEGF-A_x produite par les EC a été décrite avec des fonctions contradictoires sur l'angiogénèse. Au cours de l'angiogénèse tumorale, le VEGF sécrété par les cellules tumorales induit la prolifération et la survie des EC principalement via les voies ERK et PI3K/Akt (Takahashi et al., 2001 ; Jiang & Liu, 2009). La migration des EC en aval de VEGFR2 est induite par de multiples voies de signalisation, impliquant souvent la stimulation PI3K et l'activation des Rho GTPases (Lamallice et al., 2007). D'autre part, l'invasion cellulaire médiée par le VEGF est favorisée par l'expression de MT-MMP, MMP-2, MMP-9 et uPA qui dégradent la MB et la MEC pour faciliter la migration de cellules endothéliales et la formation de bourgeons capillaires (Van Hinsbergh et al., 2008). Le VEGFR1 est un récepteur de haute affinité pour le VEGF-A, mais sa faible activité kinase est inutile pour la morphogénèse vasculaire *in vivo*. Un déficit en VEGFR1

entraîne une prolifération vasculaire accrue et une létalité embryonnaire, probablement causée par l'axe VEGF-A/VEGFR2 (Kappas et al., 2008). Par ailleurs, l'activation du VEGFR-1 peut fournir un avantage de croissance sélectif aux tumeurs qui dépendent fortement de la signalisation Ras/Raf/MAPK. Des études *in vitro* suggèrent un rôle pour la signalisation du VEGFR-1 dans la survie des tumeurs du carcinome du sein positif au VEGFR-1 (Yao et al., 2011).

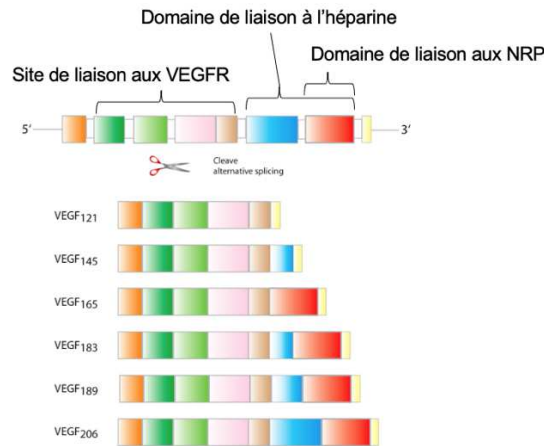


Figure 50 : Les isoformes du VEGF-A.

L'hyperperméabilité chronique induite par le VEGF pourrait être largement dépendante de la croissance de vaisseaux immatures et structurellement anormaux qui sont intrinsèquement fuyants plutôt que de la stimulation directe de la fuite vasculaire (Ferrara & Adamis, 2016). La perméabilité vasculaire est étroitement liée à l'inflammation vasculaire. Bien que le VEGF ne soit pas une cytokine inflammatoire, il peut favoriser un modèle d'expression génique inflammatoire similaire à celui de l'IL-1 β (Hofer & Schweighofer, 2007). De plus, l'activation par le VEGF de NF κ B en aval d'Akt peut induire une réponse de type inflammatoire, favorisant l'attraction des leucocytes qui peuvent contribuer au processus angiogénique (Jiang & Liu, 2009).

Il existe d'autres membres de la famille VEGF qui, bien que se liant sur les récepteurs du VEGF (VEGFR), exercent des fonctions différentes.

- Avec une homologie de 41% avec le VEGF-A, le VEGF-B interagit avec le VEGFR1 sur les EC pour exercer son activité paracrine. Le VEGF-B est relativement peu angiogénique ; il agit plutôt comme un facteur de survie pour les cellules qui l'expriment avec ses récepteurs. Dans certaines conditions pathologiques ou de stress, telles que l'ischémie ou la privation de sérum, le VEGF-B favorise la survie des cellules vasculaires en inhibant l'expression de nombreux gènes apoptotiques (Zhang et al., 2009). Dans d'autres conditions, le VEGF-B pourrait inhiber la croissance tumorale et l'angiogenèse, en entrant en compétition avec le VEGF-A (Sands et al., 2011).

- Le VEGF-C et le VEGF-D, qui présentent 30% d'homologie avec le VEGF-A, sont principalement impliqués dans la régulation de la lymphangiogenèse (Alitalo et al., 2005). NRP-2 (*neuropilin-2*) joue un rôle important dans la régulation de la lymphangiogenèse grâce à ses interactions avec le VEGFR3, augmentant l'affinité de son ligand, le VEGF-C (Olsson et al., 2006). Le VEGF-C et son récepteur jouent également un rôle dans l'initiation et la potentialisation de la néo-angiogenèse via la voie RhoA/ ROCK comme c'est le cas du VEGF-A.
- Quatre isoformes des facteurs de croissance placentaire (PlGF pour *Placental Growth Factors*) ont été décrites (Maglione et al., 1991). Contrairement au VEGF, qui se lie à la fois au récepteur VEGFR1 et 2, le PlGF se lie uniquement au VEGFR1 membranaire ou à sa forme soluble. Le PlGF-2 peut également se lier à NRP-1 et NRP-2. Le PlGF-1 et -3 sont des isoformes diffusibles, tandis que PlGF-2 et -4 ont des domaines de liaison à l'héparine (Yang et al., 2003). Le PlGF augmente l'expression de facteurs angiogéniques tels que le VEGF, le FGF-2, le PDGF- β et les MMPs, entre autres molécules. En outre, l'activation du VEGFR1 par PlGF induit une interférence moléculaire entre le VEGFR-1 et le VEGFR-2 qui amplifie la signalisation VEGF/VEGFR-2, suggérant que les EC améliorent leur propre sensibilité au VEGF en libérant du PlGF (Autiero et al., 2003). Cependant la surexpression de PlGF est connue pour favoriser la formation d'hétérodimères PlGF/VEGF au détriment des homodimères de VEGF et peut dans certaines conditions jouer un rôle plutôt anti-angiogénique en favorisant la désorganisation des vaisseaux (Eriksson et al., 2002).

III.3.2.2.1.2. Le FGF-2

La famille du facteur de croissance des fibroblastes (FGF) comprend 22 membres, dont 18 qui interagissent avec une forte affinité avec les 4 récepteurs associés de la tyrosine kinase FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3 et FGFR-4 (Turner et al., 2010). Les FGF sont des glycoprotéines sécrétées et séquestrées dans la MEC. Pour médier leur signalisation pro-angiogénique, les FGF sont libérés de la MEC par des héparinases, des protéases ou des protéines de liaison FGF spécifiques. Une fois libérées, elles se lient aux HSPG nécessaires à la stabilisation de l'interaction FGF-FGFR (Ornitz & Itoh, 2015). Au niveau tumoral, les FGF régulent un large spectre de fonctions biologiques telles que la prolifération cellulaire, la résistance à l'apoptose, la motilité, le potentiel invasif et métastatique ainsi que l'angiogenèse (Lugano et al., 2020).

Dans le domaine de l'angiogenèse, FGF-1 et FGF-2 (bFGF pour *basic* FGF), représentent les membres les mieux étudiés de la sous-famille canonique des FGF. Ils favorisent *in vitro* et *in vivo* un phénotype pro-angiogénique dans les EC (Presta et al., 2005).

Le FGF-2 est le médiateur pro-angiogénique le plus caractérisé (Compagni et al., 2000 ; Presta et al., 2005). Il exerce ses effets sur les EC via une signalisation autocrine ou paracrine médiée par le FGFR1 après avoir été libéré par les cellules tumorales et stromales ou mobilisé à partir de la MEC. Le FGF-2 favorise l'angiogenèse en agissant avec le VEGF et en induisant

la sécrétion de MMPs, d'activateur du plasminogène et de collagénase responsable de la dégradation et de l'organisation de la MEC (Ornitz & Itoh, 2015). Le FGF-2 module l'adhérence cellulaire en régulant l'expression de différentes intégrines comme $\alpha V\beta 3$ et modifie également les jonctions intercellulaires en remodelant l'organisation des jonctions adhérentes via PECAM-1, la VE-Cadhérine et la plakoglobine. Le FGF joue un rôle dans la modulation du métabolisme endothélial (dépendance à la glycolyse) induite par l'oncogène Myc, qui est crucial pour le bourgeonnement, la migration et la prolifération des TEC (Yu et al., 2017). Comme nous l'avons déjà évoqué, le FGF-2 est également un puissant facteur de stimulation des péricytes dans les tumeurs. L'activation de la voie de signalisation FGF/FGFR est associée à la résistance tumorale au traitement anti-angiogénique (Zhou et al., 2020).

III.3.2.2.1.3. Le HGF

Le facteur de croissance hépatocytaire (HGF) est une cytokine pléiotrope initialement synthétisée et sécrétée comme un précurseur monocaténaire biologiquement inactif (pro-HGF). Une fois sous sa forme active, le HGF se lie à son récepteur tyrosine kinase c-MET. Physiologiquement, le HGF et son récepteur jouent un rôle essentiel dans le développement embryonnaire, la morphogenèse des organes, la cicatrisation des plaies et la réparation tissulaire (Noriega-Guerra & Freitas, 2018). Les HSPG de surface cellulaire agissent comme des co-récepteurs ou présentateurs de signaux pour c-MET ; ils régulent non seulement la délivrance du HGF aux cellules cibles, mais contrôlent également la biodisponibilité du HGF en le séquestrant, comme c'est le cas de l'héparine. Un autre composant de l'ECM capable de séquestrer le HGF est la THBS-1, impliquée dans la régulation négative de l'angiogenèse (Margosio et al., 2003). Plus récemment, il a été montré que la voie de signalisation HGF/c-MET pouvait être affectée par ADAMTS-1 grâce à un mécanisme impliquant la dégradation de HGF par ADAMTS-1 ou sa séquestration par des motifs ADAMTS-1/THBS-1 (Noriega-Guerra et al., 2018). Comme nous l'avons mentionné précédemment, HGF contribue également au recrutement des péricytes. Ainsi, la voie de signalisation HGF/c-MET est associée à de nombreux processus impliqués dans l'angiogenèse, valant notamment à c-MET d'être décrit comme un marqueur du phénotype angiogénique sur les EC (Ding et al., 2003).

III.3.2.2.1.4. Le PDGF

La famille des facteurs de croissance dérivés des plaquettes ou PDGF pour *Platelet derived Growth Factor* est composée d'homodimères de quatre chaînes polypeptidiques PDGF-A, -B, -C et -D. les chaînes les plus classiques -A et -B peuvent s'hétérodimériser pour former du PDGF-AB. Les PDGF subissent une protéolyse pour devenir matures et actifs. Les chaînes classiques PDGF-A et PDGF-B subissent une activation protéolytique intracellulaire, tandis que les chaînes PDGF-C et PDGF-D subissent une activation extracellulaire pour générer des protéines actives. Notamment, la plasmine est capable d'activer à la fois PDGF-C et PDGF-D. Cependant, un clivage extracellulaire plus spécifique du PDGF-C et du PDGF-D se produit par

des sérine protéases ; le tPA active le PDGF-C, tandis que le PDGF-D est clivé par l'uPA et la matriptase (Folestad et al., 2018). Les différentes isoformes actives du PDGF exercent leurs effets biologiques par l'activation de leurs deux RTK, les PDGFR α et β .

Les PDGF sont des mitogènes majeurs pour un certain nombre de types cellulaires (Hellberg et al., 2010). Au cours du développement embryonnaire, les isoformes de PDGF sont nécessaires au développement, notamment à la vasculogénèse. L'hyperactivité du PDGF est retrouvée dans l'athérosclérose, dans les maladies fibrotiques ainsi que dans les tumeurs malignes. Le PDGF est couramment impliqué dans le recrutement paracrine des fibroblastes du stroma tumoral et peut réguler la motilité cellulaire, la prolifération ou encore l'angiogénèse (Ostman & Heldin 2007).

En réponse au VEGF, le PDGF-BB est sécrété par les EC, notamment au niveau des *tip cells*, pendant l'angiogénèse et facilite le recrutement des cellules murales, comme nous l'avons déjà évoqué. Un *knock-out* spécifique du PDGF-BB dans les EC abouti à un phénotype similaire à celui du *knock-out* du PDGFR β , indiquant que la signalisation paracrine entre l'endothélium et les péricytes est nécessaire dans le processus de recrutement de ces derniers (Bjarnegard et al., 2004).

Le PDGF-D se voit également impliqué dans le recrutement des péricytes (Liu et al., 2011a). Dans le cadre du cancer du sein, qui expriment des niveaux élevés de PDGF-D, il est admis que le PDGF-D contribue à la croissance tumorale via l'inhibition de l'apoptose, mais également à la dissémination métastatique (Xu et al., 2005). Il a été mis évidence que l'inhibition du PDGF-D enrayait la croissance cellulaire, l'angiogénèse, l'agressivité et l'EMT par la suppression de l'axe Notch1/Twist1 dans un modèle de carcinome rénal (Chen et al., 2017).

Le rôle critique du PDGF-C a été démontré grâce à l'augmentation de son expression dans les TEC (Clara et al., 2014 ; Crawford et al., 2009), où il favorise l'angiogénèse par l'activation de PDGFR $\alpha\alpha$ et PDGFR $\alpha\beta$ (Cao et al., 2002 ; Crawford et al., 2009). Une part importante de son activité angiogénique s'exerce via son effet sur les fibroblastes, mais également sur les macrophages (Anderberg et al., 2009). Une expression élevée de PDGFR α et PDGF-CC a été corrélée avec la présence de métastases ganglionnaires et une faible survie sans récurrence (Jansson et al., 2018).

III.3.2.2.2. Les inhibiteurs endogènes de l'angiogénèse

La régulation fine de l'angiogénèse passe notamment par la présence d'un certain nombre d'inhibiteurs endogènes, qui interfèrent avec les activités spécifiques des cellules endothéliales et par extension des cellules tumorales.

III.3.2.2.2.1. La thrombospondine-1

La thrombospondine-1 (THBS1) est capable de se lier à de nombreuses protéines. Notamment, la THBS1 est capable d'interagir avec CD47 et bloque la voie de transduction physiologique du NO, régulant de ce fait l'angiogenèse et la vasodilatation des vaisseaux (Isenberg et al., 2009 ; Maxhimer et al., 2009). La THBS-1 se lie avec une forte affinité à plusieurs facteurs angiogéniques se liant l'héparine, notamment le FGF-2 et le VEGF (Margosio et al., 2003), et inhibe leur action. Le THBS-1 se lie à la fois au VEGF libre et associé aux cellules (Gupta et al., 1999) et les complexes THBS/VEGF sont internalisés via LRP-1 (Greenaway et al., 2007), suggérant qu'il contribue à sa biodisponibilité dans le microenvironnement. La THBS-1, via son domaine N-terminal, est capable d'interagir avec les intégrines, notamment les intégrines $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 6\beta 1$, qui lui permettent de médier ses effets sur les EC (Calzada et al., 2004). En interagissant avec CD36 à la surface des EC, la THBS-1 engendre leur apoptose de manière dépendante de l'intégrine $\beta 1$ et du récepteur VEGFR2 (Rege et al., 2009 ; Zhang et al., 2009). Par le biais de l'intégrine $\beta 1$, THBS-1 induit la prolifération des péricytes tout en stimulant leur prolifération (Mirochnik et al., 2008). De plus, elle régule l'adhésion des péricytes aux EC via l'intégrine $\alpha V\beta 3$, favorisant la stabilisation des vaisseaux existants (Ketis et al., 1988).

III.3.2.2.2.2. Les TIMPs

Le rôle des MMPs est bien décrit en ce qui concerne leur rôle dans le développement tumoral, non seulement par la dégradation enzymatique de la MB et de la MEC, mais aussi par des interactions diverses avec des facteurs de croissance, des cytokines ou encore des récepteurs cellulaires, nécessaire à l'angiogenèse et l'invasion tumorale (Isaacson et al., 2017). La fonction des MMPs, est étroitement régulée à de nombreux niveaux, notamment par l'expression d'inhibiteurs endogènes, les TIMPs, comme décrit précédemment qui constitue une famille de 4 acteurs (Brew et al., 2000), capables de se lier et d'inhiber toutes les MMPs mais avec une efficacité variable en fonction du couple MMP/TIMP considéré (Arpino et al., 2015).

Activement impliqué dans la dégradation et le remodelage de la MEC, le TIMP-1 augmente significativement la production de sVEGFR1 par les EC. Il réduit ainsi la biodisponibilité du VEGF et l'angiogenèse ovarienne en condition physiologique (Bruegmann et al., 2009). Par ailleurs, les pré-adipocytes qui surexpriment le TIMP-1 contribuent à une diminution de la formation de vaisseaux sanguins *de novo* dans le tissu adipeux *in vivo* (Scroyen et al., 2010).

Le TIMP-2 est le seul membre de la famille des TIMPs qui inhibe directement la croissance des EC. Les premières études ont démontré que les EC pré-traitées avec du TIMP-2 exogène avant une stimulation par le bFGF perdaient leur potentiel prolifératif (Murphy et al., 1993), et ce par un mécanisme apparemment indépendant de l'inhibition des MMPs (Seo et al., 2003). Le mécanisme en jeu impliquerait une diminution de la phosphorylation et de

l'activation du FGFR1 et la translocation de SHP-1. Plus spécifiquement, ce mécanisme dépend de la liaison du TIMP-2 à l'intégrine $\alpha 3 \beta 1$ à la surface endothéliale. Des études complémentaires indiquent que le mécanisme fait intervenir l'inhibiteur de kinase dépendant de la cycline p27 dans les EC et la phosphorylation de pRb (Seo et al, 2006). Le TIMP-2 régule également la migration des EC via une inhibition de l'activité de la kinase Src, induisant une hausse de l'expression de RECK et une inhibition des MMPs (Oh et al., 2006). Un apport exogène de TIMP-2 dans le cadre du traitement du TNBC a supprimé la croissance tumorale primaire d'environ 36 à 50% et les métastases pulmonaires de plus de 92% (Peeney et al., 2020).

Contrairement aux autres TIMPs, après avoir été sécrété, le TIMP-3 se lie à la MEC notamment via les glycosaminoglycanes sulfatés ou est endocytosé par LRP-1 qui régule ses niveaux extracellulaires (Brew & Nagase, 2010). Notamment, l'ajout d'un antagoniste de LRP-1 entraîne une accumulation de TIMP-3 dans le milieu cellulaire (Troeberg et al., 2009). Il a été mis en évidence que la forme sheddée du récepteur LRP-1 augmentait la demi-vie du TIMP-3 et donc sa biodisponibilité dans l'espace extracellulaire (Scilabra et al., 2012). En outre, le TIMP-3 facilite la clairance de ses MMPs cibles en permettant la liaison d'un complexe TIMP-3/MMP à LRP-1, comme cela a été démontré pour la MMP-1, -13 et -14 (Carreca et al., 2020). Dans de nombreux cancers, il a été mis en évidence une hyperméthylation du promoteur de TIMP-3 intervenant dans l'inactivation de son gène, notamment dans le cancer du sein, le cancer colorectal, le cancer du poumon non à petites cellules, le carcinome thyroïdien, ou encore le glioblastome secondaire et méningiome (Rai & Baird, 2020), soutenant son rôle anti-tumoral. Parmi les TIMPs, TIMP-3 possède le plus large spectre d'enzymes substrats, car il est capable de s'associer et d'inhiber les proMMP-2 et -9 ainsi que les membres de la famille des ADAMs tels qu'ADAM10, ADAM12, ADAM17, ADAMTS-4 et ADAMTS-5 (Rai & Baird, 2020). Comme nous l'avons déjà évoqué, la MB constitue la première barrière pour les cellules cancéreuses dans le processus d'invasion. Le collagène IV peut être dégradé par la MMP-2 et -9, régulées à la hausse dans de nombreux types de tumeurs, dont l'expression est par la suite associée avec la présence de métastases. Une régulation à la hausse de TIMP-3 a été associée à une diminution des taux de MMP-2 et -9 dans plusieurs types de tumeurs et lignées cellulaires cancéreuses, notamment le cancer du sein (Kuskunović-Vlahovljak et al., 2017), constituant un mécanisme anti-métastatique crucial. Il a été démontré pour la première fois que le TIMP-3 inhibait l'angiogenèse dans la dystrophie du fond de Sorsby, un type de cécité causé par une mutation du gène TIMP-3 (BenEzra, 1997). Depuis, ses propriétés anti-angiogéniques émergent en tant qu'antagonisme compétitif de la liaison du VEGF au récepteur VEGFR2 sur les EC (Qi et al., 2003). Un court peptide de 16 acides aminés issus du domaine C-terminal de TIMP-3 s'avère inhiber les récepteurs au VEGF, FGF et PDGF *in vitro* dans les EC, les monocytes et les cellules cancéreuses du sein, indépendamment de sa fonction d'inhibition des MMPs (Chen et al., 2014). De plus, dans les EC, le TIMP-3 par son interaction avec le récepteur de type II à l'angiotensine II inhibe l'activité d'Akt et d'eNOS, l'expression du VEGF et plus largement l'angiogenèse en général (Kang et al., 2008). Dans le cadre du cancer du sein, l'expression du TIMP-3 est positivement corrélée avec la survie (Span et al., 2004).

III.3.2.2.2.3. Les Matrikines anti-angiogéniques

Matrikines	Origine	Taille (kDa)	Générée par	Effets <i>in vitro</i>	Effets <i>in vivo</i>
Angiostatine (O'Reilly et al., 1994)	Plasminogène	38	Plasmine MMPs Elastases	• Inhibe la prolifération des EC (Claesson-Welsh et al., 1998) • Perturbe la signalisation HGF/c-MET (Wajih & Sane, 2003)	• Inhibe la croissance tumorale <i>in vivo</i> (O'Reilly et al., 1994)
Endostatine (O'Reilly et al., 1997)	Collagène XVIII (NC α1)	20	Cathepsines L, B, K (Ferrerias et al., 2000)	• Induit l'apoptose des EC (Dhanabal et al., 1999) • Bloque de la signalisation du VEGF en interagissant avec le VEGFR1 (Kim et al., 2002)	• Inhibe l'angiogenèse et la croissance tumorale <i>in vivo</i> (O'Reilly et al., 1996 ; Indraccolo et al., 2002 ; Walia et al., 2015)
Restine (62% homologie avec endostatine) (Ramchandran et al., 1999)	Collagène XV (NC α1)	22		• Inhibe la migration des EC (Ramchandran et al., 1999 ; John et al., 2005)	• Inhibe l'angiogenèse tumorale <i>in vivo</i> (Xu et al., 2002) • Inhibe l'EMT et les métastases tumorales dans des modèles de cancer mammaire en contrôlant l'expression du suppresseur de métastases tumorales mir-200a/b (Lu et al., 2015)
Arresten (Colorado et al., 2000)	Collagène IV (NC α1)	26	Cathepsine S (Sugiyama et al., 2019) MMP-14, MMP-15 (Rebustini et al., 2009)	• Inhibe la prolifération des EC induites par le bFGF • Inhibe formation de structures tubulaires <i>in vitro</i> • Induit l'apoptose des EC (diminution de Bcl-2 et Bcl-xL) (Nyberg et al., 2008 ; Boosani et al., 2009).	• Inhibe l'angiogenèse tumorale <i>in vivo</i> (Nyberg et al., 2008)
Canstatine (Kamphaus et al., 2000) Potentiel anti-angiogénique plus élevé que l'angiostatine (Magnon et al., 2005)	Collagène IV (NC α2)	24	Cathepsine S (Sugiyama et al., 2019) MMP-14, MMP-15 (Rebustini et al., 2009)	• Induit l'apoptose des EC (Liaison aux intégrines αvβ3 et αvβ5 qui initient la mort cellulaire via l'activation des pro-caspases 8 et 9) (Panka & Mier, 2003 ; Magnon et al., 2005) • Induit l'apoptose des cellules tumorales par ce même mécanisme. • Inhibe l'angiogenèse et la lymphangiogenèse induites par Ang-1 (Wang et al., 2011)	• Inhibe la croissance tumorale <i>in vivo</i> (Indraccolo et al., 2002)
Tumstatine (Maeshima et al., 2000)	Collagène IV (NC α3)	28	MMP-9 (Hamano et al., 2003)	• Inhibe la prolifération des EC <i>in vitro</i> (Inhibition de la voie PI3K/Akt/mTOR) (Maeshima et al., 2001 ; Maeshima, 2002). • Inhibe formation de structures tubulaires <i>in vitro</i> (Maeshima et al., 2001)	• Inhibe la croissance tumorale <i>in vivo</i> (Maeshima et al., 2001 ; Goto et al., 2008)
Endorepelline (Mongiat et al., 2003) Fragment actif LG3 (Matricryptine)	Perlecan	23	BMP (Gonzalez et al., 2005) ; Cathepsine L (Cailhier et al., 2008)	• Inhibe la migration des EC, leur morphogenèse et perturbe l'adhésion cellulaire lors de la formation de pseudotubes <i>in vitro</i> (Boosani & Sudhakar, 2011) - Via une interaction spécifique avec l'intégrine α2β1 dont le médiateur semble être SHP1 (Woodall et al., 2008)	• Inhibe l'angiogenèse <i>in vivo</i> (Boosani & Sudhakar, 2011)

Tableau 10 : Les matrikines anti-angiogéniques.

III.3.2.2.3. Les voies de signalisation orchestrant la régulation complexe de l'angiogenèse

En plus des voies de signalisation médiées par les facteurs de croissance pro-angiogéniques et les différents inhibiteurs endogènes précédemment cités, nous pouvons citer différentes voies impliquées à différents degrés dans la régulation fine de l'angiogenèse.

III.3.2.2.3.1. Le système Angiopoïétines/Tie2

L'angiopoïétine 1 (Ang-1) est un facteur de stabilisation vasculaire exprimé par les VSMC et les cellules non vasculaires normales et tumorales, tandis que l'angiopoïétine 2 (Ang-2) est principalement produite par les EC lors du remodelage vasculaire. Les deux angiopoïétines ont la capacité de se lier au RTK Tie2 avec des affinités identiques, mais elles agissent comme des molécules antagonistes :

L'activation de Tie2 médiée par Ang-1 entraîne des signaux de survie pour les EC via la voie AKT/survivine et permet la maturation des vaisseaux ainsi que le maintien de l'intégrité vasculaire.

En revanche, Ang-2 agit comme agoniste partiel de Tie2, c'est-à-dire qu'il inhibe la signalisation Tie2 en présence d'Ang1 mais l'active faiblement en son absence (Yuan et al., 2009). Ainsi, Ang-2 entre en compétition pour la liaison à Tie2 et provoque une régression des vaisseaux en l'absence de facteurs angiogéniques, alors qu'elle potentialise l'angiogenèse en présence de VEGF (Fukuhara et al., 2010). Ang-2 est produit, stocké et libéré lors de la stimulation des EC, agissant ainsi comme un régulateur autocrine de signalisation Ang/Tie2 (Fiedler et al., 2004).

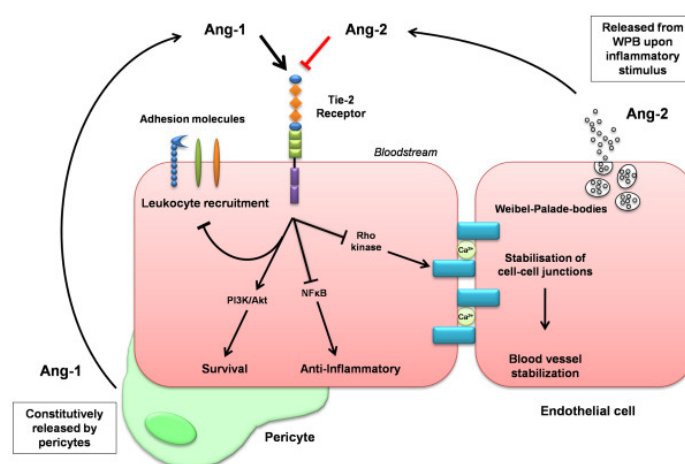


Figure 51 : Modèle schématique du système ligand-récepteur angiopoïétine-Tie2. (WPB, organisme Weibel-Palade). D'après Van Meurs et al., 2009.

Les EC au repos sont attachées aux péricytes qui produisent et sécrètent constitutivement Ang-1, qui interagit avec Tie2. Le système Ang1/Tie-2 intervient dans la phase de maturation des néo-vaisseaux en augmentant l'expression du récepteur Tie-2 dans les cellules tout en renforçant les contacts cellulaires (Elbanna et al., 2020). La liaison du ligand au domaine extracellulaire de Tie2 entraîne la dimérisation du récepteur, l'autophosphorylation, l'amarrage des adaptateurs et le couplage aux voies de signalisation intracellulaires. L'activation de Tie2 inhibe également l'expression dépendante de NF- κ B de gènes inflammatoires, tels que ceux codant pour des molécules d'adhésion luminale (par exemple, molécule d'adhésion intercellulaire-1, molécule d'adhésion de cellules vasculaires-1 et E-sélectine) (Fig. 51) (Van Meurs et al., 2009).

Lors de la phase d'activation de l'angiogenèse, l'Ang-2 agit comme un antagoniste de l'Ang-1, inhibe la signalisation Tie2, sensibilise l'endothélium aux médiateurs inflammatoires et facilite l'angiogenèse induite par le VEGF (Van Meurs et al., 2009). En effet, une expression accrue d'Ang-2 a pu être observée dans les cellules endothéliales activées pendant l'inflammation (où l'Ang-2 est stocké et rapidement libéré des WPB de manière autocrine et paracrine) et dans les vaisseaux tumoraux de plusieurs cancers humains en réponse à l'hypoxie et au VEGF (Shim et al., 2007). La perturbation médiée par Ang-2 de la signalisation protectrice Ang-1/Tie2 provoque le désassemblage des jonctions cellule-cellule via la voie Rho kinase, induisant le décollement des péricytes ou des cellules murales et accroît le relâchement de la matrice cellulaire (Fig. 51). Une expression élevée du gène Ang-2 associée à son récepteur Tie2 s'est vu négativement corrélée avec la survie globale dans le cadre du cancer du sein. Alors que le VEGF-A seul n'était pas associé à un changement dans la survie globale, une forte co-expression avec l'Ang-2 s'est vu associée à une diminution significative de la survie globale chez les patientes (Ramanathan et al., 2017). Ces résultats suggèrent que la voie de l'angiopoïétine agit comme un médiateur clé dans le switch angiogénique pathologique du cancer du sein. En utilisant un modèle de métastases cérébrales du cancer du sein (induites par des injections intracardiaques de cellules MDA-MB-231-Br ou 4T1-Br), une étude a mis évidence que l'inhibition thérapeutique combinée du VEGF et de l'Ang-2 réduisait perméabilité des lésions et la charge métastatique cérébrale face à l'utilisation du bevacizumab. (Bohn et al., 2017). Un co-ciblage du VEGFR-2 et de l'Ang-2 s'est également montré efficace pour améliorer significativement la survie dans le cadre d'un modèle préclinique de gliome, pour altérer la croissance tumorale, induire et maintenir la normalisation vasculaire et bloquer le recrutement des macrophages (Peterson et al., 2016). Des études précliniques réalisées sur des modèles de cancer colorectal, de cancer du sein et de mélanome ont montré que l'inhibition de l'Ang-2 entraînait une réduction des vaisseaux sanguins, une augmentation de la couverture péricytaire, une stabilisation des vaisseaux sanguins et une modification de l'activation de la voie liée à l'EMT (Keskin et al., 2015 ; Mazzieri et al., 2011).

Les protéines de la famille du TGF- β (*Transforming Growth Factor beta*) sont aujourd'hui l'objet d'un intérêt considérable. C'est qu'elles comportent de nombreux facteurs pléiotropes jouant un rôle essentiel au cours du développement, dans la régulation normale ou pathologique de la croissance et de la différenciation cellulaire, ainsi que dans les processus de fibrose. Le rôle de la signalisation du TGF- β dans la carcinogenèse, bien que complexe, constitue l'une des voies les plus importantes dans le microenvironnement tumoral. De nombreux types de cellules ont la capacité de répondre au TGF- β .

Cependant, le TGF β joue rôle bivalent dans la carcinogenèse. Dans les phases précoces, il agit comme un suppresseur de tumeur en activant l'arrêt de la croissance et l'apoptose. Cependant, dans les tumeurs avancées, les cellules cancéreuses échappent aux effets suppresseurs initiaux du TGF- β et utilisent ses fonctions de régulation pour favoriser leur progression tumorale. Dès lors, la signalisation du TGF- β régule l'initiation et la progression de la tumeur. Elle soutient l'EMT, l'invasion des cellules cancéreuses, l'inhibition de la réponse immunitaire, l'angiogenèse et la formation de niches pré-métastatique. L'expression du TGF- β est ainsi corrélée à un mauvais pronostic (Goulet & Pouliot, 2021).

La superfamille de TGF- β comprend 33 membres répartis en sous-familles de TGF- β et de protéine morphogénétique osseuse (BMP). La sous-famille du TGF- β comprend les TGF- β , les activines, les facteurs nodaux, la myostatine et de différenciation de croissance (GDF) tandis que la sous-famille BMP comprend les BMP, plusieurs GDF et l'hormone anti-mullérienne.

La sous-famille du TGF- β

Trois isoformes sécrétées différentes de TGF- β ont été identifiées chez les mammifères : TGF- β 1, - β 2 et - β 3. L'isoforme la plus abondante est le TGF- β 1, une protéine ubiquitaire de 44 kDa. Le TGF- β est sécrété sous une forme latente, appelée LTGF- β (*Latent Transforming Growth Factor β*). Pour assurer ses fonctions biologiques, le TGF- β doit être libéré de son peptide associé à la latence (LAP), un processus étroitement régulé par plusieurs mécanismes, dont la protéolyse enzymatique, les interactions allostériques et la dissociation mécanique. A titre d'exemple, les protéases à serine extracellulaires, telles que la plasmine, la cathepsine D et les MMPs, libèrent le TGF- β actif de sa forme latente. La THBS-1 est également, capable de lier une séquence conservée contenue dans LAP, interrompant les interactions LAP-TGF β pour exposer les sites de liaison aux récepteurs (Murphy-Ullrich & Suto, 2018). Le mécanisme le plus détaillé concerne l'activation du TGF- β par des tensions mécaniques, il s'agit d'un processus aigu lié aux forces contractiles engendrées par le remodelage de l'ECM (Klingberg et al., 2014). Par ailleurs, la liaison entre l'intégrine α V et la séquence RGD du protodomaine du TGF- β 1 et - β 3 entraîne une tension capable d'induire le dépliement de LAP et la libération de TGF- β actif (Shi et al., 2011).

Une fois activé, le TGF- β induit une signalisation impliquant des récepteurs de surface regroupant les sept récepteurs transmembranaires de type sérine/thréonine kinase de type I (T β R-I) et cinq de type II (T β R-II), également appelés récepteur d'activine de type kinase (ALK). Les différents TGF- β sont caractérisés par des affinités de liaison différentes au T β R-II. Par exemple, le TGF- β 2 se lie au T β RII 100 à 1000 fois plus faiblement que le TGF- β 1 et le TGF- β 3 (Baardsnes et al., 2009).

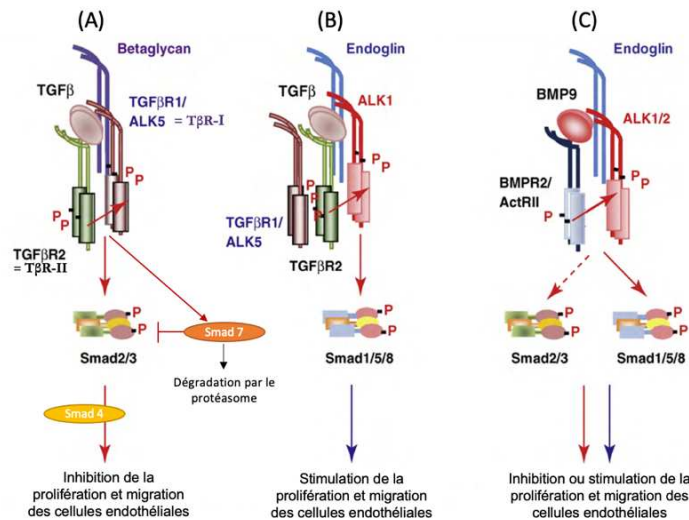


Figure 52 : La signalisation du TGF- β (et BMP9) dans les cellules endothéliales. ALK, activin receptor-like kinase; TGF- β , transforming growth factor β ; TGFBR, TGF β receptor. Adapté d'après Pardali et al., 2010.

La voie du TGF- β est une voie hautement conservée. La transduction du signal implique des voies de signalisation canoniques (dépendant de SMAD) (Fig. 52) ou non canoniques (indépendantes de SMAD). Les membres de la famille TGF- β déclenchent leurs effets cellulaires en provoquant la formation de complexes hétérotétramériques via leurs récepteurs transmembranaires type I et de type II. La plupart des signaux médiés par les TGF- β se font via les récepteurs TGF β R1/ALK5 (T β R-I) et TGF β R2 (T β R-II). Il existe deux récepteurs accessoires - l'endogline et le bétaglycane - qui régulent les interactions ligand-récepteur (Pardali et al., 2010). La famille des SMAD médiant la voie canonique du TGF-, est composée de trois groupes fonctionnels différents : i) les R-SMAD (régulateurs) comprenant SMAD1, 2, 3, 5 et 8, ii) les co-SMAD (co-stimulateurs) composé de SMAD4 et, iii) les I-SMAD (inhibiteurs) comprenant SMAD6 et 7. Une fois actif, le T β R-I phosphoryle SMAD2/3, permettant le recrutement de SMAD4. Grâce à SMAD4, le complexe SMAD2/3/4 se transloque dans le noyau où il agit comme un facteur de transcription pour activer ou réprimer des centaines de gènes cibles impliqués dans l'étendue des activités du TGF- β (Lamouille et al., 2014). Les interactions entre les co-stimulateurs et les inhibiteurs déterminent l'effet transcriptionnel. En effet, les I-SMAD sont impliqués dans la régulation de la signalisation du TGF- β en inhibant de manière compétitive la liaison de SMAD4 au R-SMAD ou en entraînant à sa dégradation par le protéasome (Kavsak et al., 2000). Les BMP sont également capable d'induire cette signalisation.

La voie non canonique joue un rôle important dans la migration, la prolifération et l'invasion cellulaires, la synthèse des protéines ECM, l'apoptose ou encore la différenciation cellulaire (Goulet & Pouliot, 2021). Cette signalisation implique les voies PI3K/Akt, ERK ou encore celle des Rho GTPases. La surexpression compensatoire du TGF- β , rapportée dans presque tous les cancers solides, s'accompagne d'une perte de sensibilité au TGF- β et se trouve corrélée avec le grade des tumeurs, leur capacité invasive et associée à un pronostic plus sombre pour le patient (Hasegawa et al., 2001). La voie de signalisation du TGF- β par l'intermédiaire de SMAD régule à la hausse les facteurs de transcription Snail, Slug, Twist et Id2 impliqués dans l'EMT (Tsubakihara et al., 2018), qui entraînent la dissolution des complexes de jonctions cellulaires. Le TGF- β favorise le détachement des cellules cancéreuses de la tumeur primaire et leur dissémination via de multiples voies de signalisation, notamment par activation d'ADAM17, la modulation de la paxilline via son interaction avec la phosphatase PP-1 ou encore l'activation de la voie de signalisation ERK/MAPK. Dans un mécanisme distinct, les protubérances lamellipodes, produites par les cellules mobiles, sont gérées par la famille des Rho GTPases, elles-mêmes coordonnées par le TGF- β (Ungefroren et al., 2018). En plus d'être impliqué dans l'EMT, le TGF- β contribue au remodelage de la MEC en augmentant l'expression des MMPs (notamment la MMP-2 et la MMP-9 (Moore-Smith & Pasche, 2011)) et de la plasmine, créant un environnement permissif à l'évasion des cellules cancéreuses (Kessenbrock et al., 2010). La dégradation de la MEC contribue, à son tour, à la libération de TGF- β séquestré et à son activation via des protéases environnantes, créant une boucle de régulation positive (Costanza et al., 2017). Par ailleurs, il a été démontré que le TGF- β induisait l'expression de l'angiopoïétine like 4 (ANGPTL4) dans les cellules tumorales ; cette cytokine, connue pour perturber les jonctions des EC, augmente la perméabilité des capillaires et facilite ainsi la migration transendothéliale des cellules tumorales (Pradua et al., 2008). Il a été décrit dans de nombreux cancers que la signalisation TGF- β était essentielle pour la formation de métastases (Goulet & Pouliot, 2021).

III.3.2.2.3.3. La voie de l'éphrine/Eph

Les récepteurs du carcinome hépatocellulaire humain producteurs d'érythroprotéines (ou récepteur Eph) constituent une sous-famille de 14 RTK. Ces récepteurs participent à de nombreux processus physiologiques et pathologiques avec un rôle important, bien que non complètement élucidé, dans la progression tumorale.

Les récepteurs Eph sont divisées en deux sous-groupes : les Eph-A(1-8 ;10) et les Eph-B(1-4 ;6). Contrairement aux autres RTK dont les ligands sont des protéines solubles, les protéines interagissant avec les récepteurs Eph sont associées à la membrane plasmique des cellules qui les expriment. Parmi elles, on retrouve les éphrines-A (1-6) et les éphrines-B (1-3) (Lisle et al., 2013), dont les effets médiés via leurs récepteurs contribuent à l'activité du cytosquelette, l'adhésion cellulaire, la connexion intercellulaire, la morphologie cellulaire ainsi que la motilité cellulaire. Une caractéristique unique du système éphrines/Eph est sa capacité à médier des signaux bidirectionnels entre cellules adjacentes (Kullander & Klein, 2002).

Le système éphrines/Eph est un des systèmes indispensables pour l'angiogenèse et la lymphangiogenèse. Il est impliqué dans le processus de maturation des vaisseaux en veines ou artères. L'Eph-B2 est présente dans les artères, tandis que l'Eph-B4 entraîne la formation de vaisseaux veineux. Si l'une d'entre elles vient à manquer, un trouble du processus de différenciation se produit (Rudno-Rudzińska et al., 2017).

À l'appui d'un effet sur le système vasculaire, il a été mis en évidence dans un modèle de cancer mammaire que le domaine extracellulaire de l'Eph-B4 attirait les EC *in vitro* et stimulait leurs capacités d'invasion, de survie et de prolifération (Noren et al., 2004). Ces résultats et d'autres soutiennent un modèle dans lequel l'Eph-B4 favorise la croissance tumorale en stimulant l'angiogenèse par l'éphrine-B2, de manière dépendante du VEGF (Martiny-Baron et al., 2010). Il a été démontré que l'éphrine-B2 était responsable du processus d'internalisation du VEGFR3 et 2, contrôlant le processus de lymphangiogenèse et d'angiogenèse au cours des processus pathologiques (Wang et al., 2010).

De manière similaire, la signalisation liée à l'Eph-A2 médiée par son ligand l'éphrine-A1 stimule l'angiogenèse dépendante du VEGF. Le blocage de la voie de signalisation médiée par l'Eph-A2 entraînait l'arrêt de la progression tumorale de concert avec l'inhibition de la néoangiogenèse (Merritt et al., 2010). Certaines études ont prouvé qu'une surexpression de l'Eph-A2 était impliquée dans l'EMT par sa liaison à la E-Cadhérine et que son expression était corrélée, via la voie de signalisation FAK, aux niveaux de MMP-2 (Li et al., 2014). Par ailleurs, il a été montré que l'hypoxie conduisait à une surexpression de l'éphrine-A1 dans les cellules de l'endothélium (Yamashita et al., 2008). La signalisation éphrine-A1/Eph-A2 est ainsi associée à un mauvais pronostic (Shao et al., 2008 ; Wykosky & Debinski, 2008).

III.3.2.2.3.3.1. Les interleukines

Les interleukines (IL) constituent une famille de cytokines sécrétées par les leucocytes et les macrophages, impliquées dans la signalisation cellulaire, servant principalement de modulateurs des réponses immunitaires. Il est largement admis que la réponse immunitaire inflammatoire chronique favorise la croissance et l'invasion tumorale. Cependant les cellules immunitaires, résidentes ou recrutées, dans le milieu inflammatoire peuvent avoir des effets assez contrastés au cours du développement tumoral. En effet, les interactions des interleukines avec leurs récepteurs sur les EC sont capables de moduler l'angiogenèse et exercer des activités à la fois pro- et anti-angiogéniques (Ribatti, 2019), en voici quelques exemples (Tab. 11).

Les interleukines			
PRO-ANGIOGENIQUES		ANTI-ANGIOGENIQUES	
IL-1	• Activité angiogénique médiée par le VEGF • Stimule la croissance tumorale, l'angiogenèse ainsi que le potentiel métastatique (Voronov et al., 2014) • IL-1α stimule la sécrétion de l'IL-8 et l'expression de protéines favorisant la migration transendothéliale des cellules inflammatoires telles que CXCL1, VCAM-1 ou encore ICAM-1 (Thornton et al., 2010)	IL-12	• Induit l'expression de l'IFN-γ, sa chimiokine anti-angiogénique IP10, le CXCL-4, l'IFN-α et le TIMP-2 (Dias et al., 1998, Airolidi et al., 2008) • Diminue l'expression du VEGF, du bFGF de l'IL-1β, de l'IL-6, de l'IL-8, de CXCL-6, du TIMP-1 et d'Ang-2 (Dias et al. 1998 ; Duda et al., 2000 ; Ferretti et al., 2010 ; Airolidi et al., 2008)
IL-6	• Induit l'angiogenèse via l'expression du VEGF et du FGF (Fisher et al., 2014) • Induit une couverture péricytaire défectueuse des vaisseaux sanguins nouvellement formés médiée par Jagged1 et l'Ang-2 (Gopinathan et al., 2015)	IL-17F	• Inhibe l'expression du VEGF, de l'IL-6 et de l'IL-8 (Xie et al., 2010 ; Tong et al., 2012)
IL-8	• Expression concomitante de l'IL-6 et l'IL-8 nécessaire à la croissance tumorale <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> (Hartman et al., 2013) • IL-8/CXCR-2 stimule la survie et la prolifération des EC ainsi que la production des métalloprotéinases, promouvant ainsi l'angiogenèse (Li et al., 2003)	IL-18	• Induit l'expression de l'IFN-γ • Diminue la migration des EC induite par le VEGF (Kim et al., 2007) • Propriétés anti-angiogénique <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> (Cao et al., 1999)
IL-17	• Induit la libération d'IL-8 et d'IL-6 au sein des tumeurs et favorise la croissance tumorale par l'IL-6 (Kehlen et al., 1999)	IL-27	• Diminue l'expression de molécules angiogéniques, telles qu'Ang-1 et Ang-2, les TGF-β1 et -β2, le VEGF-A, -C et -D • Induit l'expression de molécules angiostatiques : CXCL-9 et CXCL-10 (Cocco et al., 2010) • Inhibe la prolifération et l'activité angiogénique des cellules cancéreuses <i>in vivo</i> (Di Carlo et al., 2014)

Tableau 11 : Les interleukines pro et anti-angiogéniques.

IV. LRP-1 (*Low-density lipoprotein receptor-related protein 1*)

Le récepteur LRP-1 (*Low-Density Lipoprotein Receptor-related Protein-1*), également connu sous les noms d'A2MR (*alpha-2-macroglobulin receptor*), d'ApoER (*apolipoprotein E receptor*) et de CD91 (*cluster of differentiation 91*), est un récepteur transmembranaire polyvalent, exprimé de manière ubiquitaire par de nombreux types cellulaires (hépatocytes, cellules musculaires lisses, neurones, cellules gliales, glioblastome, etc...) (Moestrup et al., 1992). Ce récepteur est impliqué dans le développement embryonnaire et dans l'homéostasie plasmatique des tissus adultes. Décrit pour la première fois en 1988 par Herz et al., le récepteur LRP-1, appartient à la famille des récepteurs aux LDL (*Low-Density Lipoprotein*) (LDLR) (Herz et al., 1988).

La famille des LDLR comprend 14 récepteurs transmembranaires simples partageant une homologie structurelle (par exemple, des répétitions de type complément riches en cystéine). Ils possèdent également des répétitions communes impliqués dans la reconnaissance spécifique des ligands extracellulaires, le repliement des protéines, ou encore le trafic lysosomal. De même, leur courte queue intracellulaire englobe des motifs communs permettant le recrutement d'échafaudages nécessaire à la machinerie endocytaire et à la signalisation intracellulaire. Le LDLR fut le premier à être identifié comme un facteur étiologique fréquemment muté de l'hypercholestérolémie familiale (Brown & Goldstein, 1986 ; Goldstein & Brown, 2001). La fonction essentielle du récepteur LDLR est de contribuer à l'endocytose des lipoprotéines riches en cholestérol. Par la suite, les fonctions des LDLR ont été étendues à de nombreux contextes physiopathologiques tels que l'intégrité vasculaire, la neurobiologie et le développement du cancer en raison de leur capacité particulière à contrôler la compartimentation membranaire des récepteurs et la clairance de diverses classes de ligands extracellulaires (Li et al., 2000).

LRP-1 a été le deuxième membre de la famille des LDLR à être cloné (Herz et al., 1988). Les premières preuves du caractère multifonctionnel de LRP-1 apparaissent lorsque son interaction avec l'antiprotéase alpha-2-macroglobulin est mise en évidence (Strickland et al., 1990). Actuellement, LRP-1 est capable de lier et d'endocyter plus de 50 ligands (Tab. 12), tels que des lipoprotéines, des protéines de la MEC, des protéases et des complexes protéase/inhibiteur ainsi que des facteurs de croissance. Ses interactions avec d'autres récepteurs membranaires ainsi que de nombreux adaptateurs intracellulaires ou protéines d'échafaudage l'impliquent dans de nombreux processus cellulaires telles que la migration cellulaire, la survie, la prolifération et la (trans) différenciation (Lillis et al., 2008a ; Dedieu et al., 2008a ; Wujak et al., 2016). LRP-1 régule de nombreuses voies de signalisation, comme celles des MAPK, AKT, ERK, JNK ou encore celle de l'insuline.

Compte tenu de son large éventail d'interactions et d'activités, l'expression et les fonctions de LRP-1 sont étroitement contrôlées temporellement et spatialement. La délétion du gène LRP-1 dans des souris est létale dès les premiers jours du développement embryonnaire,

confirmant l'importance de ce récepteur lors de l'embryogenèse et soulignant l'incapacité des autres membres de la famille des récepteurs aux LDL à compenser cette invalidation

NOM		Références
A2M	A2-Macroglobuline	Trommsdorff et al., 1998 ; Lillis et al., 2005
Angiotensine 1-7		Gonzalez-Villalobos et al., 2006
Angiotensine II		Gonzalez-Villalobos et al., 2006
APOB	Apolipoprotéine B	Stefansson et al., 1995
APOE	Apolipoprotéine E	Trommsdorff et al., 1998 ; Willnow, 1999 ; Lillis et al., 2005
APOH	Apolipoprotéine H	Moestrup & Verroust, 2001
APOM	Apolipoprotéine M	Faber et al., 2006
APP	β -amyloid precursor protein	Lillis et al., 2005 ; Trommsdorff et al., 1998
Aprotinine		Moestrup & Verroust, 2001 ; Lillis et al., 2005
BMP4	Bone Morphogenetic Protein 4	Spoelgen et al., 2005
C1s/C1q INH	Inhibiteur de C1s/C1q	Lillis et al., 2005
CALR	Calréticuline	Lillis et al., 2005
CD44		Etique et al., 2013
Chylomicron		Lillis et al., 2005
CLU	Clusterin	Tian et al., 2019
Complément C3		Lillis et al., 2005
CST3	Cystatin C	Kaseda et al., 2007
CTGF (ou CCN2)	Connective tissue growth factor	Lillis et al., 2005
CTSB	Cathepsin B	Nielsen et al., 2007
DAB1	Disabled-1	Gotthardt et al., 2000
DLG4 (ou SAP-90)	Discs Large MAGUK Scaffold Protein 4 (synapse-associated protein 90)	Gotthardt et al., 2000
EGF	Epidermal Growth Factor	Orlando et al., 1998
Elastase		Lillis et al., 2005
Facteur IXa, facteur VIIa		Lillis et al., 2005
Fibronectine		Lillis et al., 2005
Fz-1	Frizzeld-1	Zilberberg et al., 2004
GIPC1	GIPC PDZ Domain Containing Family Member 1	Gotthardt et al., 2000
Heat shock proteins: Gp96; Hsp70; Hsp90; eHsp90 α		Basu et al., 2001 ; Li et al., 2002 ; Tian et al., 2019
Héparine cofacteur II		Lillis et al., 2005
HIV-Tat protein		Lillis et al., 2005
Htra1	HtrA serine peptidase 1	Maratoglu et al., 2013
IGFBP-3	Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3	Huang et al., 2003
IGFBP-8	Insulin-like Growth Factor Binding Protein-8	Maratoglu et al., 2013
Inhibiteur de protéine C		Lillis et al., 2005
Insuline		Orlando et al., 1998
ITGB1BP1	Integrin Subunit Beta 1 Binding Protein 1	Gotthardt et al., 2000
Lactoferrine		Lillis et al., 2005
Leptine		Dietrich et al., 2008
LGALS9	Galectin 9	Huttlin et al., 2017
LOXL2	Lysyl Oxidase Like 2	Huttlin et al., 2017
LPL	Lipoproteine Lipase	Lillis et al., 2005
MAPK8IP1	Mitogen-Activated Protein Kinase 8 Interacting Protein 1	Gotthardt et al., 2000
MAPK8IP2	Mitogen-Activated Protein Kinase 8 Interacting Protein 2	Gotthardt et al., 2000
Midkine		Lillis et al., 2005
MMP-13	Matrix Metalloproteinase 13	Etique et al., 2013
MMP-14	Matrix metalloproteinase-14	Rozanov et al., 2004
MMP-2	Matrix Metalloproteinase 2	Etique et al., 2013

MMP-9	<i>Matrix Metallopeptidase 9</i>	Lillis et al., 2005 ; Etique et al., 2013
Neuroserpine		Lillis et al., 2005
Nexine-1		Lillis et al., 2005
NOS1AP	<i>Nitric Oxide Synthase 1 Adaptor Protein</i>	Gotthardt et al., 2000
PAI-1 (SERPINE1)	Plasminogen Activator Inhibitor, type I	Orth et al., 1992 ; Etique et al., 2013
PAI-2 (SERPINE2)	Plasminogen Activator Inhibitor, type II	Etique et al., 2013
PARP-1	poly(ADP-ribose) polymérase 1	Mao et al., 2016
PDGF	Platelet-derived growth factor	Lillis et al., 2005 ; Loukinova et al., 2002
PLAT	<i>Plasminogen Activator, Tissue Type</i>	Orth et al., 1992
PLAUR	<i>Plasminogen Activator, Urokinase Receptor</i>	Czekay et al., 2001
PLG	Plasminogen	Kanagas & Makker, 1993
RAP	Receptor Associated Protein	Lillis et al., 2005
SHC1	<i>SHC Adaptor Protein 1</i>	Barnes et al., 2003
SYNJ2BP	<i>Synaptojanin 2 Binding Protein</i>	Gotthardt et al., 2000
TFPI	<i>Tissue factor pathway inhibitor</i>	Lillis et al., 2005
TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i>	Huang et al., 2003 ; Lillis et al., 2005
THBS1	<i>Thrombospondin 1</i>	Lillis et al., 2005
THBS2	<i>Thrombospondin 2</i>	Lillis et al., 2005
Thrombine		Lillis et al., 2005
TIMP1	<i>TIMP Metallopeptidase Inhibitor 1</i>	Etique et al., 2013
TIMP2	<i>TIMP Metallopeptidase Inhibitor 2</i>	Etique et al., 2013
TIMP3	<i>TIMP Metallopeptidase Inhibitor 3</i>	Etique et al., 2013 ; Scilabra et al., 2018
tPA	<i>Tissue plasminogen activator</i>	Lillis et al., 2005 ; Etique et al., 2013
Triglycérade lipase hépatique		Lillis et al., 2005
uPA	<i>Urokinase-type plasminogen activator</i>	Lillis et al., 2005 ; Etique et al., 2013
VLDL	<i>Very low-density lipoprotein</i>	Lillis et al., 2005

Tableau 12 : Liste non exhaustive de ligands de LRP-1. En bleu les protéines intracellulaires, en vert les protéines membranaires et en noir les protéines extracellulaires.

IV.1. La structure et la distribution du récepteur LRP-1

IV.1.1. Structure du récepteur LRP-1

LRP-1 est une protéine transmembranaire glycosylée de haut poids moléculaire (600 kDa). Le gène *LRP1* code pour une protéine précurseur qui se lie à la protéine associée au récepteur (RAP), une protéine chaperonne empêchant sa liaison à d'autres ligands et assurant son bon repliement dans le réticulum endoplasmique. Les trois domaines de RAP sont indépendants et n'interagissent pas mais sont connectés par des boucles flexibles qui permettent l'adoption de conformations variées (Lillis et al., 2008). RAP dirige le précurseur LRP-1 vers l'appareil de Golgi grâce au motif NPxY proximal de son domaine intracellulaire. Au sein du réseau trans-Golgi, la diminution du pH provoque la protonation des résidus histidine dans le domaine 3 de RAP, déclenchant ainsi sa dissociation du précurseur LRP-1. Par action d'une furine-convertase, LRP-1 subit un clivage intracellulaire résultant en deux sous-unités α et β liées de manière non-covalente adressées et intégrées à la membrane plasmique. Ainsi, le récepteur mature comporte une chaîne α extracellulaire de 515 kDa, et une chaîne β de 85 kDa comprenant une partie extracellulaire de 55kDa, un domaine transmembranaire unique ainsi qu'un domaine intra-cytoplasmique (ICD) de 100 acides aminés (Lillis et al., 2008 ; Auderset et al., 2016) (Fig. 53)

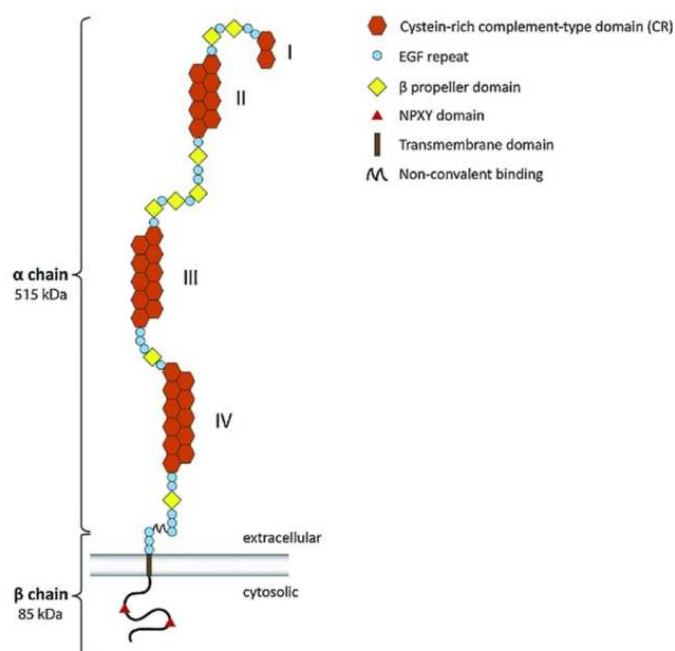


Figure 53 : Structure du récepteur LRP-1 mature. D'après Emonard et al., 2014.

IV.1.1.1. La chaîne α extracellulaire

La chaîne α permet l'interaction avec différents ligands présents dans le microenvironnement et contrôle ainsi de nombreuses fonctions associées. Les interactions des ligands avec la chaîne α de LRP-1 se font majoritairement au niveau de répétitions de type « complément riche en cystéines » (CR) également appelés « domaines de liaison aux ligands ». LRP-1 en contient quatre (clusters I à IV) constitués respectivement de 2, 8, 10 et 11 répétitions de type CR. La quasi-totalité des ligands connus de LRP-1 pour lesquels un site de liaison a été défini interagissent avec ces domaines, avec une affinité préférentielle pour les domaines II et IV (Rudenko et al., 2002). La chaîne extracellulaire de LRP-1 contient également des domaines homologues aux précurseurs de l'EGF composés de motifs YWTD repliés en turbines β et entourés de répétition de type EGF. Ces domaines sont nécessaires pour la stabilisation des domaines de liaison aux ligands mais sont également nécessaires pour le découplage des ligands due aux variations de pH au sein des endosomes (Rudenko et al., 2002).

IV.1.1.2. La chaîne β transmembranaire

Par l'intermédiaire de sa chaîne β transmembranaire, le récepteur LRP-1 est capable d'initier et de réguler des voies de signalisation. Le domaine ICD (*Intracellular domain*) de LRP-1 peut interagir, via deux domaines NPxY, avec une quinzaine d'adaptateurs protéiques cytoplasmiques impliquées dans la signalisation et le trafic intracellulaire contenant des motifs PTB et PDZ (Lillis et al., 2008). Des expériences d'inactivation des domaines NPxY montrent que le domaine proximal semble impliqué dans les phases précoces de la biosynthèse de LRP-1, alors que le domaine distal semble plutôt dédié à l'endocytose (Reekmans et al., 2010). Le

domaine transmembranaire, quant à lui, permet l'ancrage du récepteur à la membrane. Enfin, le fragment extracellulaire de la chaîne β de LRP-1, longtemps considéré comme incapable de fixer des ligands matriciels, est maintenant décrit pour sa capacité à interagir avec la pro-cathepsine D. Il favoriserait par ce biais la création d'un microenvironnement tumoral favorable au développement des tumeurs mammaires (Beaujouin et al., 2010).

Contrairement à d'autres membres de sa famille tels que les récepteurs LDLR, VLDLR, LRP-2 et apoER2, la partie cytoplasmique de LRP-1 contient un motif YxxL et deux motifs NPxY. Les motifs NPxY fonctionnent comme des signaux d'endocytose pour l'ensemble de la famille des récepteurs aux LDL, alors que le motif YxxL servirait comme signal dominant pour une endocytose rapide par LRP-1 (Li et al., 2000).

IV.1.2. La distribution de LRP-1

La localisation du récepteur LRP-1 au sein des membranes semble dépendre du type cellulaire. Il est aujourd'hui établi que LRP-1 permet l'endocytose de nombreux ligands à partir de puits recouvert de clathrine (Li et al., 2000). LRP-1 est également retrouvé au sein des radeaux lipidiques de certains types de cellules comme c'est le cas notamment dans les cellules HT1080 (Wu & Gonias, 2005). Toutefois, il semblerait que cette localisation soit temporaire et n'intervienne que ponctuellement pour promouvoir l'endocytose de protéines membranaires localisées au sein des cavéoles comme l'uPAR ou le PDGFR (Blasi & Carmeliet, 2002; Boucher et al., 2003). La localisation de LRP-1 apparaît également modulée en réponse à l'insuline. Cela a pu être observé dans des adipocytes où la quantité de LRP-1 augmente significativement au niveau des cavéoles (Zhang et al., 2004). Enfin, la déplétion en cholestérol, et donc l'altération de la composition des radeaux lipidiques, modifie le shedding de LRP-1. Le shedding correspond à un clivage protéolytique de la partie extracellulaire du récepteur. L'ectodomaine ainsi clivé (sLRP-1), composé de la chaîne α dans son intégralité ainsi que la partie extracellulaire de la chaîne β , est soluble (Quinn et al., 1997). Le clivage protéolytique peut être réalisé par différentes protéases extracellulaires en fonction du type cellulaire (MT1-MMP, ADAM-12, ADAM-17, ADAM-10, tPA... (Selvais et al., 2009 ; 2011)) et peut influencer différentes fonctions physiopathologiques (Gaultier et al., 2008). Le shedding de LRP-1 régule sa quantité à la membrane plasmique et contribue ainsi à diminuer l'endocytose qu'il régule. Il en résulte une accumulation des ligands de LRP-1 dans l'espace péricellulaire (Selvais et al., 2009). Toutefois, la forme soluble conserve la capacité de se lier à de nombreux ligands et peut ainsi moduler leur endocytose par le LRP-1 membranaire disponible. La compréhension des activités de LRP-1 en tant que régulateur du protéome membranaire est primordiale pour expliquer le rôle de ce récepteur, notamment dans des pathologies où il émerge telles que le cancer (Campion et al., 2020).

IV.2. Les grandes fonctions de LRP-1

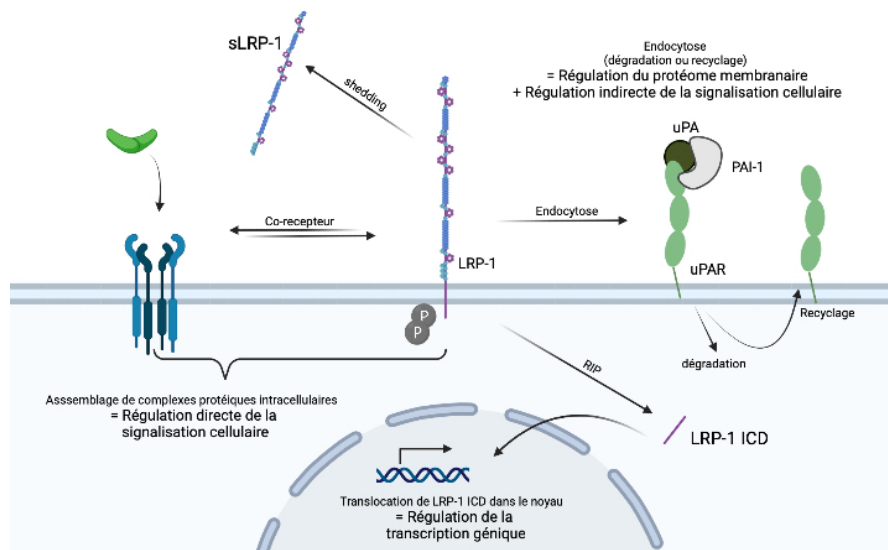


Figure 54 : Schéma représentatif des grandes fonctions de LRP-1. Créée sur Biorender

IV.2.1. L'endocytose & la régulation du protéome membranaire

Le récepteur LRP1 est capable de réguler l'abondance et le trafic de nombreuses protéines solubles ou membranaires au niveau de la membrane plasmique et de l'espace péricellulaire en les endocytant. Par ce biais, il influence la régulation des voies de signalisation sous-jacentes à ces récepteurs. La protéolyse, l'angiogenèse mais aussi l'adhérence et la migration peuvent être impactées.

- **Effets liés à la protéolyse** - Le récepteur de l'urokinase (uPAR) a été le premier récepteur identifié comme étant régulé par LRP-1. En interagissant avec uPAR et en facilitant son endocytose, LRP-1 régule négativement sa disponibilité membranaire car son recyclage n'est pas efficace à 100%, suggérant que LRP-1 est également impliqué dans son catabolisme (Nykjaer et al., 1997). La liaison d'uPA à uPAR est nécessaire pour son activité urokinase dans l'activation du système PP. L'intervention de PAI-1 déclenche l'arrêt de la signalisation et leur clairance endocytaire par LRP-1 (Czekay et al., 2001). Au fur et à mesure que les endosomes s'acidifient, la dissociation du complexe uPA/PAI-1 de l'uPAR est favorisée de sorte que le récepteur soit en partie recyclé à la surface cellulaire (Nykjaer et al., 1997). L'extinction de LRP-1 dans des fibroblastes embryonnaires murins (MEF) induit une accumulation extracellulaire d'uPA et membranaire d'uPAR (Weaver et al., 1997). En conséquence, les MEF déficients en LRP1 conservent la capacité d'activer le système PP et favorise le remodelage matriciel et l'invasion tissulaire. Toutefois, lorsque le complexe uPA/uPAR est neutralisé par la liaison de PAI-1, l'endocytose par LRP1 est nécessaire pour le recyclage d'uPAR, illustrant le rôle crucial que LRP-1 joue dans la régulation de la protéolyse.

Dans les chondrocytes, il a été mis en évidence que le récepteur LRP-1 était indispensable au maintien d'une activité protéolytique via la régulation des niveaux de MMP-13. La MMP-13 se lie rapidement au récepteur LRP-1 et elle est co-endocytée avec ADAMTS-5 et TIMP-3 pour être dégradée (Yamamoto et al., 2016). En plus de la MMP-13 et des MMP-2 et MMP-9 (Emonard et al., 2004 ; Hahn-Dantona et al., 2001), il a été montré que LRP-1 était capable de lier la pro-MMP-1 et la MMP-1. Toutefois, il a été mis en évidence que l'affinité de liaison de LRP-1 au complexe MMP-1/TIMP-1 était 30 fois supérieure à celle de l'un ou l'autre des composants seuls. Ces résultats sont aussi valables pour le complexe pro-MMP-9/TIMP-1 (Arai et al., 2020).

- **Effets liés à l'angiogenèse/ l'homéostasie vasculaire** - Dans les EC, il a été mis en évidence que l'uPAR était redistribué aux niveaux des adhérences focales au front de migration cellulaire en réponse au VEGF. Le VEGF₁₆₅ et le VEGF-E interagissent avec le VEGFR-2 et induisent l'internalisation d'uPAR via LRP-1 de manière dépendante d'uPA et de PAI-1 (Prager et al., 2004). Notamment, LRP-1 semble jouer un rôle central dans la migration des EC induite par le VEGFR-2. En effet, l'utilisation de RAP, qui inhibe l'internalisation d'uPAR/uPA/PAI-1, altère la réponse migratoire des EC (Prager et al., 2004). De surcroît, lorsque les HUVECs sont stimulées par du VEGF, uPAR interagit avec le VEGFR-2 et le complexe est internalisé par LRP-1, régulant alors la signalisation pro-angiogénique (Herkenne et al., 2015).

L'endocytose médiée par LRP-1 peut diriger les produits d'endocytose vers la voie de dégradation lysosomale, ce qui modifie la répartition membranaire d'un ligand et indirectement la signalisation qui lui est associée. Par exemple, LRP-1 module la signalisation du PDGF en contrôlant l'ubiquitination et l'endocytose du PDGFR β , ce qui lui permet indirectement de prendre part à la régulation de l'activation de la voie ERK en réponse à une stimulation du PDGF-BB (Takayama et al., 2005). En plus de son rôle primordial dans le développement embryonnaire, avec la formation de vaisseaux sanguins et l'hématopoïèse précoce, la signalisation du PDGFR β possède des rôles établis dans la tumorigenèse en favorisant la progression tumorale et l'angiogenèse (Andrae et al., 2008).

LRP-1 exprimé par les macrophages permet *in vivo* d'assurer la clairance du complexe FVII activé/antithrombine III (SERPINC1) impliqué dans les phases tardives de la voie de coagulation extrinsèque après une lésion endothéliale (Fazavana et al., 2016).

- **Effets liés à l'adhérence et la migration** - L'implication de LRP-1 dans l'endocytose des protéines matricielles peut modifier les interactions cellule-MEC impliquant des récepteurs d'adhérence.

Dans un modèle de cancer thyroïdien, il a été mis en évidence que le récepteur LRP-1 régula le recyclage de l'intégrine β 1, sans impliquer la voie lysosomale (Theret et al., 2017). En plus de l'adressage lysosomal ou du recyclage impliquant les endosomes, LRP-1 peut être impliqué dans la maturation et la stabilité des protéines membranaires (Salicioni et al.,

2004). De plus, l'interaction physique de LRP-1 avec l'intégrine $\beta 1$ stimule la formation du complexe intégrine $\beta 1$ /kindlin-2, nécessaire à l'activation de l'intégrine. Plus précisément, la sérine 76 dans la queue cytoplasmique LRP-1 est cruciale pour son interaction avec kindlin-2, l'activation de l'intégrine $\beta 1$ et l'adhérence cellulaire. Ainsi, LRP-1 servirait de point focal dans le système de contrôle de qualité de l'intégrine pour assurer une connexion ferme à la MEC (Wujak et al., 2018)

En parallèle de ses effets liés à la protéolyse, le complexe uPA/uPAR peut recruter et activer les dimères d'intégrines $\alpha v\beta 3$ et $\alpha v\beta 5$ par le biais de LRP-1, générant ainsi des sites d'ancrage pour la vitronectine (Czekay et al., 2003). Une activité anti-adhérente peut être médiée par PAI-1 en entraînant l'endocytose du complexe uPA/uPAR/intégrine. Dans ce sens, il a été mis en évidence que l'adhérence des macrophages impliquait un complexe protéique comprenant l'intégrine hétérodimérique $\alpha M\beta 2$, du tPA et de la fibrine. La fixation de PAI-1 à tPA permet de ponter ce complexe à LRP-1 et d'engendrer son endocytose, nécessaire à la rupture du contact cellule-matrice et à la migration cellulaire (Cao et al., 2006).

Enfin, des données indiquent que le récepteur serait également impliqué dans la translocation nucléaire, non pas de ligand, comme cela a déjà pu être démontré pour des toxines solubles (Chaumet et al., 2015), mais de protéines transmembranaires, telles que MerTK (Borgman et al., en reviewing). Étant donné que de nombreux RTK jouent un rôle dans l'oncogenèse dans le noyau (Song et al., 2013), l'identification des déclencheurs de ce processus semble d'une grande importance pour pouvoir les utiliser à des fins de traitement (Borgman et al., en reviewing).

IV.2.2. La signalisation cellulaire médiée par l'assemblage de complexes protéiques de signalisation intracellulaire

Le récepteur LRP-1 est capable d'interagir avec des protéines d'échafaudage et de signalisation via son ICD. Ces processus sont régulés par des mécanismes de phosphorylation initiant une signalisation cellulaire directe. Contrairement à la signalisation indirecte qu'il peut engendrer lorsqu'il modifie l'abondance, la fonction ou le trafic d'un autre récepteur de signalisation cellulaire. Cette voie par laquelle LRP-1 régule la signalisation favorise les processus de croissance, de survie et de différenciation cellulaire. Elle peut être initiée par le récepteur LRP-1 seul ou un complexe de co-récepteurs impliquant LRP-1 à la suite de la liaison de ligands spécifiques.

- **Effets liés à la croissance et à la différenciation cellulaires** – Des études de mutagenèses dirigées ont mis en évidence que la substitution Y63A de la chaîne β de LRP-1 avait des répercussions sur de nombreuses voies de signalisation, conduisant notamment à la suractivation des kinases ERK, FAK et de la cycline D1, et à la stimulation de la prolifération (Zhang et al., 2008).

Dans un modèle fibroblastique, il a été mis en évidence que la liaison du tPA sur LRP-1 induisait son association avec des intégrines de type $\beta 1$. Ce recrutement nécessite la phosphorylation du domaine cytoplasmique de LRP-1, qui engendre la fixation et l'activation sur les intégrines de ILK (*Integrin-Liked Kinase*). En relayant la signalisation induite par le tPA et médiée par les intégrines, LRP-1 contribue à la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes et potentialise de ce fait, l'effet du TGF- β (Hu et al., 2007).

Comme indiqué précédemment, le récepteur LRP-1 contribue aux événements de signalisation du PDGF. Des données ont révélé l'association des deux récepteurs dans les endosomes où ils forment un complexe de signalisation nécessaire à l'activation de ERK mais aussi de la voie PI3K/Akt par le PDGF (Muratoglu et al., 2010).

Des études ont rapporté que LRP-1 correspondait au récepteur T β RV/IGFBP-3 (Herz et al., 1988). En effet, ils ont montré que la transfection stable de cellules de carcinome pulmonaire humain avec l'ADNc de LRP-1 leur conférait une sensibilité au TGF- $\beta 1$ ou à l'IGFBP-3. Dans les cellules non musculaires, la liaison de l'IGFBP-3 à LRP-1 est nécessaire pour l'inhibition de la prolifération qu'il engendre. Toutefois, LRP-1 ne semble pas indispensable dans les cellules myogéniques (Pampusch et al., 2011). Cet exemple illustre la versatilité du récepteur LRP-1 conditionnée, entre autres, par le type cellulaire.

LRP-1 forme également un complexe avec le récepteur à l'IGF-1, nécessaire à la phosphorylation de ShcA en réponse à l'IGF-1 et aboutissant à l'activation de la voie Ras/MAPK sous-jacente et à la prolifération cellulaire (Woldt et al., 2011).

- **Effets liés à la protéolyse** - En plus de sa fonction endocytaire, LRP-1 module également l'expression des métalloprotéinases via ses fonctions de signalisation. Ainsi, la liaison de tPA à LRP-1 induit la phosphorylation de la tyrosine 63 de la partie cytoplasmique de la chaîne β et déclenche la transduction du signal intracellulaire pour induire l'expression de la MMP-9 dans les fibroblastes interstitiels rénaux (Hu et al., 2006). Une telle régulation de la MMP-9 médiée par LRP-1 a également été démontrée dans le cerveau, à la fois dans des cultures cellulaires et *in vivo* (Wang et al., 2003). De manière assez surprenante, la liaison de PAI-2 à LRP-1 stimule la voie ERK et entraîne une augmentation des niveaux transcriptionnels de MMP-9. Cette augmentation promeut le potentiel métastatique dans des cellules tumorales mammaires (Fayard et al., 2009). Dans ce sens, il a été mis en évidence que LRP-1 induisait l'expression de la MMP-2 et MMP-9 via la signalisation ERK dans un modèle de glioblastome, favorisant ainsi l'invasion tumorale (Song et al., 2009).
- **Effets liés à l'adhérence et la migration** – Le récepteur LRP-1 a été décrit comme un récepteur motogénique (Degryse et al., 2004). La liaison de PAI-1 qu'il soit actif ou inactif (par exemple sous forme clivée) sur le récepteur LRP-1 est capable de stimuler la migration des VSMC par activation de la voie JAK/STAT. LRP-1 peut également contrôler la

migration des MEF en régulant négativement les activités Rac1 et ERK sous la dépendance de l'uPAR (Weaver et al., 1997 ; Ma et al., 2002).

- **Effets liés à l'angiogenèse** – Par le biais de ces fonctions de signalisation, LRP-1 joue un rôle central dans la prolifération des EC et la néovascularisation. La répression d'expression de LRP-1 dans un modèle murin provoque une augmentation de la néo-vascularisation rétinienne. En outre, une augmentation de l'activité PARP-1, une phosphorylation subséquente de pRB et de CDK-2, qui favorise la progression du cycle cellulaire et l'angiogenèse, ont été associées à la répression de LRP-1. Ces données suggèrent que LRP-1 en interagissant avec PARP-1 dans les EC régule négativement la prolifération et la néo-vascularisation (Mao et al., 2016).

Dans les MEF, un déficit en LRP-1 est associé à des niveaux accrus de collagène de type III, de SERPINF1 (ou PEDF) ainsi que du récepteur uPAR-AP/Endo-180. Il a été mis en évidence que ces effets liés à LRP-1 dépendaient de la régulation transcriptionnelle médiée par la voie JNK. La capacité de LRP-1 à réguler l'expression de ces facteurs indépendamment de son activité d'endocytose souligne la multiplicité des rôles qu'il pourrait jouer dans la détermination de la structure des vaisseaux sanguins et dans l'angiogenèse (Gaultier et al., 2006).

Ainsi les interactions du récepteur LRP-1 avec ou sans co-récepteurs membranaires ainsi que de nombreux adaptateurs intracellulaires ou protéines d'échafaudage lui permettent de réguler de nombreuses fonctions cellulaires (Lillis et al., 2008 ; Wujak et al., 2016).

IV.2.3. La régulation de l'expression génique par protéolyse intra-membranaire régulée

Il existe de plus en plus de preuves que la dégradation protéolytique intra-membranaire régulée (RIP pour *Regulated Intramembrane Proteolysis*) est impliquée dans une variété de processus importants de signalisation transmembranaire. Ce mécanisme de protéolyse permet une modulation de l'expression génique en réponse aux signaux extracellulaires. Le mécanisme RIP est décrit pour différents récepteurs tels que APP, ErbB4, Notch et notamment LRP-1 (Toussey et al., 2009 ; Lal et al., 2011 ; Emonard & Marbaix, 2015). Alternativement, ce mécanisme de clivage peut mettre fin aux événements de signalisation impliquant la protéine transmembranaire considérée.

Ce mécanisme de régulation médié par LRP-1 correspond au clivage de son domaine transmembranaire par une γ -sécrétase et le shedding simultané de son ectodomain (sLRP-1), phénomène susmentionné, à la suite de l'activation de la PKC. Le fragment libéré de 12 kDa que constitue le domaine intracellulaire de LRP-1 pourra se transloquer dans le noyau pour réguler la transcription de gènes cibles (Emonard & Marbaix, 2015).

LRP1-ICD contient de nombreux motifs impliqués dans différentes voies de signalisation : deux motifs NPxY, dont le motif distal est contigu à un motif YxxL, et deux motifs dileucine (Li et al., 2000). Il a été mis en évidence que les deux motifs NPxY pouvaient se lier et interagir avec de nombreuses protéines cytosoliques telles que Dab1 (*Disabled-1*), Fe65, JIP1 (*JNK-interacting protein* ou MAPK8IP1), PSD-95 (*postsynaptic density protein 95*), ShcA (*Src homology and collagen*) ou CED-6/GULP (Berger et al., 2010 ; Boucher et Herz, 2011).

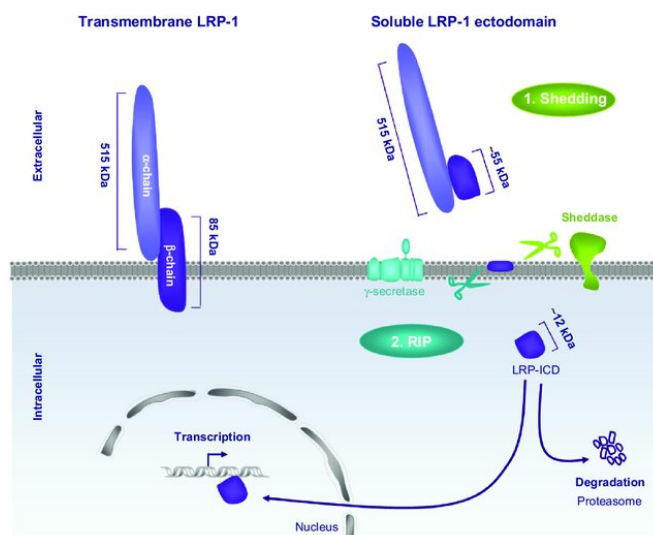


Figure 55 : Régulation de l'expression génique par LRP1-ICD. D'après Emonard & Marbaix, 2015

Par exemple, des études *in vitro* ont montré que LRP1-ICD pouvait être colocalisé dans le noyau avec l'histone acétyl transférase Tip60 (Kinoshita et al., 2003), connu pour interagir avec Fe65, une protéine adaptatrice de corégulation de la transcription qui forme un complexe transcriptionnellement actif avec le domaine intracellulaire de l'APP (Baek et al., 2002). Ces résultats soutiennent le postulat que LRP1-ICD est capable d'altérer l'activité transcriptionnelle du complexe APP/Fe65/Tip60 (Kinoshita et al., 2003). La surexpression de Fe65L1, membre de la famille des Fe65, favorise la dégradation de LRP-1 (Guénette et al., 2002), permettant une boucle de rétroaction. Sans la présence de LRP1-ICD, le complexe APP/FE65/Tip60 semble jouer un rôle central dans la régulation du métabolisme de l'apoE et du cholestérol dans le système nerveux central (SNC) en interagissant avec le promoteur de LRP-1 et en supprimant sa transcription (Liu et al., 2007).

Dans les neurones, la translocation de LRP1-ICD dans le noyau conduit à la mort cellulaire par apoptose dans des conditions ischémiques (Polavarapu et al., 2008). Le blocage de la libération de LRP1-ICD bloque la capacité de LRP-1 à supprimer la croissance indépendante de l'ancrage dans une lignée cellulaire dérivée d'une tumeur du SNC humain (Liu et al., 2007). Ainsi, le récepteur LRP-1 via son domaine ICD est capable de réguler la survie cellulaire dans le système nerveux.

LRP-1 limite également la signalisation des gènes inflammatoires inducibles par les LPS *in vitro* et *in vivo*. L'inflammation est un processus potentiellement néfaste et nécessite un contrôle

strict, dans lequel nous détaillerons l'implication de LRP-1. Par exemple, dans les macrophages, le domaine ICD de LRP-1, une fois transloqué dans le noyau, est capable de se lier au promoteur de l'interféron- γ et de le réprimer. La transcription basale des gènes cibles du LPS et la sécrétion induite par le LPS de cytokines pro-inflammatoires se voient augmentées en l'absence de LRP-1 (Zurhove et al., 2008).

L'ensemble de ces données suggèrent qu'en plus de ces fonctions endocytaires et de signalisation direct, le récepteur LRP-1 présente une fonction plus générale de régulateur de la transcription.

IV.3. Les implications physiologiques et pathologiques de LRP-1

IV.3.1. Rôle dans le métabolisme des lipoprotéines et des lipides

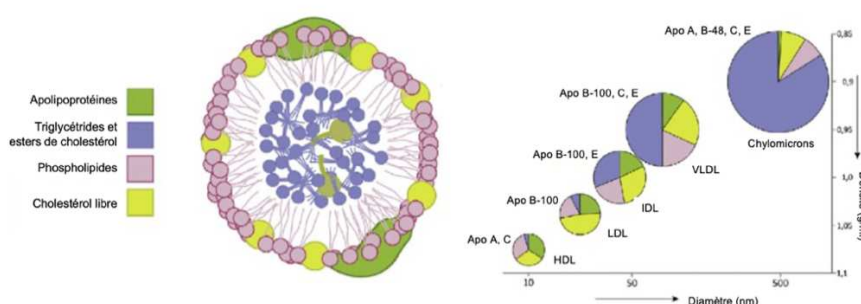


Figure 56 : Les différentes lipoprotéines et leurs caractéristiques.

Adaptée d'après Van Leeuwen et al., 2018.

Les lipoprotéines transportent les lipides dans le sang. Elles sont classées selon leur taille et leur densité, définie comme le ratio entre la fraction lipidique et protéique (Fig. 56). Les apolipoprotéines (Apo) constituent les éléments structuraux essentiels des lipoprotéines. Elles jouent un rôle central dans leur assemblage et dans leur transport via des récepteurs cellulaires spécifiques, notamment les récepteurs aux LDL.

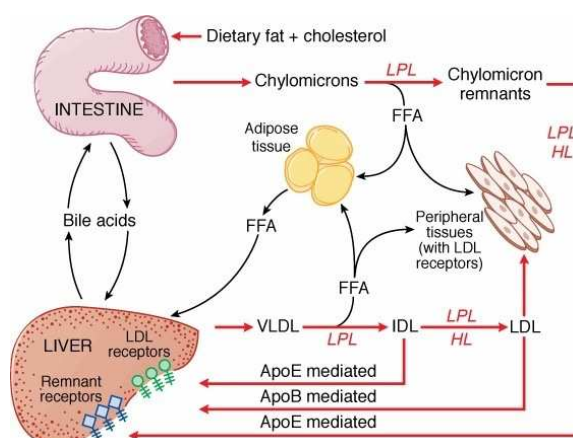


Figure 57 : Schéma simplifié du métabolisme des lipides et du cholestérol.

D'après WordPress.com

Les LDL, issues du métabolisme des VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) et des IDL (*Intermediary Density Lipoprotein*), sont les lipoprotéines les plus riches en cholestérol. Environ 40 à 60% de toutes les LDL sont éliminées par le foie dans un processus médié par l'apo B et les LDLR hépatiques (Rensen et al., 2000)(Fig. 57). LRP-1 contribue à l'endocytose et la dégradation subséquente des VLDL riches en triglycérides (TG) et des restes de chylomicrons du plasma (Beisiegel et al., 1991).

L'insuline joue un rôle important dans le métabolisme des chylomicrons. Elle induit une translocation de LRP-1 vers la membrane plasmique hépatique pour permettre une absorption postprandiale optimale. Les souris *knock-out* pour l'expression de LRP-1 au niveau hépatique présentent un phénotype obèse, une glycémie à jeun élevée, une faible clairance du glucose et une stéatose hépatique. Ce phénotype s'accompagne d'une diminution de la sécrétion hépatique de VLDL et de réponses insuliniques atténuées (Ding et al., 2016), suggérant le rôle crucial de LRP-1 dans l'homéostasie lipidique.

La participation de LRP-1 dans la régulation du métabolisme des TG intracellulaires dans les adipocytes a également été démontrée, soulignant de potentielles implications dans la lipogenèse, et ainsi le développement de l'obésité (Zheng et al., 2017b).

LRP-1 est impliqué dans l'accumulation et l'homéostasie du cholestérol dans les macrophages. Des souris possédant des macrophages déplétés pour LRP-1 (macLRP1-/-) présentent des taux plasmatiques élevés de cholestérol et de triglycérides résultant de l'accumulation de grosses particules de lipoprotéines riches en TG dans la circulation (Lillis et al., 2015). En outre, LRP-1 semble médier ses effets de manière dépendante de la signalisation induite par Shc1/PI3K/Akt/PPAR γ /LXR (*Liver X Receptor*) qui soutient l'expression du transporteur ABCA1 (*ATP-binding cassette A1*) dans les macrophages (Xian et al., 2017).

La dyslipidémie présente un impact délétère sur le remodelage cardiaque post-ischémique, avec des conséquences directes sur les composants de la MEC, notamment l'ésatine. LRP-1 joue un rôle dans le remodelage ventriculaire pathologique en régulant l'accumulation intracellulaire d'ester de cholestérol dans les cardiomyocytes (Samouillan et al., 2012). Ces effets seraient médiés par deux mécanismes : (1) il favoriserait l'exportation du cholestérol et inhiberait sa biosynthèse via l'interaction extracellulaire avec le TGF- β et l'activation de Wnt5a ; (2) il favoriserait l'exportation et l'élimination du cholestérol via une voie intracellulaire médiée par ERK2, entraînant l'expression de ABCA-1 et NCEH1 (Neutral Cholesterol Ester Hydrolase 1) (El Asmar et al., 2016).

Ainsi, LRP-1 peut non seulement avoir un effet sur l'absorption du cholestérol, mais également sur son transport intracellulaire et son métabolisme dans plusieurs types cellulaires. Considérant que LRP-1 constitue un facteur clé dans l'homéostasie lipidique, cela implique que des altérations fonctionnelles de ce récepteur, peuvent favoriser des dysfonctionnements

cellulaires, principalement dans les hépatocytes, les adipocytes et les macrophages, et conduire notamment au développement du syndrome métabolique (Actis et al., 2018).

IV.3.2. Rôle dans l'inflammation, la réponse immunitaire et la phagocytose

Les différentes fonctions de LRP-1 lui permettent d'influencer l'étendue de la réponse inflammatoire. LRP-1 étant exprimé de manière ubiquitaire, il peut agir au niveau de différents organes et contribue au développement d'un certain nombre de maladies dans lesquelles l'inflammation participe à la pathogenèse.

Inflammation/Réponse immunitaire

L'inflammation en tant que réponse tissulaire aiguë et robuste est déclenchée pour combattre une infection ou un danger, et sa régulation est tout aussi importante pour éviter des dommages tissulaires continus. Les macrophages constituent les principaux acteurs de l'inflammation aiguë et chronique dans de nombreux contextes homéostatiques, pathogènes et antimicrobiens (Shi & Pamer, 2011). Les signaux microbiens ou de danger activent les récepteurs de reconnaissance des agents pathogènes sur les macrophages pour générer des réponses pro-inflammatoires initiales, mais la reprogrammation, ou leur polarisation, permet ensuite à ceux-ci de cesser cette réponse quand elle n'a plus lieu d'être (Lawrence & Natoli, 2011). Les TLR (*Toll-like receptor*) activent LRP-1 dans les macrophages primaires humains et murins. LRP-1 phosphorylé entraîne ensuite le recrutement et l'activation du complexe effecteur Rab/PI3K, qui active la signalisation Akt/mTOR pour reprogrammer les macrophages et limiter la libération de cytokines inflammatoires. Grâce à ce mécanisme, LRP-1 contribue à la suppression de l'inflammation induite par les TLR (Luo et al., 2018b).

- **Signalisation des LPS** – Les LPS bactériens (présents dans la paroi de toutes les bactéries à Gram négatif) induisent une réponse inflammatoire profonde en se liant au récepteur de surface cellulaire TLR4. L'activation d'un réseau complexe de signalisation intracellulaire aboutit finalement à la translocation nucléaire des facteurs de transcription interféron régulateur facteur 3 (IRF-3) et NFκB, ainsi qu'à l'induction de l'expression génique, de cytokines inflammatoires par exemple (Palsson-McDermott & O'Neill, 2004). L'examen de macrophages péritonéaux murins a révélé que LRP-1 jouait un rôle dans la limitation de la réponse inflammatoire induite par le LPS. En réponse à l'exposition au LPS, LRP-1 est traité de manière protéolytique (RIP), conduisant à la libération de LRP1-ICD. Une fois transloqué dans le noyau, LRP1-ICD interagit avec IRF-3 et favorise son exportation nucléaire et sa dégradation protéasomale (Zurhove et al., 2008).
- **Signalisation du TNF-α** - Gaultier et al. ont décrit une voie alternative par laquelle LRP-1 exerce son activité anti-inflammatoire. Il s'agit d'une voie dans laquelle LRP-1 régule l'expression en surface du TNFαR1 dans les macrophages murins, et donc la sensibilisation

des cellules à la signalisation inflammatoire initiée par le TNF- α . L'absence de LRP-1 conduit à une activation accrue de NF κ B via la dégradation de sa protéine de liaison inhibitrice I κ B après phosphorylation par la kinase I κ B (Gaultier et al., 2008).

- **Facteur de croissance** – LRP-1 peut moduler directement la signalisation des facteurs de croissance en les liant, en interagissant avec leurs récepteurs kinases spécifiques, mais également au travers de son domaine intracellulaire, en interagissant avec des adaptateurs cytoplasmiques et des molécules de signalisation. Notamment, le récepteur LRP-1 est capable d'interagir avec le TGF- β qui module la réponse inflammatoire et immunitaire (Yang et al., 2012), en plus de réguler divers processus tels que la prolifération et la différenciation cellulaire, l'EMT, la synthèse matricielle mais également l'angiogenèse. Chez des souris dont les VSMC sont déficientes en LRP-1, l'absence de régulation de la signalisation du TGF- β est associée à la prolifération de la média des grosses artères ainsi qu'à une susceptibilité accrue à l'athérosclérose. Une perturbation des couches élastiques de la tunique média a également été observée, indiquant qu'une activité inflammatoire accrue pourrait contribuer au phénotype de ces souris, lorsque LRP-1 est absent pour la réguler (May et al., 2007).

Généralement, LRP-1 semble limiter la réponse inflammatoire et aider à contrôler les lésions tissulaires (May, 2013), en accord avec le rôle protecteur qu'il joue dans des nombreuses pathologies directement associées à l'inflammation.

Phagocytose

La phagocytose rapide des cellules apoptotiques est cruciale pour l'homéostasie tissulaire normale, comme dans la résolution d'un état inflammatoire et/ou d'une réponse immunitaire. Le mécanisme par lequel les cellules apoptotiques sont reconnues et phagocytées est complexe et implique une multitude d'interactions récepteur/ligand distinctes. La protéine du complément C1q et les membres de la famille du collagène de défense ont été bien caractérisés dans leur capacité à améliorer l'activité phagocytaire des monocytes, des macrophages et des DC (Bohlsou et al., 2006). Il a été montré que le récepteur LRP-1 contribuait directement à la phagocytose mais qu'il n'était cependant pas impliqué dans l'augmentation de la phagocytose déclenchée par C1q (Lillis et al., 2008b).

IV.3.3. Rôle protecteur dans l'athérosclérose

Les maladies cardiovasculaires constituent la principale cause de mortalité dans le monde. La cause sous-jacente de la majorité des maladies cardiovasculaires est l'athérosclérose (Kobivama et al., 2018). L'athérosclérose a longtemps été simplement considérée comme le résultat d'une accumulation passive de lipides formant des plaques d'athérome au niveau de l'intima des vaisseaux sanguins. Étant donné le rôle clé du métabolisme lipidique et des

différents composants lipidiques dans le développement de cette pathologie, l'implication du récepteur LRP-1 et plus largement des récepteurs aux LDL n'est donc pas surprenante.

Il a été montré que l'activité de LRP-1 dans les VSMC *in vivo* chez la souris conférait un effet anti-athérogène, en limitant l'activation de la signalisation du récepteur PDGFR- β (Boucher et al., 2003), et du TGF- β (Wujak et al., 2016). L'inhibition des voies de signalisation du PDGF par LRP-1 serait liée à une compétition pour le récepteur PDGFR- β , contribuant ainsi à la protection de l'intégrité vasculaire (Craig et al. 2013). En outre, LRP-1 limite l'accumulation intracellulaire de cholestérol en activant Wnt5a par l'intermédiaire du TGF- β , agissant par ce biais sur la synthèse endogène de cholestérol et son efflux (Jenty, 2016).

IV.3.4. Rôle protecteur contre la formation des anévrismes

Les mutations affectant les protéines contractiles dans la MEC, les microfibrilles ou les VSMC peuvent prédisposer l'aorte aux anévrismes. De plus, la synthèse et la fragmentation aberrantes de la MEC contribuent à la maladie aortique (Humphrey et al., 2014 ; Milewicz et al., 2017).

Précédemment, il a été montré que LRP-1 maintenait l'intégrité de la paroi vasculaire et que les souris possédant une déficience en LRP-1 dans les VSMC (smLRP1-/-) présentaient une signalisation excessive du PDGF, une augmentation de la prolifération des VSMC, la formation d'anévrismes et une susceptibilité accrue à l'athérosclérose. De surcroît, les souris smLRP1-/- se sont vu caractérisées par une dilatation aortique étendue *in vivo* accompagnée d'une lame élastique désorganisée et dégradée ainsi que d'un épaissement médial des vaisseaux artériels résultant d'un excès de dépôt de matrice. De manière surprenante, cela n'était pas attribuable à la signalisation excessive du PDGF. Au contraire, une analyse protéomique a révélé que les vaisseaux smLRP1-/- exprimaient 4 fois plus la serine peptidase HtrA1, enzyme sécrétée connue pour dégrader les composants de la matrice et pour nuire à l'élastogenèse, entraînant une fragmentation des fibres élastiques. Faisant de HtrA1 un nouveau ligand pour LRP-1, cette étude a également mis en évidence une accumulation excessive d'IGFBP-8, ligand de LRP-1 et médiateur clé de la fibrose (Muratoglu et al., 2013). Les souris smLRP1-/- ont également révélé une augmentation significative du dépôt de collagène, une conséquence potentielle de l'augmentation de la signalisation du TGF- β (Schlumberger et al., 1991). Par ailleurs, il a été mis en évidence un rôle essentiel pour LRP-1 dans le contrôle de la contractilité des VSMC en régulant les événements de signalisation Ca²⁺ importants pour la polymérisation de l'actine et la dynamique du cytosquelette. Cette fonction de LRP-1 est probablement essentielle pour sa remarquable capacité à moduler l'homéostasie vasculaire, qui, si elle se retrouve perturbée, peut mener à la formation d'anévrismes (Au et al., 2018).

IV.3.5. Rôle promoteur dans la maladie d'Alzheimer

Largement exprimé dans le SNC sain, LRP-1 est impliqué dans la régulation de la fonction synaptique, particulièrement au niveau postsynaptique où il gère le renouvellement et le recyclage des protéines synaptiques (Nakajima et al., 2013). Les cellules de Schwann, qui fournissent la myélinisation et le soutien trophique aux axones dans le système nerveux périphérique sain, démontrent une expression de LRP-1 considérablement accrue en réponse à une lésion. Dans la sclérose en plaques, l'échec d'élimination des produits de myéline dégénérée est crucial dans l'initiation de la réponse immunitaire (Campana et al., 2006). Ainsi, LRP-1 en tant que récepteur phagocytaire des cellules apoptotiques, des débris cellulaires et de la myéline dégénérée joue un rôle important dans l'acquisition des caractéristiques physiopathologiques de cette maladie auto-immune (Gaultier et al., 2009 ; Fernandez-Castaneda et al., 2013).

La maladie d'Alzheimer (AD pour *Alzheimer Disease*) est une maladie complexe qui pourrait avoir une ou plusieurs causes liées à l'inflammation, l'infection, les anomalies neurovasculaires, les variantes génétiques, les lésions de la myéline et le microbiome de l'intestin (Zhan et al., 2018). Elle se caractérise par une accumulation extracellulaire de plaques amyloïdes composées d'une protéine insoluble appelée peptide β -amyloïde ($A\beta$) (Murphy & LeVine, 2010). C'est la dégradation intracellulaire d'une protéine transmembranaire nommée protéine précurseur de l'amyloïde (APP) par la préséniline-1 intervenant, entre autres, dans l'activité de la γ -sécrétase qui donne naissance aux $A\beta$ (Ulery et al., 2000).

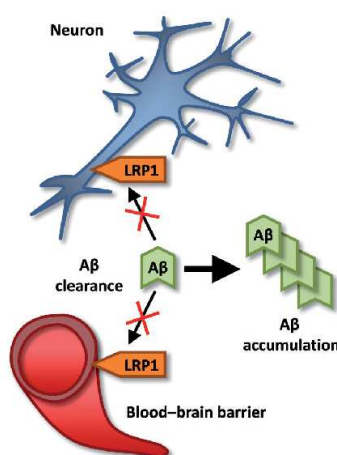


Figure 58 : Impact d'une expression réduite de LRP-1 dans la maladie d'Alzheimer.

D'après Wujak et al., 2016

Il est largement décrit que LRP-1 joue un rôle dans la promotion de l'accumulation des $A\beta$ et donc de leur toxicité dans la pathogenèse de l'AD. En effet, LRP-1 est capable d'interagir avec l'APP favorisant ainsi son internalisation et son catabolisme (Kounnas et al., 1995). Une fois que les $A\beta$ sont produits et sécrétés dans l'espace extracellulaire du cerveau, LRP-1 est impliqué dans leur absorption cellulaire dans les neurones, la microglie, les astrocytes, les VSMC, les péricytes, les EC et le plexus choroïde. Selon le contexte les $A\beta$ peuvent être dégradés dans

les lysosomes ou s'accumuler dans les cellules provoquant ainsi une toxicité cellulaire. Au niveau de la barrière hématoencéphalique (BBB pour *Blood Brain Barriere*), LRP-1, fortement exprimé, est capable de transcytoser certaines molécules. Il est ainsi directement impliqué dans l'efflux des A β du compartiment cérébral vers le compartiment sanguin. Deane et al. ont montré que le récepteur soluble sLRP-1 pouvait lier 70-90% des A β circulants dans le sang périphérique, empêchant leur accès au cerveau. Chez les personnes atteintes de l'AD, les niveaux de LRP-1 au niveau de la BBB se voient particulièrement réduits, tout comme les niveaux de A β se liant aux sLRP-1 plasmatique. À l'aide d'un modèle murin de l'AD, les auteurs ont démontré qu'en administrant une forme soluble de LRP-1, ils étaient en mesure de réduire la charge de plaque amyloïde cérébrale tout en améliorant l'apprentissage et la mémoire de leurs sujets murins (Deane et al., 2011). Plusieurs études ont également démontré une implication de LRP-1 en tant que récepteur endocytaire et de signalisation de l'Apo E, déterminant génétique majeur de l'AD, et sa fonction en tant que récepteur des A β (Holtzman et al., 2012). En effet, l'Apo E, principalement produite et sécrétée par les astrocytes dans le cerveau, est lipidée pour fournir du cholestérol/lipides aux neurones et à d'autres cellules par l'intermédiaire de LRP-1. Les isoformes d'Apo E affectent probablement le métabolisme des A β par LRP-1 en interagissant directement avec les peptides ou en entrant en compétition avec eux pour la liaison au récepteur LRP-1 (Auderset et al., 2016).

La plupart des études menées sur cette pathologie sont réalisées à partir de modèle cellulaires et animaux, ce qui limite l'acquisition d'une vision globale de l'implication de LRP-1 dans l'AD. Il semble indispensable de déterminer les potentiels changement d'expression et de fonctions de LRP-1 à des stades spécifiques de la pathologie ainsi que les différents rôles de LRP-1 selon le contexte, notamment en fonction du type de cellules (neurones, astrocytes etc...), de l'âge des patients, des stades de la maladie et des différentes isoformes d'Apo E (Shinohara et al., 2017).

IV.3.6. Rôle controversé dans le cancer

Du fait de sa capacité à contrôler le niveau pericellulaire de divers facteurs de croissance et protéases exerçant des effets délétères lors de la progression tumorale, LRP-1 a longtemps été perçu comme un suppresseur de tumeur potentiel (Dedieu & Langlois, 2008). Son activité d'endocytose vis-à-vis par exemple du PDGF, de l'uPAR, de la THBS, du VEGF ou encore du TGF- β , le prédispose à conditionner l'environnement stromal, et ainsi influencer le devenir tumoral. En effet, LRP-1 est capable de réguler le taux de facteurs impliqués dans des processus variés, comme la prolifération, la survie ou l'angiogenèse. Toutefois, nous avons vu, que son rôle ne s'arrête pas là. LRP-1 apparait comme un récepteur versatile capable de réguler la capacité des cellules à répondre aux facteurs de croissance et à interagir avec la MEC. En outre, via une régulation de la signalisation ou de l'expression génique, LRP-1 peut participer aux perturbations qui se produisent dans le microenvironnement (Langlois et al., 2009 ; Van Gool et al., 2015). Ainsi, ses actions se veulent influencées et déterminées par sa localisation dans des domaines spécialisés de la membrane plasmique ainsi que par, la présence de molécules de

signalisation disponibles pour interagir avec lui. Ces caractéristiques le positionnent comme un récepteur inévitablement impliqué dans la progression tumorale. Récemment, il a été identifié comme un biomarqueur global multi-cancer au sein d'un réseau pour la prédiction des résultats cliniques (Martinez-Ledesma et al., 2015).

De nombreuses études ont suggéré un rôle pour LRP-1 dans la régulation de la progression tumorale. Toutefois, il est important de prendre en considération le fait que son rôle puisse différer en fonction de l'origine tissulaire ou du stade tumoral. Plusieurs études ont rapporté qu'une faible expression de LRP-1 était liée à des stades tumoraux avancés et à une faible survie dans plusieurs tumeurs solides, telles que le carcinome hépatocellulaire (Huang et al., 2012), l'adénocarcinome pulmonaire (Meng et al., 2011), le mélanome (de Vries et al., 1996), les tumeurs de Wilms (Desrosiers et al., 2006) ou encore le cancer du côlon (Boulagnon-Rombi et al., 2018). Au contraire, une expression élevée de LRP-1 s'est vu associée à des stades tumoraux avancés dans le carcinome de l'endomètre (Catasús et al., 2011), le cancer du sein (Catasús et al., 2011), les carcinomes de la prostate (McGarvey et al., 1996), les cancers thoroidiens (Dedieu et al., 2008b), les cancers rénaux (Feng et al., 2018) et semble l'être dans le glioblastome (Song et al., 2009).

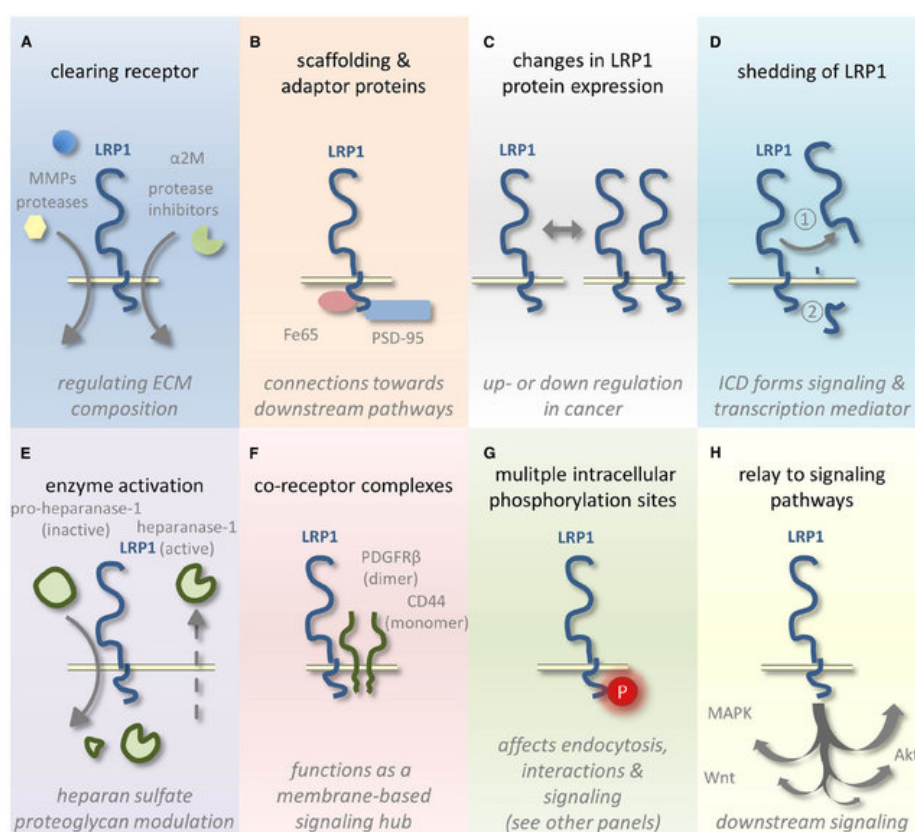


Figure 59 : Représentation schématique des différentes fonctions de LRP-1 potentiellement impliquées dans la progression tumorale. D'après Van Gool et al., 2015.

LRP-1 dans le cancer mammaire

Benes et al., ont mis en évidence des allèles polymorphismes C766T dans l'exon 3 du gène *LRP1* ainsi qu'une augmentation de leur fréquence chez les patientes atteintes d'un cancer du sein par rapport à une population témoin (Benes et al., 2003), suggérant un lien entre le gène LRP-1 et la susceptibilité de déclencher un cancer du sein. Une précédente étude anatomopathologique a révélé que LRP-1 était majoritairement surexprimé dans les sous-types HER2+ et les triples négatifs par rapport aux autres sous-types (Catasús et al., 2011), offrant l'idée que LRP-1 pourrait soutenir l'agressivité des tumeurs mammaires.

Le récepteur LRP-1 est directement impliqué dans la migration cellulaire en modulant les fonctions des intégrines par un contrôle subtil de leur cycle endocytose/recyclage (Theret et al., 2017). La répression du récepteur LRP-1 dans un modèle de TNBC nous a conduit à observer une augmentation de la rigidité cellulaire, une diminution des protubérances cellulaires et finalement à une altération des capacités migratoires (Berquand et al., 2018). Ainsi, LRP-1 est capable de réguler l'adhérence et la dés-adhérence des cellules cancéreuses. L'internalisation de CD44, protéine de surface cellulaire essentielle à la définition des propriétés adhérentes des cellules tumorales, y contribue (Perrot et al., 2012). CD44 est essentielle dans l'EMT. Il a été mis en évidence que le cancer mammaire de sous-type basal présentait un enrichissement de CD44, en corrélation avec l'EMT, le profil génique des cellules souches cancéreuses et le pronostic (Xu et al., 2016).

Le récepteur LRP-1 participe directement à la régulation des cascades protéolytiques et au remodelage conséquent de la MEC par endocytose de nombreuses protéinases actives ou complexes protéinase/inhibiteur, comme nous avons pu l'évoquer précédemment. En plus de son activité catabolique, LRP-1 peut interagir avec de nombreuses protéines via sa chaîne intracytoplasmique pour constituer une plateforme de signalisation cellulaire. En activant la voie MEK/ERK et en inhibant simultanément MKK7/JNK, LRP-1 peut réguler l'ancrage des cellules cancéreuses à l'ECM, favorisant l'invasion (Langlois et al., 2010). D'autre part, la clairance de la pepsine dépendante de LRP-1 s'est vu attribuée un rôle dans le contrôle du potentiel invasif des cellules luminales et TNBC (Kang et al., 2014). PAI-2 ou PN-1, fortement exprimée dans les tumeurs mammaires RE- et de haut grade, promeut les métastases pulmonaires par le biais de la sécrétion de MMP-9, dont la régulation positive est dépendante de la signalisation engendrée par l'interaction PN-1/LRP-1 (Fayard et al., 2009). Par ailleurs, LRP-1 semble contribuer au mimétisme vasculaire, déclenché *in vitro* par une privation de sérum dans le milieu des cellules tumorales mammaires stimulées par ZEB-1, régulateur de l'EMT (Drápela et al., 2020). Il a été mis en évidence que les miARN (miR-200c, miR-183, miR-96 et miR-182) cibles de ZEB-1, qui inhibent le processus de mimétisme vasculaire, inhibent également LRP-1, l'intégrine $\beta 1$ et les ligands extracellulaires nécessaires au processus, à savoir la fibronectine-1 et PN-1. Ainsi, LRP-1 s'avère impliqué dans la plasticité cellulaire nécessaire à l'EMT, mais également dans un processus lié à l'angiogenèse pathologique associé à un mauvais pronostic (Langer et al., 2018).

Les tumeurs à croissance rapide *in vivo* dépassent souvent leur approvisionnement en sang disponible environnant, se soumettant à un microenvironnement hypoxique. Il a été montré que les cellules MDA-MB-231, exprimant HIF-1 α , sécrétaient la protéine de choc thermique Hsp90 α et l'utilisaient pour survivre en cas d'hypoxie via une signalisation autocrine médiée par LRP-1 (Dong et al., 2016). Notamment, la liaison spécifique de Hsp90a à LRP-1 entraîne une stimulation du développement tumoral et de la colonisation métastatique pulmonaire (Sahu et al., 2012). D'autre part, cette interaction Hsp90a/LRP-1 et les signaux pro-métastatiques associés se sont vu renforcés par la présence de la clusterine dans les sous-types luminaux et TNBC (Tian et al., 2019). De manière intéressante, Hsp90 α est absente du microenvironnement normal, ce qui suggère des opportunités prometteuses pour une thérapie ciblée (Sahu et al., 2012). En tant que senseur du microenvironnement, LRP-1 a déjà été décrit comme un gène régulé par l'hypoxie (Montel et al., 2007). Dans un modèle de xénogreffe, l'invalidation de LRP-1 a entraîné une hypersensibilisation à l'hypoxie et une diminution de la synthèse du VEGF, limitant de ce fait la dissémination métastatique. Par ailleurs, il a été mis en évidence que LRP-1 était une cible de p53. En réponse à un stress sublétalet létal, l'expression transcriptionnelle de LRP-1 se voit régulée à la hausse par p53. Toutefois, lors d'un stress létal, l'intervention des miR103 et miR107, régulés à la hausse par p53, inhibent la traduction de LRP-1, conduisant à la mort cellulaire. Ainsi, LRP-1 contribue à l'intégration des stimuli extérieurs, notamment en cas de stress létal (Leslie et al., 2018).

Ces études soulignent la polyvalence des fonctions de LRP-1 qui semble contribuer à la progression et l'invasion mammaire et soutiennent les recherches en cours pour identifier les interfaces moléculaires spécifiques mobilisées par le récepteur qui pourraient être ciblées pour contrôler le comportement agressif des cellules tumorales.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Il est aujourd'hui irrécusable que le caractère invasif d'un cancer primaire est déterminé, non seulement, par le génotype et le phénotype des cellules tumorales, mais également par les nombreuses interactions avec leur microenvironnement. Celui-ci est composé d'une variété de types cellulaires, capables de moduler le développement, les capacités d'infiltration ainsi que la réponse angiogénique de la tumeur. Ainsi, l'étude du microenvironnement et de ses acteurs a pris une place primordiale dans le domaine de la recherche sur le cancer.

L'équipe au sein de laquelle, j'ai réalisé mes travaux de thèse s'intéresse tout particulièrement au récepteur LRP-1. Du fait de sa fonction d'épuration de protéases extracellulaires impliquées dans les processus de dissémination métastatique, le récepteur LRP-1 a longtemps été perçu comme un potentiel suppresseur de tumeur. Aujourd'hui, l'ensemble des données disponibles attestent que son rôle est bien plus complexe. Du fait de sa capacité à interagir et contrôler la dynamique de nombreuses molécules du microenvironnement tumoral, l'équipe 1 de l'unité de recherche MEDyC s'intéresse à étudier l'impact prometteur en tant que cible thérapeutique et/ou biomarqueur qu'il pourrait avoir dans le cadre de la tumorigénèse. Les travaux menés dans ce sens ces dernières années au sein de notre unité ont permis de préciser la fonction d'endocytose du récepteur LRP-1, notamment vis-à-vis des protéases extracellulaires mais aussi de faire émerger de nouvelles fonctions du récepteur au niveau de la cellule tumorale et de son microenvironnement (Dedieu & Langlois, 2008 ; Langlois et al., 2009 ; Van Gool et al., 2015). Cette thèse, en tenant compte des découvertes récentes dans le domaine, s'inscrit dans la continuité de ces travaux et cherche à préciser si LRP-1 peut constituer une cible thérapeutique et/ou un biomarqueur dans le TNBC.

L'expression privilégiée du récepteur LRP-1 dans les cancers du sein et notamment dans les TNBC, nous a encouragé à étudier son implication dans la progression de ce cancer agressif. Plus particulièrement, nous nous sommes focalisés sur la compréhension de son rôle, qu'il soit direct ou indirect, dans le contrôle de l'angiogénèse tumorale. La multitude des interactions que LRP-1 peut mettre en place avec des molécules de l'environnement péricellulaire, des protéines transmembranaires ou encore des adaptateurs intracellulaires démultiplie ses fonctions et le place comme un candidat en mesure d'influencer différents processus liés à la progression tumorale tels que la croissance, la migration, l'invasion et notamment l'angiogénèse. La considération du rôle physiologique de LRP-1 dans le remodelage et l'homéostasie vasculaire (He et al., 2021), ainsi que sa régulation médiée par l'hypoxie (Montel et al., 2007), élément déclencheur du *switch angiogenic*, nous a amené à présupposer que LRP-1 pourrait être un acteur important de l'angiogénèse associée au cancer.

Les objectifs de ces travaux de thèse peuvent se diviser en plusieurs tâches :

Partie I

- **L'étude du potentiel tumorigénique du récepteur LRP-1 et son influence sur l'angiogenèse tumorale dans un modèle de TNBC *in vivo*.**

Ce premier objectif de ma thèse a consisté en l'établissement de modèles d'études cellulaires basées sur une stratégie d'interférence à l'ARN et leur validation *in vitro*. Nous avons poursuivi nos investigations en étudiant le rôle du récepteur LRP-1 lors de la tumorigenèse mammaire *in vivo* chez le petit animal. La mise en place d'un modèle de xénogreffe orthotopique et de tests angiogéniques, adossés à l'utilisation de modalités d'imagerie précliniques (IRM (MR SolutionsTM) et FMT) et à des analyses IHC, nous ont permis d'évaluer le potentiel tumorigénique conditionné par l'expression de LRP-1.

- **L'étude fonctionnelle et moléculaire *in vitro* de l'influence de LRP1 sur la composante vasculaire.**

La réalisation de ce deuxième objectif s'est focalisée sur la caractérisation du rôle de LRP-1 dans l'angiogenèse *in vitro*. Pour cela, un certain nombre d'études fonctionnelles *in vitro* ont été réalisées sur des cellules endothéliales afin d'évaluer le potentiel angiogénique de milieux conditionnés tumoraux (TCM). Cette seconde tâche comprend également l'analyse protéomique du sécrétome des cellules tumorales afin d'identifier les acteurs moléculaires responsables des effets biologiques observés.

Partie II

- **L'étude de l'influence de LRP-1 sur le potentiel métastatique des cellules tumorales.**

Pour être au plus proche des effets observés *in vivo*, nous avons entrepris l'évaluation des effets de l'hypoxie sur le sécrétome des cellules tumorales *in vitro*, tout en tentant d'évaluer le rôle du récepteur LRP-1 dans la modulation du potentiel métastatique des cellules tumorales, lors d'une étape cruciale : l'intravasation.

Materials &
MÉTHODES

Lignées cellulaires et culture

Les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 ont été achetées auprès de DSMZ (Braunschweig, Allemagne (DE)). Les cellules ont été cultivées dans du milieu complet composé de DMEM (1 g/L de glucose) supplémenté par 10% de Sérum de Veau Fétal (SVF) (ATCC® 30-2020™, LGC, Molsheim, France (FR)) et maintenues à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂. Pour toutes les expériences, les cellules ont été décollées en utilisant une solution de trypsine-EDTA 1X (Sigma Aldrich, St. Louis, États-Unis). Les cellules ont été rincées avec du tampon phosphate salin (PBS pour *phosphate-buffered saline*) à 37°C avant l'ajout de la trypsine, à raison de 1ml pour une T75. Les cellules sont remises à l'étuve à 37°C pendant 3 min, puis la réaction est arrêtée par l'ajout de milieux complet. Les cellules sont récupérées puis soumises à une centrifugation à 1000 rpm pendant 10 min. Le culot cellulaire résultant est repris dans un volume précis et les cellules sont comptées, pour êtreensemencée ou utilisée lors d'expériences.

Pour la réalisation de l'étude concernant l'expression de LRP-1, les lignées cellulaires de cancer du sein MCF-7 (ATCC® HTB-22™, LGC), T-47D (ACC 739, DSMZ), SK-Br3 (ACC 736, DSMZ), Hs-578T (ATCC® HTB-126™, LGC), BT-20 (ATCC® HTB-19™, LGC) et 4T1 (ATCC® CRL-2539™, LGC) ont également été utilisées. Les MCF7 ont été cultivées dans du milieu EMEM 10% SVF supplémenté par 0.1 mg/mL d'insuline recombinante ; Les T-47D dans du milieu RPIMI-1640 10% SVF ; Les SK-Br3 dans du milieu 5a (modifié) de McCoy 10% SVF ; Les Hs-578t dans du milieu DMEM 10% SVF supplémenté par 0.1 mg/mL d'insuline recombinante ; Les BT-20 dans du milieu EMEM 10% SVF et les 4T1 dans du milieu RPIMI-1640 10% SVF. Les cellules MDA-MB-231 métastasées au cerveau (MDA-MB-231 BR-GFP) ont été obtenues auprès du Dr Ribot Emeline, du centre de résonance Magnétique des systèmes biologiques (Université de Bordeaux, UMR 5536, CNRS), et ont été cultivées dans du DMEM (1 g/L de glucose) 10% SVF.

Les cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC) (C-12203) ont été achetées auprès de Promocell (Handschuhsheimer, DE) et les HUVEC-GFP marquées avec du GFP (ZHC-2402) ont été obtenues auprès de Cellworks (Buckingham, UK). Les cellules ont été cultivées dans du milieu basal EBM™-2 (CC-3156) supplémenté d'EGM™-2 SingleQuots™ (CC-4176) (Lonza, Walkersville, MD) contenant du SVF, de l'hydrocortisone, du hFGF-β, du VEGF, du IGF1-R3, de l'acide ascorbique, du hEGF, du sulfate de Gentamicin (GA-1000) et de l'héparine et maintenues à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂. Pour les différentes expériences, les cellules ont été utilisées à des passages compris entre 3 à 5. Les cellules ont été décollées à l'aide d'une solution d'Accutase® (C-41310; Promocell, Handschuhsheimer, DE). Les cellules ont été rincées avec du tampon phosphate salin PBS à 37°C avant l'ajout de l'Accutase®, à raison de 2 ml pour une T75. Les cellules sont laissées à température ambiante pendant 5 à 10 min pour leur permettre de se dissocier. Les cellules sont ensuite récupérées avec du milieux complet, comptées et ensemencées au besoin. Une centrifugation n'est pas nécessaire, l'arrêt de la réaction enzymatique se fera à 37°C.

Transfection cellulaire

shARN. Les cellules MDA-MB-231 ont été transfectées de manière stable avec le plasmide d'expression pOPRSV-1/MCS (Agilent Technologies, Courtaboeuf, Les Ulis, FR), contenant soit une séquence d'ARN interférant ciblant LRP-1 : AAG CAG TT GCC TGC AGA GAT (MDA-MB- 231 shLRP-1) ou une séquence de contrôle : CCA GTC GCC ATTA ATT ATG CAA (MDA-MB-231 shCtrl). La veille de la transfection, les cellules MDA-MB-231 WT ont étéensemencées à raison de 4.10^5 cellules/puits en plaques 6 puits. Pour chaque condition de transfection (shLRP-1 et shCtrl), 7,5 μ L de Lipofectamine 3000 (LF3000, ThermoFischer Scientific, Massachusetts, USA) diluée dans 125 μ L de milieu Opti-MEM sont préparés dans un microtube et vortexés 2-3s. Puis, les shARN stockés sur de la glace sont ajoutés à raison de 1 μ g dans 125 μ L d'Opti-MEM auxquels 2 μ L de P3000 Reagent (2 μ L/ μ g d'ADN) sont ajoutés au mélange. Les tubes contenant les shARN sont ajoutés à ceux contenant la LF3000 (ratio 1 :1 pour un volume total de 500 μ L/condition). Le mélange est incubé à température ambiante pendant 10 à 15 min. 250 μ L du mélange shARN/LF sont ensuite déposés sur les cellules, en gouttes à gouttes dans 2 ml de milieu complet à raison de deux puits par condition. 48h plus tard, le milieu est remplacé par du milieu complet contenant 800 μ g/mL de Généticine (G418; Sigma Aldrich, St. Louis, USA) permettant de sélectionner les cellules transfectées. Le changement de milieu est renouvelé toutes les 48 h pour éliminer les débris cellulaires et permettent la croissance de la population transfectée. Une fois que les cellules atteignent 75-80% de confluence dans les puits, elles peuvent être repiquées et utilisées. Pour maintenir la sélection des cellules transfectées, la généticine est ajoutée tous les 3 passages au milieu complet.

siARN. La veille de la transfection, les cellules MDA-MB-231 WT ont étéensemencées à raison de 4.10^5 cellules/puits en plaques 6 puits. Pour chaque condition de transfection (siLRP-1 et siCtrl), 3,75 μ L de LF3000 diluée dans 125 μ L de milieu Opti-MEM sont préparés dans un microtube et vortexés 2-3s. D'autre part, les siARN (ON-TARGETplus Human LRP1 siRNA, L-004721, Horizon discovery, Perkin Elmer, Waltham, USA) stockés sur de la glace sont dilués à 20 nM dans 125 μ L d'Opti-MEM. Les tubes contenant les siARN sont ajoutés à ceux contenant la LF3000 (ratio 1 :1 pour un volume total de 500 μ L/condition). Le mélange est incubé à température ambiante pendant 10 à 15 min. 250 μ L du mélange siARN/LF sont ensuite déposés sur les cellules, en gouttes à gouttes dans 2 ml de milieu complet à raison de deux puits par condition. 48h plus tard, les cellules sont trypsinées et les deux puits d'une même condition peuvent être regroupées et les cellules sont prêtes à être utilisées.

Traitement par RAP

RAP est produite au laboratoire dans un système procaryote sous forme de protéine recombinante. Ajoutée de manière exogène, RAP agit comme un antagoniste de LRP-1 avec une affinité de l'ordre du nanomolaire et va limiter son interaction avec la majorité de ses partenaires dont les protéines des contacts focaux. Le milieu de culture est retiré et les cellules sont lavées une fois au PBS. Du milieu de culture contenant RAP, utilisée à une concentration

de 19,5 µg/mL soit $5 \cdot 10^{-7}$ nM, est ajouté pendant une durée maximale d'1h. À l'issue de ce temps d'incubation, le milieu contenant RAP est renouvelé ou remplacé par le milieu de culture complet initial selon le besoin. Nous considérons que RAP agit pendant 24h.

Préparation des milieux conditionnés tumoraux (TCM)

48h. Les cellules MDA-MB-231 shLRP-1 ou shCtrl ont étéensemencées dans du milieu complet à raison de $3,2 \cdot 10^6$ cellules/flasques de culture T150. 48h après l'ensemencement, le milieu a été remplacé par 8 ml de DMEM contenant 1% de SVF. Après 48h d'incubation, le surnageant a été centrifugé à 10 000xg pendant 10 min. En parallèle, les cellules ont été récupérées et dénombrées en utilisant le compteur automatique Scepter™ 2.0, (Merck Millipore, Molsheim, FR). Les équivalents cellulaires entre les TCM shLRP-1 et shCtrl ont été obtenus en diluant le TCM le plus concentré avec du DMEM. Les TCM résultants, équivalents par paires, ont été stockés en aliquotes à 20°C pour éviter plusieurs cycles de congélation/décongélation.

24h. Les cellules MDA-MB-231 shLRP-1, shCtrl, siLRP-1 ou siCtrl ont étéensemencées dans du milieu complet à raison de $1,2 \cdot 10^6$ cellules/boîtes de culture B10 de 35 mm. 48h après l'ensemencement, 2 lavages PBS ont été réalisés et le milieu a été remplacé par 3,5 ml de DMEM ne contenant ni rouge de phénol ni SVF. Après 24h d'incubation, le surnageant a été centrifugé à 10 000xg pendant 10 min. En parallèle, les cellules ont été trypsinées et comptées à l'aide du Scepter™ 2.0 (Merck Millipore, Molsheim, FR). Les équivalents cellulaires entre les TCM shLRP1 et shCtrl ont été obtenus en diluant le TCM le plus concentré dans du DMEM. Les milieux conditionnés tumoraux résultants, équivalents par paires, ont été stockés comme mentionné ci-dessus.

Préparation des milieux conditionnés HUVECs stimulés par les TCM

Les HUVECs ont étéensemencées à raison de $1,2 \cdot 10^6$ cellules/boîtes de culture B10 de 35 mm. 24h après l'ensemencement, les cellules ont été lavées 2 fois avec du PBS puis le milieu a été remplacé par des TCM 24h de MDA-MB-231 shLRP-1 ou shCtrl. Après 24h d'incubation, les cellules ont été lavées 2 fois avec du PBS puis 3,5 ml de DMEM ne contenant ni rouge de phénol ni SVF ont été ajoutés. Après 24h d'incubation, le surnageant a été centrifugé à 10 000xg pendant 10 min. Les milieux conditionnés résultants ont été stockés en aliquotes à 20 °C pour éviter plusieurs cycles de congélation/décongélation.

Prolifération cellulaire

Les HUVECs ont étéensemencées dans des plaques à 96 puits à raison de $1 \cdot 10^4$ cellules/mL dans 100 µL de milieu complet. Après 24h, 2 lavages au PBS ont été réalisés et le milieu a été remplacé par 100 µL des TCM à tester ou des conditions de contrôle (EGM-2, EBM-2 et DMEM 0,8% SVF). Ensuite, 20 µL de MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) à une concentration de 5 mg/mL ont été ajoutés dans chaque puits après 0, 24, 48 et 72h de traitement par les TCM ou milieux de contrôle. Après 4h d'incubation, les milieux

sont aspirés puis 150 μL de DMSO (diméthylsulfoxyde) ont été ajoutés dans chaque puits. L'absorbance (densité optique, DO) à 560 nm contre 690 nm a été mesurée en utilisant un lecteur de microplaques (Tecan Infinite®, Mannedorf, Suisse) pour déterminer la concentration de formazan. Les résultats correspondent à la moyenne + SEM de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicat.

Migration endothéliale

Les HUVECs ont étéensemencées à une densité de $1,5 \cdot 10^5$ cellules/ cm^2 sur des filtres ThinCert™ pré-tapissés de fibronectine de plasma bovin (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) à 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pendant une nuit. Le surplus a été éliminé puis les inserts sont laissés à sécher pendant 30 min sous une hotte à flux laminaire. Les puits inférieurs ont été remplis avec 800 μL d'EGM-2, d'EBM-2, de DMEM 0,8% SVF ou des TCM 48h à tester contenant 182 μL de DMEM 3,5% SVF frais (pour atteindre une concentration finale de 0,8% SVF). Par la suite, 200 μL d'une solution d'HUVECs ajustée à $5 \cdot 10^4$ cellules/ml dans de l'EBM-2 ont été ajoutés dans le puits supérieur de chaque insert. Les plaques de 24 puits ont été incubées à 37°C en atmosphère humide en présence de 5% de CO_2 . Après 8h, le milieu de chaque compartiment a été retiré et remplacé par du méthanol froid pendant 15 min à température ambiante pour fixer les cellules. Les inserts ont ensuite été rincés par bains successifs dans l'eau distillée. Les cellules n'ayant pas migrées sur le puits supérieur de l'insert ont été éliminées à l'aide d'un coton-tige. Les membranes ont été excisées des inserts et montées sur des lames d'observation microscopiques avec le milieu de montage *ProLong® Gold Antifade* (contenant du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole)) (Invitrogen, Waltham, USA). Les cellules ayant migrées ont été comptées sur 9 champs microscopiques aléatoires par membrane en utilisant un microscope à fluorescence (X20) (Evos, Thermofisher Scientific, Massachusetts, USA) couplé à une caméra. Les résultats correspondent à la moyenne + SEM de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicat.

Dosage de l'activité plasmine (S-2251™)

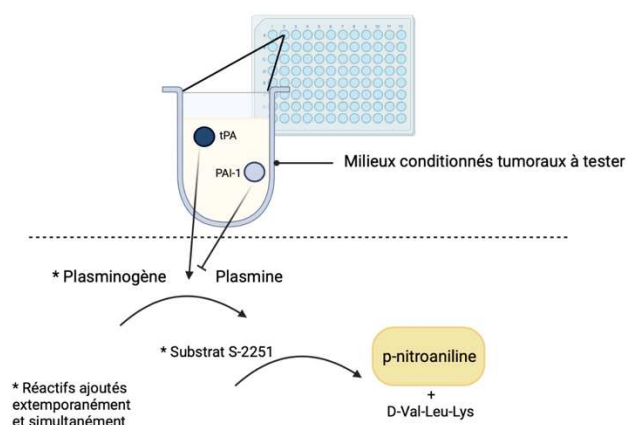


Figure 60 : Représentation schématique du dosage de l'activité plasmine avec le S-2251™

Un substrat chromogène sélectif pour la plasmine, le S-2251™ (Chromogenix, Diapharma, Westchester, USA), a été utilisé pour suivre la conversion du plasminogène. Les TCM ont été

mélangés avec un tampon contenant 0,1 M de Tris-HCl pH 7,8 et 20 µl de Plasminogène EACA reconstitué à 10U/ml (Calbiochem, Darmstadt, DE). Pour initier la réaction, 20 µl d'une solution de S-2251TM (3,5 mM) ont été ajoutés dans chaque puit. La génération de plasmine a été détectée en mesurant l'absorbance de la libération de p-nitroaniline toutes les 30 min à 405 nm pendant 20h (Tecan Infinite®, Mannedorf, Suisse).

Formation de pseudotubes sur Matrigel®

La veille de l'expérience, du Matrigel® réduit en facteur de croissance (GFR pour *Growth Factor Reduced*) (Corning®, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) a été décongelé sur de la glace à 4°C. Dix microlitres de Matrigel® GFR ont ensuite été déposés dans chacun des puits d'une plaque *µ-Slide Angiogenesis ibiTreat* pré-refroidie (ibidiTM, Martinsried, DE) sur un lit de glace pendant 15 min et la plaque a été incubée à 37°C pendant 30 min. 1,5.10⁴ cellules HUVECs GFP ont étéensemencées dans 50 µl de TCM à tester ou des milieux de culture contrôles, à savoir EGM-2, EBM-2, DMEM 0,8% SVF. La plaque a ensuite été incubée à 37°C en atmosphère humide en présence de 5% de CO₂ pendant 8h. Après 8h à 37°C, les cellules ont été imagées à un grossissement ×4 sur un microscope inversé Nikon eclipse 300 (fabricant) couplé à une caméra. La longueur totale du réseau, le nombre de nœuds et de jonctions ont été analysés à l'aide du logiciel AutoTube. Les expériences ont été réalisées 3 fois de manière indépendantes et en triplicats

Migration transendothéliale

Une solution d'HUVECs GFP à 3,75.10⁵ cellules/ml a été préparée dans du milieu EGM-2 et 200 µl (soit 75000 cellules) ont été déposés sur les membranes des inserts ThinCertTM pré-tapissées de fibronectine de plasma bovin (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) à 7 µg/ml pendant une nuit. Le puits inférieur a également été rempli avec du milieu complet (800 µL) pour permettre aux cellules de proliférer jusqu'à former une monocouche sur la membrane. 48h plus tard, les cellules tumorales à 75% de confluence en T25 ont été marquées au Cell TrackerTM Red CMTPX (C34552, Invitrogen, Waltham, USA) de la manière qui suit. 50 µg de réactif Cell TrackerTM ont été reconstruits dans 7,29 µl de DMSO stérile pour atteindre une solution stock de 10 mM. Cette solution est ensuite diluée au 1/666 (15 µM) dans 4,85 ml de milieu DMEM 2% SVF. 2 ml de cette solution Cell TrackerTM est ajoutée à un culot cellulaire de 2.10⁵ cellules tumorales. Les cellules sont incubées 45 min à 37°C avant d'êtreensemencées. Une nouvelle plaque 24 puits est utilisée et les inserts contenant les HUVECs y sont transférés en prenant soin d'aspirer délicatement le milieu des cellules endothéliales contenu dans les inserts sans perturber la monocouche. La monocouche est ensuite rincée avec du DMEM sans SVF. La solution cellulaire tumorale est ajoutée sur la monocouche d'HUVECs à raison de 300 µl (soit 30000 cellules) et le puits inférieur est rempli de DMEM 10% SVF. Les plaques ont ensuite été incubées à 37°C en atmosphère humide en présence de 5% de CO₂ et 21% d'O₂ (normoxie) ou 1% d'O₂ (hypoxie) pendant 8h ou 15h. Pour la condition hypoxique, les cellules tumorales ont été placées 24h en hypoxie avant d'être marquées puisensemencées pour la migration. Après le temps imparti d'incubation, le milieu a été retiré et remplacé par du PAF 2% pendant

15 min à 37°C pour fixer les cellules. Les inserts ont ensuite été rincés par bains successifs dans du PBS. Les cellules n'ayant pas migrées sur le puits supérieur de l'insert ont été éliminées à l'aide d'un coton-tige. Les membranes ont été excisées des inserts et montées sur des lames d'observation microscopiques avec le milieu de montage *ProLong® Gold Antifade* (contenant du DAPI (4'6-diamidino-2-phénylindole)) (Invitrogen, Waltham, USA). Les cellules ayant migrées ont été comptées sur 5 champs microscopiques aléatoires par membrane en utilisant un microscope à fluorescence (X30) (EvoS, Thermofisher Scientific, Massachusetts, USA) couplé à une caméra. Les résultats correspondent à la moyenne + SEM de 2 expériences indépendantes au minimum réalisé en triplicat.

Extraction des protéines totales et immunoblotting

A partir de cultures cellulaires. Des cellules ensemencées en B10 à 80-90% de confluence ont été rincées au PBS froid à deux reprises, puis lysées sur la glace par ajout de 300 µL de tampon (HEPES 50mM (m/v) pH 7,6 ; NaCl 100mM (m/v) ; EDTA 20mM (m/v)) auxquels il a été ajouté extemporanément 1% (v/v) de Triton X-100, du PMSF (1/100), du Na₃VO₄ 125mM (1/100), du PIC (1/500)). Les cellules sont décollées de leur support par grattage et le lysat résultant est récupéré en microtubes eppendorf de 1,5ml. Stockés sur de la glace, les lysats sont vortexés toutes les 5min pendant 45min afin de permettre la solubilisation des protéines membranaires. Le matériel insoluble est éliminé par centrifugation à 4°C pendant 15min à 10 000xg. Le surnageant est récupéré et conservé à -20°C.

A partir d'extraits tumoraux. Les tubes contenant jusqu'à 50mg de poudre de lyophilisats de tumeur conservés à sec à -80°C sont récupérés et posés sur un lit de glace puis 1ml de tampon de lyse, décrit précédemment, est ajouté. Maintenu dans la glace, le lysat est vortexé toutes les 5min pendant 45min. Le matériel insoluble est éliminé par centrifugation et le surnageant est stocké comme décrit précédemment.

Les échantillons sont soumis à un dosage protéique selon la méthode au BCA à partir du kit BCA Protein Assay (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA). Les concentrations protéiques sont déterminées par comparaison à une gamme étalon, réalisée à partir de BSA (0 à 200 µg/mL).

Les échantillons sont repris dans du tampon d'échantillon (Tris-HCl 500 mM pH 6,8 ; bleu de bromophénol 0,5% (m/v) ; SDS 10% (m/v) ; saccharose 20% (m/v) ; avec β-Mercaptoéthanol 10% (v/v)). Les protéines sont soumises à une électrophorèse en gel de polyacrylamide à 8 ou 10%, et contenant 0,1% de SDS. La migration se fait 30 min à 60V puis 1h à 100V dans du tampon de migration (Tris-HCl 25mM pH 8,3 ; Glycine 192mM ; SDS 0,1% (m/v)). Après leur migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (GE Healthcare, Illinois, USA). Le transfert est réalisé à 70V de 1h30 à 3 heures selon les protéines à étudier, à 4°C, dans du tampon de transfert (Tris/HCl 25mM ; Glycine 192mM ; Ethanol 20% (v/v) ; pH 8,3). La membrane est colorée de manière réversible au rouge Ponceau (Rouge Ponceau S 0,2%

(m/v), TCA 3% (m/v)) afin de vérifier l'efficacité du transfert et d'effectuer la découpe de la membrane en fonction du poids moléculaire attendu des protéines étudiées. Après rinçage au TBS-T (Tris-HCl 20mM (m/v) pH 7,5 ; NaCl 150mM (m/v) ; Tween 20 0,1% (v/v)), la membrane est incubée 1h à température ambiante dans une solution de saturation TBS-T 5% (m/v) de lait écrémé ou 3% de BSA (m/v) selon les propriétés et la spécificité de l'anticorps primaire. Les membranes sont incubées sur la nuit à 4°C en présence de l'anticorps primaire, dilué dans une solution TBS-T contenant 1% (m/v) de lait écrémé ou 2% (m/v) de BSA : Anti-LRP-1 [EPR3724] (1/10000, monoclonal de lapin, ab92544, Abcam, Cambridge, UK); Anti-GAPDH (14C10) (1/10000, monoclonal de lapin, #2118, Cell Signaling, Massachusetts, USA); Anti-HIF-1 α (D1S7W) XP® (1/1000, monoclonal de lapin, #36169, Cell Signaling, Massachusetts, USA). Après 3 lavages de 10 min au TBS-T pour éliminer les anticorps primaires non liés, les membranes ont été incubées 1h à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire, dirigé contre une portion espèce-spécifique de l'anticorps primaire. Après 3 lavages de 10 min au TBS-T, les protéines ont été révélées par chimioluminescence (kit ECLTM (enhanced chemiluminescent) ou kit ECL PrimeTM, Merck Millipore, Molsheim, FR) via l'utilisation du système Odyssey (Li Cor, Hambourg, DE). Après révélation, la membrane est rincée au TBS-T, séchée et conservée à sec à 4°C.

Isolement des ARN totaux et PCR en temps réel

Les analyses des transcrits (ARNm) ont été effectuées sur des échantillons cellulaires ou tumoraux de cancer du sein. L'ARN total a été isolé en utilisant le réactif Extract-All (Eurobio, Les Ulis, FR) directement sur les cellules cultivées en B10 préalablement lavées au PBS (2 fois) pour les échantillons cellulaires, ou sur les poudres d'extraits tumoraux culotées en eppendorf 2ml pour les échantillons tumoraux. Les échantillons ont été traités à la DNase (RQ1 RNase-Free DNase, Promega, Wisconsin, USA) en suivant les instructions du fabricant. La qualité des ARN a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %. La concentration d'ARN total (ng/ μ L) a été mesurée à 260 nm en utilisant un NanoDropTM One (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA) et pour chaque échantillon, 250 ng d'ARN total ont été utilisés pour la transcription inverse en utilisant le kit VERSO cDNA (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA) selon les instructions du fabricant en utilisant un mélange d'amorces hexamères aléatoires et d'oligo dT ancrés. Les niveaux de transcrits ont été déterminés par quantification en temps réel à l'aide d'un mélange Absolute SYBR Green Rox (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA), sur un système de détection PCR en temps réel CFX 96 touch (Bio-Rad, Californie, USA). Les réactions PCR ont été réalisées en double dans des plaques 96 puits (15 μ l par puits) dans un tampon contenant le SYBR Green mix 1x (incluant la Taq polymérase, les dNTP et le colorant SYBR Green), 280 nM d'amorces directes et inverses, et une dilution 1:10 de ARN de transcription inverse. Après dénaturation à 95°C pendant 15 min, l'amplification s'est produite en deux étapes : 10s de dénaturation à 95°C et 45s d'anneau/extension à 60°C, avec un total de 40 cycles. Des conditions de cyclage thermique identiques ont été utilisées pour toutes les cibles. La spécificité de l'amplification PCR a été vérifiée en utilisant une courbe de dissociation thermique de 65°C à 95°C après le cycle final. Les valeurs de seuil de cycle (Ct) ont été enregistrées avec le logiciel Bio-Rad CFX ManagerTM 3.1 (Bio-Rad, Californie, USA). Des

amorces spécifiques ont été dessinées à l'aide des logiciels Primer3 et BLAST (National Center for Biotechnology Information) et sont présentées dans le tableau ci-dessous (Tab. 13). L'efficacité de la PCR des jeux d'amorces a été calculée en effectuant une PCR en temps réel sur des dilutions en série et était de 90 % à 110 %. Pour chaque expérience, les réactions PCR ont été réalisées en double et 3 expériences indépendantes ont été analysées. L'expression génique relative a été déterminée avec la formule de multiplication par induction : $2^{-\Delta\Delta C_t}$, où $\Delta\Delta C_t = (C_t \text{ GI [échantillon inconnu]} - C_t \text{ GI [échantillon de référence]}) - (C_t \text{ gènes de référence [échantillon inconnu]} - C_t \text{ gènes de référence [échantillon de référence]})$. GI est le gène d'intérêt. RS18 et RPL32 ont été utilisés comme contrôles internes. L'échantillon de référence est l'échantillon MDA-MB-231 WT ou shCtrl, choisi pour représenter 100 % de l'expression GI. Les moyennes $\pm$ SEM proviennent de 3 expériences indépendantes réalisées en double.

Gene	Forward Primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>LRP-1</i>	GCTATCGACGCCCTTAAGAC	CGCCAGCCCTTTGAGATACA
<i>VEGF121</i>	ATCTTCAAGCCATCCTGTGTGC	TCGGCTTGTCACATTTTCTTG
<i>VEGF165</i>	ATCTTCAAGCCATCCTGTGTGC	CAAGGCCACAGGGATTTTC
<i>VEGF189</i>	ATCTTCAAGCCATCCTGTGTGC	CACAGGGAACGCTCCAGGAC
<i>VEGF all</i>	GCAGAATCATCACGAAGTGG	GCATGGTGATGTTGGACTCC
<i>RS18</i>	GCAGAATCCACGCCAGTACAA	GCCAGTGGTCTTGGTGTGCT
<i>RPL32</i>	CATTGGTTATGGAAGCAACAAA	TTCTTGAGGAAACATTGTGAG

Tableau 13 : Primers PCR utilisés

Études *in vivo*

Des souris (femelles Balb/c nude âgées de 5-6 semaines) fournies par la société Janvier (Labs Janvier, Le Gnest-Saint-Isle, FR) ont été hébergées dans des cages ventilées sous air filtré et acclimatées pendant une semaine avant manipulation. Les expérimentations animales ont été approuvées et réalisées dans le respect des règles déontologiques sous le numéro d'autorisation APAFIS#4373-2016030410575189 vI « Etude de l'implication du récepteur LRP-1 dans les modèles TNBC chez la souris » délivrée par l'administration de l'enseignement supérieur et de la recherche rattachée au Ministère de l'Éducation Nationale. Toutes les procédures ont été réalisées sous anesthésie générale induite par inhalation de 3% d'isoflurane pour l'induction et à 1,5% pour le maintien pendant l'imagerie. Pour toutes les expériences, les souris anesthésiées ont été maintenu à 37°C à l'aide d'une plaque chauffante.

Modèle de xénogreffe orthotopique

Les cellules MDA-MB-231 shLRP-1 ou shCtrl ont été récupérées à l'aide d'Accutase®, comptées puis mises en suspension dans une solution cellulaire à $5 \cdot 10^7$ cellules/ml avant inoculation. Deux groupes de 12 souris ont été utilisés et ont reçu une injection de 100 μ l (5×10^6 cellules) shctrl ou shLRP-1 dans le coussinet adipeux de la 4^{ème} glande mammaire. La croissance tumorale a été évaluée en mesurant la longueur (A) et la largeur (B) avec un pied à coulisse

numérique 2 fois par semaine. Les volumes ont été calculés en utilisant la formule suivante : $1/2(A \times B^2)$. Les souris ont été sacrifiées 28 jours après l'inoculation. Après excision, une partie des tissus tumoraux a été fixée dans du paraformaldéhyde à 4% (Sigma Aldrich, Saint-Louis, USA) pendant 24h avant d'être inclus dans de la paraffine pour parfaire une analyse immunohistochimique. L'autre partie des échantillons a été immergée dans de l'azote liquide, transférés dans des flacons adéquats et stockés à -80°C . Le broyage cryogénique de ces échantillons tumoraux a été réalisé à l'aide d'un vibro-broyeur MM 400 (Retsch, Haan, DE). Les échantillons sont ainsi fragmentés et homogénéisés en quelques secondes sous l'effet de l'impact et du frottement générés entre les billes et la paroi intérieure du bol de broyage contenant de l'azote liquide. La poudre résultante est ensuite directement utilisée pour en extraire les protéines ou les ARNs.

Matrigel® Plug

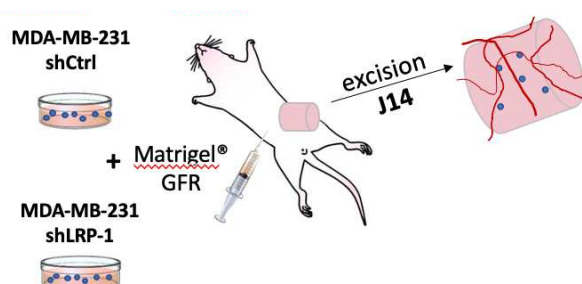


Figure 61 : Protocole de Matrigel® Plug

2.10^5 cellules MDA-MB-231 shLRP-1 ou shCtrl ont été mises en suspension dans 0,1 ml de milieu DMEM 1g/L, mélangées à 0,4 ml de Matrigel® GFR (Corning®, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) et implantées en sous-cutanée dans le flanc de souris femelles BALB/c-nu de 7 semaines (Labs Janvier, Le Genest-Saint-Isle, FR) ($n=12/\text{groupe}$). 21 jours après l'injection, les animaux ont été sacrifiés et les Matrigel® plug ont été excisés, photographiés et fixés dans du paraformaldéhyde 4% (Sigma Aldrich, Saint-Louis, USA) pour être analysés histologiquement.

Modèle de membrane chorio-allantoïde de poulet (CAM pour *Chick Chorioallantoic Membrane*)

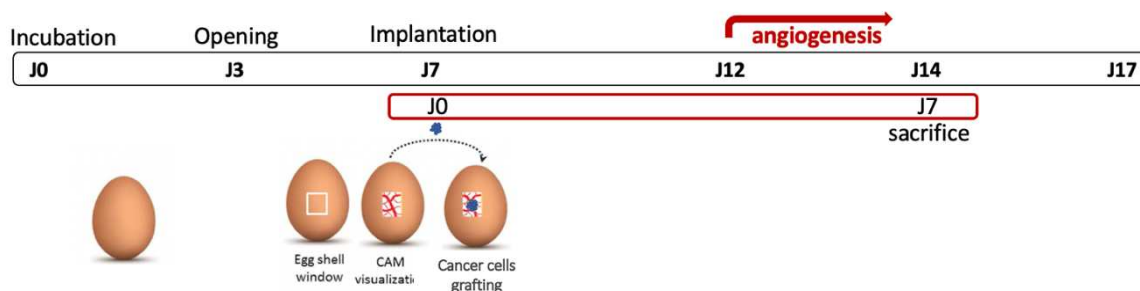


Figure 62 : Protocole de CAMs assay

Cette expérience a été réalisée en collaboration avec le Prof. Bikfalvi et le Dr. Billottet (LAMC INSERM U1029, Bordeaux University). Des œufs de poule fertilisés (EARL Les Bruyères, FR)

ont été incubés à 37°C dans 65% d'atmosphère humidifiée dans un incubateur rotatif permettant des rotations de 25 degrés toutes les 6 heures. Au 3^{ème} jour du développement embryonnaire, une ouverture a été réalisée dans la coquille des œufs et scellée avec un film adhésif (ruban Durapore). Au 10^{ème} jour embryonnaire, une fois la membrane chorio-allantoïde complètement formée, une légère lacération de sa surface a été effectuée à l'aide d'un scalpel et des anneaux en plastique (fabriqués à partir de lamelles Nunc Thermanox) ont été placés à sa surface. Quatre millions de cellules MDA-MB-231 shLRP-1 ou shCtrl ont été déposées en couche mince à l'intérieur de l'anneau en plastique. Au 17^{ème} jour, les CAMs ont été fixées *in vivo* avec du paraformaldéhyde à 4% pendant 30 min à température ambiante. La zone contenue dans l'anneau a été découpée et incluse dans de l'OCT (*Optimal cutting temperature compound*) ou directement congelée dans de l'azote liquide, pour une analyse plus approfondie. Les photos numériques ont été prises au stéréomicroscope (Nikon SMZ800, Tokyo, Japon). L'analyse quantitative a été réalisée en utilisant une macro développée sous MATLABTM par le Dr El-Hadi Djermoune.

Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)

Les images ont été acquises à l'aide de :

- Une séquence d'écho de spin rapide (FSE) coronale pondérée en T2 avec un temps d'écho (TE)/temps de répétition (TR)= 68/5000 ms ; Champ de vision= 60mm x 60 mm ; Épaisseur de tranche= 1mm ; Matrice= 512 x 240 (avec suréchantillonnage 2x dans la direction de lecture) avec zéro remplissage= 512 x 256 pendant la reconstruction (Résolution= 0,234 mm × 0,25 mm) ; Longueur du train d'écho= 8, Nombre de moyennes = 1 ; Largeur de bande effective du récepteur (BW) = 20 kHz ;
- Une séquence d'écho de spin rapide (FSE) transversale pondérée en T2 avec un temps d'écho (TE)/temps de répétition (TR) = 68/5000 ms ; Champ de vision= 40 mm x 40 mm ; Épaisseur de tranche= 1 mm ; Matrice= 256 x 240 avec un rembourrage à 256 x 256 lors de la reconstruction (Résolution = 0,156 mm × 0,167 mm) ; Longueur du train d'écho= 8 ; Nombre de moyennes= 2, Bande passante du récepteur (BW) = 20 kHz ;
- Une séquence d'écho spin rapide (FSE) pondérée en T1 avec un temps d'écho (TE)/temps de répétition (TR)= 11/720 ms ; Champ de vision= 16 mm x 16 mm x 16 mm ; Matrice= 128 x 128 x 80 (Résolution = 0,125 mm × 0,125 mm × 0,2 mm) ; Longueur du train d'écho= 4 ; Nombre de moyennes= 2 ; Angle de retournement= 40° ; Bande passante (BW) = 100 kHz;

La perfusion a été mesurée en DCE (*Dynamic Contrast Enhancement*)-MRI (TR= 60 ms ; Angle de bascule= 25° et un total de 105 expériences) après une injection intraveineuse d'un bolus de 100 µL de gadolinium (ClariscanTM, GE Healthcare, Illinois, USA) soit une concentration de 0,2mmol/Kg à partir de l'expérience 6/105 pour garder une ligne de base sans produit de contrast. Le temps total d'imagerie du DCE était de 20 min pour une durée d'imagerie totale d'environ 40 minutes en comptant les imageries morphologiques. Les analyses d'intensité ont

été réalisées après reconstruction 4D avec le logiciel OsiriX (Pixmeo, Genève, Suisse) en utilisant le plugin d'amélioration des ROI (*Region Of Interest*).

Imagerie optique

L'imagerie optique ou tomographie moléculaire de fluorescence (FMT) a été réalisée à l'aide d'un scanner FMT-4000 (PerkinElmer, Waltham, USA) préalablement calibré selon les instructions du fournisseur. La quantification de la fluorescence a été effectuée avec le logiciel TrueQuant 3.0 (PerkinElmer, Waltham, USA). Les agents de contraste AngioSense™-750/AngioSense™-680 ou HypoxiSense™-680 ont été utilisés, avec un filtre d'excitation de 750 ± 3 nm ou 670 ± 3 nm, respectivement et un filtre d'émission de 690-740 nm. Les acquisitions en trans-illumination 3D et 2D ont été réalisées 24h après l'injection intraveineuse de 100 µl du produit de contraste. Un régime sans chlorophylle a été prescrit aux souris imagées au moins deux semaines avant la première imagerie et pendant toute la durée de l'expérience pour limiter le phénomène d'auto-fluorescence.

Immunohistochimie et Immunofluorescence

Concernant les expériences d'immunohistochimie, un anticorps primaire anti-CD31 [EPR17259] (1/100, monoclonal de lapin, ab18298 ; Abcam, Cambridge, UK) et anti-VEGF (C-1) (1/100, monoclonal de lapin, sc-7269 ; Santa-Cruz, Californie, USA) ont été utilisés. Les coupes 3 µm ont été réalisées à l'aide d'un microtome et déposées sur des lames d'observation Superfrost+, séchées puis conservées à 37°C. Le lendemain, les lames ont été déparaffinées au moyen de bain successif de xylène et d'alcool à 100°, 95° et 70°. Elles ont été chauffées au bain marie à 95°C pendant 40 min. Après 20 min de refroidissement à RT, elles ont été lavées à l'eau distillée. Les réactifs Peroxydase Block et le Protein Block du kit Novolink Polymer Detection System (RE7150-K, Leica Biosystem, Wetzlar, DE) ont été utilisés selon les consignes du fournisseur. Ensuite, les lames ont été incubées en chambre humide avec l'anticorps primaire diluée dans du tampon de dilution Emerald Antibody diluent (F/936B-03 ; Cell Marque™, MMFrance, Torcy, FR) à 4°C pendant une nuit. Les réactifs Post Primary Block et le Novolink Polymer du kit Novolink précédemment mentionnés ont été utilisés selon les consignes du fournisseur. Après les lavages, 200 µl de DAB (diaminobenzidine) ont été déposés sur les lames pendant 10 min à RT. Après quelques secondes de lavage à l'eau, les lames ont été contrecolorées à l'hématoxyline 5 min, de nouveau lavées puis montées d'une lamelle avec du milieu de montage Eukitt® (Kinder GmbH, Breisgau, DE).

Pour les expériences d'immunofluorescence, l'anticorps primaire anti-Vimentine (V6) (1/100, monoclonal de souris, sc-6260; Santa Cruz, Californie, USA) a été utilisé. Les CAMs ont été cryofixés dans une solution d'OCT (*Optimal Cutting Temperature*, Dutscher, France) refroidi à l'azote liquide, puis conservés à -80°C. Les blocs ont été coupés au cryostat à une épaisseur de 6 µm et déposés sur des lames SuperFrost+ conservées à -20°C. Pour le marquage, les coupes sont remises à température ambiante et réhydratées par une succession de lavages au PBS (3 x 5 min). Une perméabilisation des cellules est réalisée avec du PBS-T (PBS Triton X-100 0,1%)

pendant 10 min, puis un rinçage au PBS (3 x 5 min) est effectué. Les lames sont ensuite incubées 30 min à température ambiante dans une solution de blocage (TBS (PBS + 0,2% Tween 20) + 1% de BSA + 22,52 mg/mL de glycine). L'anticorps primaire dilué dans du TBS PBS-BSA 2% est incubé une nuit à 4°C en chambre humide. 6 lavages de 3 min au PBS sont effectués, puis l'anticorps secondaire est ajouté dilué dans du PBS-BSA 2% pendant 1 heure à température ambiante à l'abri de la lumière. Les coupes sont par la suite incubées pendant 30 min à température ambiante avec du DAPI (4',6-diamidino-2phénylindole, marquage nucléaire). Après rinçage au PBS, les lames sont finalement montées avec des lamelles avec du milieu de montage *ProLong™ Gold Antifade* (Invitrogen, Californie, USA) puis vernis.

Des contrôles positifs et négatifs appropriés ont été utilisés tout au long des expériences.

ProtéomeProfiler™

Les kits de screening *ProteomeProfiler™ Human Angiogenesis* (55 protéines, #ARY007, R&D Systems, Minneapolis, USA) et *ProteomeProfiler™ Human Protease Inhibitor* (32 protéines, #ARY022, R&D Systems, Minneapolis, USA) en respectant les instructions du fabricant. Des anticorps de capture sélectionnés étaient préalablement déposés en double sur des membranes de nitrocellulose. Les membranes ont été saturées, puis incubées dans les milieux conditionnés tumoraux à tester, et mélangés avec un cocktail d'anticorps de détection biotinylés. Tout complexe protéine/anticorps de détection présent est lié par son anticorps de capture apparenté immobilisé sur la membrane. La streptavidine-peroxydase de raifort et des réactifs de détection chimioluminescents sont ajoutés et un signal est produit proportionnellement à la quantité de protéine liée. La chimioluminescence est détectée de la même manière qu'un Western blot.

Protéomique quantitative sans marquage

L'analyse protéomique a été réalisée par la plateforme de protéomique de l'Université de Bordeaux (<https://proteome.cgfb.u-bordeaux.fr/en>). Les étapes de préparation des échantillons et de digestion des protéines ont été réalisées comme décrit précédemment (Henriet et al., 2017). Les analyses NanoLC-MS/MS ont été réalisées à l'aide d'un système Ultimate 3000 RSLC Nano-UPHLC (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA) couplé à un spectromètre de masse nanospray Orbitrap Fusion™ Lumos™ Tribrid™ (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Chaque extrait peptidique a été chargé sur une précolonne PepMap C18 de 300 µm ID x 5 mm (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA) à un débit de 10 µL/min. Après une étape de dessalage de 3 min, les peptides ont été séparés sur une colonne EasySpray de 50 cm (75 µm ID, 2 µm de billes C18, 100 000 de taille de pores, ES803A rev.2 (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA)) avec un gradient linéaire de solvant B de 4 à 40 % (0,1 % d'acide formique dans 80 % d'ACN) en 115 min. Le débit de séparation a été fixé à 300 nL/min. Le spectromètre de masse fonctionnait en mode ion positif à une tension d'aiguille de 2,0 kV. Les données ont été acquises à l'aide du logiciel Xcalibur 4.1 dans un mode dépendant des données. Les balayages MS (m/z 375-1500) ont été enregistrés à une résolution de R= 120 000 (@ m/z 200) et une cible AGC de 4×10⁵ ions collectés en 50 ms, suivi d'un

cycle de service à vitesse maximale allant jusqu'à 3 secondes pour l'acquisition MS/MS. Les ions précurseurs (2 à 7 états de charge) ont été isolés dans le quadripôle avec une fenêtre de masse de 1,6 Th et fragmentés avec une énergie de collision normalisée HCD@30%. Les données MS/MS ont été acquises dans le piège à ions avec un mode de balayage rapide, une cible AGC de 3×10^3 ions et un temps d'injection maximum de 300 ms. Les précurseurs sélectionnés ont été exclus pendant 60 secondes. L'identification des protéines et la quantification sans marquage (LFQ) ont été effectuées dans Proteome Discoverer 2.4. Les algorithmes MS Amanda 2.0, Sequest HT et Mascot 2.4 ont été utilisés pour l'identification des protéines en mode batch en recherchant dans une base de données Uniprot Homo sapiens (75 093 entrées, sortie le 20 mai 2020). Deux clivages enzymatiques manqués ont été autorisés. Les tolérances de masse en MS et MS/MS ont été fixées à 10 ppm et 0,6 Da. L'oxydation (M), l'acétylation (K) et la désamidation (N, Q) ont été recherchées en tant que modifications dynamiques et la carbamidométhylation (C) en tant que modification statique. La validation des peptides a été réalisée à l'aide de l'algorithme Percolator (Käll et al., 2007). et seuls les peptides « de confiance élevée » ont été retenues, ce qui correspond à un taux de fausses découvertes de 1 % au niveau du peptide. Le nœud détecteur de caractéristiques Minora (LFQ) a été utilisé avec le mappeur de caractéristiques et le quantificateur d'ions précurseurs. Les paramètres de normalisation ont été sélectionnés comme suit : (1) Peptides uniques ; (2) Abondance des précurseurs basée sur l'intensité ; (3) Mode de normalisation : quantité totale de peptides ; (4) Calcul de l'abondance des protéines : abondances sommées ; (5) Calcul du ratio des protéines : paire basée sur le ratio ; et (6) Test d'hypothèse : test t (basé sur le contexte). Des données quantitatives ont été prises en compte pour les protéines maîtres, quantifiées par un minimum de 2 peptides uniques, un facteur de changement supérieur à 2 et une valeur p statistique inférieure à 0,05. Les données protéomiques de spectrométrie de masse ont été déposées au Consortium ProteomeXchange via le référentiel partenaire PRIDE (Deutsch et al., 2020) avec l'identifiant de jeu de données PXD022978.

RÉSULTATS

– Partie I –

Quel est l'implication du récepteur LRP-1 *in vivo* dans la progression du cancer mammaire triple négatif ?

Module-t-il l'angiogénèse tumorale *in vivo* ?

*
**

Comment le récepteur LRP-1 des cellules tumorales influence-t-il le comportement endothélial *in vitro* ?

Quels sont les acteurs moléculaires associés à ces effets ?

– Partie I (a) –

Implication du récepteur matricellulaire LRP-1 dans l'angiogenèse du cancer mammaire triple négatif

Océane Champion^{1,2}, Jessica Thevenard Devy^{1,2}, Clotilde Billottet³, Christophe Schneider^{1,2}, Nicolas Etique^{1,2}, Jean-William Dupuy⁴, Anne-Aurélien Raymond⁵, Camille Boulagnon Rombi^{2,7}, Marie Meunier^{1,2}, El-Hadi Djermoune⁶, Elodie Lelièvre^{1,2}, Amandine Wahart^{1,2}, Camille Bour^{1,2}, Cathy Hachet^{1,2}, Andréas Bikfalvi³, Stéphane Dedieu^{1,2}, Jérôme Devy^{1,2*}

¹ Université de Reims Champagne-Ardenne, UFR Sciences Exactes et Naturelles, 51687 Reims Cedex 2, France

² CNRS UMR 7369, Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire, MEDyC, Reims, France

³ INSERM, LAMC, U1029, University Bordeaux, Pessac, France

⁴ Université de Bordeaux, Plateforme Protéome, F-33000, Bordeaux, France.

⁵ Plateforme Oncoprot, TBM-Core US 005, F-33000 Bordeaux, France

⁶ Université de Lorraine, CNRS, CRAN, F-54000 Nancy, France

⁷ Laboratoire d'Anatomie Pathologie, CHU Reims, F-51100 Reims, France

*Corresponding author: Jerome.devy@univ-reims.fr

Contexte - Le cancer du sein, en tant que cancer le plus diagnostiqué chez les femmes dans le monde et principale cause de décès par cancer, est une maladie hétérogène caractérisée par divers phénotypes et une hétérogénéité considérable des caractéristiques moléculaires et histopathologiques¹. Le cancer du sein triple négatif (TNBC) représente environ 15% des cancers mammaires et se caractérise par la non-expression du récepteur aux œstrogènes, du récepteur à la progestérone et l'absence de surexpression et/ou d'amplification de HER2⁵. En l'absence de ces trois marqueurs, les patients atteints de TNBC ne bénéficient pas des thérapies systémiques ciblées, telles que les thérapies hormonales ou celles à base de trastuzumab. Ainsi, le TNBC, restant réfractaire aux avancées des thérapies ciblées et conventionnelles³, exige l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques afin d'améliorer les options de traitement. Le récepteur LRP-1 (Low-density lipoprotein receptor-related protein 1), appartenant à la famille des LDLR, régule de nombreuses fonctions cellulaires par le biais de ses interactions avec diverses molécules de l'environnement péricellulaire, des protéines transmembranaires ou encore des adaptateurs intracellulaires. Défini comme un « mécano-senseur » du microenvironnement, LRP-1 est impliqué dans la dynamique du protéome membranaire, élément central de la progression tumorale. Une étude anatomopathologique a révélé que LRP-1 semblait majoritairement surexprimé dans les cancers mammaires triple négatifs et HER2+ par rapport aux autres sous-types¹⁷. Ceci nous a amené à nous intéresser à son implication dans la progression des TNBC et plus particulièrement au rôle qu'il pourrait jouer dans le contrôle de l'équilibre angiogénique.

Méthodes - L'implication du récepteur LRP-1 dans le TNBC a été évaluée en utilisant une stratégie d'interférence à l'ARN (shARN) dans les cellules MDA-MB231. *In vivo*, les effets tumorigènes et angiogéniques des cellules réprimées pour LRP-1 ont été évalués à l'aide d'un

modèle de xénogreffe orthotopique et de deux tests angiogéniques (Matrigel® plug, CAMs assay). Les modalités d'imagerie précliniques telles que l'IRM-DCE (*Dynamic Contrast Enhancement*) et la tomographie moléculaire de fluorescence, associée à de l'immunohistochimie *ex vivo* ont été utilisées pour réaliser un suivi longitudinal des tumeurs et obtenir des informations morphologiques et fonctionnelles sur le réseau vasculaire tumoral. *In vitro*, le potentiel angiogénique des HUVECs, au travers de la prolifération, la migration, la formation de structures tubulaires et l'activité plasmine, a été évalué à l'aide de milieux conditionnés tumoraux. Une analyse protéomique des sécrétomes a été réalisée pour mettre en évidence les acteurs moléculaires impliqués et les voies de signalisation dépendantes de LRP-1.

Résultats - La répression de LRP-1 dans les tumeurs MDA-MB-231 a conduit à un retard de croissance de 60% comparé aux tumeurs contrôle en raison, entre autres, de différences vasculaires morphologiques et fonctionnelles, confirmées par des modèles angiogéniques. Certaines sections de tumeurs réprimées pour LRP-1 présentaient de nombreuses structures infructueuses, affichant un signal CD31 mais sans lumière, ainsi que des structures ressemblant à des lacs hémorragiques plutôt qu'à des vaisseaux. De nombreuses anastomoses ont également été observées, mettant en évidence une anarchie vasculaire marquée lorsque LRP-1 est réprimé dans les MDA-MB-231. De plus, les tumeurs réprimées pour LRP-1 ont montré une augmentation significative de la nécrose par rapport aux tumeurs contrôle, en conséquence directe de l'augmentation de l'hypoxie intra-tumorale. *In vitro*, le sécrétome des cellules réprimées pour LRP-1 a restreint les capacités angiogéniques des HUVECs. L'analyse protéomique a révélé que LRP-1 soutenait la croissance tumorale et l'angiogenèse via une régulation de la signalisation du TGF- β , du système plasminogène/plasmine et d'autres acteurs de l'angiogenèse (PAI-1/-2, TIMPs ou THBS1).

Discussion - Ces dernières années, LRP-1 a émergé dans l'angiogenèse, notamment dans la régulation des voies de signalisation impliquées dans différents processus endothéliaux tels que la prolifération, la migration, la perméabilité et la formation de structures tubulaires^{33,34}. LRP-1 joue également un rôle essentiel dans l'homéostasie vasculaire³⁵. Nous avons montré que LRP-1 jouait un rôle décisif, non seulement en contribuant à la survie et à la prolifération des cellules tumorales³⁹, mais notamment en modulant l'équilibre angiogénique au sein du microenvironnement tumoral. Ainsi, LRP-1 émerge comme un acteur pro-angiogénique important impliqué dans la fonctionnalité et de l'organisation des vaisseaux sanguins tumoraux, nécessaires à la croissance tumorale mammaire. La caractérisation des sécrétomes par une approche de protéomique a ouvert de nombreuses pistes dans l'identification des acteurs moléculaires grâce auxquels LRP-1 soutient l'angiogenèse. L'hypoxie, en plus d'engendrer une augmentation rapide et chaotique de la formation de vaisseaux sanguins⁴³, conditionne l'agressivité tumorale dans les phases tardives. Étant donné le profil hypoxique des tumeurs réprimées pour LRP-1, la question de savoir si le récepteur, lui-même régulé par l'hypoxie, pourrait jouer un rôle bivalent dans les différentes phases de la progression tumorale mammaire s'avère pertinente et nécessite d'être adressée par la suite.

LRP-1 matricellular receptor involvement in triple negative breast cancer tumor angiogenesis

Océane Champion^{1,2}, Jessica Thevenard Devy^{1,2}, Clotilde Billottet³, Christophe Schneider^{1,2}, Nicolas Etique^{1,2}, Jean-William Dupuy⁴, Anne-Aurélien Raymond⁵, Camille Boulagnon Rombi^{2,7}, Marie Meunier^{1,2}, El-Hadi Djermoune⁶, Elodie Lelièvre^{1,2}, Amandine Wahart^{1,2}, Camille Bour^{1,2}, Cathy Hachet^{1,2}, Andréas Bikfalvi³, Stéphane Dedieu^{1,2}, Jérôme Devy^{1,2*}

1 Université de Reims Champagne-Ardenne, UFR Sciences Exactes et Naturelles, 51687 Reims Cedex 2, France

2 CNRS UMR 7369, Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire, MEDyC, Reims, France

3 INSERM, LAMC, U1029, University Bordeaux, Pessac, France

4 Université de Bordeaux, Plateforme Protéome, F-33000, Bordeaux, France.

5 Plateforme Oncoprot, TBM-Core US 005, F-33000 Bordeaux, France

6 Université de Lorraine, CNRS, CRAN, F-54000 Nancy, France

7 Laboratoire d'Anatomie Pathologie, CHU Reims, F-51100 Reims, France

**Corresponding author: Jerome.devy@univ-reims.fr*

Abstract

Background: LRP-1 is a multifunctional scavenger receptor belonging to the LDLR family. Due to its capacity to control pericellular levels of various growth factors and proteases, LRP-1 plays a crucial role in membrane proteome dynamics, which appears decisive for tumor progression.

Methods: LRP-1 involvement in TNBC was assessed using RNA interference strategy in MDA-MB-231 cells. In vivo, tumorigenic and angiogenic effects of LRP-1-repressed cells were evaluated using an orthotopic xenograft model and two angiogenic assays (Matrigel® plugs, CAM). DCE-MRI, FMT, and IHC were used to complete a tumor longitudinal follow-up and obtain morphological and functional vascular information. In vitro, HUVECs angiogenic potential was evaluated using tumor secretome, subjected to a proteomic analysis to highlight LRP-1-dependant signalling pathways.

Results: LRP-1 repression in MDA-MB-231 tumors led to 60% of growth delay as a result of, inter alia, morphological and functional vascular differences, confirmed by angiogenic models. In vitro, LRP-1-repressed cells secretome restrained HUVECs angiogenic capabilities. Proteomics analysis revealed that LRP-1 supports tumor growth and angiogenesis through TGF- β signalling and plasminogen/plasmin system.

Conclusions: LRP-1, by its wide spectrum of interactions, emerges as an important matricellular player in the control of cancer-signalling events such as angiogenesis, by supporting tumor vascular morphology and functionality.

Background

Breast cancer (BC), as the most diagnosed cancer in women worldwide and the leading cause of cancer-related death, is an heterogeneous disease characterized by diverse phenotypes and a considerable heterogeneity in molecular and histopathological features¹. Based on transcriptomics analysis, five BC subtypes have been identified: luminal A, luminal B, human epidermal growth factor 2 receptor (HER2)-enriched, basal-like and normal-like²⁻⁴. From a morphological perspective, BC subtypes discrimination occurs according to histological observations, tumor grade, lymph nodes and predictive immunohistochemistry markers detection such as estrogen and progesterone receptors (ER and PR) or HER2. Triple negative breast cancer (TNBC), accounting for approximately 15% of all BC, is characterized by the non-expression of ER, PR and the lack of HER2 overexpression and/or amplification² associated with mesenchymal characteristics as well as a stem cell-like expression signature⁵. As basal-like tumors subtype mostly do not express ER, PR and HER2, they tend to be reference as TNBC. However, by identification of gene expression, these tumors are distinct, although not mutually exclusive^{6,7}. It has been showed in a cohort that 77% of basal-like tumors were TNBC, while 71% of TNBC were basal-like⁷. In the absence of hormonal receptors and HER-2 receptor expression, TNBC patients do not benefit from currently available receptor-targeted systemic therapy, such as hormonal and trastuzumab-based therapies. Thus, TNBC, remaining refractory to targeted and conventional therapies advancements³, demands identification of novel therapeutic targets in order to enhance therapeutic options.

In recent years, the tumor microenvironment research has taken an important place in the cancer research field⁸. It is well recognized that the primary cancer invasiveness is determined not only by the tumor cells genotype and phenotype, but also by their interactions with the extracellular environment, variously composed of cellular types, which modulate tumor development and infiltration capacities as well as angiogenic responses⁴.

Once a tumor lesion exceeds a few millimeters in diameter, hypoxia and nutrient deprivation trigger the ‘angiogenic switch’ to allow tumor progression⁹. Tumor cells exploit their microenvironment by releasing soluble mediators such as growth factors, chemokines, and cytokines to activate normal, quiescent cells around them and initiate a cascade of events that quickly defects. The magnitude and quality of the angiogenic response are ultimately determined by the balance of pro- and anti-angiogenic signals and, more specifically, their unique activities on multiple cell types¹⁰. There are several classical or more sophisticated mechanisms leading to new vessels formation within a tumor. Among them, there are sprouting and intussusception angiogenesis, co-option of preexisting vessels, vascular mimicry or angiogenesis from endothelial stem cells¹¹. All these mechanisms are available to serve exacerbated tumor needs to survive, proliferate, and invade adjacent tissues.

The endocytic low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) plays a crucial role in controlling membrane proteome dynamics^{12,13}. This receptor is composed of a 515 kDa α extracellular chain containing extracellular ligand binding domains organized in 4 clusters and

an 85 kDa transmembrane β -chain containing a short cytoplasmic domain characterized by 2 NPxY motifs (Asn-Proline-X-Tyrosine) triggering endocytosis. LRP-1 directly participates in the extracellular matrix (ECM) remodeling through endocytosis of numerous active proteinases or proteinase/inhibitor complexes¹⁴. LRP-1 is also involved in cell migration, a key process in the acquisition of tumor cells invasiveness, by modulating integrins functions through a subtle control of their endocytosis/recycling cycle¹⁵. In addition to its catabolic activity, LRP-1 binds to many proteins via its intracytoplasmic chain (ICD) to constitute a cellular signalling platform. By activating the MEK/ERK pathway, and concomitantly inhibiting MKK7/JNK, LRP-1 can regulate cancer cells anchoring to the ECM¹⁶. A previous anatomopathological study has revealed that LRP-1 is predominantly overexpressed in TNBC and HER2⁺ BC compared to other subtypes¹⁷. This prompted us to take an interest in its involvement in TNBC progression and more specifically to its direct or indirect role in controlling the angiogenic balance and whether this role could be decisive for tumor progression¹⁷⁻²⁰.

The present work investigates LRP-1 tumorigenic potential in MDA-MB-231 cells using an RNA interference strategy. By means of an orthotopic mammary fat pad model, a MatrigelTM plug and a CAMs assay, we showed that LRP-1 repression affects *in vivo* tumor growth by modulating, *inter alia*, angiogenesis. Further functional studies based on *in vitro* tumor conditioned media (TCM) effects on Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) behaviors and angiogenic capabilities reinforced LRP-1 role in modulating angiogenesis process. Proteomics analysis of TCM showed that LRP-1 supports angiogenesis and tumor growth through the TGF- β signalling and plasminogen/plasmin system modulation, to only name a few. Thus, the matricellular receptor LRP-1, by its wide spectrum of interactions within the microenvironment, appears as an important actor in the control of BC signalling events such as angiogenesis.

Materials and methods

Cell lines and culture

MDA-MB-231 breast cancer cells were purchased from DSMZ (Braunschweig, Germany) and grown in 10% fetal bovine serum (FBS) (ATCC® 30-2020™, LGC, Molsheim, France) DMEM (1 g/L of glucose). Cells were stably transfected with the pOPRSV-1/MCS expression plasmid (Agilent Technologies, Courtaboeuf, Les Ulis, FR), containing a coding LRP-1 interfering RNA sequence: AAG CAG TT GCC TGC AGA GAT (shLRP-1) or a scramble control sequence: CCA GTC GCC ATTA ATT ATG CAA (shCtrl). 0.8 mg/ml of geneticin (G418; Sigma Aldrich, St. Louis, USA) was used for selection. For screening need, MCF-7, T-47D, SK-Br3, Hs-578T, BT-20 and 4T1 breast cancer cell lines have also been used.

HUVECs (C-12203) were purchased from Promocell (Handschuhsheimer, DE) and HUVECs-GFP labelled with GFP (ZHC-2402) from Cellworks (Buckingham, UK). Cells were cultivated in EBM™-2 Basal Medium (CC-3156) supplemented with EGM™-2 SingleQuots™ (CC-4176; Lonza, Walkersville, USA). Cells at P3 to P5 passage were used.

For all procedures, cells were harvested using 1X Trypsin-EDTA Solution (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) or Accutase® (C-41310; Promocell, Handschuhsheimer, DE) and were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

Tumor and HUVECs conditioned media preparation

Tumor cells were seeded at 3.2×10^6 in T150 flasks or at 1.2×10^6 in 35mm Dish. 48h after seeding, media was replaced by DMEM. After incubation, the supernatant was centrifuged (10,000g, 4°C, 10min). Cells were harvested and counted using Scepter™ 2.0 (Merck Millipore, Molsheim, FR). Cell equivalents between shLRP1 and shCtrl TCM were made by diluting the most concentrated. Resulting TCMs, equivalent in pairs, were stored in aliquots at 20°C to avoid multiple freeze–thaws.

HUVECs were seeded at 1.2×10^6 in 35mm Dish. 24h after seeding cells were treated with TCM for 24h and media was replaced by phenol red free DMEM for 24h. The supernatant was centrifuged and stored as described below.

For details, see Supplementary Methods Section (SMS).

In vivo studies

Mice (5-6 weeks-old female Balb/c nu) purchased from Janvier (Janvier labs, Le Gnest-Saint-Isle, FR) were housed in ventilated cages under filtered air and acclimatized for one week prior to manipulation. Animal experiments were approved and carried out in compliance with ethics rules under the authorization number APAFIS#4373-2016030410575189 vI “Study of LRP-1 receptor involvement in TNBC models in mice” distributed by the higher education and research administration attached to the French National Education Ministry. All procedures were conducted under general anesthesia induced by inhalation of 3% isoflurane and maintained with 1.5% during imaging.

Orthotopic xenograft model

shLRP-1 or shCtrl MDA-MB-231 cells were harvested using Accutase®, washed and resuspended into a 5×10^7 /ml cell solution before inoculation. Group of 12 mice were injected with 100µl into the mammary fat pad. Tumor growth was assessed by measuring the length (A) and width (B) with a digital caliper every week. Volumes were calculated using $1/2(A \times B^2)$. Mice were sacrificed 28 days after inoculation. After excision, tumor tissues were immersed in liquid nitrogen, transfer to vial and stock at -80°C or fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma Aldrich, Saint-Louis, USA) for 24h and embedded in paraffin.

Matrigel® Plug

2x10⁵ of shLRP-1 or shCtrl MDA-MB-231 cells were resuspended in 0.1 ml of growth medium, mixed with 0.4 ml of growth factor-reduced Matrigel® (Corning®, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) and implanted subcutaneously into each 7 weeks-old female BALB/c-nu mice flank (Janvier labs, Le Genest-Saint-Isle, FR) (n=12/group). 21 days after injection, animals were sacrificed and Matrigel® plugs were excised, photographed, and fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma Aldrich, Saint-Louis, USA) for histological analysis.

Optical imaging

Fluorescent molecular tomography (FMT) was conducted using an FMT-4000 scanner (PerkinElmer, Waltham, USA) calibrated beforehand with fluorophores according to supplier's instructions. Fluorescence quantification was achieved with TrueQuant 3.0 software (PerkinElmer, Waltham, USA). AngioSense™-750/AngioSense™680 or HypoxiSense™-680 contrast agent were used, with an excitation filter of 750 ± 3nm or 670 ± 3nm, respectively and an emission filter of 690-740. 3D and 2D trans-illumination acquisitions were carried out 24h after an 100µl intravenous contrast agent injection.

MRI imaging

T1, T2 measurements and MR imaging were performed with a 3T system (MR Solutions™, Guildford, UK) using a T1 SE (TR=500ms, TE=12ms) or a Dynamic Contrast Enhancement (DCE) sequence. A bolus of 0.1 mmol/kg Gd-DOTA (Dotarem®, Guerbet, France) was injected intravenously through a catheter to distribute throughout the entire vasculature and diffuse into surrounding tissues. A mouse body coil was used. Temperature was maintained by a heating air flow built into the animal bed system. Respiration was monitored throughout the entire scan. For details, please see SMS.

Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay

4x10⁶ of shLRP-1 or shCtrl MDA-MB-231 cells were deposited as a thin layer on the surface of fertilized chicken eggs (EARL Les Bruyères, FR). On day 17, CAMs were fixed *in vivo* (4% paraformaldehyde, RT, 30min), and included. Digital photographs were taken under a Nikon SMZ800 stereomicroscope. Quantitative analysis was performed using a MATLAB routine developed by Dr El-Hadi Djermoune²¹ in which the vascular structures segmentation lean on the vesselness probability map of 2D images²². For details, see the SMS.

Histology

Histological analysis of formaldehyde-fixed and paraffin-embedded tumors and Matrigel® plugs were performed on 4 µm hematein, eosin and saffron (HES)-stained sections prepared using routine methods. Necrosis area was calculated as the ratio of (necrosis surface/tumor surface) x100 and mitotic index in 10 consecutive high-power fields (HPF= 0.31 mm²) in the highest mitotic activity area.

Immunohistochemistry

For immunohistochemistry, tumor and Matrigel® plugs sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in solutions of graded ethanol. Antigen retrieval was performed at 95°C for 40min in 0.01M sodium citrate buffer sections were then immersed in 3% hydrogen peroxide for 30 min to block endogenous peroxidase activity. Anti-CD31 [EPR17259] (1/100, rabbit monoclonal, ab18298; Abcam, Cambridge, UK) primary antibody were used. Please see SMS for details. CD31-

immunostained vessels, exhibiting a lumen, were numerate on 5 consecutive HPF in the area with the vessels' greatest density. Interpretation was fulfilled in blind by an external anatomopathologist.

Protein extraction and western blot (WB) analysis

WB was realized as described in¹⁹ using the anti-LRP-1 β -chain [EPR3724] (1/10⁴, rabbit monoclonal, ab92544; Abcam, Cambridge, UK).

RNA isolation and real-time PCR

Total mRNA was extracted using TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). PCR primers were synthesized by Eurogentec (Liege, Belgium) as follow (5'-3') for LRP1: GCTATCGACGCCCTAAGAC and CGCCAGCCCTTTGAGATACA (Tab. S1). Please see SMS for details.

Tubule formation

1.5x10⁴ GFP-HUVECs cells were seeded in 50 μ l of condition to be tested into μ -Slide Angiogenesis plate, ibiTreat (ibidiTM, Martinsried, DE) for 8h at 37°C. Cells were imaged at $\times 4$ magnification on a Nikon eclipse 300 inverted microscope. Total network length and branching number were assed using AutoTube²³. See SMS for details.

Endothelial proliferation and migration

MTT assay was realized as described in²⁴. Migration experiments were carried out using ThinCertTM cell culture inserts (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) in 8 μ m pores fibronectin-coated membranes in 24-well plate as described in²⁵. Please see SMS for details.

Proteomics

Label-free quantitative proteomics was performed using an Ultimate 3000 RSLC Nano-UPHLC system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) coupled to a nanospray Orbitrap FusionTM LumosTM TribridTM Mass Spectrometer (Thermo Scientific, USA). Please see SMS for details.

S-2251TM Assay

Chromogenic substrate selective for plasmin, S-2251 (Chromogenix, Diapharma, Westchester, USA), was used to follow the initial rate of plasminogen activation by measuring p-nitroaniline generation. TCM were mixed with a buffer containing 0.1M Tris-HCl pH 7.8 and 20 μ l of plasminogen EACA reconstituted at 10U/ml (Calbiochem, Darmstadt, Germany). To initiate the reaction, 20 μ l of 3.5mM S-2251TM was added to each well. Generation of plasmin was detected by measuring absorbance of the p-nitroaniline release every 30min at 405nm during 10h (Tecan Infinite®, Mannedorf, Switzerland).

Statistical analysis

The data are expressed as means +/- SEM, as indicated in the figure legends. For statistical analysis, independent t-test was used *in vitro* and non-parametric Mann-Whitney *in vivo* to assess the significance of mean differences. Differences were considered significant at a P value of 0.05 or less. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.005; ****p<0.001.

Results

LRP-1 is preferentially expressed in TNBC cell lines.

We evaluated LRP-1 expression level in TNBC cell lines, MDA-MB-231, Hs-578T, BT-20, 4T1 and in non-TNBC cell lines, MCF-7, SKBR3, T47D. LRP-1 was found to be more expressed at the transcriptional and translational levels in TNBC cell lines (MDA-MB-231 > 4T1 > Hs578T > BT-20) in comparison to non-TNBC cell lines (T47D > MCF-7 > SK-BR3) (Fig. 1A,B). Therefore, to investigate LRP-1 role in TNBC progression, we used the MDA-MB-231 cell line stably transfected to allow a constitutive expression of LRP-1-targeting shRNA (shLRP-1) or a scrambled shRNA (shCtrl). RT-qPCR and immunoblot showed a significant decrease in LRP-1 mRNA (by 60%) and protein (by 67%) expression, respectively, in shLRP-1 MDA-MB-231 cells compared with shCtrl (Fig. 1C,D). These results validated our LRP-1 study model in MDA-MB-231 cells. As shown in Fig. S1, LRP-1 expression in MDA-MB-231 without antibiotic selection pressure showed no significant difference up to 35 days, indicating that LRP-1-targeting shRNA was stable over time and compatible with *in vivo* experiments (Fig. S1).

LRP-1 acts as a pro-tumorigenic receptor, by modulating tumor angiogenesis, in an orthotopic mammary fat pad TNBC model.

In order to precise LRP-1 role in *in vivo* TNBC progression, we performed mammary fat pad experiments by injecting shLRP-1 or shCtrl MDA-MB-231 cells orthotopically into nude mice and followed tumor development for 28 days. Significant tumor volume differences appeared 14 days post-injection. shLRP-1 tumors volume was reduced by 63% compared with shCtrl (mean of $118,83 \pm 64,04$ vs $323,43 \pm 92,65$ mm³; median of 90,32 vs 323,7 mm³, ***p<0.0001) (Fig. 2A). 28 days after injection, three quarters of shCtrl tumors had reached the endpoint versus one sixth of shLRP-1 (8/12 vs 2/12 tumors). Tumor volume differences persisted on living mice to reach ultimately by 28 days a 64% reduced tumor volume in shLRP-1 MDA-MB-231 tumors compared with shCtrl (mean of $507,32 \pm 101,36$ vs $1399,30 \pm 347,91$ mm³; median of 508,54 vs 1322,22 mm³; ***p<0.001) (Fig. 2A). In order to examine *in vivo* functional aspects of neo-formed vascular networks within tumors, we used Dynamic Contrast Enhancement (DCE)-MRI and Fluorescent Molecular Tomography (FMT) imaging methods. As shown in Fig. 2B, temporal changes in contrast enhancement due to the gadolinium (Clariscan®) concentration within tumors after an intravenous bolus injection allowed us to observe fully perfused shCtrl tumors while shLRP-1 tumors appeared only perfused superficially for a quarter of tumors circumference. To keep exploring the functional aspect of the vascular network, we used a long-circulating near-infrared fluorescent blood-pool agent (AngioSense™-750). We observed a clear heterogeneity within tumors groups, that did not allow us to conclude significantly on the slighter AngioSense™-750 signal trend in shLRP-1 tumors compared to shCtrl (Fig. 2C). However, major population of shCtrl tumors [1] with an AngioSense™-750 signal from 180 to 260 pmol presented a comparable signal on tumor edges (Fig. 2C, right panel). One of shCtrl tumors [2] stood out with a different profile and half the signal recovered

(87 pmol) compared with the others. Concerning shLRP-1 tumors, we observed different profiles. From one low vascularized tumor with 38 pmol [5] to what seems to be an hyperpermeable marked profile with 269 pmol of AngioSense™-750 signal [4]. Nevertheless, we found a major shLRP-1 population [3] having the same profile, characterized by an accumulation of AngioSense™-750 from 111 pmol to 251 pmol in the heart of the tumor (Fig. 2C, right panel). Results obtained using HypoxiSense™-680 fluorescent imaging agent that detects carbonic anhydrase 9 (CA IX) tumor cell surface expression, revealed a rise of hypoxia in shLRP-1 tumors compared to shCtrl (0.079 ± 0.020 vs 0.010 ± 0.04 pmol/mm³) (Fig. 2D). Both LRP-1 immunoblots, and RT-qPCR realized from tumors samples confirmed LRP-1 protein repression of more than 50% (Fig. 2E) and more than 70% at the transcriptional level (Fig. 2F) at the end of the protocol in shLRP-1 tumors compared to shCtrl. CD31 labelling followed by microvascular density (MVD) analysis were performed and highlighted differences of vascularization, revealed by a decrease of vessels number in shLRP-1 tumors section ($-50\% \pm 7\%$, $**p < 0.01$) (Fig. 2G). In line with these observations, HES staining showed largest necrosis areas in shLRP-1 tumors compared to shCtrl ($52 \pm 6\%$ vs $20 \pm 4\%$ of tumor area, $**p < 0.01$) (Fig. 2H). Count of mitoses did not reveal any difference between the two groups (Fig. 2I). Thus, vascular networks formed within shLRP-1 tumors presented morphological and functional differences compared to shCtrl, which were decisive for the primary tumor progression. This seems to be explained by the microenvironment physicochemical properties modulation, especially hypoxia.

LRP-1 repression alters angiogenesis in MDA-MB-231 Matrigel® plugs and CAMs assays.

In order to understand how LRP-1 repression in MDA-MB-231 cells may affect *in vivo* neo-angiogenesis, we performed a Matrigel® plug (MP) assay while using DCE-MRI and FMT preclinical modalities to pull out information on vascular features inside the plugs. We used the AngioSense™-680 agent *in vivo* at D7 and *ex vivo* at D21 in FMT after injecting tumor cells mixed with Matrigel®. As shown in Fig. 3A,B, fluorescence intensity was about 7-fold lower *in vivo* at D7 ($22,7 \pm 9,3$ vs $162,9 \pm 46.9$ pmol, $**p < 0.01$) and *ex vivo* at D21 ($0,7 \pm 0,7$ vs $13,2 \pm 2,2$ pmol, $*p < 0.05$) in shLRP-1 MDA-MB-231 MPs compared to shCtrl. By using DCE-MRI, we showed that shLRP-1 MPs perfusion appeared less effective than in shCtrl (Fig. 3C,D,E). Maximum intensity value analyses confirmed that shLRP-1 MPs were less perfused than shCtrl (1500 ± 108 vs 1250 ± 73 A.U., $***p < 0.001$) and quantification of the area under the curve (AUC), which reflects the total amount of contrast transiting through the regional vascular system, highlighted a decreased perfusion in shLRP-1 MPs by 45% compared to shCtrl (3294 ± 237 vs 1868 ± 217 A.U., $**p < 0.01$). MVD analysis revealed, similarly to the mammary fat pad experiment, a 40% decreased vessels number in shLRP-1 MPs compared to shCtrl (42 ± 3 vs 28 ± 2 vessels/field, $**p < 0.01$) (Fig. 3F, middle and right panel). Additionally, we evaluated angiogenic properties of LRP-1 expressed by MDA-MB-231 cells *in ovo*, using a chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay²⁶. Using a MATLAB™ homemade plugin, segmentation of angiogenesis showed that shLRP-1 CAMs grafted with shLRP-1 MDA-MB-

231 cells showed a decreased neo-angiogenic vessels length (4606 ± 1021 vs 2350 ± 439 pixels, $*p < 0.05$) and branching (71 ± 17 vs 46 ± 12 pixels, $*p < 0.05$) compared with shCtrl (Fig. 3G). In accordance with results obtained on tumor mammary fat pad, we also observed 1/3 of hemorrhagic CAMs when shLRP-1 MDA-MB-231 were grafted (Fig. S2).

LRP-1-down-regulated MDA-MB-231 secretome modulates the angiogenic potential of endothelial cells.

To explore how LRP-1 influences tumor progression and angiogenesis, we investigated whether LRP-1 silenced MDA-MB-231 secretome could modulate the angiogenic potential of endothelial cells (ECs). *In vitro* effects of shLRP-1 or shCtrl tumor conditioned media (TCM) were assessed on migratory, proliferative capacities and tube formation abilities of HUVECs. Results on cell proliferation indicated that HUVECs were relatively more proliferative ($+19 \pm 4\%$, $*p < 0.05$) when incubated for at least 48h in shLRP-1 MDA-MB-231 TCMs compared with shCtrl (Fig. 4A). As seen in Fig. 4B,C, we showed that shLRP-1 MDA-MB-231 TCMs were significantly less chemoattractant than shCtrl (Fig. 4B). Indeed, we measured a significant 58% decreased migrated HUVECs number toward shLRP-1 TCMs compared with shCtrl (Fig. 4C). Finally, ECs tubulogenesis assays revealed that HUVECs stimulated by shLRP-1 MDA-MB-231 TCMs displayed decreased abilities to organize themselves into tubule structures compared to control conditions (Fig. 4D). Segmentation of tubulogenesis revealed a significant decrease of the total length ($15 \pm 3.8\%$, $***p < 0.001$) and branching number ($+30 \pm 1\%$, $***p < 0.001$) in shLRP-1 TCM-stimulated condition compared with shCtrl (Fig. 4E).

MDA-MB-231 secretome analysis reveals that LRP-1 angiogenic effects involved TGF- β and plasminogen/plasmin pathways

To decipher mechanisms by which LRP-1 can influence tumor progression and angiogenesis, 24h shLRP-1 and shCtrl cells secretomes were investigated using mass spectrometry-based proteomics. Intracellular proteins, most certainly coming from exosomes were excluded. When LRP-1 is stably repressed in cells, many factors (whether pro or anti-angiogenics) are modulated, as it is shown on the representative heatmap (Fig. 5A). Based on in-depth analysis via Proline software and using GSEA and Ingenuity Pathways for pathways representation, we highlighted a preferential modulation scheme of certain pathways, such as the transforming growth factor- β (TGF- β) signalling (notably TGF β -1, TGF β -2, TGF β I) and the plasminogen/plasmin (PP) system (including PLG, PLAT and a batch of SERPIN) (Fig. 5B). In addition, TIMP-1, TIMP-2 and TIMP-3 with ratios of 35.37, 3.79 and 98.13, respectively, were enriched in shLRP-1 secretome compared to shCtrl, as well as THBS1 with a ratio of 39.17 (Fig. S3), suggesting a strong regulation of proteinase activity and anti-angiogenic effects. Pro-angiogenic molecules such as ECM1, GRN and FST were also enriched with ratios of 77.49, 12.04 and 15.31, respectively (Fig. S3). Modulation of the PP system was confirmed by measuring plasmin

activity by using S-2251TM (HD-Val-Leu-Lys (pNA)) (Fig. 6). Photometric measurements of plasmin activity demonstrated an exponential increase in plasmin activity in shCtrl MDA-MB-231 TCMs, reaching an optical density at 405nm (OD405) of 2.70 ± 0.1 after 630min. In contrast, a slower conversion of plasminogen into plasmin was measured in shLRP-1 MDA-MB-231 TCMs with an OD405 of 1.70 ± 0.02 after 630min (Fig. 6A). Data obtained from 24h HUVECs conditioned media by shLRP-1 or shCtrl TCM showed more pronounced effects (Fig. 6B). Thus, HUVECs stimulated by shLRP-1 TCM exhibit a decreased plasmin activity compared to HUVECs stimulated by shCtrl, leading to a lesser propensity to migrate and invade.

Discussion

This study aimed to enlighten LRP-1's role in TNBC tumor growth and more precisely its involvement in tumor angiogenesis using an MDA-MB-231 cell line-based model. Previous data from our group and others have observed that LRP-1 and LDLR expression were higher in mammary tumor tissues^{27,28}, contribute to LDL-C uptake from the blood²⁹ and a poor prognosis³⁰. Especially, LRP-1 was shown to be involved in the invasiveness of luminal and TNBC subtypes of BC^{18,31,32}. In recent years, LRP-1 has emerged to be involved in angiogenesis, notably by regulating LRP1-dependent signalling pathways in different endothelial processes such as proliferation, migration, permeability and tube formation^{33,34}. LRP-1 also plays an essential role in vascular homeostasis, markedly by having a protective role in atherosclerosis pathogenesis and aneurysms formation³⁵. Furthermore, some studies have revealed angiomodulatory capacities of LRP family members in various solid tumors, including BC³⁶⁻³⁸.

Here, we showed that LRP-1 plays a more decisive role, not only by contributing to cells survival and proliferation³⁹; it modulates (directly or indirectly) the angiogenic balance through its pivotal roles within the tumor microenvironment. We showed that LRP-1 repression in MDA-MB-231 tumors led to a significant tumor growth decrease (60%) compared to the control group. Lower proliferative capacities of shLRP-1 cells observed *in vitro* (15-20%, data not shown) are not sufficient to explain such a tumor volume difference. Otherwise, no significant difference in mitotic index in the viable parts of the tumors was found.

As angiogenesis is required for tumor progression and growth¹¹, DCE-MRI experiments were conducted to assess tumor angiogenesis and enable physiological alterations depiction as well as morphological changes⁴⁰. shLRP-1 tumors characterized by a decreased tumor perfusion *in vivo* exhibited numerous unsuccessful structures, displaying a CD31 signal but without lumen, suggesting that stimulation of angiogenesis was present and sustained but not able to reach shCtrl vascular achievement. *In vivo* vascular density evaluation in FMT confronted us with intra-tumor heterogeneity. Two major distinct populations were found according to the signal distribution either peripheral in shCtrl or central in shLRP-1 tumors. An accumulation of fluorochrome in the peritumoral tissue is thought to be due to highly leaky vessels or potential hemorrhage within tumors⁴¹. Certain CD31-stained shLRP-1 tumors section exhibited large structures looking like hemorrhagic lakes rather than vessels but also anastomoses were observed, highlighting a marked vascular anarchy when LRP-1 is repressed in MDA-MB-231. shLRP-1 tumors showed a significant increase in necrosis compared to shCtrl, as a direct result of the increased hypoxia. As LRP-1 is known to be upregulated by hypoxia⁴², we ascertained that its expression was still low enough in our *in vivo* tumor model at the protocol end. As a common phenomenon in most malignant tumors, hypoxia leads to an advanced but dysfunctional vascularization, by inducing an imbalance between pro- and anti-angiogenic factors production and thus, leading to a rapid and chaotic blood vessel formation increase⁴³.

By focusing on *in vivo* and *in ovo* angiogenic assays, we highlighted LRP-1 silenced cells difficulties to support angiogenesis. *In vivo* and *ex vivo* vascular densities found in MPs were

indeed lower when LRP-1 expression was repressed, consistent with the decreased vessels number in CD31-stained MPs sections. In line with these data, blood perfusion appeared less efficient in shLRP-1 MPs. As for the CAMs assay, it demonstrates that vascular networks generated by shLRP-1 cells exhibited a lesser overall length and a lower number of branchings. These results corroborate that LRP-1 plays a significant role in the outcome of angiogenic processes in MDA-MB-231 tumor cells.

In vitro, LRP-1 influences the tumor cells secretome which shapes ECs behaviors, among the microenvironment cells. We showed that shLRP-1 MDA-MB-231 cells secretome generates a decreased HUVECs angiogenic potential by impacting their abilities to form 3D-tubular network on Matrigel® and unsurprisingly, their migratory capacities. However, we found that shLRP-1 TCM led to a higher EC proliferative rate over time than shCtrl. The overall growth of a vasculature is the result of both proliferation and migration controlled by a myriad of factors in the tumor microenvironment, including many pro and anti-angiogenic factors⁴⁴. In a computational model, authors have modulated proliferation and migration rates separately. They have demonstrated that EC proliferation increase at the expense of migration leads to an increase in sprouts, which then mostly exhibit anastomoses preventing vessels functionality⁴⁵.

Through a proteomic approach, we demonstrated the extensive LRP-1's influence on MDA-MB-231 tumor cells secretome, where 962 proteins were identified. When it comes to identifying by which precise molecular pathways LRP-1 plays its part on tumor progression and angiogenesis, the task is intricate. We highlighted a solid modulation of TGF- β signalling as well as a modulation of the plasminogen/plasmin (PP) system. Under physiological conditions and in early stages of carcinogenesis, TGF- β acts as a tumor suppressor by restricting cell growth and stimulating apoptosis to maintain homeostasis in tissues. However, in advanced tumors, cancer cells escape TGF- β initial suppressive effects and use its regulatory functions to promote their progression with clear roles in processes supporting cancer cell invasion, epithelial-mesenchymal transition (EMT), immune response suppression, angiogenesis, and metastasis⁴⁶. In addition, TGF- β contributes to matrix remodeling by increasing the expression of MMPs⁴⁷ and plasmin, creating a permissive environment allowing cancer cells to metastasize⁴⁸. Through endogenous TGF- β 1 activation, it has been shown that thrombospondin-1 (THBS1) up-regulates the PP system and promotes tumor cell invasion in MDA-MB-231 cells⁴⁹. THBS1, over-expressed in LRP-1-repressed MDA-MB-231, is established as an anti-angiogenic and anti-tumoral protein⁵⁰. Notably, THBS1 binds to free and cell-associated VEGF⁵¹ and THBS1/VEGF complexes are internalized via LRP-1⁵², suggesting that LRP-1 contribute to VEGF bioavailability during neovascularization. No significant difference was found in VEGF expression between shLRP-1 and shCtrl (data not shown). However, in THBS1 up-regulated cells, VEGF could be sequestered and thus not as sufficient for cells to ensure proper VEGF-stimulated angiogenesis. As THBS1 regulates vessel stabilization, its overexpression has been shown to suppress vascular growth and expand vessel diameter⁵³, suggesting that it could be associated with dysfunctional angiogenesis, like in Fabry disease⁵⁴. Despite an increased plasminogen expression and one of its activators in shLRP-1 TCM, a decreased plasmin activity was measured. The explanation appears more sophisticated than the plasminogen or its

activators unavailability, suggesting system inhibitors involvement, such as SERPINE1/2 (PAI-1/2) or SERPINC1 (antithrombin-III) able to thwart the enzymatic cascade⁵⁵. Angiogenesis is associated with an important extracellular remodeling involving different proteolytic systems, among which the PP system plays an essential role. ECs migration is associated with significant proteolysis upregulation and, conversely, PP system inhibition reduces angiogenesis *in vitro*⁵⁶. Thus, prevention of *in vitro* HUVECs tubular structure formation in shLRP-1 TCM is consistent with the decreased plasmin activity in HUVECs CM after shLRP-1 TCM stimulation, given that pseudotube formation is based on ECs proteolytic activity and migratory capacities generated in response to their environment. However, genetically altered mice for PP system developed without overt vascular anomalies indicating a possible compensation by other proteases *in vivo*⁵⁶. Furthermore, SERPINF1, expressed 5 times more in shLRP-1 TCM, has been described as an inhibitor of hypoxia-induced angiogenesis by either directly targeting HIF-1 or regulating HIF-1's target genes signalling cascades, thus blocking EC survival, proliferation and migration, or leading to their apoptosis⁵⁷.

Although we have previously shown that shLRP-1 cells revealed *in vitro* increased cells rigidity with membrane extension dynamics drop directly reflecting their altered migratory capacities¹⁹, these results could be divergent *in vivo*. When we set an experimental configuration that mimics *in vivo* environment or approaches it, whether it is a CAMs assay or 3D spheroids formation, shLRP-1 cells grafts, or spheroids exhibit a more invasive profile than expected compared to shCtrl (Fig. S4). As hypoxia contribute to TGF- β up-regulation and EMT phenotype acquisition resulting in cell mobility and metastasis, it could be the trigger of invasiveness *in vivo*. Moreover, long exposure to hypoxia is associated with DNA breaks and replication errors high frequency, potentially leading to genetic instability and mutagenesis⁵⁸, increasing metastatic potential. Thus, the question of whether shLRP-1 cells, less proliferative, with lower migratory properties *in vitro*, forming primary tumors of smaller sizes *in vivo*, could surpass shCtrl MDA-MB-231 cells aggressiveness in the late tumorigenesis stages due to the hypoxia rise and a permissive signalling such as TGF- β , is more than relevant and will be addressed afterward.

In the present study, we showed that LRP-1 emerges as an important matricellular player in the control of cancer-signalling events such as angiogenesis, by supporting tumor vascular organization in a way that appears dispensable but ultimately essential for a vascular effectiveness for tumor growth.

Acknowledgements

This paper and the research behind it would not have been possible without the support of MR SolutionsTM company, the “La ligue contre le cancer” french association and the French National Centre for Scientific Research (CNRS). We thank the “PICT” cell and tissue imaging platform for preclinical modalities imaging access. We also thank Dr. Richet Nicolas for its help in qPCR, Ms Bouland Nicole for tissue immunohistochemistry processing and Ms. Anais Choffart for 3D spheroid realization.

Financial disclosure

We declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Author's contribution

JD designed, directed and coordinated the project. OC contributed to the design and implementation of the research. JD, JTD, CS, NE have designed plasmids (molecular biology experiments) and set up the stable transfection of mammary cell line. OC and JD performed in vivo mice experiments with preclinical imaging technical support from CaB, AW, MM. OC performed in vitro experiments with technical support from MM (cell culture), CH (Immunoblot), EL (RT-qPCR). JWD and AAR carried out the proteomics and the analysis of the raw data: heatmap and pathways with OC. EHD developed MATLAB plugin for angiogenesis segmentation and analysis. ClB realized CAM assays experiments and analysis. CBR provided her expertise by analyzing and interpreting IHC experiments. SD and AB provided critical feedback and assisted the completion of the research. OC and JD wrote the manuscript. All authors have read it and provided critical feedback and thus contributed to the final version of the manuscript.

Figure 1

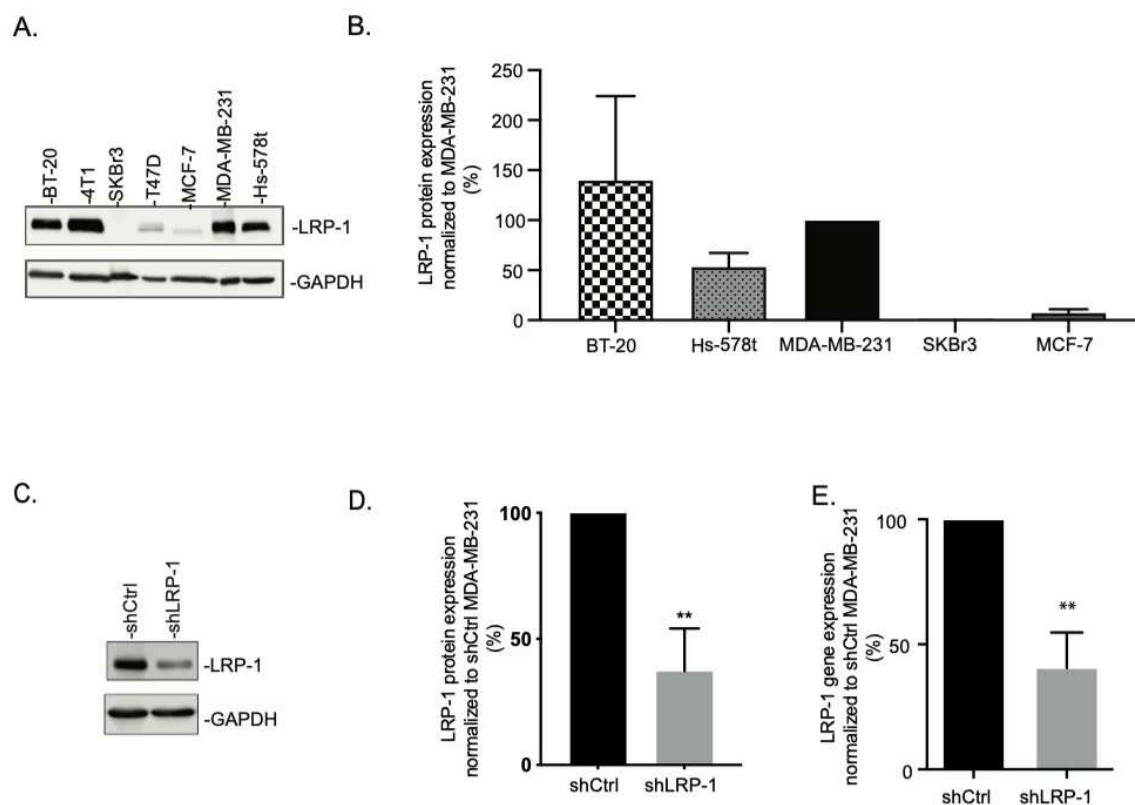


Fig. 1 LRP-1 is preferentially expressed in TNBC cell lines. **a** LRP-1 mRNA levels in human breast cancer cell lines (MDA-MB-231, BT-20, Hs-578T, SK-BR-3, T-47D, MCF-7) analysed by qRT-PCR (n=3). **b** Representative immunoblot screening of LRP-1 expression in breast cancer cell lines (BT-20, 4T1, SK-BR-3, T-47D, MCF-7, MDA-MB-231, Hs-578T). **c** LRP-1 mRNA relative expression in shCtrl and shLRP-1 MDA-MB-231 cells determined by RT-qPCR and normalized to shCtrl MDA-MB-231 (n=3). **d** (left panel) Representative immunoblot of LRP-1 expression in shLRP-1 and shCtrl MDA-MB-231 cells expression. (right panel) Densitometric analysis of LRP-1 expression and normalization to shCtrl MDA-MB-231 (n=4). Data points are mean $\pm$ SEM. n $\geq$ 3. *p<0.05; **p<0.01 (Student t-test).

Figure 2

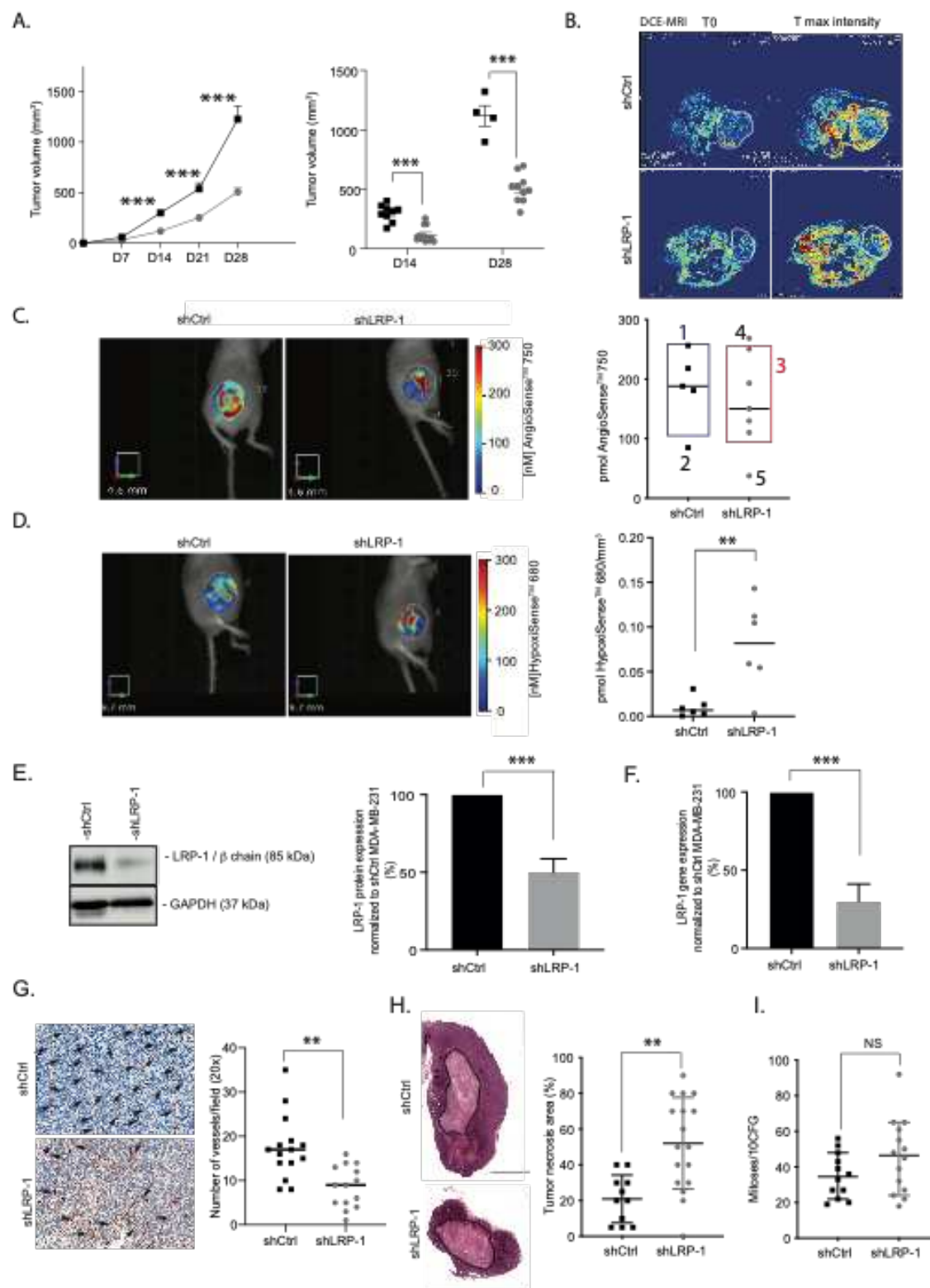


Fig. 2 LRP-1 plays a pro-tumorigenic role *in vivo*, by supporting tumor angiogenesis, in MDA-MB-231 orthotopic xenografts. **a** (left panel) Tumor growth of shLRP-1 and shCtrl MDA-MB-231 orthotopic xenografts injected in BALBc/nu mice over 28 days (n=12 per group). (right panel) Tumor volume repartition at D14 and D28 after implantation. **b** Images of T0 and Tmax intensity from DCE-MRI acquired in shLRP-1 and shCtrl xenografts bearing mice after an intravenous bolus injection of Clariscan™. Dotted lines show tumor area. **c** (left panel) Representative images of AngioSense™-750 accumulation within BALBc/nu mice bearing shLRP-1 and shCtrl MDA-MB-231 xenografts. (right panel) 3D fluorescence quantification (pmol)(n=5). Different populations have been identified according to imaging profiles (1,2,3,4,5). **d** (left panel) Representative images of HypoxiSense™-680 accumulation within BALBc/nu mice bearing shLRP-1 and shCtrl xenografts. (right panel) 3D fluorescence quantification per tumor volume (pmol/mm³)(n=6). **e** (left panel) Representative immunoblot of LRP-1 expression in harvested shLRP-1 and shCtrl MDA-MB-231 xenografts. (right panel) Densitometric analysis of LRP-1 expression and normalization to shCtrl xenografts expression (n=3). **f** LRP-1 mRNA relative expression in harvested shLRP-1 and shCtrl MDA-MB-231 xenografts determined by qRT-PCR and normalized to shCtrl xenografts expression (n=3). **g** (left panel) Representative microphotographs of CD31 immuno-localization on shLRP-1 and shCtrl MDA-MB-231 xenografts tissue sections (x200). Scale bar: 50µm. (right panel) Number of vascular structures per 5 fields in CD31-stained sections of shLRP-1 and shCtrl MDA-MB-231 xenografts (x200) (n=6). **h** (right panel) Representative HE-stained sections of shLRP-1 and shCtrl MDA-MB-231 xenografts. Dotted lines show necrosis area. Scale bar: 500µm. (left panel) Percentage of tumor necrosis area within shLRP-1 and shCtrl MDA-MB-231 xenografts sections (n=11). **i** Number of mitoses per 10 high power fields (HPF) corresponding to 2 mm² in shLRP-1 and shCtrl MDA-MB-231 xenografts tissue sections (x200) (n=12). Data points are mean ± SEM. n≥3. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 (Mann-Whitney or Student t-test).

Figure 3

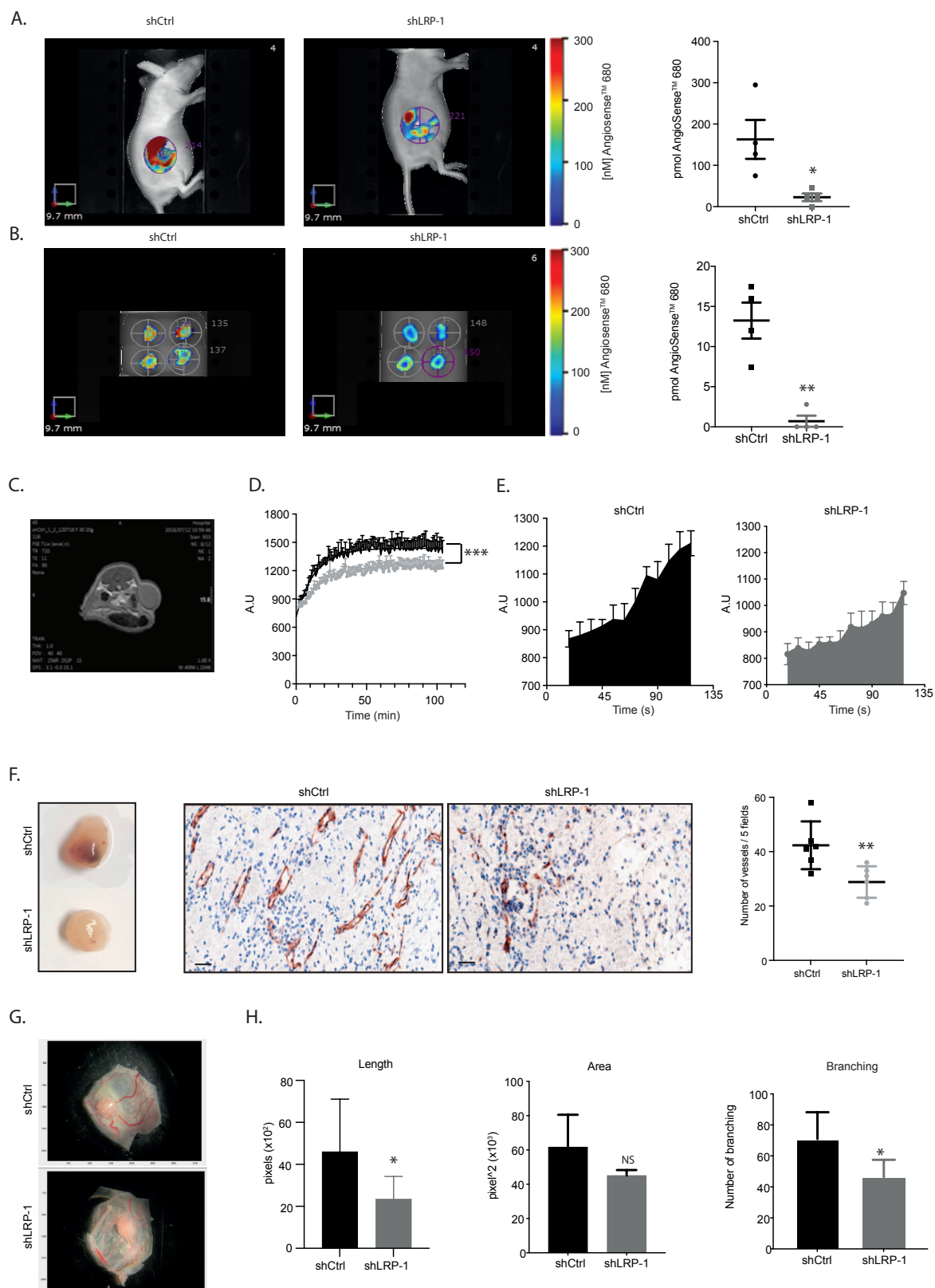


Fig. 3 LRP-1 repression affects MDA-MB-231 Matrigel® plugs angiogenesis. **a** (left panel) Representative images of AngioSense™-680 accumulation within BALBc/nu mice bearing shLRP-1 and shCtrl Matrigel® Plug (MP). (right panel) 3D fluorescence quantification at day 7 (pmol)(n=4). **b** (left panel) Representative images of AngioSense™-680 accumulation in *ex vivo* harvested shLRP-1 and shCtrl MP. (right panel) 3D fluorescence quantification at the end of the protocol (pmol)(n=4). **c** Coronal T1-weighted representative image of shCtrl MDA-MB-231 MP implantation. Dotted lines show MP. **d** Representative DCE-MRI signal intensity curve acquired in shLRP-1 and shCtrl MDA-MB-231 MP bearing mice after an intravenous bolus injection of Clariscan™. A.U = Arbitrary Unit. **e** Representative Area Under the Curve (AUC) of shLRP-1 and shCtrl MDA-MB-231 MP. **f** (left panel) Representative macrophotographs of shLRP-1 and shCtrl MDA-MB-231 MP after excision. (middle panel) Representative microphotographs of CD31 immuno-localization on shLRP-1 and shCtrl MDA-MB-231 MP tissue sections (x200). Scale bar: 50 μ m. (right panel) Number of vascular structures per 5 fields in shLRP-1 and shCtrl MDA-MB-231 MP tissue sections (x200) (n=6). **g** Representative macrophotographs of shLRP-1 and shCtrl grafted CAMs and vascular segmentation using a homemade MATLAB© plugin. **h** Total length of vascular structures and number of branching quantified through pixels measurements in shLRP-1 and shCtrl-grafted CAMs (n=5). Data points are mean $\pm$ SEM. n $\geq$ 3. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 (Mann-Whitney or Student t-test).

Figure 4

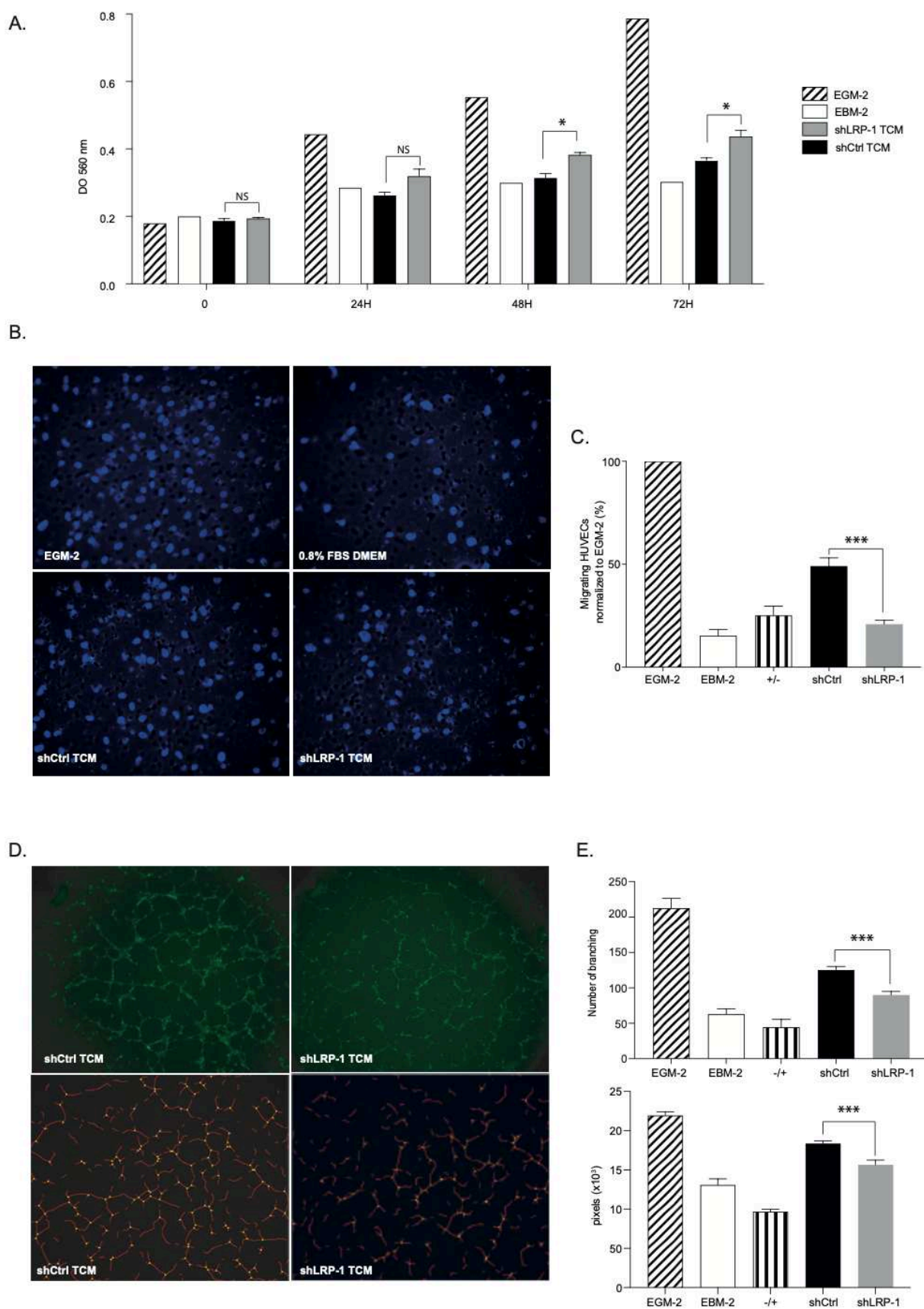


Fig. 4 shLRP-1 MDA-MB-231 secretome restricts the angiogenic potential of endothelial cells.

a MTT colorimetric cell proliferation assay of HUVECs incubated in EGM-2, EBM-2, shLRP-1 and shCtrl MDA-MB-231 TCM over time (0, 24H, 48H and 72H) (n=3). **b** Representative microphotographs of migrating HUVECs through a fibronectin-coated 8 μ m porous membrane by chemoattraction of EGM-2, 0.8% FBS DMEM (+/-), shLRP-1 and shCtrl MDA-MB-231 TCM for 8 hrs. **c** Histogram of migrating cells percentage per condition normalized to EGM-2 values (n=3). **d** (top panel) Representative microphotographs of HUVECs ability to form tubule-like structures when stimulated by shLRP-1 or shCtrl MDA-MB-231 TCM for 8H. (bottom panel) Tubular-like structures segmentation using AutoTube Software²³. **e** (top panel) Number of branching and (bottom panel) tubular-like structures surface area quantified through pixels measurement in EGM-2, EBM-2, 0.8% FBS DMEM (+/-), shLRP-1 and shCtrl MDA-MB-231 TCM conditions (n=3). Data points are mean $\pm$ SEM. n $\geq$ 3. *p < 0.05; **p<0.01; ***p<0.001 (Student t-test).

Figure 5

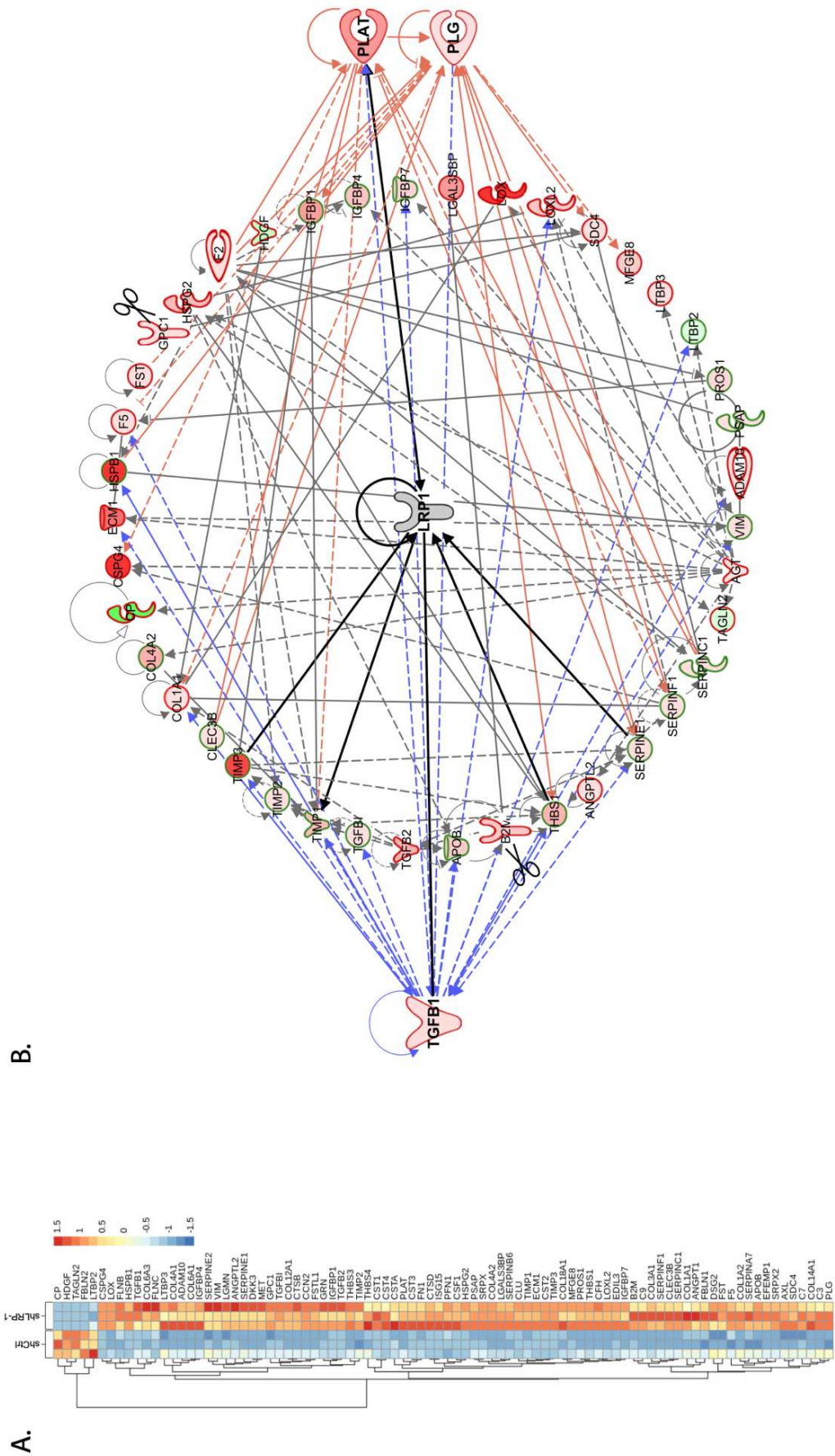
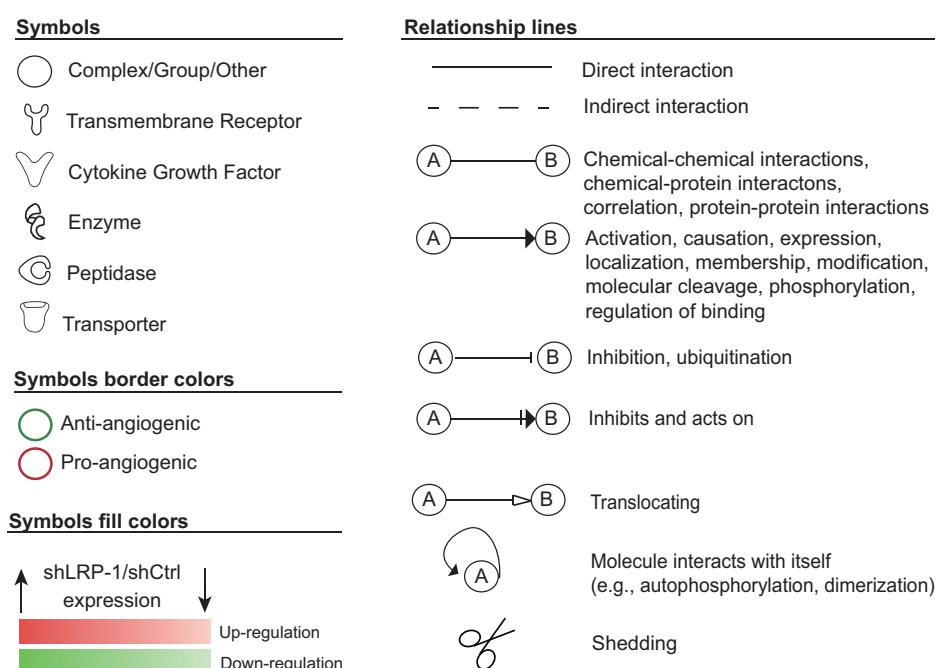


Fig. 5 LRP-1 may affect angiogenesis through TGF β signalling and the plasminogen/plasmin system modulation. **a** Colored heatmap generated from proteomics analysis data using the ggplot2 R package reflecting LRP-1 influence in 24h shLRP-1 and shCtrl MDA-MB-231 TCM. Comparison of proteomics profiles between shLRP-1 and shCtrl triplicate. Logarithmic scale of fold change from 1.5 to -1.5 . **b** Representative pathway of LRP-1 modulations in MDA-MB-231 secretome. Among selective known genes linked to cancer progression and/or angiogenesis, protein-protein interactions were mapped using Ingenuity Pathways Analysis. TGF- β signalling (governed by TGF β 1 on the left) and the plasminogen/plasmin system (represented by PLG/PLAT on the right) stand out by their privileged place within these multiple interactions organized around LRP-1.



ADAM10= A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 ; ANGPT1= Angiopoietin 1 ; ANGPTL2= Angiopoietin-like protein 2 ; APOB= Apolipoprotein B ; AXL= Tyrosine-protein kinase receptor UFO ; B2M= Beta-2-Microglobulin ; C3= Complement component 3 ; C7= Complement component 7 ; C9= Complement component 9 ; CCN2= Connective tissue growth factor ; CFH= Complement Factor H ; CLEC3B= C-Type Lectin Domain Family 3 Member B ; CLU= Clusterin ; COL12A1=Collagen type XII alpha 1 chain ; COL14A1=Collagen type XIV alpha 1 chain ; COL18A1= Collagen type XVIII alpha 1 chain ; COL1A1= Collagen type I alpha 1 chain ; COL1A2= Collagen type I alpha 2 chain ; COL3A1= Collagen type III alpha 1 chain ; COL4A1= Collagen type IV alpha 1 chain ; COL4A2= Collagen type IV alpha 2 chain ; COL6A1= Collagen type VI alpha 1 chain ; COL6A3= Collagen type VI alpha 3 chain ; CP= Ceruloplasmin ; CSF1= Colony Stimulating Factor 1 ; CSPG4= Chondroitin sulfate proteoglycan 4 ; CST1= Cystatin-SN ; CST2= Cystatin-SA ; CST3=Cystatin-C ; CST4= Cystatin-S ; CSTA= Cystatin-A ; CTSB= Cathepsin B ; CTSD= Cathepsin D ; DKK3= Dickkopf-related protein 3 ; DSG2= Desmoglein 2 ; ECM1= Extracellular Matrix Protein 1 ; EDIL3= EGF Like Repeats And Discoidin Domains 3 ; EFEMP1= EGF Containing Fibulin Extracellular Matrix Protein 1 ; F5= Coagulation Factor V ; FBLN1=Fibulin 1 ; FBLN2= Fibulin 2 ; FLNB= Filamin B ; FLNC= Filamin C ; FN1= Fibronectin ; FST= Follistatin ; FSTL1= Follistatine-like 1 ; GPC1= Glypican-1 ; GRN= Granulin ; HDGF= Heparin Binding Growth Factor ; HSPB1= Heat shock protein family B (small) member 1 ; HSPG2= Basement membrane-specific Heparan Sulfate Proteoglycan core protein ; IGFBP1= Insulin-like growth factor-binding protein 1 ; IGFBP4= Insulin Like Growth Factor Binding Protein 4 ; IGFBP7= Insulin-like growth factor-binding protein 7 ; ISG15= Interferon-stimulated gene 15 ; LGAL3BP= Galectin-3 binding protein ; LGMN = Legumain ; LOX= Lysyl oxidase ; LOXL2= Lysyl Oxidase Like 2 ; LTBP2= Latent Transforming Growth Factor Beta Binding Protein 2 ; LTBP3= Latent Transforming Growth Factor Beta Binding Protein 3 ; MET= MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase ; MFGE8= Milk fat globule-EGF factor 8 protein ; PFN1= Profilin-1 ; PLAT= Plasminogen Activator Tissue Type ; PLG= Plasminogen ; PROS1= Vitamin K-dependent protein S ; PSAP= Prosaposin ; SDC4= Syndecan 4 ; SERPINA7= Serpin Family A Member 7 or TBG (Thyroxine-Binding Globulin) ; SERPINB6= Serpin Family B Member 6 or PI-6 (Proteinase inhibitor 6) ; SERPINC1= Serpin Family C Member 1 or Antithrombin ; SERPINE1= Serpin Family E Member 1 or PAI-1 (plasminogen activator inhibitor type I) ; SERPINE2 = Serpin Family E Member 2 or PN-1 (protease nexin-1); SERPINF1= Serpin Family F Member 1 or PEDF (Pigment epithelium-derived factor); SRPX= Sushi Repeat Containing Protein X -Linked ; SRPX2= Sushi Repeat Containing Protein X-Linked 2 ; TAGLN2= Transgelin 2 ; TGFB1= Transforming growth factor beta 1 ; TGFB2= Transforming growth factor beta-2 ; TGFB1= Transforming growth factor beta-induced ; THBS1= Thrombospondin 1 ; THBS3= Thrombospondin 3 ; THBS4= Thrombospondin 4 ; TIMP1= TIMP Metallopeptidase Inhibitor 1 ; TIMP2= TIMP Metallopeptidase Inhibitor 2 ; TIMP3= TIMP Metallopeptidase Inhibitor 3 ; VIM= Vimentin.

Figure 6

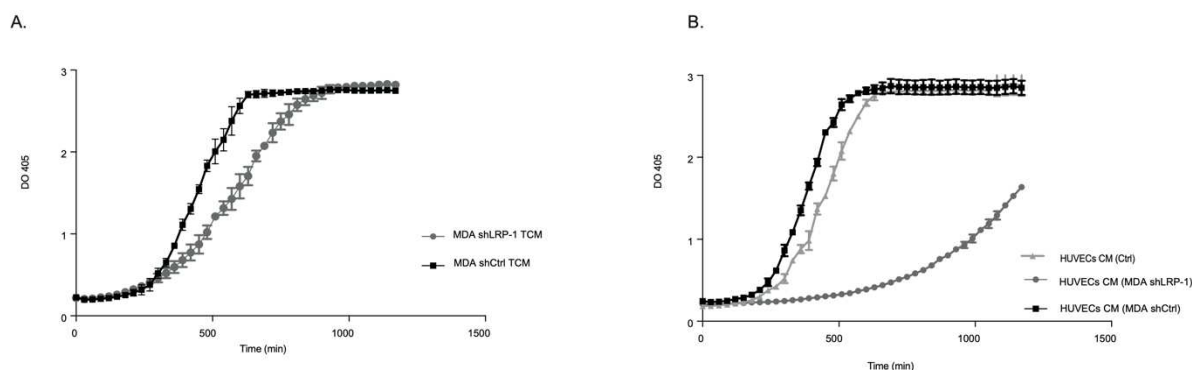


Fig. 6 LRP-1 modulates plasmin activity in 24h MDA-MB-231 secretome. a. plasmin activity generated in 24h shLRP-1 and shCtrl MDA-MB-231 TCM was measured every 30 min during 20h by a colorimetric technique using a synthetic substrate of plasmin S-2251TM (H-D-Val-Leu-Lys(pNA)) (n=3) **b.** plasmin activity generated in 24h HUVECs CM after their stimulation by 24h shLRP-1 and shCtrl MDA-MB-231 TCM was measured every 30 min during 20h by a colorimetric technique using a synthetic substrate of plasmin S-2251TM (H-D-Val-Leu-Lys(pNA)) (n=3). Data points are mean $\pm$ SEM. n $\geq$ 3. **p<0.01; ***p<0.001 (Student t-test).

Supplementary data section

Figure S1

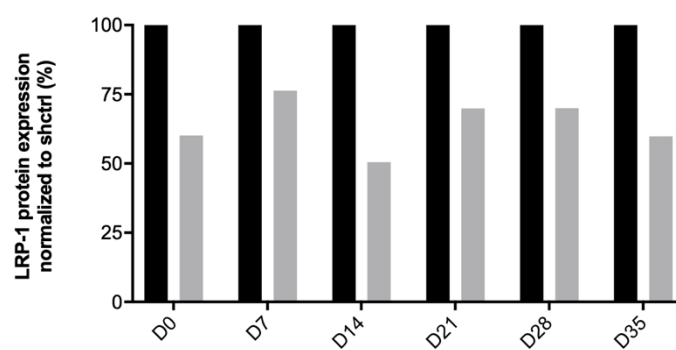


Fig. S1 LRP-1 targeted shRNA stability over time. Densitometric analysis of LRP-1 immunoblot in shLRP-1 MDA-MB-231 cells normalized to shCtrl over time without Geneticin™ (G418 Sulfate) selection pressure (n=1).

Figure S2

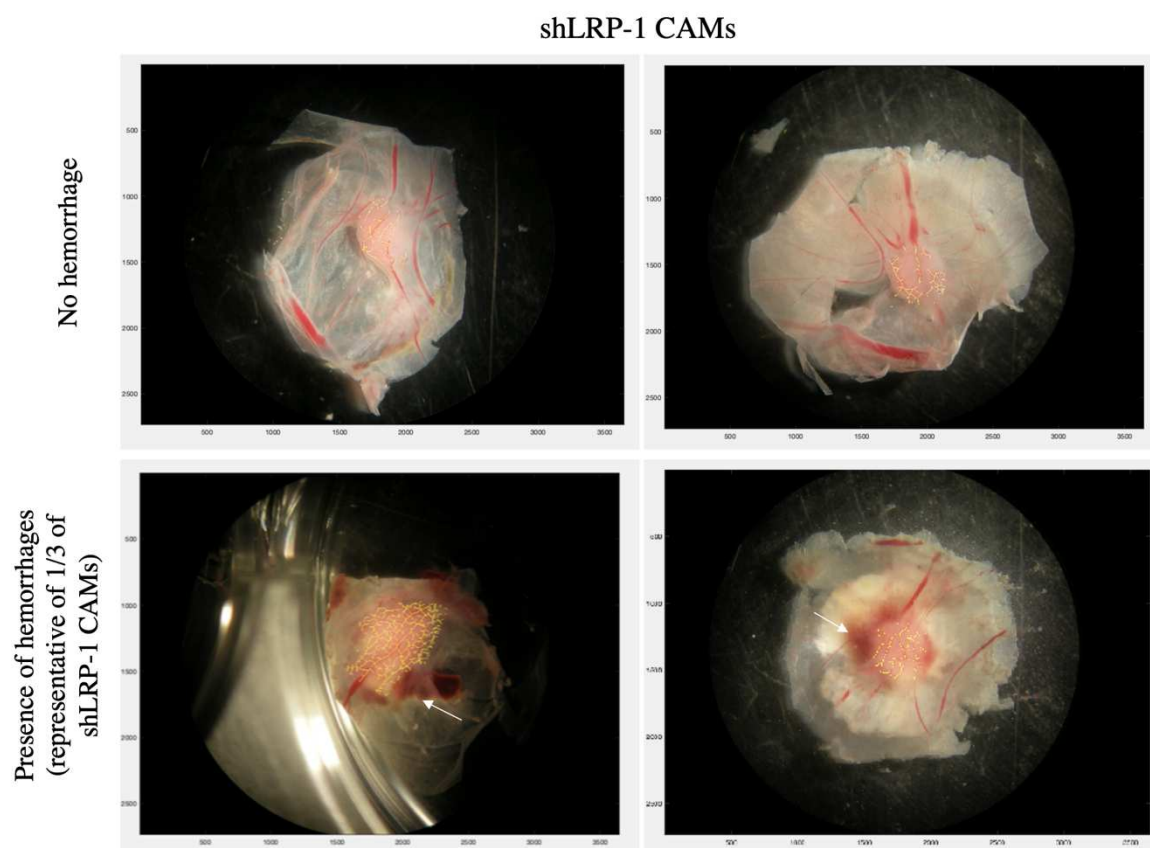


Fig. S2 Hemorrhages in shLRP-1 CAMs. (upper panels) Representative macrophotographs of shLRP-1 CAMs without bleeding. (bottom panels) Representative hemorrhage profiles of 1/3 of shLRP-1 CAMs. The bleeding is located by an arrow.

Figure S3

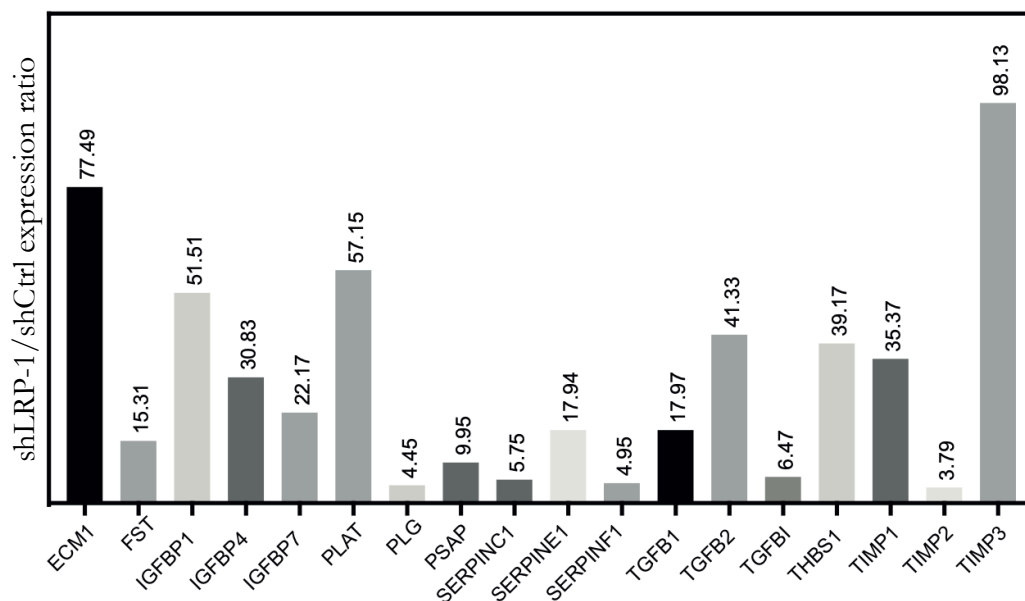


Fig. S3 Proteomic enrichment in shLRP-1 secretome. shLRP-1/shCtrl ratio of proteins of interest from proteomics analysis with Proline. All published ratios are significant ($p \leq 0.05$).

ECM1= Extracellular Matrix Protein 1 ; FST= Follistatin; IGFBP1= Insulin-like growth factor-binding protein 1 ; IGFBP4= Insulin Like Growth Factor Binding Protein 4 ; IGFBP7= Insulin-like growth factor-binding protein 7 ; PLAT= Plasminogen Activator Tissue Type ; PLG= Plasminogen ; PSAP= Prosaposin ; SERPINC1= Serpin Family C Member 1 or Antithrombin ; SERPINE1= Serpin Family E Member 1 or PAI-1 (plasminogen activator inhibitor type I) ; SERPINF1= Serpin Family F Member 1 or PEDF (Pigment epithelium-derived factor); TGFB1= Transforming growth factor beta 1 ; TGFB2= Transforming growth factor beta-2 ; TGFB1= Transforming growth factor beta-induced ; THBS1= Thrombospondin 1 ; TIMP1= TIMP Metalloproteinase Inhibitor 1 ; TIMP2= TIMP Metalloproteinase Inhibitor 2 ; TIMP3= TIMP Metalloproteinase Inhibitor 3.

Figure S4

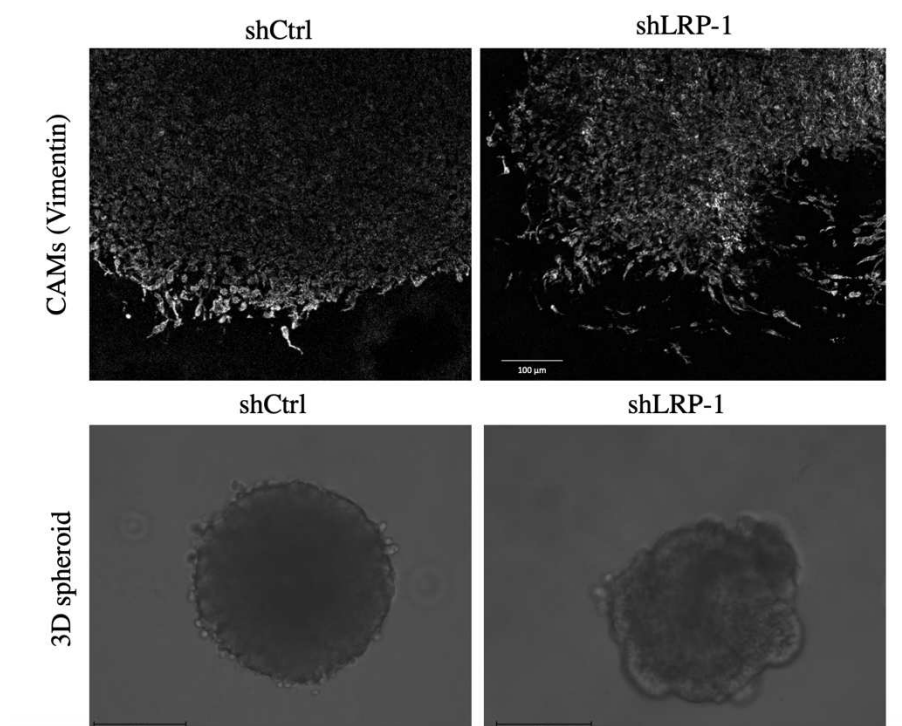


Fig. S4 Morphological profile of shLRP-1 CAMs and 3D spheroid. (top panels) Representative microphotography of vimentin immunofluorescence staining in shCtrl and shLRP-1 CAMs. Scale bar: 100 μ m. (bottom panels) Representative microphotographs of 3D shCtrl and shLRP-1 spheroid 48h after formation. Scale bar: 275 μ m.

Tableau S1

Gene	Name	Accession number ¹	Forward Primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Annealing temperature (°C)	Amplicon size (bp)
<i>LRP-1</i>	LDL receptor related protein 1	NM_002332.3 ¹	GCTATCGACGCCCTAAGAC	CGCCAGCCCTTGAGATACA	60	80
<i>RS18</i>	ribosomal protein 18 40S small ribosomal subunit	NM_022551.2 ¹	GCAGAATCCACGCCAGTACAA	GCCAGTGGTCTTGGTGTGCT	60	208
<i>RPL32</i>	60S ribosomal protein L32	NM_000994.4 ¹	CATTGGTTATGGAAGCAACAAA	TTCTTGAGGAAACATTGTGAG	60	150

Tab. S1 Primer sequences used for qRT-PCR analysis genes. ¹ NCBI accession number

Bibliographical references

- 1 Miller, K. D. *et al.* Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* **66**, 271-289 (2016).
- 2 Metzger-Filho, O. *et al.* Dissecting the heterogeneity of triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* **30**, 1879-1887 (2012).
- 3 Cleator, S., Heller, W. & Coombes, R. C. Triple-negative breast cancer: therapeutic options. *Lancet Oncol* **8**, 235-244 (2007).
- 4 Catalano, V. *et al.* Tumor and its microenvironment: a synergistic interplay. *Semin Cancer Biol* **23**, 522-532 (2013).
- 5 Jang, M. H., Kim, H. J., Kim, E. J., Chung, Y. R. & Park, S. Y. Expression of epithelial-mesenchymal transition-related markers in triple-negative breast cancer: ZEB1 as a potential biomarker for poor clinical outcome. *Hum Pathol* **46**, 1267-1274 (2015).
- 6 Alluri, P. & Newman, L. A. Basal-like and triple-negative breast cancers: searching for positives among many negatives. *Surg Oncol Clin N Am* **23**, 567-577 (2014).
- 7 Bertucci, F. *et al.* How basal are triple-negative breast cancers? *Int J Cancer* **123**, 236-240 (2008).
- 8 Baghban, R. *et al.* Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Commun Signal* **18**, 59 (2020).
- 9 Folkman, J. & Hanahan, D. Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis. *Princess Takamatsu Symp* **22**, 339-347 (1991).
- 10 Weis, S. M. & Cheresch, D. A. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med* **17**, 1359-1370 (2011).
- 11 Lugano, R., Ramachandran, M. & Dimberg, A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell Mol Life Sci* **77**, 1745-1770 (2020).
- 12 Lillis, A. P., Van Duyn, L. B., Murphy-Ullrich, J. E. & Strickland, D. K. LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiol Rev* **88**, 887-918 (2008).
- 13 Emonard, H., Theret, L., Bennasroune, A. H. & Dedieu, S. Regulation of LRP-1 expression: make the point. *Pathol Biol (Paris)* **62**, 84-90 (2014).
- 14 Herz, J. & Strickland, D. K. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest* **108**, 779-784 (2001).
- 15 Theret, L. *et al.* Identification of LRP-1 as an endocytosis and recycling receptor for beta1-integrin in thyroid cancer cells. *Oncotarget* **8**, 78614-78632 (2017).
- 16 Langlois, B. *et al.* LRP-1 promotes cancer cell invasion by supporting ERK and inhibiting JNK signaling pathways. *PLoS One* **5**, e11584 (2010).
- 17 Catasus, L. *et al.* Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 is associated with proliferation and invasiveness in Her-2/neu and triple-negative breast carcinomas. *Hum Pathol* **42**, 1581-1588 (2011).
- 18 Dedieu, S. & Langlois, B. LRP-1: a new modulator of cytoskeleton dynamics and adhesive complex turnover in cancer cells. *Cell Adh Migr* **2**, 77-80 (2008).

- 19 Berquand, A. *et al.* A gentle approach to investigate the influence of LRP-1 silencing on the migratory behavior of breast cancer cells by atomic force microscopy and dynamic cell studies. *Nanomedicine* **18**, 359-370 (2019).
- 20 Campion, O. *et al.* Contribution of the Low-Density Lipoprotein Receptor Family to Breast Cancer Progression. *Front Oncol* **10**, 882 (2020).
- 21 El Alaoui-Lasmaili, K. *et al.* A new algorithm for a better characterization and timing of the anti-VEGF vascular effect named "normalization". *Angiogenesis* **20**, 149-162 (2017).
- 22 Jerman, T., Pernus, F., Likar, B. & Spiclin, Z. Enhancement of Vascular Structures in 3D and 2D Angiographic Images. *IEEE Trans Med Imaging* **35**, 2107-2118 (2016).
- 23 Montoya-Zegarra, J. A. *et al.* AutoTube: a novel software for the automated morphometric analysis of vascular networks in tissues. *Angiogenesis* **22**, 223-236 (2019).
- 24 Fuselier, C. *et al.* Anti-Tumoral and Anti-Angiogenic Effects of Low-Diluted Phenacetinum on Melanoma. *Front Oncol* **11**, 597503 (2021).
- 25 Alexander, R. A. *et al.* VEGF-induced endothelial cell migration requires urokinase receptor (uPAR)-dependent integrin redistribution. *Cardiovasc Res* **94**, 125-135 (2012).
- 26 Bikfalvi, A. [Tumoral angiogenesis: models, targets and inhibition]. *J Soc Biol* **203**, 167-170 (2009).
- 27 de Gonzalo-Calvo, D. *et al.* Intratumor cholesteryl ester accumulation is associated with human breast cancer proliferation and aggressive potential: a molecular and clinicopathological study. *BMC Cancer* **15**, 460 (2015).
- 28 Pires, L. A. *et al.* Effect of neoadjuvant chemotherapy on low-density lipoprotein (LDL) receptor and LDL receptor-related protein 1 (LRP-1) receptor in locally advanced breast cancer. *Braz J Med Biol Res* **45**, 557-564 (2012).
- 29 dos Santos, C. R. *et al.* LDL-cholesterol signaling induces breast cancer proliferation and invasion. *Lipids Health Dis* **13**, 16 (2014).
- 30 Cedo, L., Reddy, S. T., Mato, E., Blanco-Vaca, F. & Escola-Gil, J. C. HDL and LDL: Potential New Players in Breast Cancer Development. *J Clin Med* **8** (2019).
- 31 Kang, H. S. *et al.* LRP1-dependent pepsin clearance induced by 2'-hydroxycinnamaldehyde attenuates breast cancer cell invasion. *Int J Biochem Cell Biol* **53**, 15-23 (2014).
- 32 C, T., Dv, S., A, S., V, K. & A, K. A Concurrent Comparison of the Epidemiology and Clinical Presentation of Patients Hospitalized with Pandemic 2009 (H1N1) Influenza and Seasonal Influenza-A in Sub-himalayan Region of Himachal Pradesh. *J Assoc Physicians India* **67**, 70-74 (2019).
- 33 Strickland, D. K. & Muratoglu, S. C. LRP in Endothelial Cells: A Little Goes a Long Way. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **36**, 213-216 (2016).
- 34 Mao, H., Xie, L. & Pi, X. Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1 Signaling in Angiogenesis. *Front Cardiovasc Med* **4**, 34 (2017).
- 35 El Asmar, Z. *et al.* Convergent Signaling Pathways Controlled by LRP1 (Receptor-related Protein 1) Cytoplasmic and Extracellular Domains Limit Cellular Cholesterol Accumulation. *J Biol Chem* **291**, 5116-5127 (2016).

- 36 Njah, K. *et al.* A Role of Agrin in Maintaining the Stability of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 during Tumor Angiogenesis. *Cell Rep* **28**, 949-965 e947 (2019).
- 37 Pencheva, N. *et al.* Convergent multi-miRNA targeting of ApoE drives LRP1/LRP8-dependent melanoma metastasis and angiogenesis. *Cell* **151**, 1068-1082 (2012).
- 38 Lu, C. W. *et al.* VLDL and LDL, but not HDL, promote breast cancer cell proliferation, metastasis and angiogenesis. *Cancer Lett* **388**, 130-138 (2017).
- 39 Safina, D. *et al.* Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 is a novel modulator of radial glia stem cell proliferation, survival, and differentiation. *Glia* **64**, 1363-1380 (2016).
- 40 Türkbey, B., Thomasson, D., Pang, Y., Bernardo, M. & Choyke, P. L. The role of dynamic contrast-enhanced MRI in cancer diagnosis and treatment. *Diagnostic and interventional radiology (Ankara, Turkey)* **16**, 186 (2010).
- 41 Onda, N., Kemmochi, S., Morita, R., Ishihara, Y. & Shibutani, M. In vivo imaging of tissue-remodeling activity involving infiltration of macrophages by a systemically administered protease-activatable probe in colon cancer tissues. *Transl Oncol* **6**, 628-637 (2013).
- 42 Montel, V., Gaultier, A., Lester, R. D., Campana, W. M. & Gonias, S. L. The low-density lipoprotein receptor-related protein regulates cancer cell survival and metastasis development. *Cancer Res* **67**, 9817-9824 (2007).
- 43 Muz, B., de la Puente, P., Azab, F. & Azab, A. K. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckl)* **3**, 83-92 (2015).
- 44 Jiang, X. *et al.* The role of microenvironment in tumor angiogenesis. *J Exp Clin Cancer Res* **39**, 204 (2020).
- 45 Qutub, A. A. & Popel, A. S. Elongation, proliferation & migration differentiate endothelial cell phenotypes and determine capillary sprouting. *BMC Syst Biol* **3**, 13 (2009).
- 46 Goulet, C. R. & Pouliot, F. TGFbeta Signaling in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol* **1270**, 89-105 (2021).
- 47 Moore-Smith, L. & Pasche, B. TGFBR1 signaling and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **16**, 89-95 (2011).
- 48 Kessenbrock, K., Plaks, V. & Werb, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* **141**, 52-67 (2010).
- 49 Albo, D. *et al.* Thrombospondin-1 and transforming growth factor-beta 1 promote breast tumor cell invasion through up-regulation of the plasminogen/plasmin system. *Surgery* **122**, 493-499; discussion 499-500 (1997).
- 50 Ren, B., Yee, K. O., Lawler, J. & Khosravi-Far, R. Regulation of tumor angiogenesis by thrombospondin-1. *Biochim Biophys Acta* **1765**, 178-188 (2006).
- 51 Gupta, K. *et al.* VEGF prevents apoptosis of human microvascular endothelial cells via opposing effects on MAPK/ERK and SAPK/JNK signaling. *Exp Cell Res* **247**, 495-504 (1999).

-
- 52 Greenaway, J. *et al.* Thrombospondin-1 inhibits VEGF levels in the ovary directly by binding and internalization via the low density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1). *J Cell Physiol* **210**, 807-818 (2007).
- 53 Iruela-Arispe, M. L., Luque, A. & Lee, N. Thrombospondin modules and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 1070-1078 (2004).
- 54 Do, H. S. *et al.* Enhanced thrombospondin-1 causes dysfunction of vascular endothelial cells derived from Fabry disease-induced pluripotent stem cells. *EBioMedicine* **52**, 102633 (2020).
- 55 Law, R. H. *et al.* An overview of the serpin superfamily. *Genome Biol* **7**, 216 (2006).
- 56 Rakic, J. M. *et al.* Role of plasminogen activator-plasmin system in tumor angiogenesis. *Cell Mol Life Sci* **60**, 463-473 (2003).
- 57 He, Y. L. *et al.* Enhanced hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α stability induced by 5-hydroxymethyl-2-furfural (5-HMF) contributes to protection against hypoxia. *Mol Med* **20**, 590-600 (2015).
- 58 Luoto, K. R., Kumareswaran, R. & Bristow, R. G. Tumor hypoxia as a driving force in genetic instability. *Genome Integr* **4**, 5 (2013).

– Partie I (b) –

Cette partie est consacrée aux résultats obtenus i) pour l'expression du VEGF par les cellules tumorales invalidées ou non pour LRP-1, ii) pour l'analyse protéomique des sécrétomes issus des MDA-MB-231 invalidées pour l'expression de LRP-1 avec les stratégies basées sur l'utilisation de siARN.

Le VEGF est un des facteurs pro-angiogénique le plus étudié et se voit impliqué dans l'angiogenèse tumorale. Nous avons étudié les conséquences de l'invalidation de LRP-1 des cellules MDA-MB-231 sur l'expression du VEGF. Des expériences d'immunohistochimie anti-VEGF, réalisées à partir de coupes de tumeurs de MDA-MB-231 shLRP-1 et shCtrl, n'ont pas révélé de différence significative quant à l'expression du VEGF. Toutefois, des tendances ont pu être dégagées. Une augmentation de la positivité cellulaire au VEGF est observée dans les tumeurs MDA-MB-231 shLRP-1 avec néanmoins une intensité de marquage inférieure à celle observée dans les tumeurs shCtrl (**Fig. R1a,b, Part. I (b)**). L'analyse par RT-qPCR des niveaux d'expression de différentes isoformes du VEGF met en évidence une augmentation d'expression du VEGF dans les tumeurs shLRP-1 comparées aux shCtrl. Notamment, une augmentation significative du VEGF-165 dans les extraits tumoraux MDA-MB-231 shLRP-1 comparés aux shCtrl (1,00 vs 1,73 ; ** $p < 0,01$) a pu être mesurée (**Fig. R1c, Part. I (b)**). Une diminution transcriptionnelle du VEGF total *in vitro* dans les cellules MDA-MB-231 shLRP-1 comparées aux shCtrl a été observée mais n'a pas pu être corrélée à une diminution d'expression du VEGF dans le sécrétome des cellules shLRP-1 puisque nous avons mesuré par ELISA une augmentation du VEGF d'un facteur 2 comparé au sécrétome des cellules shCtrl ($n=9$; 100 vs 196% ; *** $p < 0,005$) (**Fig. R1d,e, Part. I (b)**). Par ailleurs, lorsque l'expression relative du VEGF exprimé par les tumeurs est comparée à celle des cellules, l'expression du VEGF tend à diminuer dans les extraits tumoraux shCtrl comparés aux extraits cellulaires, alors que l'inverse se produit concernant les cellules shLRP-1 (**Fig. R1f, Part. I (b)**).

Figure R1

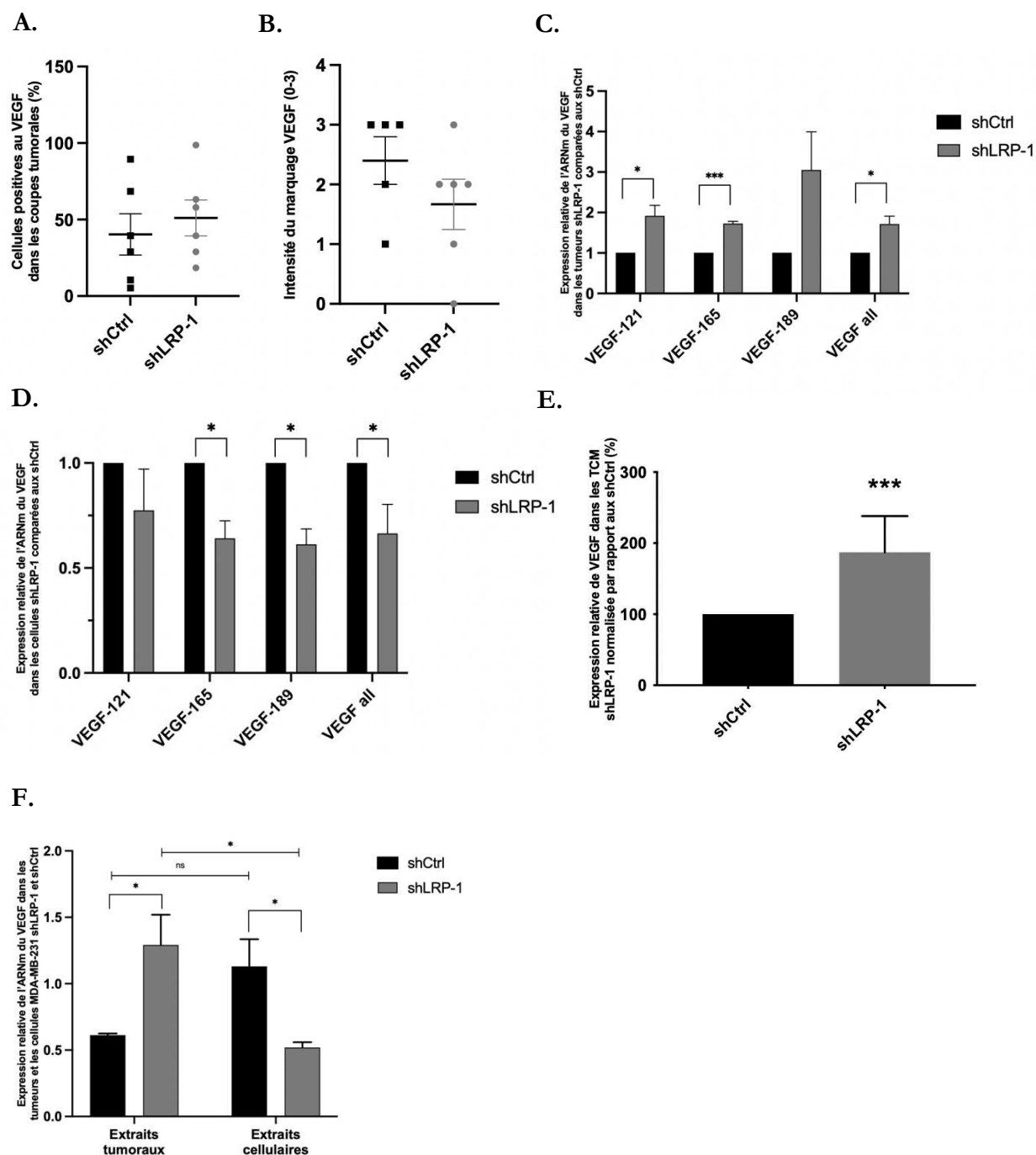


Fig. R1 Etude de la modulation de l'expression du VEGF en fonction de l'expression de LRP-1. **a** Pourcentage de cellules positives à l'immunomarquage VEGF sur les coupes tumorales shLRP-1 et shCtrl (n=6/groupe). **b** Intensité du marquage VEGF sur une échelle de 0 à 3 (0: nul ; 1: faible ; 2: modéré ; 3: intense)(n=5/groupe). **c** Expression relative de l'ARMm du VEGF-121, VEGF-165, VEGF-189 et de l'ensemble des isoformes dans les tumeurs MDA-MB-231 shLRP-1 normalisée par rapport à celle des tumeurs shCtrl fixée arbitrairement à 1. **d** Expression relative de l'ARMm du VEGF-121, VEGF-165, VEGF-189 et de l'ensemble des isoformes dans les cellules MDA-MB-231 shLRP-1

normalisée par rapport à celle des shCtrl fixée arbitrairement à 1. Moyenne de 3 expériences indépendantes $\pm$ SEM. **e** Pourcentage d'expression relative du VEGF mesurée par ELISA (*Human VEGF DuoSet ELISA*, DY293B, Biotechne) dans les TCM MDA-MB-231 shLRP-1 normalisée par rapport aux TCM shCtrl (n=9). **f** Comparaison de l'expression relative de l'ARNm du VEGF all dans les extraits tumoraux et cellulaires de MDA-MB-231 shLRP-1 et shCtrl. Les données sont représentatives de la moyenne $\pm$ SEM d'au moins 3 expériences indépendantes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$ (*student t test*).

Les stratégies permettant d'étudier le rôle d'une protéine se basent sur son invalidation et/ou sa surexpression afin d'en déterminer la/les fonction(s). L'équipe de recherche que j'ai intégrée lors de mon doctorat travaillait depuis plusieurs années sur le rôle de LRP-1, et a opté pour une approche visant à réprimer l'expression de LRP-1 en utilisant une approche d'interférence à l'ARN. Ainsi, les MDA-MB-231 shLRP-1 sont le fruit de la transfection stable des cellules MDA-MB-231 par un plasmide permettant d'exprimer un shARN dirigé contre LRP-1. L'établissement d'un modèle stable de répression de LRP-1 s'est avéré indispensable pour la réalisation de nos modèles *in vivo*, et plus confortable *in vitro* que l'utilisation de siARN. Néanmoins, nous avons voulu savoir si l'inhibition transitoire de LRP-1 par une stratégie siRNA conduisait à des effets similaires sur le sécrétome.

Nous avons d'abord comparé l'expression protéique et transcriptionnelle de LRP-1. Il s'avère que l'utilisation de siRNA permet d'améliorer l'efficacité de l'invalidation de l'expression de LRP-1 puisqu'une diminution de 77% de la quantité d'ARNm est observée dans les MDA-MB-231 siLRP (**Fig. R2a, Part. I (b)**) contre 60% dans les cellules exprimant stablement les shARN. Cette différence est confirmée au niveau protéique avec une diminution d'expression de 95% dans les siLRP-1 et de 67% dans les MDA-MB-231 shARN (**Fig. R2b, Part. I (b)**). Ainsi, l'utilisation de siARN, bien que transitoire, s'avère bien plus performante pour réprimer l'expression de LRP-1 comparée à l'utilisation de shARN. Pour tenter de mieux comprendre le rôle du récepteur LRP-1, nous avons analysé les sécrétomes des cellules MDA-MB-231 transfectées par des siARN (siLRP-1 et siCtrl). L'analyse protéomique des sécrétomes siLRP-1/siCtrl a révélé davantage de protéines que celle des shLRP-1/shCtrl. Néanmoins, l'analyse des rapport siLRP-1/siCtrl révèle une plus faible proportion des résultats exploitables à la vue de la significativité des réplicas comparés aux shARN. Parmi les différences significatives nous pouvons noter que les facteurs de changement d'expression apparaissent plus modérés dans les siARN (2,279 au maximum) comparées aux shARN, où l'on retrouve souvent des facteurs de changement importants reflétant une détection maximale par la technique de 1000 (**Fig. R2c, Part. I (b)**).

Figure R2

A. B.

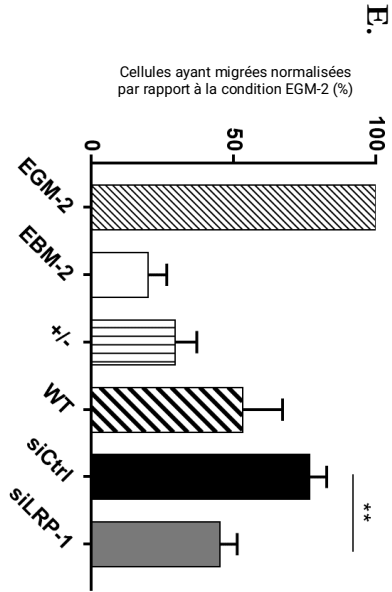
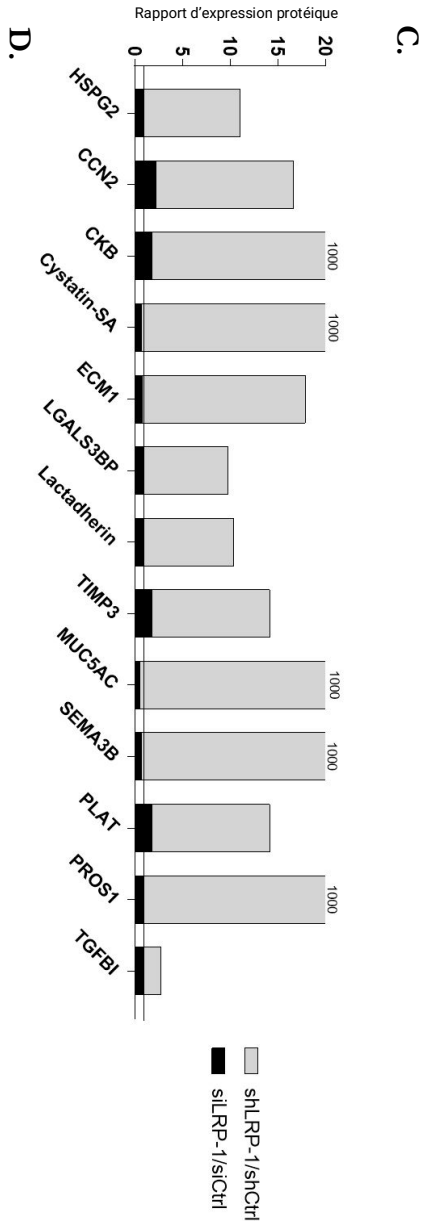
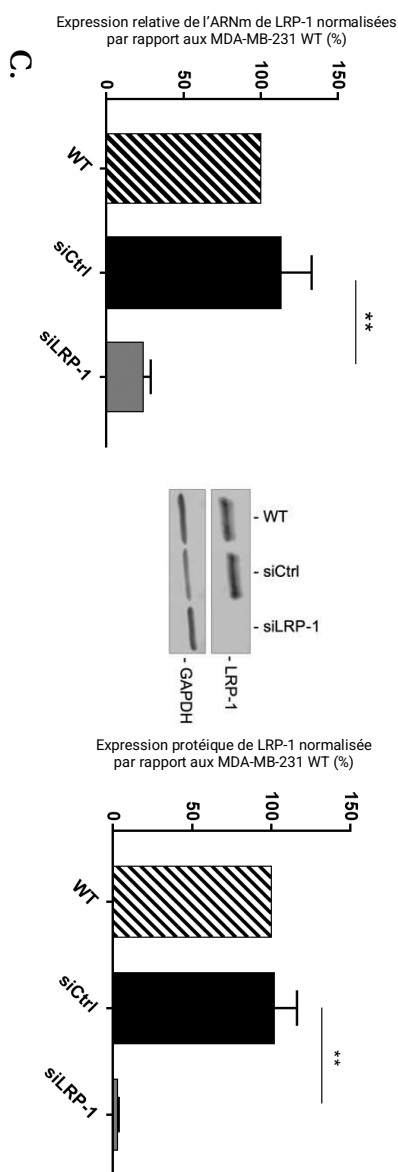


Fig. R2 Caractérisation et étude des sécrétomes issues de cellules invalidées pour l'expression de LRP-1 par l'intermédiaire de siARN et de shARN. **a** Expression relative de l'ARNm de LRP-1 dans les cellules MDA-MB-231 siCtrl et siLRP-1 normalisée par rapport aux WT (n=3). **b** (panel de gauche) Immunoblot représentatif de l'expression de LRP-1 dans les cellules MDA-MB-231 WT, siCtrl et siLRP-1. (panel de droite) Analyse densitométrique de l'expression de LRP-1 dans les cellules MDA-MB-231 siCtrl et siLRP-1 normalisée par rapport aux WT (n=3). **c** Comparaison des ratios d'expression protéique des sécrétomes siLRP-1/siCtrl et shLRP-1/shCtrl issus de la protéomique basée sur la spectrométrie de masse. La ligne noire correspond à un ratio égal à 1. Tous les ratios présentés sont significatifs ($p < 0,05$) (n=3). **d** Microphotographies représentatives de la migration des HUVECs à travers une membrane poreuse de 8 μ m recouverte de fibronectine par chimioattraction vers les milieux EGM-2, EBM-2, DMEM 0,8% SVF (+/-), le sécrétome des cellules WT, siCtrl et siLRP-1 pendant 8 heures. Barre d'échelle : 100 μ m. **e** Pourcentage de cellules ayant migrées par condition normalisé par rapport à la condition contrôle EGM-2 (n=3). Les données sont représentatives de la moyenne +/- SEM d'au moins 3 expériences indépendantes. ** $p < 0,01$ (*student t test*).

HSPG2= Heparan Sulfate Proteoglycan 2 ; CCN2= Connective tissue growth factor ou CTGF ; CKB= Creatine kinase B-type ; ECM1= Extracellular Matrix Protein 1 ; LGALS3BP= Galectin 3 Binding Protein ; TIMP3= Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 ; MUC5AC= Mucin-5AC ; SEMA3B= Semaphorin 3B ; PLAT= Plasminogen Activator Tissue-type ; PROS1= Vitamin K-dependent protein S precursor ; APOH= Apolipoprotein H ; C1R= Complement component 1r ; SERPIND1= Serpin Family D Member 1 ; PDGFRL= Platelet Derived Growth Factor Receptor Like ; HTRA1= HtrA Serine Peptidase 1 ; THBS4= Thrombospondin-4 ; DCD Dermicidin ou proteolysis-inducing factor (PIF).

L'expression de la moitié des protéines dont le rapport siLRP-1/siCtrl ne varie pas augmente significativement dans les cellules shLRP-1 comparées aux shCtrl avec des rapports supérieurs à 1,925. C'est le cas notamment pour ECM1 dont le rapport siARN est de 0,824 contre 17,08 lorsqu'il est question de shARN, mais aussi de PROS1 (0,896 vs 1000), LGALS3BP (0,881 vs 8,917) ou encore TGFBI (0,85 vs 1,925). Toutefois, parmi les protéines détectées dans l'analyse des siARN, deux d'entre elles présentent des résultats divergeant. L'expression de la MUC5AC et celle de la SEMA3B diminuent dans les sécrétomes siLRP-1/siCtrl avec des ratios de 0,578 et 0,735, respectivement, alors qu'elles augmentent infiniment dans les sécrétomes shLRP-1/shCtrl (**Fig. R2c, Part. I (b)**). Par ailleurs, quatre protéines présentent un ratio supérieur à 1,5, venant appuyer les résultats comparables obtenus dans l'analyse des shARN. Ainsi, CCN2, CKB, TIMP3 et PLAT apparaissent régulées à la hausse dans les cellules siLRP-1 et shLRP-1 comparées aux siCtrl et shCtrl, respectivement. Elles pourraient jouer un rôle éminent et robuste dans les effets biologiques observés en lien direct avec la répression du récepteur LRP-1 (**Fig. R2c, Part. I (b)**). Contrairement au système

plasminogène/plasmine, nous n'avons pas retrouvé de modulation de la voie du TGF- β mise en évidence dans le sécrétome des shLRP-1/shCtrl, suggérant que les effets observés dans les MDA-MB-231 shRNA seraient le fruit d'une adaptation plus stable, secondaire. Malgré le fait que certaines protéines ne soient pas modulées dans les sécrétomes siLRP-1/siCtrl par rapport au shLRP-1/shCtrl, les expériences de migration cellulaire réalisées avec les HUVECs indiquent que les milieux conditionnés provenant des MDA-MB-231 siCtrl ou shCtrl possèdent les mêmes capacités de chemoattraction. L'utilisation de milieux conditionnés shLRP-1 ou siLRP-1 diminuent similairement les capacités migratoires des cellules endothéliales. L'utilisation de TCM siLRP-1 induit une diminution de 40% des capacités migratoires des HUVECs comparé au nombre de cellules migrant vers les TCM siCtrl (**Fig. R2e, Part. I (b)**). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus avec les milieux conditionnés issus de cellules MDA-MB-231 shLRP-1, où une diminution de 58% avait été mesurée (**Fig. 4, Part. I (a)**). Ces données soutiennent nos conclusions quant à la contribution du récepteur LRP-1 exprimé par les cellules tumorales dans la modulation du potentiel angiogénique des cellules endothéliales. Le fait que les effets soient moins prononcés pourrait s'expliquer par les différences de niveaux d'expression protéique observées dans les sécrétomes des cellules siLRP/siCtrl par comparaison aux différences observées dans les shLRP/shCtrl.

RÉSULTATS

– Partie II –

Quels sont les effets de LRP-1 sur la composition du sécrétome des MDA-MB-231 cultivées en hypoxie ?

Le récepteur LRP-1 est-il impliqué dans le processus de dissémination métastatique des cellules tumorales ?

Cette partie II des résultats est consacrée aux résultats préliminaires obtenus sur la contribution de LRP-1 dans le processus de dissémination métastatique. Nous nous intéresserons au rôle de LRP-1 dans la réponse à l'hypoxie au travers de l'analyse des sécrétomes et du processus de migration transendothéliale. Il s'agira de préciser le rôle du récepteur LRP-1 dans les phases tardives de la progression tumorale, rôle pouvant diverger de celui observé dans les phases plus précoces de la pathologie.

L'hypoxie joue un rôle prépondérant dans le développement tumoral et en particulier dans l'induction de l'angiogenèse tumorale. Nous avons voulu comprendre comment LRP-1, dont le gène est lui-même régulé par l'hypoxie, influence la réponse cellulaire face à ce stress déterminant dans l'évolution du cancer. Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à comparer le sécrétome des cellules shLRP-1/shCtrl en hypoxie par rapport à leur sécrétome en normoxie. Comme illustré dans la figure 3, nous avons tout d'abord validé les conditions expérimentales de culture cellulaire en hypoxie en mesurant par WB les niveaux d'expression protéique d'HIF-1 α dans les cellules MDA-MB-231 shLRP-1 et shCtrl (**Fig. R3a, Part. II**). L'expression/stabilisation de HIF-1 α s'établit après environ 3 heures, et reste stable jusque 8h. En condition normoxique, HIF-1 α est rapidement dégradé par le protéasome. Les données obtenues nous permettent d'affirmer que l'invalidation de l'expression de LRP-1 s'observe toujours en condition hypoxique (**Fig. R3b, Part. II**). En effet, plusieurs articles décrivent une régulation positive de l'expression de LRP-1 en hypoxie ; il fallait donc s'assurer que la stratégie shRNA permettait de conserver une diminution d'expression du récepteur LRP-1 en conditions hypoxiques avant de réaliser une analyse du sécrétome. Concernant l'analyse protéomique des sécrétomes, l'hétérogénéité intra-échantillon ne nous a pas permis d'obtenir des résultats protéomique en hypoxie aussi riches qu'en normoxie (**Fig. 5, Part. I (a)**). Par comparaison, les résultats obtenus en condition normoxique nous avaient permis de mettre en évidence une modulation significative ($p < 0.05$) de 544 protéines contre 78 protéines en condition hypoxique. Après s'être affranchis manuellement des protéines non sécrétées, nous avons comparé le ratio des TCM shLRP-1/shCtrl en hypoxie avec celui des TCM shLRP-1/shCtrl en normoxie (**Fig. R3c, Part. II**). Parmi les 12 protéines identifiées, une d'entre elles, MAMDC2 (*MAM Domain Containing 2*), membre de la famille des MAM (*Meprin/ A5-protein/ PTPmu*) et dotée d'une activité anti-tumorale récemment mise en évidence (Lee et al., 2020), présente un ratio supérieur à 1,5. Lorsque les cellules sont soumises à l'hypoxie pendant 24h, sa présence dans le sécrétome augmente de près de 56% dans les shLRP-1 en comparaison aux shCtrl en condition normoxique (58,87 vs 25,98).

Figure R3

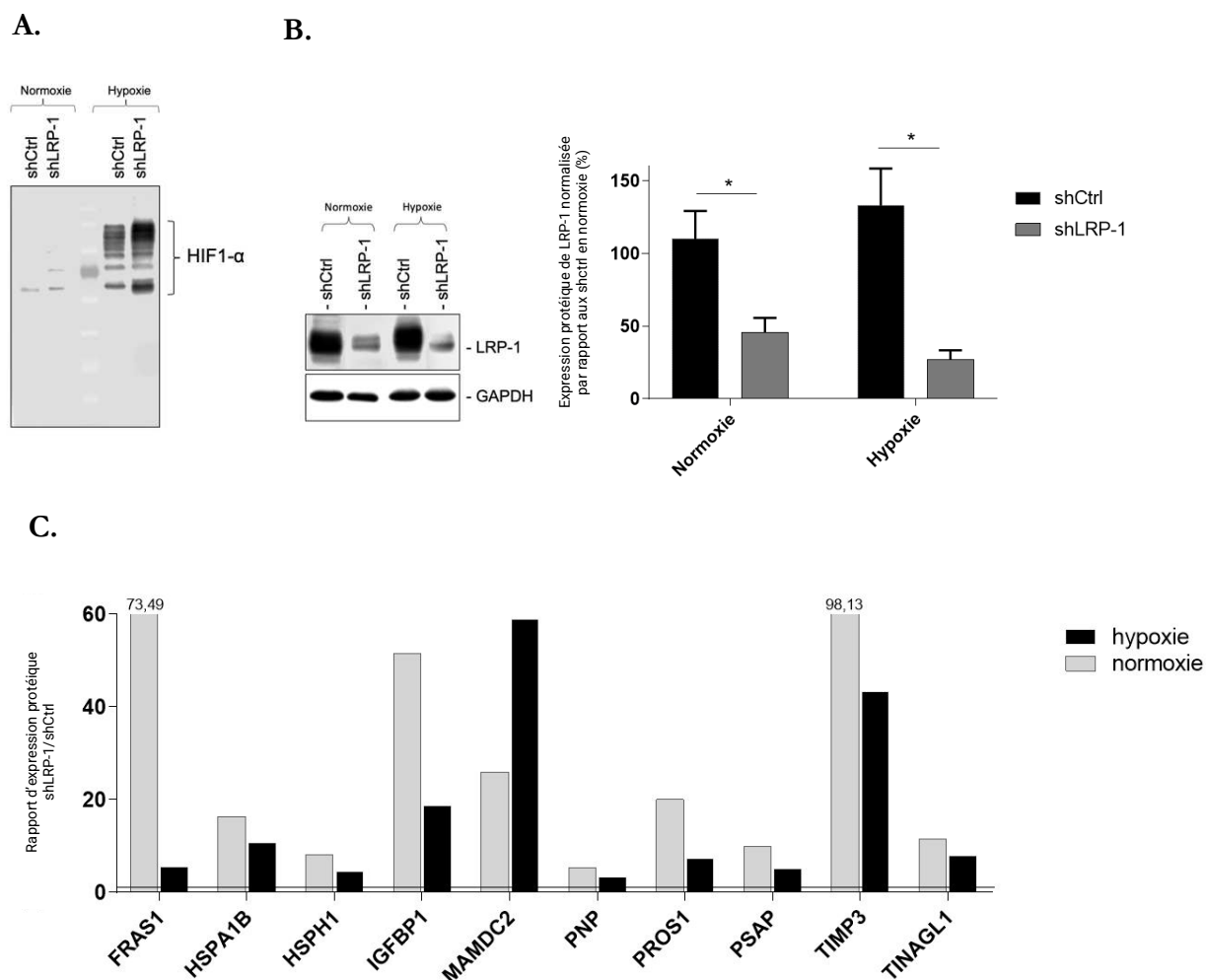
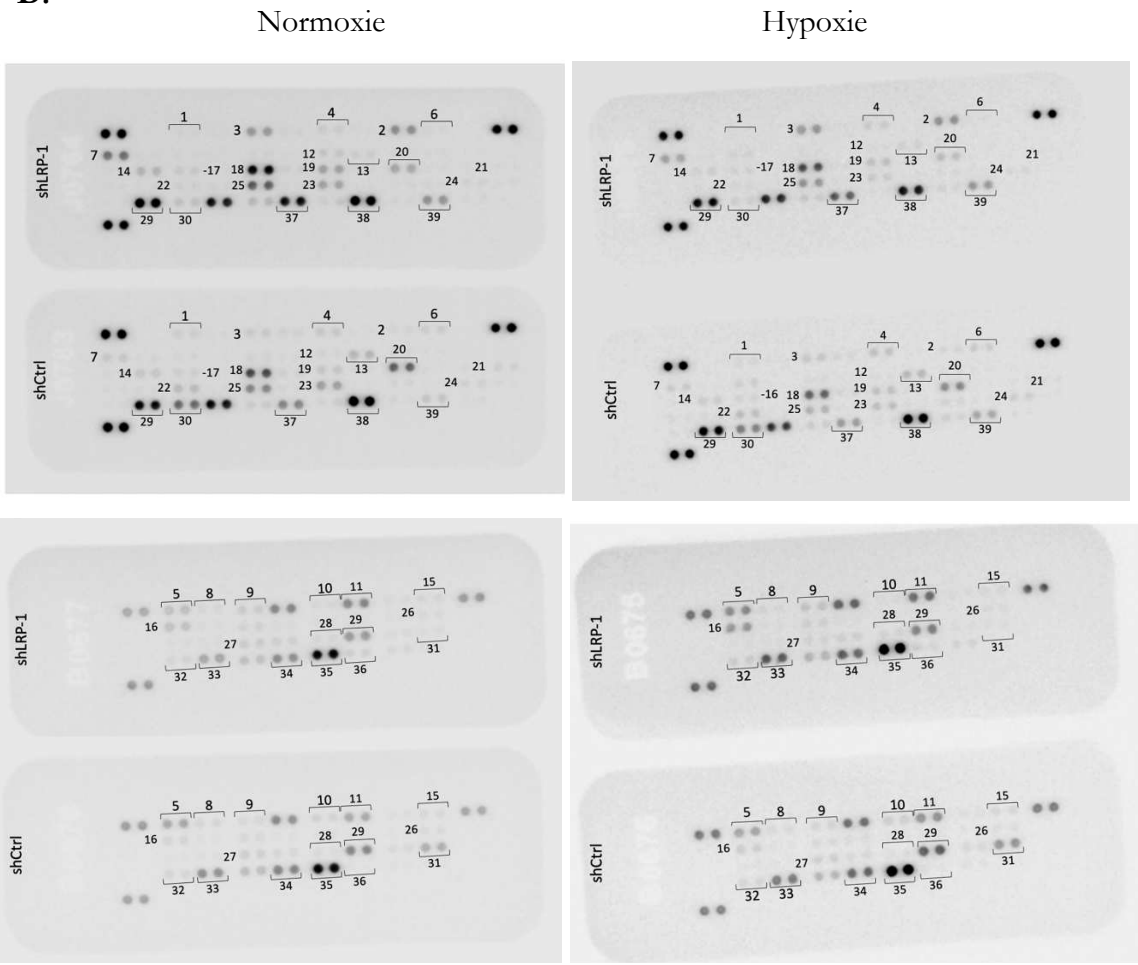


Fig. R3 Modulation du sécrétome angiogénique des MDA-MB-231 shLRP-1 en hypoxie. **a** Immunoblot représentatif de l'expression de HIF1- α dans les cellules MDA-MB-231 shCtrl et shLRP-1 en normoxie et en hypoxie pendant 3 heures. **b** (panel de gauche) Immunoblot représentatif de l'expression de LRP-1 dans les cellules MDA-MB-231 shLRP-1 et shCtrl en hypoxie pendant 24h et en normoxie. (panel de droite) Analyse densitométrique de l'expression de LRP-1 en hypoxie et en normoxie dans les cellules MDA-MB-231 shLRP-1 et shCtrl normalisée par rapport aux shCtrl en normoxie (n=3).

D.



E.

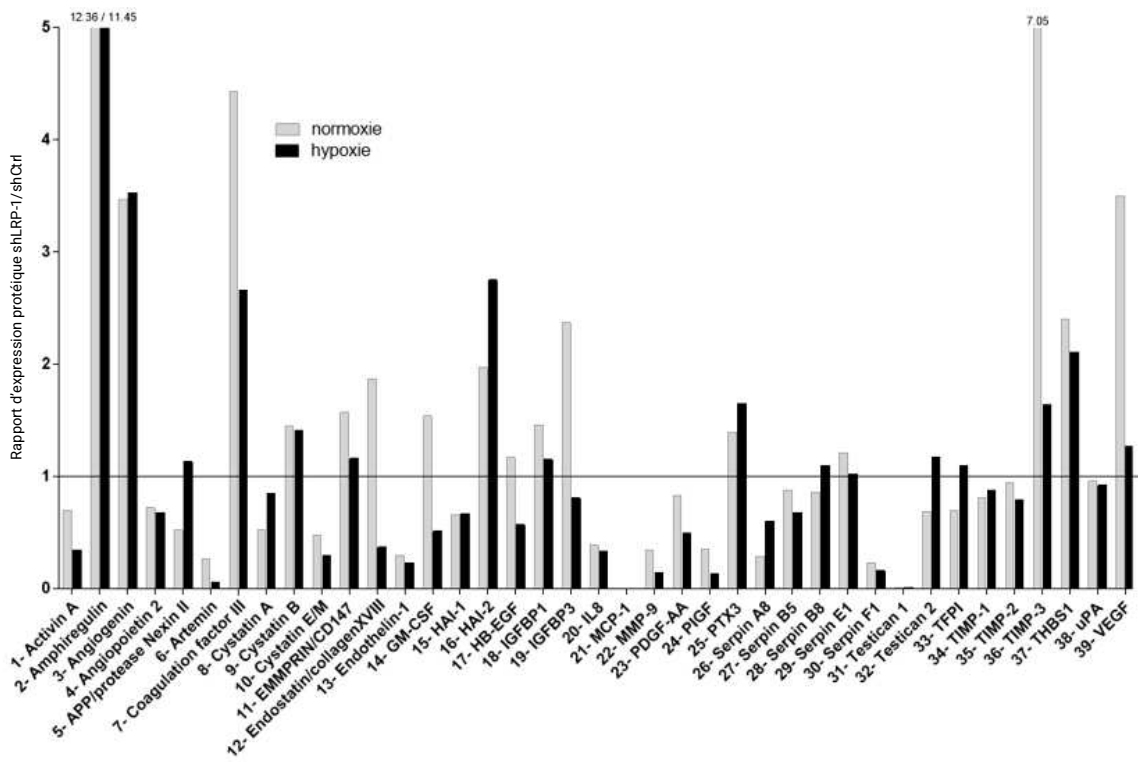


Fig. R3 Modulation du sécrétome angiogénique des MDA-MB-231 shLRP-1 en hypoxie (suite).

c Ratios d'expression protéique des sécrétomes shLRP-1/shCtrl issus de la protéomique en normoxie et en hypoxie. La ligne noire correspond à un ratio égal à 1. Tous les ratios présentés sont significatifs ($p < 0,05$) ($n = 3$). **d** Membranes annotées issues de *ProteomeProfiler™ Angiogenesis* et *Protease inhibitor* réalisés à partir de milieux conditionnés tumoraux de shLRP-1 et shCtrl en hypoxie et en normoxie. **e** Ratios d'expression protéique des sécrétomes shLRP-1/shCtrl issus des *ProteomeProfiler™* normalisés par rapport au point de référence entre eux. Pour une meilleure visibilité, la valeur de 3 ratios hors de l'échelle choisie est indiquée à leur extrémité. La ligne noire correspond à un ratio égal à 1 ($n = 1$). * $p < 0,05$ (*Student t test*). DKK1= Dickkopf 1 ; EMMPRN= Extracellular matrix metalloproteinase inducer ; FRAS1= Fraser extracellular matrix complex subunit 1 ; GM-CSF= Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ; HAI-1/2= Hepatocyte growth factor activator inhibitors 1/2 ; HB-EGF= Heparin-binding EGF-like growth factor ; HSPA1B= Heat shock protein family A (Hsp70) member 1B ; HSPH1= Heat shock protein family H (Hsp110) member 1 ; IGFBP1/3= Insulin-like growth factor binding protein-1/3 ; IL8= Interleukin-8 ; MAMDC2= MAM domain containing 2 ; MCP-1= Monocyte chemoattractant protein 1 ou CCL2 (Chemokine ligand 2) ; MMP-9= Matrix metalloproteinase 9 ; PDGF-AA= Platelet derived growth factor AA ; PlGF= Placental growth factor ; PNP= Purine nucleoside phosphorylase ; PROS1= Vitamin K-dependent protein S ; PTX3= Pentraxin 3 ; TFPI= Tissue factor pathway inhibitor ; THBS1= Thrombospondin-1 ; TIMP-1/2/3= TIMP Metalloproteinase inhibitor 1/2/3 ; TINAGL1= Tubulointerstitial nephritis antigen like 1 ; uPA= Urokinase-type plasminogen activator ; VEGF= Vascular endothelial growth factor.

D'autre part, parmi les protéines présentant un rapport hypoxie/normoxie inférieur à 0,75, c'est-à-dire dont l'expression diminue en hypoxie comparé à la normoxie, nous retrouvons FRAS1, IGFBP1, PROS1, PSAP, TIMP3, HSPA1B, HSPBP1, HSPH1 et TINAGL1. La modulation la plus importante correspond à celle de FRAS1 dont le rapport passe de 73,49 en normoxie à 5,5 en hypoxie (**Fig. R3c, Part. II**). Nous pouvons remarquer qu'aucune protéine parmi celles mesurées ne diminue dans les shLRP-1 comparées aux shCtrl en hypoxie, on observe « simplement » une augmentation moindre de l'expression par rapport à la normoxie.

Dans le but d'enrichir les résultats de protéomique, nous avons réalisé un screening semi-quantitatif par le biais de puces à anticorps *ProteomeProfiler™* (**Fig. R3d,e, Part. II**). Parmi les 39 protéines identifiées au travers des deux *ProteomeProfiler™ Angiogenesis* et *Proteases inhibitor* réalisés, 20 d'entre elles présentent un rapport shLRP-1/shCtrl en hypoxie significativement différent, compris entre 0,75 et 1,5, comparé à leur rapport en normoxie. Ces 20 protéines peuvent être divisées en deux groupes, d'une part, les protéines présentant une augmentation d'expression en hypoxie comparée à la normoxie, comme APP/protease Nexin II, Cystatin A, Serpin A8, Testican 2 et TFPI. D'autre part, les protéines, comme Activin A, Artemin, Cystatin

E/M, Endostatin, GM-CSF, HB-EGF, IGFBP-3, MMP-9, PDGF-AA, PlGF, SERPINF1, Testican 1, TIMP-3 et VEGF, qui présentent une diminution d'expression en hypoxie comparée à la normoxie. D'autres protéines tendent vers une normalisation de leur expression (rapport shLRP-1/shCtrl compris entre 0,75 et 1,5) en hypoxie comparé à la normoxie, comme APP/protease Nexin II, Cystatin A, IGFBP-3, Testican 2, TFPI, VEGF. Par exemple, le VEGF présente un rapport d'expression shLRP-1/shCtrl de 3,50 en normoxie et qui devient non significatif en hypoxie (1,27). En comparant la modulation du VEGF dans le sécrétome des shLRP-1 et des shCtrl en hypoxie par rapport à la normoxie indépendamment l'un de l'autre, il apparaît que le VEGF augmente de 70% en hypoxie par rapport à la normoxie dans les shCtrl, alors qu'il augmente de 20% dans les shLRP-1. D'autres protéines, comme HB-EGF et PDGF-AA, qui ne présentaient pas de différence d'expression en normoxie, voient cette différence s'accroître en hypoxie en faveur d'une diminution d'expression dans les shLRP-1/shCtrl. L'endostatine et GM-CSF sont les seules protéines qui présentent des rapports divergents en condition hypoxique comparée à la normoxie. En effet, les rapports shLRP-1/shCtrl de l'endostatine et du GM-CSF augmentent en normoxie (rapports de 1,87 et 1,54, respectivement) et diminuent en hypoxie (rapports de 0,37 et 0,51, respectivement). Pour finir, nous avons pu observer que la protéine MCP-1 n'était pas détectée dans le sécrétome des cellules shLRP-1 comparées aux shCtrl, que ce soit en normoxie ou en hypoxie.

Pour terminer cette étude, nous nous sommes focalisés sur une étape clé de la dissémination métastatique : les processus d'intravasation. La capacité des cellules tumorales à adhérer et à migrer entre les cellules endothéliales est un bon moyen d'évaluer *in vitro*, leur capacité à rejoindre la circulation sanguine et donc leur potentiel métastatique. Les tests de migration réalisés sur les MDA-MB-231 shARN n'ont pas montré de différences significatives. Malgré l'échantillonnage réduit qui nécessite d'être augmenté, une tendance a pu être observée. Les cellules MDA-MB-231 shLRP-1 semblent moins transmigrier en normoxie que les shCtrl, alors que la tendance s'inverse en hypoxie (**Fig. R4a, Part. II**). En parallèle, nous avons réalisé les mêmes tests en utilisant les cellules MDA-MB-231 WT traitées préalablement avec du RAP. Alors qu'aucune différence n'a été observée en normoxie, une augmentation de plus de 70% a été mesurée dans les MDA-MB-231 préalablement traitées avec du RAP comparées aux WT (**Fig. R4b, Part. II**). Par ailleurs, l'utilisation d'un autre modèle cellulaire basé sur les BT-20, une lignée triple négative dérivée d'un carcinome canalaire invasif d'une femme de 74 ans (Lasfargues & Ozzello, 1958), nous a permis de mettre en évidence une diminution de 30% de la migration transendothéliale des cellules préalablement traitées avec du RAP en normoxie (**Fig. R4c, Part. II**).

Figure R4

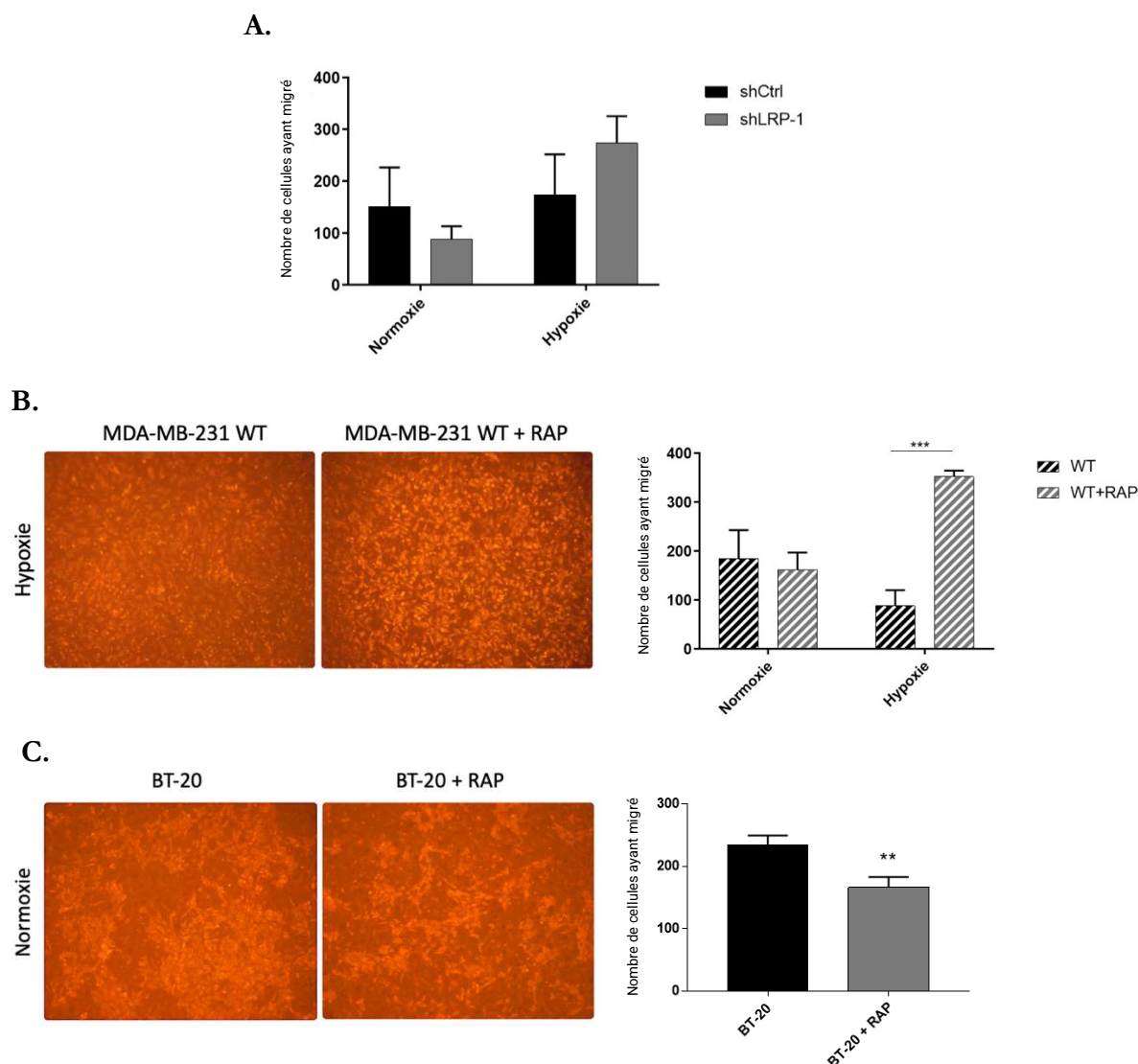


Fig R4. Influence de l'expression de LRP-1 sur la migration transendothéliale en hypoxie. **a** Quantification du nombre de cellules MDA-MB-231 shCtrl et shLRP-1 ayant migré au travers d'une monocouche d'HUVECs pendant 8h en normoxie et en hypoxie (n=2). **b** (panel de gauche) Microphotographies représentatives de la migration transendothéliales des cellules MDA-MB-231 WT +/- RAP en hypoxie. (panel de droite) Quantification du nombre de cellules ayant migré au travers d'une monocouche d'HUVECs pendant 8 heures en normoxie et en hypoxie (n=2). **c** (panel de gauche) Microphotographies représentatives de la migration transendothéliales des cellules BT-20 +/- RAP en normoxie. (panel de droite) Quantification du nombre de cellules ayant migré au travers de la monocouche d'HUVECs pendant 15 heures (n=3). **p<0,01 ; ***p<0,001 (*Student t test*)

Pour compléter ces résultats, nous nous sommes intéressés à la comparaison de l'expression de LRP-1 dans des cellules MDA-MB-231 issues de métastases cérébrales (MDA-MB-231 *Brain*) à celle des cellules sauvages. La réalisation du modèle métastatique correspond à l'injection de cellules parentales MDA-MB-231 inoculées dans le ventricule gauche de souris nude. Ces cellules ont disséminé de manière préférentielle au niveau des os mais également, avec une fréquence moindre, aux glandes surrénales, aux ovaires et au cerveau 3 à 4 semaines après l'inoculation. Par une technique d'explantation (Jensen et al., 1964), les MDA-MB-231 métastasées au cerveau ont été cultivées *in vitro* puis réinoculées dans le ventricule gauche. Les cellules métastatiques cérébrales ont ensuite été de nouveau isolées et mises en culture. Cette procédure a été répétée 6 fois jusqu'à ce qu'aucune micrométastase ne soit détectée histologiquement ailleurs que dans le cerveau, permettant ainsi l'établissement d'un clone MDA-MB-231 *Brain*, qui se dissémine exclusivement dans le cerveau après une inoculation intracardiaque (Yoneda et al., 2001). En les comparant aux MDA-MB-231 WT nous avons mis en évidence que les cellules MDA-MB-231 *Brain* présentaient une diminution d'expression de LRP-1 de 42% au niveau protéique et 62% au niveau transcriptionnel (**Fig. R5, Part. II**).

Figure R5

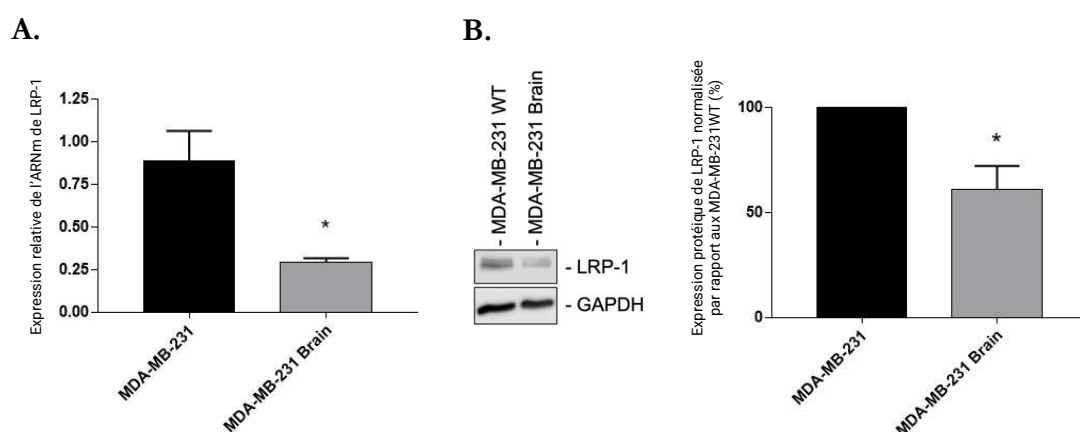


Fig. R5. Diminution de l'expression de LRP-1 dans les MDA-MB-231 Brain. a Expression relative de l'ARNm de LRP-1 dans les cellules MDA-MB-231 WT et MDA-MB-231 Brain (n=3). b (panel de gauche) Immunoblot représentatif de l'expression de LRP-1 dans les cellules MDA-MB-231 WT et Brain. (panel de droite) Analyse densitométrique de l'expression de LRP-1 dans les cellules MDA-MB-231 Brain normalisée par rapport aux WT (n=3). *p<0,05 (*Student t test*)

Cette régulation adaptative de LRP-1 dans des cellules issues de métastases nous amène à souligner le rôle divergent que LRP-1 pourrait jouer dans les phases tardives du cancer face au rôle pro-tumoral que nous avons mis en évidence dans la tumeur primaire.

Discussion

DISCUSSION

Partie I

La première partie des travaux présentés dans ce manuscrit de thèse visait à préciser le rôle du récepteur LRP-1 dans la croissance tumorale d'un modèle de cancer mammaire triple négatif (MDA-MB-231) et à évaluer son implication dans l'angiogenèse tumorale associée. Comme nous l'avons évoqué dans la discussion de l'article « *LRP-1 matricellular receptor involvement in triple negative breast cancer tumor angiogenesis* » en cours de révision, l'expression de LRP-1 a été corrélée aux sous-types de cancer mammaire HER2+ et triple négatif (Catasus et al., 2011). De plus, ces dernières années, LRP-1 a émergé en tant que régulateur de l'homéostasie vasculaire physiologique et s'est vu jouer un rôle important dans les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales, les péricytes et les macrophages (He et al., 2021). Certaines études ont démontré les capacités angio-modulatrices des membres de la famille des LDLR dans diverses tumeurs solides, dont le cancer mammaire (Lu et al., 2017). Néanmoins peu de publications se sont intéressées à l'implication du récepteur LRP-1, exprimé par la cellule tumorale, dans l'angiogenèse pathologique associée au cancer, soulignant la singularité de ces travaux de recherche.

La stratégie d'interférence à l'ARN par transfection d'un ARN double brin, *small hairpin RNA* (shARN), choisie pour étudier la fonction de LRP-1, entraîne une perte de fonction par dégradation de l'ARN messenger et/ou par inhibition de la traduction. Toutefois, d'autres méthodes existent comme la transfection/transduction de siARN ou encore de miARN artificiels. La déplétion totale du gène LRP-1 étant létale au stade embryonnaire chez la souris, nous avons choisi d'utiliser des cellules pour lesquelles l'invalidation n'est pas totale. Ce choix nous permet d'étudier le rôle de LRP-1 dans la progression et de ne pas dérégler totalement notre modèle cellulaire. Toutefois, des modèles invalidés pour l'expression de LRP-1 existent (Gordts et al., 2012). C'est pourquoi des méthodes telles que le KO conditionnel dans le temps (système inductible) et/ou dans l'espace (spécifique d'un tissu) peuvent être des solutions lorsqu'il s'agit de travailler sur des modèles animaux. Le premier système inductible à contrôle négatif décrit dans la littérature se base sur l'utilisation de l'opéron lactose, réprimé constitutivement par lacI et induit par ajout d'isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Baim et al., 1991). Aujourd'hui, d'autres systèmes existent pour contrôler l'expression des gènes, comme le système Cre/loxP, le système Tet-on/off ou encore CRISPR/Cas9. Le système Tet-on/off, régulé par la tétracycline ou l'un de ses dérivés, est alors utilisé comme un outil fiable pour l'expression régulée d'un transgène (Gossen & Bujard, 1992), d'autant plus qu'il offre un contrôle réversible contrairement aux deux autres. Deux versions complémentaires du système de régulation par la tétracycline ont été successivement développées. Le premier système (Tet-off) utilise une protéine chimérique tTA. En l'absence de tétracycline (ou doxycycline), tTA reconnaît un motif de la séquence opératrice tetO de l'opéron tétracycline placé en amont d'un promoteur minimal, s'y fixe sous forme de dimère avec une forte affinité, et induit la transcription. En présence de tétracycline, tTA se lie préférentiellement à l'antibiotique ce qui induit des changements de conformation, une baisse d'affinité et une absence de transcription. Le deuxième système est basé sur une répression constitutive du gène de résistance et du gène associé par tetR liée aux séquences de tetO dans le promoteur. La

répression est levée par la tétracycline, qui se lie avidement à tetR. De cette manière, la résistance à la tétracycline et l'expression d'un gène associé sont contrôlées d'une façon simple et réversible au moyen d'un commutateur marche/arrêt médié par la tétracycline elle-même. De nombreux modèles ont pu être décrits, notamment chez les rongeurs (Furth et al., 1994 ; Delerue et al., 2014). Toutefois, les tétracyclines et en particulier la doxorubicine, inhibent l'activité des MMPs indépendamment de leurs activités connexes (Castro et al., 2011), ce qui peut s'avérer problématique dans des modèles tumoraux où elles jouent un rôle important dans l'invasion. Par ailleurs, des systèmes d'expression combinatoire Cre/LoxP, qui modifient de manière irréversible la séquence du génome, et Tet-on/off ont été utilisés comme système génétique inductible et réversible (Jiang et al., 2016) ; dans ces modèles, le système CRISP/Cas9 n'était pas optimal. En effet, l'expression constitutive de Cas9 entraîne souvent des résultats indésirables, tels que la toxicité cellulaire et les effets hors cible, c'est notamment ce qu'une équipe de notre unité de recherche ont pu observer en tentant d'invalider LRP-1 dans des cellules tumorales pancréatiques.

En comparant le sécrétome des MDA-MB-231 siARN avec les shARN, nous nous sommes assurés du bien fondé de nos résultats, tout en ouvrant des pistes de réflexion quant à l'utilisation de ces deux systèmes. La première observation concerne le pourcentage de répression protéique de LRP-1 engendré par les deux systèmes. L'utilisation de siARN induit une diminution d'expression de LRP-1 de 95% dans les MDA-MB-231 siLRP-1 contre 67% dans les shLRP-1. Pour les 2 stratégies, la transfection a été réalisée en utilisant la Lipofectamine 3000, qui exploite la technologie des nanoparticules lipidiques. Néanmoins, l'efficacité de répression diffère. Il semble important dans un premier temps de rappeler le fonctionnement de ces deux molécules :

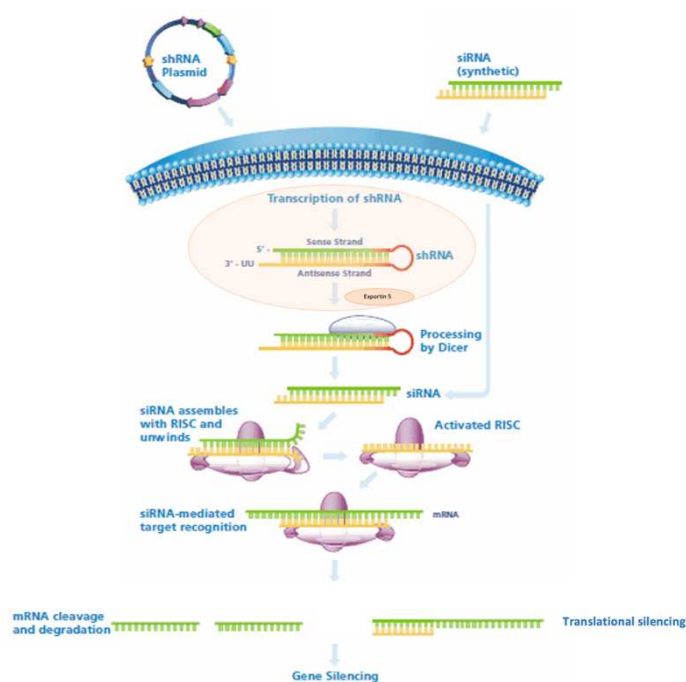


Figure 63 : Mécanismes d'action des shARN et des siARN. Adaptée d'après Sigma

- Après son entrée dans le cytoplasme, les siARN, qui sont des petits ARN interférents double brin de 21 à 24 nucléotides, sont directement reconnus et pris en charge par le complexe protéique RISC (*RNA-induced Silencing Complex*). RISC agit pour libérer le brin sens (brin complémentaire de l'ARN), permettant ainsi le processus d'interférence ARN via la reconnaissance par complémentarité de bases nucléiques. Une fois la cible liée, l'endonucléase Argonaute (complexe RISC) clive le transcrit au niveau du site de reconnaissance. Les deux fragments sont ensuite rapidement dégradés par des exonucléases. La transfection de petits ARN interférents dans les cellules a donc pour conséquence la destruction spécifique des ARN messagers ciblés, empêchant toute nouvelle traduction de la protéine codée par ces ARN messagers.
- Après l'entrée du vecteur d'expression du shRNA dans le cytoplasme, la séquence d'ADN codant pour le shRNA doit être transportée dans le noyau pour la transcription. Les transcrits primaires (pré-shRNA) suivent une voie similaire à celle des miARN. Ils sont traités par le complexe Drosha/DGCR8 puis transportés vers le cytoplasme via l'exportine-5, pour être pris en charge par le complexe Dicer/TRBP/PACT où ils sont ensuite transformés en shRNA matures. Les shRNA matures sont associés à la protéine Argonaute et assurent leur fonction d'interférence de l'ARN soit par clivage et dégradation de l'ARNm, soit par suppression de la traduction.

Dans le cadre des shARN, plusieurs paramètres doivent être respectés afin de permettre une invalidation de l'expression de notre protéine d'intérêt. A savoir, une intégration d'un nombre suffisant de copies dans le génome pour permettre une synthèse conséquente dans le noyau puis le traitement et le transport des shARN vers le cytoplasme. De nombreux shARN commerciaux promettent une efficacité de *knock-down* plus élevée que la nôtre, toutefois la transfection cède souvent sa place à la transduction. Dans ce cas, le shARN est introduit par le biais d'un vecteur viral (lentivirus) qui permet une intégration d'un grand nombre de copies du shARN (shADN) dans l'ADN des cellules quiescentes et en division, avec une faible immunogénicité. Cependant, aux vues des résultats *in vivo* observés, la répression du récepteur LRP-1 à hauteur de 67% au niveau protéique apparaît plus que suffisante pour observer des effets biologiques marqués. Le risque auquel on s'expose à vouloir une répression proche du *knock-out*, est de provoquer une reprogrammation des cellules par effet rebond. Cela semble d'autant plus valable lorsqu'il s'agit d'étudier une protéine ubiquitaire et pivot comme LRP-1 (Langlois et al., 2009). En effet, les effets observés en son absence pourraient ne plus être en lien avec les voies de signalisation physiologiques et pathologiques qu'il régule mais traduire une compensation globale guidée par la survie qui n'a pas lieu d'être physiologiquement. Il apparaît évident qu'il n'y a pas de méthodes universelles. Il convient de prendre en compte le modèle d'étude, la protéine d'intérêt, et les questions biologiques posées, tout en ayant conscience des avantages et des limites du modèle que l'on choisit d'utiliser.

En mettant en évidence que la répression du récepteur LRP-1 dans les tumeurs MDA-MB-231 entraînait une diminution significative de la croissance tumorale de 60% par rapport au groupe contrôle, nous nous sommes également intéressés aux effets de LRP-1 sur la prolifération cellulaire. Les résultats obtenus ont mis en évidence une diminution de leur capacité proliférative *in vitro* de 15 à 20% par rapport aux shCtrl. Cependant, les résultats *ex vivo* n'ont pas permis de mettre en évidence de différence significative d'index mitotique dans les parties viables des tumeurs des deux groupes, confirmant que les effets observés *in vivo* n'étaient pas liés à une différence de prolifération cellulaire. De plus, l'observation d'une augmentation de l'hypoxie au sein des tumeurs shLRP-1 comparées aux shCtrl suggère une prolifération tumorale rapide et/ou la mise en place d'une angiogenèse faisant défaut (Eales et al., 2016). Rappelons qu'au-delà de 1 à 2 mm, une tumeur ne peut pas croître sans un apport vasculaire (Folkman, 1971). Les rapports entre cellules tumorales/vascularisation -et microenvironnement au sens large- sont ainsi cruciaux dans l'histoire naturelle et le déterminisme de chaque cancer, tout autant que les propriétés intrinsèques des cellules tumorales (Hinshaw et al., 2019). L'exploration de l'angiogenèse tumorale au sein des tumeurs shLRP-1 que nous avons menée *in vivo* par le biais de l'imagerie préclinique et *ex vivo* avec des approches immunohistochimiques, nous a permis de mettre en évidence des différences indéniables mais parfois subtiles et difficilement quantifiables. Les tumeurs shLRP-1 ont présenté une diminution significative de la perfusion tumorale *in vivo* associée à un marquage anti-CD31 positif en immunohistochimie mais sans lumière et caractérisée par d'immenses structures s'apparentant à des lacs hémorragiques. De nombreuses anastomoses ont également été observées microscopiquement, nous donnant véritablement l'impression d'une stimulation de l'angiogenèse soutenue, mais anarchique. L'anastomose entre les capillaires tumoraux et les artérioles de l'hôte apparaît aléatoire et laisse place à un réseau irrégulier et chaotique dans de nombreuses tumeurs (Forster et al., 2017) ; il est souvent impossible de distinguer les veinules, capillaires ou artérioles (Siemann, 2011). La présence de vaisseaux hyperperméables se caractérisent par de potentielles hémorragies tumorales (Hashizume et al., 2000). Les résultats obtenus en FMT nous ont permis de mettre en évidence une accumulation diffuse du fluorochrome AngioSense-680 dans le tissu péri-tumoral des tumeurs shLRP-1 48 heures après l'injection. Alors que la perméabilité tumorale donne l'impression d'être statique, il a été montré qu'il s'agissait en réalité d'un phénomène dynamique comprenant des poussées vasculaires suivies d'une éruption brève mais vigoureuse de fluide dans l'espace interstitiel de la tumeur (Matsumoto et al., 2016). Cet évènement peut être à l'origine de l'extravasation des nanoparticules d'AngioSense-680 à partir des vaisseaux sanguins tumoraux au sein des tumeurs shLRP-1.

Comparées aux shCtrl, les tumeurs shLRP-1 sont caractérisées par une augmentation de la nécrose, conséquence directe de l'augmentation de l'hypoxie intra-tumorale (Tomes et al., 2003). Étant donné que le gène du récepteur LRP-1 a déjà été décrit comme étant régulé par l'hypoxie (Montel et al., 2007), nous nous sommes assurés que son expression restait suffisamment faible dans notre modèle tumoral *in vivo* à la fin du protocole, mais également *in vitro* à la suite d'une exposition à un environnement hypoxique. Lors de la progression tumorale, l'hypoxie est observée à des degrés plus ou moins importants (Eales et al., 2016). Elle conduit alors à une stimulation locale et soutenue de l'angiogenèse tumorale en induisant un déséquilibre

entre la production de facteurs pro- et anti-angiogéniques (Muz et al., 2015). La difficulté des cellules shLRP-1 à induire l'angiogenèse a été illustrée au travers de tests angiogéniques *in vivo* (Matrigel® Plug) et *in ovo* (CAMs). La technique de Matrigel® plug nous a permis de nous soustraire du modèle tumoral et de l'hypoxie associée tout en observant comment le sécrétome des cellules tumorales réprimées ou non pour LRP-1 au sein d'un Matrigel® plug étaient capables d'induire l'angiogenèse *in vivo*. La densité vasculaire et l'efficacité de perfusion se sont avérées moindres dans les Matrigel® plugs composés de cellules shLRP-1, le tout associé à une diminution du nombre de vaisseaux et une vascularisation plus superficielle. Ces données suggèrent que le sécrétome résultant des cellules shLRP-1, à lui seul, n'est pas capable d'induire une signalisation pro-angiogénique au sein des Matrigel® plugs comparés à ce que nous observons dans les Matrigel® plugs shCtrl. Et cela, indépendamment de plusieurs influences physico-chimiques liées au microenvironnement tumoral, dont l'hypoxie. Ces résultats corroborent l'idée que le récepteur LRP-1 joue un rôle important dans l'issue des processus angiogéniques engendrés par les cellules tumorales MDA-MB-231. *In vivo*, LRP-1 possède un rôle émergent dans l'homéostasie vasculaire. Exprimé par les cellules vasculaires, il œuvre pour le maintien de l'intégrité vasculaire en contribuant au remodelage vasculaire et à l'angiogenèse. Sa dérégulation est souvent associée à des troubles physiologiques et fonctionnels vasculaires (He et al., 2021). L'observation de troubles vasculaires dans les tumeurs shLRP-1, appuyée par les données déjà publiées sur le rôle de LRP-1 dans l'homéostasie vasculaire, suggèrent qu'il pourrait jouer un rôle important dans la régulation de l'angiogenèse par les cellules tumorales.

L'utilisation des sécrétomes issus de MDA-MB-231 shLRP-1 a différenciellement modulé le comportement des HUVECs. Les disparités qui existent entre les différents types de cellules endothéliales (macrovasculaires ou microvasculaires) appellent à la vigilance lors des conclusions résultant d'expériences *in vitro* réalisées sur un seul type de cellules endothéliales, qui peuvent s'avérer trompeuses (Nanobashvili et al., 2003). Les HUVECs, provenant de la veine de cordon ombilical, ne constituent probablement pas le meilleur modèle pour étudier l'angiogenèse tumorale qui se produit au niveau des capillaires/petits vaisseaux, mais constituent le modèle le plus répandu. Nous avons choisi d'utiliser un pool de cellules HUVECs commercialisées provenant de plusieurs donneurs pour limiter l'hétérogénéité des réponses cellulaires entre les différents donneurs (Watson et al., 1995). La concordance entre nos résultats *in vitro* et *in vivo*, nous a conforté dans l'idée que le modèle d'HUVECs, bien que non optimal, était un outil cohérent dans notre modèle. Nous avons montré que le sécrétome des cellules MDA-MB-231 shLRP-1 engendrait une diminution du potentiel angiogénique des HUVECs en impactant leurs capacités à former des structures tubulaires sur Matrigel® et sans surprise, leurs capacités migratoires. De manière étonnante, nous avons constaté que l'utilisation du sécrétome des cellules shLRP-1 conduisait à une augmentation des capacités prolifératives des HUVECs. La croissance globale d'un système vasculaire est le résultat à la fois de la prolifération et de la migration contrôlée par une myriade de facteurs pro et anti-angiogénique régulés dans le temps et dans l'espace au sein du microenvironnement tumoral (Jiang et al., 2020). Dans un modèle bio-informatique, des auteurs ont modulé séparément les taux de prolifération et de migration de cellules endothéliales. Ils ont démontré qu'une prolifération accrue des cellules endothéliales au détriment de la migration entraînait une augmentation de nombres de bourgeons, souvent

associée à des anastomoses limitant la fonctionnalité vasculaire (Qutub et al., 2009). Aux vues des résultats *ex vivo* observés, il n'est pas incohérent de constater une prolifération endothéliale plus importante lorsque les HUVECs sont stimulées par les sécrétomes des cellules shLRP-1.

Aux vues des différences de perfusion tumorale observées *in vivo* dans les tumeurs shLRP-1 par rapport aux shCtrl, en IRM DCE et en FMT, il nous a semblé important de statuer sur l'expression du VEGF pour expliquer ces effets. En effet, le VEGF est l'acteur moléculaire qui est régulé par de nombreuses voies de signalisation et capable de moduler l'angiogenèse (Carmeliet, 2005). Toutefois, dans notre modèle, le VEGF ne semble pas être l'élément central impliqué dans la modulation de l'angiogenèse observée dans les tumeurs *in vivo* et dans la modulation du potentiel endothélial *in vitro*. Bien que les expériences d'immunohistochimie (anti-VEGF) réalisées sur des coupes tumorales ne nous ait pas permis de conclure quant à une différence significative d'expression entre les tumeurs shLRP-1 et shCtrl, nous avons pu néanmoins observer davantage de cellules positives au VEGF dans les tumeurs shLRP-1 par rapport aux cellules formant les tumeurs shCtrl, avec cependant une intensité du marquage moins forte. Les expériences de RT-qPCR ont mis en évidence une augmentation transcriptionnelle du VEGF mesurée à partir d'extraits tumoraux, qui est cohérente avec l'augmentation caractéristique de l'hypoxie dans les tumeurs shLRP-1. En effet, le VEGF fait partie des cibles directes de HIF-1 α (Maxwell et al., 1997). Toutefois, au même titre que son augmentation dans le sécrétome des cellules MDA-MB-231 en l'absence de LRP-1, les fonctions pro-angiogéniques du VEGF ne semblent pas faire foi *in vitro* comme *in vivo*. Ces résultats soutiennent l'implication de mécanismes supplémentaires dans la régulation de la biodisponibilité du VEGF conditionnés par l'expression de LRP-1.

**

Grâce à une approche protéomique, réalisée en collaboration avec la plateforme Oncoprot affiliée à l'unité BaRITOn (INSERM US005), nous avons pu analyser les effets de la répression du récepteur LRP-1 sur le contenu du sécrétome des cellules tumorales MDA-MB-231. Cette approche a été utilisée afin d'apprécier les voies de signalisation régulées par LRP-1 et associées à l'angiogenèse tumorale. L'utilisation de la bio-informatique appliquée à nos données brutes de protéomique, nous a permis, en hiérarchisant les enrichissements, de mettre en évidence une modulation solide de la signalisation du TGF- β , ainsi qu'une modulation du système plasminogène/plasmine (PP). L'enrichissement de nombreuses autres protéines, qu'elles soient pro- (IGFBP-1, LOXL2, CTSD, ECM1, PROS1, FRAS1, LGAL1, LGALS3BP...) ou anti-angiogéniques (TIMP-1/2/3, IGFBP-3/4/7, THBS-1/3, PSAP, SERPINs...) a également été révélé dans le sécrétome des cellules shLRP-1 comparées aux shCtrl. Une modulation généralement plus modérée des cibles a été mise en évidence dans les cellules siLRP-1 comparées aux siCtrl. Elle semble pouvoir s'expliquer par la transitivité de la méthode, à l'instar des effets plus prononcés, observés au sein du sécrétome des shARN, qui ont pu se consolider au cours du temps en raison de la stabilité du modèle. Entre une expression protéique de LRP-1 de 5% dans les siLRP-1 et de 33% dans les shLRP-1, il semble cohérent d'observer des différences significatives au niveau des sécrétomes, et c'est sans compter que la

transitivité ou la stabilité de la méthode joue un rôle non négligeable. De plus, le stress et la perturbation membranaire liée à la transfection en elle-même peut également jouer un rôle dans les différences observées entre les siARN et les shARN. La disparité qui existe entre ces deux méthodes n'est pas sans précédent. Bhinder et Djaballah ont déjà mis en lumière au travers d'une analyse basée sur les données littéraires la divergence des données au sein de l'interférence à ARN, en fonction de la méthode choisie (Bhinder et Djaballah, 2013). En comparant les résultats de screening à partir de 16 siARN et de 14 shARN, ils se sont aperçus qu'il existait un chevauchement extrêmement faible, à la fois entre et au sein des cibles spécifiques aux outils utilisés. Sur la base d'un test de gain de fonction, qui tend à donner des résultats plus clairs, seul un chevauchement de 29 protéines a été observé entre les bibliothèques d'siARN et d'shARN qui partagent 15 068 gènes communs. Plus encore, ils ont suggéré que certaines cibles génétiques obtenues à partir du screening des shARN étaient spécifiques à la technique par opposition à la régulation négative spécifique du gène en question. Ces résultats soulignent l'intérêt de prendre en compte les deux méthodes dans notre vision globale.

Dans des conditions physiologiques et aux premiers stades de la cancérogenèse, le TGF- β agit comme un suppresseur de tumeur en limitant la croissance cellulaire et en stimulant l'apoptose pour maintenir l'homéostasie dans les tissus. LRP-1 a été identifié comme le récepteur V du TGF β (TGFR-V), dont l'expression est requise pour l'inhibition de croissance cellulaire par le TGF- β 1. Ces effets sont engendrés par la colocalisation de LRP-1 avec les TGFR-I, -II et -III, qui présentent des affinités pour le TGF- β 1 (Huang et al., 2003). Toutefois, dans les tumeurs avancées, les cellules cancéreuses échappent aux effets suppressifs initiaux du TGF- β . Elles parviennent à utiliser ses fonctions régulatrices pour promouvoir leur progression avec des rôles clairs dans les processus soutenant l'invasion des cellules cancéreuses, la transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT), la suppression de la réponse immunitaire, l'angiogenèse et les métastases (Goulet et al., 2021) (Fig. 64). Notamment, la signalisation du TGF- β régule négativement les claudines, les occludines et la ZO-1, et engendre une dégradation des jonctions serrées (Heldin & Moustakas, 2007). De plus, le TGF- β contribue au remodelage de la MEC en augmentant l'expression des MMPs (Moore-Smith et al., 2011) et de la plasmine, créant un environnement permissif permettant aux cellules cancéreuses de métastaser (Kessenbrock et al., 2010). On pourrait supposer que les effets pro-tumoraux du TGF- β 1 dépendent également, au moins en partie, de LRP-1. Malgré l'accumulation du TGF- β 1 dans le sécrétome des cellules tumorales shLRP-1 comparé aux shCtrl, un effet globalement anti-tumoral et anti-angiogénique est observé. De manière assez surprenante, nous n'avons pas retrouvé de modulation solide du TGF- β dans les siARN, où les ratios d'abondance siLRP-1/siCtrl du TGF- β 1 et - β 2, proche de 1, n'étaient pas significatifs.

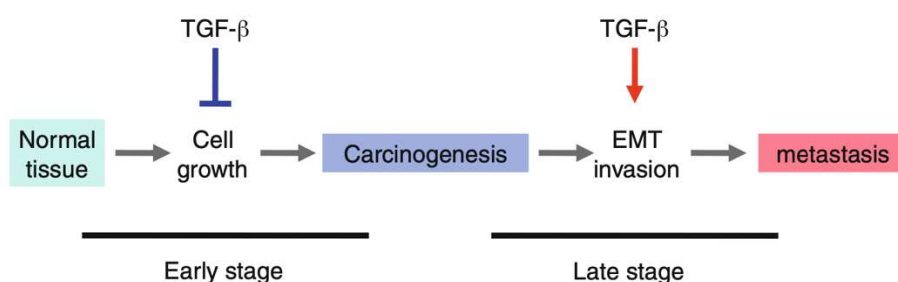


Figure 64 : Rôles bivalents du TGF- β dans la carcinogénèse mammaire. D'après Imamura et al., 2012.

Nous avons pu observer une augmentation du TGFBI (*TGFB-Induced*) ou ig-H3, dans le sécrétome des shLRP-1. Ce dernier est doté d'une activité qui semble controversée. Certaines équipes soutiennent la théorie selon laquelle le TGFBI agit comme une puissante molécule endogène anti-tumorale et anti-angiogénique en ciblant l'intégrine $\alpha v \beta 3$, et soulignent l'importance des niveaux physiologiques de TGFBI circulant dans l'inhibition de la croissance tumorale (Son et al., 2013). En ce sens, d'autres chercheurs ont montré dans des cellules MCF-7, que le TGFBI modérait le potentiel métastatique des cellules tumorales (Wen et al. 2011). Plus récemment, une étude a mis en évidence que l'inhibition du TGFBI entraînait dans un modèle tumoral murin MMTV-PyMT, une normalisation des vaisseaux tumoraux, avec une amélioration de la perfusion et une diminution de l'hypoxie. Les auteurs ont également mis en évidence une diminution significative des cellules souches cancéreuses, ainsi que des métastases pulmonaires. Dans une cohorte de patientes atteintes d'un cancer du sein, l'expression de TGFBI s'est vue corrélée à un mauvais pronostic et associée aux sous-types les plus agressifs de cancer du sein (Fico et al., 2020). Ce qui semble être l'argument/la démonstration le plus comparable à notre modèle de MDA-MB-231 et aux TNBC en général, suggérant que le TGFBI pourrait jouer un rôle important, alors que son expression est augmentée *in vivo* dans les tumeurs shLRP-1, dans la réponse à l'hypoxie et la promotion d'une angiogenèse chaotique.

Le facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF) ou CCN2 est une protéine matricellaire capable de réguler l'adhérence cellulaire, la migration et la survie. CCN2 est notamment connu pour sa capacité à favoriser la fibrose en soutenant la signalisation du TGF- β à induire une production excessive de MEC via l'axe CCN2/intégrine $\alpha v \beta 3$ /Src/Smad1 (Nakerakanti et al., 2011). CCN2 s'avère également être un médiateur essentiel du remodelage vasculaire physiologique en régulant les interactions EC-péricytes via la voie du PDGF (Hall-Glenn et al., 2012). Il ne semblerait pas étonnant qu'une modulation de son expression puisse influencer l'angiogenèse en condition pathologique. En effet, l'expression de CCN2 dans des cellules de cancer mammaire a été associée avec une augmentation de la migration *in vitro* et de l'angiogenèse tumorale *in vivo* (Chien et al., 2011). CCN2 apparaît comme un médiateur de l'angiogenèse locale induite par les cellules tumorales mammaires. LRP-1 a été identifié comme un des récepteurs de CCN2, impliquée dans la biologie du cartilage, comme l'ossification endochondrale et la réparation du cartilage (Kawata et al., 2006 ; 2012). De plus, LRP-1 contribue à la clairance de CCN2. Ainsi, l'augmentation de CCN2 dans le sécrétome des cellules shLRP-1, confirmée dans le sécrétome des cellules siLRP-1, semble être en lien direct avec la

répression de LRP-1. Le rôle crucial que CCN2 joue dans la chondrogenèse lui vaut d'être impliquée dans les métastases osseuses issues du cancer mammaire. L'utilisation d'un anticorps neutralisant CCN2 dans un modèle de métastases osseuses chez la souris a entraîné une diminution des métastases ostéolytiques, de la microvascularisation et des ostéoclastes impliqués. Une diminution de la croissance tumorale primaire *in vivo* ainsi qu'une diminution de la prolifération et de la migration d'HUVECs *in vitro* a également été observée avec l'anticorps anti-CCN2. Les effets observés se sont avérés dépendants de l'expression de PTHrP (*ParaThyroid Hormone-related Protein*) et de son récepteur, qui régulent positivement l'expression de CCN2 dans les cellules MDA-MB-231 via la PKC et la PKA, qui activent la signalisation ERK1/2 (Shimo et al., 2006). Bien que la modulation pro-angiogénique de CCN2 n'apparaisse pas décisive pour stimuler la progression et l'angiogenèse de la tumeur primaire dans notre modèle, CCN2 pourrait jouer un rôle dans la formation de métastases osseuses à partir de cellules MDA-MB-231 réprimées pour LRP-1.

À la suite de l'activation endogène du TGF- β 1, il a été démontré que la thrombospondine-1 (THBS1) régule positivement le système PP et favorisait l'invasion des cellules tumorales dans les cellules MDA-MB-231 (Albo et al., 1997). La THBS1, surexprimée dans les sécrétomes MDA-MB-231 shLRP-1, est une protéine aux propriétés anti-angiogéniques et anti-tumorales (Ren et al., 2006). Elle se lie au VEGF libre ou associé aux cellules (Gupta et al., 1999) et les complexes THBS1/VEGF sont internalisés par LRP-1 (Greenaway et al., 2007), soulignant le rôle de LRP-1 dans la biodisponibilité du VEGF pendant la néo-vascularisation. Aucune différence significative n'a été trouvée dans l'expression protéique du VEGF entre les shLRP-1 et shCtrl à cause d'une trop grande variabilité entre les échantillons shLRP-1. Toutefois, nous avons mis en évidence une diminution du VEGF au niveau transcriptionnel et une augmentation au niveau du sécrétome, soulignant la versatilité de sa régulation. Alors que son expression apparaît peu ou pas significativement modulée au niveau transcriptionnel et protéique, sa présence dans le sécrétome des cellules MDA-MB-231 semble nettement augmentée lorsque le récepteur LRP-1 est réprimé. En sachant que les cellules shLRP-1 expriment dans leur sécrétome d'avantage de THBS1 que les shCtrl, le VEGF présent pourrait être d'avantage séquestré par la THBS1. Ainsi une partie du VEGF dans le sécrétome des cellules shLRP-1 pourrait ne pas être disponible pour assurer une angiogenèse appropriée. De plus, ces complexes THBS1/VEGF pourraient s'accumuler dans le sécrétome sans pouvoir être endocyté par le récepteur LRP-1 bien moins exprimé. Décrit comme régulant la stabilisation des vaisseaux, la THBS1 lorsqu'elle est surexprimée, supprimerait la croissance vasculaire et augmenterait le diamètre des vaisseaux (Iruela-Arispe et al., 2004), suggérant qu'elle pourrait contribuer dans notre modèle à une angiogenèse dysfonctionnelle, comme c'est le cas dans la maladie de Fabry (Do et al., 2020).

L'angiogenèse est associée à un important remodelage extracellulaire impliquant différents systèmes protéolytiques, parmi lesquels le système PP joue un rôle essentiel. Il n'est pas surprenant, aux vues des résultats *in vivo* obtenus, d'observer une modulation de ce système entre les cellules shLRP-1 et shCtrl. Nous avons mesuré une diminution de l'activité plasmine dans le sécrétome des cellules shLRP-1 comparées aux shCtrl et ce, malgré une expression

accrue du plasminogène et l'un de ses activateurs (PLAT) dans le sécrétome des cellules shLRP-1, et siLRP-1. Pour expliquer cette diminution, il semble important de prendre en compte l'implication d'inhibiteurs de ce système, comme les SERPINE1 (PAI-1) ou SERPINC1 (Antithrombine-III) qui sont capables d'inhiber la cascade enzymatique (Law et al., 2006). La migration des cellules endothéliales est associée à une régulation positive de la protéolyse et, à l'inverse, l'inhibition du système PP inhibe l'angiogenèse *in vitro* (Rakic et al., 2003). Ainsi, la diminution de la capacité des HUVECs à former des pseudotubes *in vitro* dans les TCM shLRP-1 est cohérente avec la diminution de l'activité plasmine mesurée dans les milieux conditionnés d'HUVECs préalablement stimulées par des TCM shLRP-1. En effet, la formation de pseudotubes repose sur l'activité protéolytique des cellules endothéliales et leurs capacités migratoires générées en réponse à leur environnement, deux propriétés diminuées lorsque les HUVECs sont stimulées par les sécrétomes des cellules shLRP-1. Toutefois, il a été montré que des souris génétiquement modifiées pour le système PP se développaient sans anomalies vasculaires manifestes, suggérant une compensation possible *in vivo* (Rakic et al., 2003). Une étude plus récente a mis en évidence que les cellules endothéliales pouvaient se déplacer et se différencier en structures vasculaires *in vitro* et *in vivo* également en l'absence d'activité protéolytique, réalisant un type de néovascularisation appelé l'angiogenèse amiboïde, pour laquelle l'implication de l'interaction uPAR-intégrines se veut indispensable (Chillà et al., 2018).

Outre les SERPINE1 et SERPINC1, les SERPINF1 et SERPINE2, également régulées à la hausse dans le sécrétome des cellules shLRP-1 pourraient contribuer à expliquer les effets observés :

- La SERPINF1 ou PEDF (*Pigment epithelium-derived factor*) a été décrite comme un inhibiteur de l'angiogenèse induite par l'hypoxie en ciblant directement HIF-1 ou en régulant les cascades de signalisation des gènes cibles de HIF-1, bloquant ainsi la survie, la prolifération et la migration des cellules endothéliales ou en conduisant à leur apoptose (He et al., 2015).
- La SERPINE2 ou PAI-2 ou PN-1 (Protéase nexine-1) est connue pour interagir avec plusieurs modulateurs de l'angiogenèse, tels que les protéases, les protéines matricielles et les glycosaminoglycanes. Il a été démontré qu'elle possédait indépendamment de son activité anti-protéases des propriétés anti-angiogéniques *in vivo* et *in vitro* qui nécessitaient sa liaison aux glycosaminoglycanes (Selbonne et al., 2012). Cette activité au sein du sécrétome des shLRP-1 pourrait être médiée par la présence de HSPG2 et CSPG4, qui sont largement surexprimées par comparaison au sécrétome des shCtrl. Par ailleurs, comme nous l'avons évoqué dans l'introduction, la liaison de PAI-2 à LRP-1 stimule la voie ERK et entraîne une augmentation des niveaux d'ARNm de MMP-9, promouvant le potentiel invasif (Fayard et al., 2009). Ces données suggèrent que PAI-2 via LRP-1 pourrait jouer un rôle important dans l'agressivité des cellules tumorales mammaires indépendamment de ses activités anti-tumorales mentionnées ci-dessus.

Dans une étude récente, il a été mis en évidence que l'activité angiogénique de cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux sénescents étaient diminuée par

comparaison aux cellules non sénescents. Par le biais d'une approche assez similaire à la nôtre, les auteurs ont mis en évidence l'implication de facteurs anti-angiogéniques régulés à la hausse, comme THBS1, TGFBI, TIMP3, TIMP2 (Ratushnyy et al., 2020), que nous retrouvons également augmentées dans le sécrétome de nos cellules shLRP-1 comparées aux shCtrl. Le sécrétome des cellules shLRP-1 présente effectivement des taux très importants de TIMP-3 et dans une moindre mesure de TIMP-2. Avec une activité anti-angiogénique, le TIMP-2 inhibe directement la croissance des cellules endothéliales. De plus, il a été montré que le TIMP-2 était capable de réguler directement la motilité et l'invasion des cellules tumorales dans le cancer du poumon non à petites cellules, indépendamment de l'inhibition de la MMP-2, sans altérer leur croissance *in vitro*. Ces données indiquent que le TIMP-2 pourrait, en plus d'inhiber l'angiogenèse, moduler directement la croissance tumorale par son interaction avec le microenvironnement (Bourboulia et al., 2011). Contrairement aux autres TIMPs, après avoir été sécrété, le TIMP-3 se lie à la MEC via les glycosaminoglycanes sulfatés par exemple où il peut être endocytosé par LRP-1 qui régule ses niveaux extracellulaires (Brew & Nagase, 2010). Il a été montré que l'ajout d'un antagoniste de LRP-1 entraînait une accumulation de TIMP-3 dans le milieu cellulaire (Troeberg et al., 2009), en accord avec les résultats que nous observons en protéomique, et par le biais du ProteomeProfiler™. Bien qu'une hausse flagrante des MMPs n'ait pas été mise en évidence dans les sécrétomes des cellules shLRP-1, il semblerait que le TIMP-3 puisse faciliter la clairance de ses MMPs cibles en permettant la liaison du complexe TIMP-3/MMP à LRP-1, comme cela a été démontré pour la MMP-1, -13 et -14 (Carreca et al., 2020). Outre ses fonctions d'inhibiteur d'un large spectre de protéases, le TIMP-3 est capable d'entrer en compétition avec le VEGFR2 des cellules endothéliales pour lier le VEGF environnant (Qi et al., 2003). De plus, il promeut l'apoptose des cellules endothéliales via un mécanisme dépendant des caspases (Qi et al., 2015). Un autre mécanisme qui pourrait intervenir dans la séquestration du VEGF sécrété par les cellules shLRP-1.

La dérégulation des facteurs de croissance analogues à l'insuline (IGF) constitue un déterminant important de la carcinogenèse mammaire. Ainsi l'expression de leurs régulateurs, la famille des IGFBP, semble capitale. Agissant de manière dépendante et indépendante de l'IGF dans l'angiogenèse, les IGFBP possèdent aussi bien des effets stimulateurs ou inhibiteurs (Slater et al., 2019). Parmi les IGFBP dont la sécrétion est augmentée dans les cellules shLRP-1 comparées aux shCtrl, IGFBP-1, IGFBP-3, IGFBP-4 et IGFBP-7 sont retrouvées.

- Bien que plusieurs études rapportent le rôle de l'IGFBP-1 dans la physiopathologie vasculaire et la fonction endothéliale, son étude dans le cadre de l'angiogenèse du cancer mammaire est limitée. La surexpression de l'IGFBP-1 chez des souris transgéniques s'est vu améliorer la fonction endothéliale vasculaire grâce à une augmentation de la production basale de NO (Wheatcroft et al., 2003). L'IGFBP-1 stimule l'expression et la phosphorylation de l'eNOS via la voie PI3K/AKT – un effet indépendant du récepteur IGF-1 (Rajwani et al., 2012). Le NO est un médiateur important de l'angiogenèse (Cooke, 2003), et bien que l'angiogenèse *in vitro* n'ait pas été examinée dans les cellules de ces souris, on pourrait supposer que la régulation à la hausse de la voie PI3K/AKT par l'IGFBP-1 stimule l'angiogenèse comme décrit ailleurs (Karar & Maity, 2011). Le domaine RGD de

liaison à l'intégrine de l'IGFBP-1 est potentiellement intéressant dans ce contexte, reconnaissant que la signalisation en aval des intégrines, via FAK par exemple, stimule l'angiogenèse (Peng et al., 2004). Dans le glioblastome, l'analyse protéomique a identifié l'IGFBP-1 comme le médiateur clé de l'angiogenèse sécrétée par les cellules microgliales en réponse au facteur de stimulation des colonies de macrophages (MCSF) (Nijaguna et al., 2015).

- La corrélation entre l'expression de IGFBP-3 et la survie dans le cancer du sein a été mise en évidence, lui conférant un rôle anti-tumoral. Il a été mis en évidence que les tumeurs mammaires à un stade précoce et nécrosées exprimaient des taux plus élevés d'IGFBP-3, tandis que son expression avait tendance à diminuer au fur et à mesure que le grade tumoral évoluait (Raval et al., 2016). De plus, il est important de préciser que le récepteur LRP-1 a, entre autres, pour synonyme IGFBP-3R (*IGFBP-3 receptor*) (Huang et al., 2003), il est donc directement impliqué dans la régulation de l'IGBP-3. L'ensemble de ces données apparaissent cohérentes avec l'augmentation de l'IGFBP-3 mesurée par le biais des ProteomeProfilerTM dans le sécrétome des cellules shLRP-1 comparés aux shCtrl.
- Le rôle de l'IGFBP-4 est, quant à lui, moins décrit dans le cadre du cancer du sein. Toutefois, il a été mis en évidence qu'il était doté de puissants effets anti-angiogéniques et anti-tumorigéniques indépendants de l'IGF. Dans le cadre du glioblastome, l'IGFBP-4 se montre notamment capable d'inhiber les cathepsines, impliquées dans la dégradation de la membrane basale, l'invasion tumorale et l'angiogenèse, pour médier ses effets anti-tumoraux (Moreno et al., 2013).
- L'expression de l'IGFBP-7 apparaît inversement corrélée à la progression du cancer du sein et se voit associée à un mauvais pronostic, similairement à l'IGFBP-3. Plus encore, l'expression de l'IGFBP-7 a été associée à la suppression des voies oncogéniques et la restauration de la sénescence cellulaire dans les mélanomes, conduisant à leur régression. Il a été mis en évidence que la surexpression ectopique de l'IGFBP-7 dans un modèle de cellules mammaires triples négatives réduit la prolifération cellulaire *in vitro* par rapport aux cellules contrôles, par le biais d'une signalisation de rétroaction négative de la voie ERK. Ces résultats se sont vérifiés *in vivo* (Amemiya et al., 2011), suggérant qu'il pourrait jouer un rôle important dans le retard de croissance des tumeurs shLRP-1.

Ces données suggèrent que les IGFBP-1, -3, -4 et -7 pourraient être des acteurs importants de la régulation de l'angiogenèse médiée par LRP-1 dans le cancer mammaire triple négatif.

Par ailleurs, nous avons pu observer l'accumulation de trois protéines interconnectées : la protéase procathépsine D (CTSD), le pré-activateur prosaposine (PSAP) et la protéine de biogenèse lysosomale progranuline (GRN) dans le sécrétome des shLRP-1 comparé aux shCtrl. Leur interdépendance crée de potentiels mécanismes de rétroaction pour protéger et soutenir les cellules en situation de stress (Tayebi et al., 2020).

- La progranuline est un facteur de croissance sécrété et impliqué dans une multitude de processus allant de la régulation de l'inflammation et la cicatrisation à la tumorigénèse (Zhou et al., 2015). En raison, au moins en partie, de ses effets mitogènes et angiogéniques, l'expression de la GRN a été liée à plusieurs cancers, notamment le cancer du sein, généralement avec une corrélation directe entre l'augmentation de son expression et la gravité du cancer (Tangkeangsirisin et al., 2004 ; Serrero et al., 2012). Le trafic lysosomal de la progranuline, indépendamment de son interaction avec la sortiline, est médié par la protéine lysosomal soluble, la prosaposine. La GRN se lie à la PSAP, qui se lie ensuite à l'un de ses propres récepteurs de trafic, le CI-M6PR ou LRP-1, et transporte la GRN jusqu'aux lysosomes (Zhou et al., 2015).
- Comme la progranuline, le rôle de la prosaposine, précurseur hautement conservé des saposines A, B, C et D, ne se restreint pas au trafic lysosomal. La PSAP a été précédemment identifiée comme un régulateur fonctionnel de la progression métastatique. Un peptide cyclique avec des propriétés similaires à celles d'un médicament dérivé de la séquence active de PSAP, a présenté des effets prometteurs en favorisant la régression tumorale dans un modèle de xénogreffe de tumeur dérivée d'une patiente de cancer de l'ovaire métastatique (Wang et al., 2016), attestant de son rôle anti-tumoral.
- La protéase lysosomal procathepsine D, est, quant à elle, depuis longtemps décrite comme un marqueur de mauvais pronostic dans le cancer du sein (Foekens et al., 1999), sans pour autant que les mécanismes impliqués soient totalement compris. Sécrétée de manière constitutive par des lignées cellulaires de cancer du sein triple négatif, comme les BT-20 et les MDA-MB-231, il a été mis en évidence que la pro-CTSD des cellules tumorales pouvait être ciblée efficacement par des anticorps pour déclencher une réponse immunitaire anti-tumorale (Ashraf et al., 2019). De plus, une étude récente a mis en évidence que le déficit en CTSD *in vivo* dans un modèle tumoral mammaire MMTV-PyMT retardait le développement tumoral spontané en altérant la signalisation du complexe mTORC1, induisant de ce fait une quiescence cellulaire réversible. Les auteurs révèlent dans cette étude un rôle pivot pour la CSTD dans la réponse cellulaire aux stimuli oncogéniques (Ketterer et al., 2020). Pour finir, la CTSD, partiellement endocytée par le récepteur LRP-1, est capable d'inhiber la protéolyse intramembranaire régulée par LRP-1 pour moduler la transcription génique dans les fibroblastes au sein du microenvironnement tumoral mammaire. Cela entraînant l'excroissance des fibroblastes par LRP-1, indépendamment de l'activité catalytique de CTSD, en bloquant simplement le premier clivage de LRP-1 supposé libéré l'ectodomaine LRP-1 β -CTF. Le second clivage, quant à lui, génère le domaine LRP-1 β -intracellulaire, LRP-1 β -ICD, qui module *in fine* la transcription du gène (Derocq et al., 2011).

Aux vues de ces interactions, il n'est pas inattendu de voir ces trois protéines modulées par la répression du récepteur LRP-1 dans les sécrétomes de cellules shLRP-1. Leurs différents rôles établis dans la progression tumorale mammaire apparaissent en accord avec les résultats observés.

Parmi les protéines pro-angiogéniques régulées à la hausse dans le sécrétome des cellules shLRP-1 par rapport aux shCtrl, se trouve LOXL2. De nombreuses études ont montré que l'augmentation de l'expression de LOXL2 était associée à l'agressivité des cancers, notamment dans le cancer du sein. En plus de son rôle intracellulaire, LOXL2 possède un rôle extracellulaire de pontage du collagène et agit en conséquence sur la rigidité du microenvironnement. Elle se veut importante dans le comportement cellulaire et ainsi dans la progression tumorale. Notamment, il a été montré que l'inhibition de LOXL2 sécrétée *in vivo*, avec un anticorps spécifique, conduisait à la diminution du nombre de fibroblastes activés, de cellules endothéliales et de la production de cytokines et de facteurs de croissance, comme le TGF- β (Barry-Hamilton et al., 2010). LOXL2 semble également impliquée dans la formation des niches métastatiques. En effet, LOXL2, sécrétée dans les tumeurs, s'accumulerait au niveau de sites pré-métastatiques et entraînerait le pontage du collagène de type I, permettant le recrutement de cellules myéloïdes afin de former une niche métastatique. Ce processus favoriserait ainsi l'invasion des cellules tumorales dans le tissu cible (Wong et al., 2011). Enfin, il a été mis en évidence un rôle pour cette protéine dans la régulation de l'angiogenèse tumorale. L'utilisation d'un anticorps spécifique dirigé contre LOXL2 s'est vu provoquer une diminution de la formation de capillaires *in vitro* et de l'angiogenèse *in vivo* dans les cancers du sein et de l'ovaire de façon dépendante de l'activité catalytique de l'enzyme (Barry-Hamilton et al., 2010).

Deux protéines de la famille des galectines se voient également augmenter dans le sécrétome des cellules shLRP-1 comparées aux shCtrl : La galectine-1 (LGAL1) et la protéine de liaison à la galectine-3 (LGALS3BP).

- Des preuves provenant de plusieurs études *in vitro* et de modèles murins *in vivo* ont mis en évidence que la galectine-1 favorisait la prolifération, l'invasion, les métastases, l'angiogenèse et l'échappement immunitaire des tumeurs dans de nombreux cancers, notamment le cancer du sein (Astorgues-Xerri et al., 2014). Pour exemple, l'inhibition de la galectine-1 dans un modèle murin de 4T1 a mis en évidence une diminution du nombre de lésions pulmonaires métastatiques ainsi qu'une augmentation du pourcentage de cellules T cytotoxiques sur les sites métastatiques (Ito et al., 2012 ; Dalotto-Moreno et al., 2013). Une analyse rétrospective *in silico* a mis en exergue qu'une expression transcriptionnelle élevée de galectine-1 était un facteur de mauvais pronostic dans les TNBC (Grosset et al., 2016). Récemment, un lien direct entre des taux élevés de galectine-1 dans les cancers mammaires humains et murins et le phénotype *claudine-low* a été mis en évidence (Balestrieri et al., 2021).
- Concernant la LGALS3BP, il a été mis en évidence que des taux sériques ou tissulaires élevés étaient associés à un mauvais pronostic et au développement de métastases dans divers cancers humains. Une étude a également montré que l'inactivation de LGALS3BP dans les MDA-MB-231 entraînait une diminution de l'adhérence cellulaire sur la fibronectine, une réduction de la migration transendothéliale et une diminution de l'expression du VEGF. De plus, LGALS3BP s'est montré capable de stimuler directement

la tubulogénèse des HUVECs de manière indépendante du VEGF mais dépendante de la galectine-3 (Piccolo et al., 2013).

Le sécrétome des shLRP-1 comparé aux shCtrl a révélé une augmentation des protéines de la matrice ECM-1 et FRAS1.

- Une étude a également révélé que l'expression de FRAS1 était significativement corrélée à, entre autres, TGFB1, ce qui s'avère être le cas dans notre modèle puisque les deux protéines sont régulées à la hausse dans le sécrétome des cellules shLRP-1 (Umeda et al., 2019).
- La surexpression d'ECM1 apparaît comme un prédicteur indépendant de mauvais pronostic dans les carcinomes primitifs du sein. Dans une étude portant sur les cellules MDA-MB-231 et Hs-578t, l'ECM-1 est apparue comme un acteur clé dans le processus métastatique, qui régule l'architecture du cytosquelette d'actine, au moins en partie via des altérations d'expression de S100A4 (*S100 Calcium Binding Protein A4*) et TGFβR2 ainsi qu'une modulation des Rho GTPases, notamment RhoA (Gómez-Contreras et al., 2017). Toutefois des différences ont été observées entre les deux lignées triple négatives, toutes deux basales, p53 mutés et non mutés pour BRCA1 ni pour la voie PI3K (Chavez et al., 2010). L'absence d'ECM-1 entraîne une diminution de l'invasion et une diminution de l'expression de CD44 dans les cellules Hs-578t, mais pas dans les MDA-MB-231 (Gómez-Contreras et al., 2017). Ainsi, l'augmentation de ECM-1 dans notre modèle pourrait bien soutenir la migration et l'adhérence cellulaire comme cela l'a été démontré mais elle ne semble pas suffisante à elle seule pour soutenir le processus métastatique. Étant donné que l'ECM-1 est impliquée dans l'EMT, il semble cohérent qu'elle ait d'avantage d'effets sur les cellules Hs-578t, issues d'une tumeur primaire, plutôt que sur les MDA-MB-231, issues d'une effusion pleurale et peu différenciées, et par conséquent avec un profil mésenchymateux potentiellement plus prononcé. Grâce à une interaction physique avec l'EGFR, ECM-1 potentialise la phosphorylation du récepteur et de ERK en présence d'EGF, suggérant que l'ECM-1 pourrait jouer un rôle important dans le développement du cancer mammaire via l'axe EGFR (Lee et al., 2014). En effet, l'EGFR est fortement exprimé dans les TNBC, en particulier dans les sous-types BL (60-78%) (Yin et al., 2020), ce qui lui vaut d'être un axe étudié dans la recherche de traitement ciblé. Toutefois, les traitements anti-EGFR apparaissent propices à la résistance (Lev, 2020), notamment via des mécanismes de résistance acquise, tels que des mutations de KRAS, NRAS et BRAF ou l'amplification des gènes HER2 ou c-Met par exemple (Nakai et al., 2016). ECM-1 semble également capable de stabiliser la signalisation de HER3 dans les cellules de cancer mammaire. Il a été montré que la formation de l'hétérodimère EGFR-HER3, en tant que hub de signalisation, était un acteur clé dans la tumorigénèse des TNBC de type BL, mais pas pour les cancers présentant un phénotype *claudin-low* (Sinevici et al., 2020). Les cellules MDA-MB-231, présentant ce phénotype, n'apparaissent donc pas concernées. Qu'en est-il pour les cellules shLRP-1 ? Est-ce que LRP-1 pourrait jouer un rôle dans l'acquisition de ce phénotype associé à une agressivité accrue ? (Fig. 65).

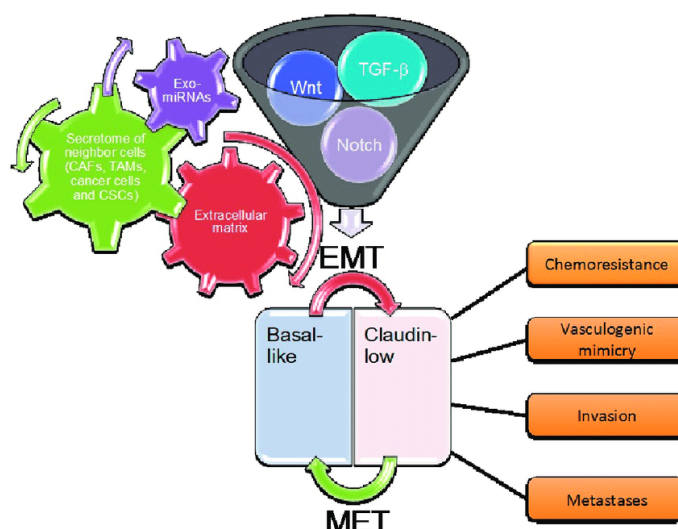


Figure 65 : Facteurs contribuant au phénotype claudin-low et son impact sur le comportement tumoral. D'après Fedele et al., 2017.

Le métabolisme dérégulé des cellules tumorales est une caractéristique de la progression du cancer, et également de la résistance aux traitements. Dans un criblage des gènes régulant le métabolisme, la créatine kinase, isoforme cérébrale (CKB) a été identifiée comme étant régulée à la baisse dans les cellules tumorales mammaires n'exprimant pas HIF-1 (Barch et al., 2018). CKB fait partie d'une famille de créatine qui catalysent de manière réversible le transfert d'un groupe phosphorylé à haute énergie de l'ATP à la créatine, générant des réserves locales de phosphocréatine dans la réaction directe et régénérant l'ATP dans la réaction inverse. Les créatine kinases sont régulées à la hausse dans une variété de tumeurs solides, y compris les cancers du sein. Des données non publiées, présentées via un poster lors du congrès AACR Cancer research 2019, révèlent que le knock-down de la CKB dans des cellules tumorales dérivées du modèle murin transgénique PyMT de cancer du sein métastatique n'altère ni la prolifération cellulaire ni la migration, mais impacte significativement l'invasion *in vitro*, suggérant que CKB pourrait soutenir les phases tardives de la tumorigenèse (Barch et al., 2018). Il a été mis en évidence dans un modèle de cancer colorectal que la CKB pouvait être libérée dans l'espace extracellulaire par les cellules métastatiques rencontrant une hypoxie et catalyser la production de phosphocréatine, importée et utilisée pour générer de l'ATP, alimentant ainsi la survie métastatique (Loo et al., 2015). Cette protéine augmentée aussi bien dans le sécrétome des shLRP-1 que des siLRP-1 pourrait bien jouer un rôle dans l'évolution métastatique de la maladie.

Ces données soulignent la complexité de la régulation médiée par LRP-1 dont les effets résultants de sa répression reflètent les interconnexions de ces différentes fonctions. Les protéines aussi bien pro- qu'anti-angiogéniques dont LRP-1 contrôle l'endocytose à des fins de recyclage ou de dégradation, se retrouvent en excès dans le sécrétome, et peuvent potentiellement exacerber leur signalisation. Toutefois, une protéine ne peut pas médier ses effets sans le récepteur adéquat. Ainsi, les protéines nécessitant LRP-1 pour médier certains de leurs effets pourraient se retrouver dans le milieu extracellulaire sans pour autant pouvoir

influencer le comportement cellulaire de manière paracrine ou autocrine. Il semble même que les différents ligands de LRP-1 puissent être en compétition pour lier le peu de LRP-1 exprimé à la surface des cellules shLRP-1. Les voies de signalisation privilégiées se verraient ainsi dépendante des différentes affinités de liaison et difficilement prévisible avec les éléments dont nous disposons.

Ces données de protéomique constituent le point de départ du décryptage moléculaire pour tenter d'identifier les mécanismes impliqués dans les changements vasculaires observés *in vivo* dans notre modèle de TNBC lorsque le récepteur LRP-1 est réprimé.

Partie II

L'objectif suivant est de savoir si des cellules de TNBC n'exprimant pas ou peu LRP-1 métastasent et dans quelle mesure. Pour commencer à répondre à cette question *in vitro*, il était impératif de prendre en compte un paramètre décisif pour la croissance tumorale et la dissémination métastatique *in vivo* : L'hypoxie. L'hypoxie conditionne l'agressivité. Ainsi, l'éventualité que le rôle du récepteur LRP-1 soit divergent en condition hypoxique mériterait d'être investigué, et ce, malgré les propriétés pro-angiogéniques et pro-tumorales démontrées de LRP-1 dans la tumeur primaire. D'autant plus qu'une des caractéristiques des cellules métastatiques est leur capacité à survivre en situation de stress et les shLRP-1 pourraient bien avoir une capacité de survie supérieure à celle des shCtrl en raison de la répression du récepteur LRP-1. *In vitro*, il a précédemment été mis en évidence que les cellules shLRP-1 présentaient une rigidité cellulaire accrue accompagnée d'une baisse de la dynamique des extensions membranaires impactant directement leurs capacités migratoires (Berquand et al., 2019). Au laboratoire, les résultats d'invasion en chambre de Boyden® modifiées ont montré que les cellules MDA-MB-231 shLRP-1 étaient moins invasives que les shCtrl, ce qui semble cohérent avec la diminution de l'activité plasmine que nous avons mesurée dans le sécrétome des cellules shLRP-1. Toutefois, lorsque nous nous plaçons dans une configuration expérimentale qui se rapproche des conditions physiopathologiques *in vivo*, qu'il s'agisse de *CAM assay* ou de la formation de sphéroïdes 3D, les cellules shLRP-1 présentent alors un profil plus évasif par rapport aux shCtrl. Comme l'hypoxie contribue à l'acquisition du phénotype EMT entraînant la mobilité cellulaire et les métastases (Hung et al., 2013), elle pourrait être le déclencheur de l'invasion *in vivo*. De plus, la longue exposition à l'hypoxie observée dans les tumeurs réprimées pour LRP-1 pourrait être associée à des cassures d'ADN et à des erreurs de réplication à haute fréquence, conduisant potentiellement à une instabilité génétique et une mutagenèse, qui augmentent le potentiel métastatique. Ainsi, un environnement hypoxique, bien que défavorable à la prolifération et à la survie de la majorité des cellules, contribue à la sélection de clones cellulaires ayant acquis, à la suite d'altérations génétiques et phénotypiques, la capacité d'outrepasser la privation en oxygène et en nutriments. L'hypoxie est impliquée dans l'induction d'un phénotype CSC par les cellules tumorales, via notamment HIF-1 et HIF-2 qui activent l'expression de gènes tels que *POU5F1*, *SOX2* et *NANOG*, codant pour des facteurs de transcription nécessaire au maintien des propriétés des CSC (Noman et al., 2011). L'hypoxie pourrait entraîner un enrichissement des CSC en l'absence de LRP-1, conduisant à une

agressivité tumorale accrue dans les phases tardives, une récurrence et une résistance aux traitements (Najafi et al., 2019).

L'analyse des cibles différentiellement régulées par l'hypoxie dans nos deux types cellulaires a révélé une diminution de la majorité des cibles déjà identifiée dans le sécrétome des cellules shLRP-1 (FRAS1, PROS1, IGFBP-1, PSAP, TIMP3). Néanmoins, nous avons pu observer l'enrichissement d'une protéine : MAMDC2, récemment été identifiée en tant que biomarqueur doté de propriétés anti-tumorales dans le cancer mammaire (Lee et al., 2020). De plus, une étude précédente a montré qu'une signature génique composée de trois gènes, dont MAMDC2, permettait de prédire la survie face au cancer mammaire dans plusieurs cohortes (Meng et al., 2016). L'augmentation de son expression en hypoxie par rapport à la normoxie dans les shLRP-1 pourrait améliorer la survie des cellules et ainsi contribuer à l'agressivité dans les phases tardives.

Il a été mis en évidence que la capacité de prolifération de cellules tumorales gastriques n'exprimant pas FRAS1 est inhibée par l'augmentation de l'activité des caspases et l'altération du cycle cellulaire (Umeda et al., 2019). Son expression a également été associée à l'activation des voies de signalisation EGFR et PI3K (Umeda et al., 2019), souvent altérée en raison de mutations ou d'une expression aberrante dans le cancer mammaire (Davis et al., 2014). Dans différents modèles de cancer, il a été mis en évidence que la protéine PROS1 exprimée par les cellules tumorales, soutenait la survie des cellules tumorales en interagissant avec le RTK Tyro3, et était impliquée, entre autres, dans la signalisation Erk (Al Kafri et al., 2019). Régulateur clé dans l'inflammation et la réponse aux dommages vasculaires (Burstyn-Cohen et al., 2009), PROS1, est un ligand des récepteurs de la famille des TAM (Tyro-3/Axl/Mer), dont la régulation spatiale est, pour certains, médiée par LRP-1 (Subramanian et al., 2014). *In vivo*, nous avons pu observer une augmentation de la nécrose en conséquence directe de l'hypoxie intra-tumorale ; en transposant les résultats *in vitro* obtenus, il n'est pas impossible qu'une partie de la population tumorale shLRP-1 puisse intégrer la diminution et/ou ne pas être en mesure d'intégrer les signaux prolifératifs médiés par FRAS1 et PROS1, engendrant ainsi une diminution de la survie cellulaire au sein de la tumeur.

Augmenté dans le sécrétome des cellules shLRP-1/shCtrl en normoxie, le TIMP-3 se voit diminuer en hypoxie. Cette diminution de l'expression du TIMP-3 dans les sécrétomes des cellules en hypoxie, pourrait jouer un rôle pro-tumoral. Une étude récente a montré que la protéine de liaison à l'ARN Msi1 (*Musashi1*) diminuait directement l'expression de TIMP-3, en tant qu'inhibiteur de MMP-9, pour médier ses effets pro-métastatiques (Bi et al., 2021). Ces données suggèrent le rôle important que pourrait jouer la diminution du TIMP3 dans les shLRP-1 en hypoxie dans les phases tardives du TNBC.

Il en est de même pour la PSAP et TINAGL1 (*Tubulointerstitial Nephritis Antigen Like 1*), protéines qui jouent des rôles anti-angiogéniques, dont l'expression améliorée en normoxie se voit diminuer dans le sécrétome des shLRP-1/shCtrl en hypoxie. La PSAP inhibe les métastases tumorales via la stimulation paracrine et endocrinienne de la p53 et de THBS1 au

niveau du stroma (Kang et al., 2009). L'expression ectopique de la PSAP *in vivo* entraîne la suppression du phénotype métastatique des cellules 4T1(hautement métastatiques) et MDA-MB-231 SCP28 (une sous-population métastatique osseuse dérivée des MDA-MB-231) (Ell et al., 2014). Concernant TINAGL1, il a été mis en évidence qu'elle supprimait la progression et les métastases du TNBC en inhibant simultanément la signalisation FAK/intégrines et la voie de l'EGFR (Shen et al., 2019).

Les protéines de choc thermique (Hsp) constituent des protéines cellulaires abondantes impliquées dans l'homéostasie des protéines. Elles se répartissent en isoformes constitutives et inductibles et leurs niveaux d'expression peuvent être modulés en conditions de stress, telles que l'élévation de la température, des niveaux d'oxygène réduits, les infections, une inflammation ou une exposition à des substances toxiques (Santos et al., 2017). Dans ces situations, les Hsp évitent la mort cellulaire en empêchant, entre autres, la dénaturation et la précipitation des protéines cellulaires. Bien que la majorité des fonctions des Hsp s'exercent dans le cytoplasme et les organites, plusieurs éléments révèlent leurs capacités à induire des réponses cellulaires dans le milieu extracellulaire. Les protéines Hsp ne possèdent pas de peptides signal de sécrétion, et leur sécrétion se fait sous forme non conventionnelle comme au travers des exosomes. La diminution de la quantité de HSPA1B et HSPH1 dans le sécrétome des cellules shLRP-1/shCtrl en hypoxie comparée à la normoxie pourrait induire une augmentation de la sensibilité générale de l'environnement tumoral des cellules shLRP-1 à l'hypoxie. Il est décrit que les cellules tumorales MDA-MB-231 sécrètent la protéine Hsp90 α en réponse à l'hypoxie afin de promouvoir leur survie (Dong et al., 2016) et leur motilité, et cette réponse est médiée de manière autocrine par le récepteur LRP-1 (Zhao et al., 2010). Bien que l'expression de cette protéine n'ait pas été retrouvée dans le sécrétome des cellules tumorales, elle n'en ait pas moins à exclure de futures investigations étant donné le potentiel de son inhibition dans le TNBC (Anant et al., 2017).

La signalisation liée à l'hypoxie engendre un enrichissement de nombreux gènes cibles, capables de répondre au stress induit par cette diminution de concentration en oxygène. Or, nous nous apercevons que nous avons majoritairement en hypoxie une atténuation des différences d'expression observées en normoxie. Ces résultats suggèrent que LRP-1 semble jouer un rôle majeur dans la réponse à l'hypoxie et pourrait conférer aux cellules la capacité d'augmenter leur robustesse face au stress engendré.

L'analyse des résultats obtenus avec les ProteomeProfilerTM a mis en évidence trois protéines : l'endostatine et GM-CSF dont l'expression en normoxie est augmentée dans les shLRP-1 comparées aux shCtrl mais diminuée en hypoxie, et MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein 1*), dont l'expression est réprimée dans les shLRP-1 quel que soit les niveaux d'oxygène.

L'endostatine, matrikine qui résulte d'un clivage protéolytique du domaine NC1 du collagène XVIII, inhibe spécifiquement la prolifération endothéliale et inhibe l'angiogenèse et la croissance tumorale (O'Reilly et al., 1997). Son augmentation en normoxie dans le sécrétome des cellules shLRP-1 comparées aux shCtrl est cohérente avec les résultats observés *in vivo*. Dans

l'environnement tumoral, les tumeurs shLRP-1 sont susceptibles d'avoir une activité protéolytique plus élevée en raison de l'accumulation des protéases dans le milieu extracellulaire en conséquence d'un manque d'épuration endocytaire par LRP-1. Cette augmentation de la protéolyse pourrait libérer des matrikines, comme l'endostatine, qui augmente dans le sécrétome des cellules shLRP-1/shCtrl en normoxie. En revanche, en condition hypoxique, le fait que l'endostatine diminue dans le sécrétome des cellules shLRP-1 en hypoxie soutiendrait l'hypothèse selon laquelle les cellules shLRP-1 pourraient être plus agressives. Cette diminution pourrait s'expliquer par une augmentation des inhibiteurs des protéases qui la génèrent, les cathepsines L, B, K (Ferrerias et al., 2000). De plus, il semble important de préciser que l'expression de l'endostatine dans les shCtrl ne varie que très peu entre les conditions hypoxiques et normoxiques, soutenant l'idée que cette régulation différentielle entre l'hypoxie et la normoxie est pleinement dépendante de la répression de LRP-1.

Le facteur de croissance GM-CSF (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) est majoritairement décrit pour son rôle essentiel dans la modulation immunitaire et l'hématopoïèse. Un grand nombre de preuves expérimentales indique que le GM-CSF, dont l'expression est augmentée dans plusieurs types de cancers humains, marque efficacement les cellules cancéreuses pour qu'elles soient reconnues par le système immunitaire (Hong et al., 2016). Toutefois, le rôle du GM-CSF dans la progression tumorale apparaît difficilement généralisable selon les cancers. Il a été mis en évidence que le GM-CSF pouvait rééduquer les TAM vers un phénotype anti-tumoral dans un modèle de cancer mammaire, grâce à la sécrétion de sVEGFR1, bloquant l'action du VEGF (Eubank et al., 2009). Il est largement admis que les TAM contribuent à l'angiogenèse et facilitent la dissémination métastatique. Ainsi, par ce mécanisme, le GM-CSF agirait comme un inhibiteur de l'angiogenèse et des métastases *in vivo* (Eubank et al., 2009). Toutefois, il a été mis en évidence que GM-CSF était la cible du NFkB lors de la stimulation de l'ostéoclastogénèse et de la résorption osseuse liées aux métastases osseuses de cancer mammaire (Park et al., 2007). Ces données suggèrent que selon le contexte et sa source, le GM-CSF peut ainsi jouer des rôles divergents dans le processus de dissémination métastatique. Il est intéressant de préciser que le GM-CSF diminue presque de moitié dans le sécrétome des cellules shLRP-1 en hypoxie comparées aux cellules en normoxie, alors qu'il augmente de 30% dans les shCtrl. Ainsi, la répression de LRP-1 entraîne une modulation de GM-CSF bivalente des cellules face à l'hypoxie.

Que ce soit en normoxie ou en hypoxie, les cellules shLRP-1 n'expriment pas de MCP-1 comparées aux cellules shCtrl. Le MCP-1 agit comme un chemoattractant sur les monocytes dans la tumeur qui, à leur tour, se différencient en TAM. Ainsi, le MCP-1 améliore indirectement la production de VEGF par le recrutement des TAM, qui le sécrètent (Szomolay et al., 2012). Son absence dans le sécrétome des cellules shLRP-1, à l'instar de sa présence dans les shCtrl, pourrait contribuer à la diminution de l'angiogenèse observée *in vivo* via une diminution du recrutement de TAM. Un marquage des macrophages sur les coupes tumorales serait nécessaire pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Les métastases sont associées à 90% des décès liés au cancer (Institut National du Cancer, 2018), il semble donc primordial d'en comprendre les mécanismes. L'invasion cellulaire est une étape centrale dans le processus de formation des métastases. Les conditions préalables à l'invasion cellulaire sont (1) l'adhésion cellulaire (force d'adhésion), (2) la génération de force, (3) le détachement (désadhésion et remodelage du cytosquelette) et (4) la composition de la matrice et le remodelage via des enzymes (Fig. 66). La régulation de ces paramètres détermine les capacités invasives des cellules tumorales. Une cellule n'exprimant pas ou peu LRP-1 présente une augmentation de la rigidité et une baisse de la dynamique d'extension membranaire se traduisant par une diminution de ses capacités migratoires (Berquand et al., 2019).

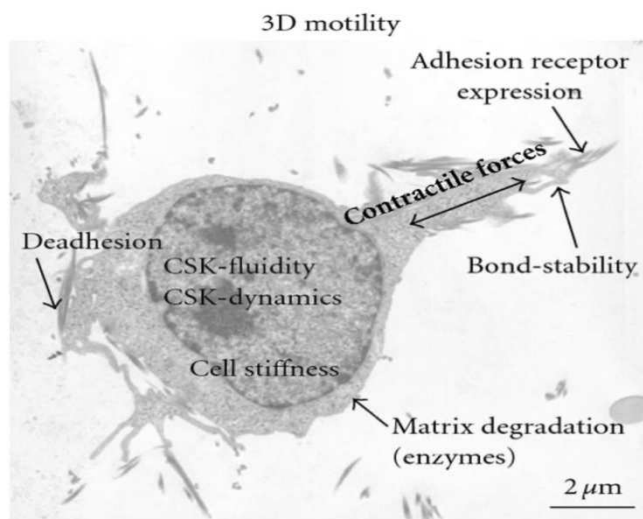


Figure 66 : Microscopie électronique à transmission d'une cellule MDA-MB-231 envahissant une matrice 3D de collagène. D'après Mierke, 2008.

Ces résultats ont été corrélés avec une diminution de l'activité des Rho GTPase. La famille Rho des petites GTPases comprend plus de 60 membres et peut être subdivisée en plusieurs sous-familles, notamment Rho (RhoA, RhoB, RhoC), Rac (Rac1, Rac2, Rac3, RhoG) et Cdc42 (Cdc42, RhoQ, RhoJ). Les voies Rho GTPase régulent de multiples aspects importants pour la dissémination des cellules malignes, à savoir l'EMT, les jonctions cellule-cellule, la formation de protubérances membranaires, la plasticité de la migration cellulaire et l'adaptation à un environnement hypoxique, comme l'atteste une revue récente (Jansen et al., 2018). Il a été mis en évidence que RhoC, exprimée constitutivement dans le cancer du sein, engendrait une augmentation de l'expression du VEGF (Wu et al., 2004). De plus, elle est impliquée dans l'interaction entre les cellules malignes et les cellules endothéliales lors de la migration transendothéliale (Reymond et al., 2015).

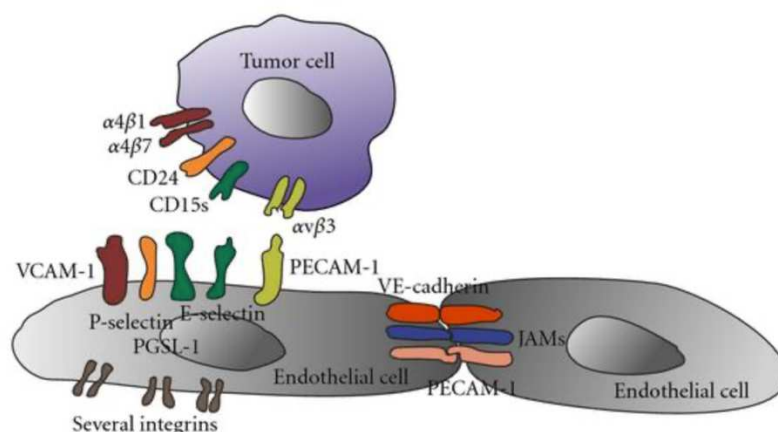


Figure 67 : Interactions entre la tumeur et cellules endothéliales lors de l'adhésion et de la transmigration des cellules tumorales. D'après Mierke, 2008.

L'intravasation est une étape importante du processus métastatique, dans lequel les cellules cancéreuses, après avoir dégradé la lame basale, adhèrent aux cellules endothéliales et transmigrent à travers l'endothélium pour rejoindre la circulation sanguine. Cette étape peut être modélisée *in vitro* par le biais d'un test de migration transendothéliale. Les résultats préliminaires que nous avons obtenus sont nuancés. Le fait que les MDA-MB-231 shLRP-1 aient tendance à moins transmigrier en normoxie au travers de la monocouche d'HUVECs ne semble pas incohérent aux vues de leurs capacités migratoire et invasive. Outre les récepteurs cellule-matrice, les récepteurs d'adhésion cellule-cellule jouent un rôle important dans la migration transendothéliale des cellules tumorales (ainsi que des leucocytes) (Fig. 67). Il a été rapporté que l'intégrine $\alpha v \beta 3$ ainsi que la protéine CD24 ancrée par le glycosylphatidylinositol facilitaient la transmigration des cellules tumorales et amélioraient l'invasion (Bauer et al., 2007). La protéine CD44v4 avec son ligand majeur, la sélectine-E, sont également impliqués dans ce processus (Zen et al., 2008). Les cellules endothéliales exprimant L1-CAM et PECAM-1 apparaissent comme des contre-récepteurs qui interagissent avec l'intégrine $\alpha v \beta 3$ des cellules cancéreuses (Buckley et al., 1996). L1-CAM et la sélectine-P ont été décrites comme des ligands du CD24 (Runz et al., 2008). L'intégrine $\alpha 4 \beta 1$ interagit, quant à elle, avec VCAM-1 ou CD14 pour améliorer la migration ou l'invasion des cellules tumorales (Humphries & Humphries, 2007) (Fig. 67). Une altération de ces interactions pourrait affecter les propriétés cellulaires et modifier le potentiel invasif des cellules tumorales. La répression de LRP-1, régulateur du protéome membranaire, et notamment des intégrines, semble plus qu'en mesure d'influencer ce processus. De plus, LRP-1 interagit et endocyte CD44 pour réguler l'adhérence des cellules tumorales (Perrot et al., 2012). Une accumulation membranaire de CD44 en l'absence de LRP-1 pourrait avoir des conséquences sur la migration transendothéliale des cellules shLRP-1 en augmentant leur attachement cellulaire. Il a été mis en évidence que CD44 était en mesure de potentialiser l'adhérence de cellules métastatiques de la prostate et du sein au niveau des cellules endothéliales de la moelle osseuse (Draffin et al., 2004). Toutefois, l'adhérence doit être finement régulée pour permettre la migration transendothéliale.

Les résultats de migration transendothéliale que nous avons obtenus sur deux expériences indépendantes sont partagés. Avec beaucoup de prudence, nous pouvons penser que la tendance à la diminution de la migration transendothéliale observée en normoxie dans les cellules shLRP-1 mais également dans les cellules WT+RAP reflète les conséquences de la diminution d'expression de LRP-1 ou de son absence de fonction. L'utilisation d'un autre modèle de TNBC (BT-20) a engendré une diminution significative de la migration transendothéliale en présence de RAP. LRP-1 apparaît donc impliqué, bien que non exclusivement car les effets sont modérés, dans ce processus. L'utilisation de RAP, qui aide initialement au repliement de LRP-1 et d'autres membres de la famille des récepteurs aux LDL, constitue un ligand préférentiel pour les LDL-R et empêche l'endocytose d'autres ligands par ces derniers. Bien que les fonctions de LRP-1 soient inévitablement impactées à la vue de son expression diminuée dans les cellules shLRP-1, une dimension supplémentaire s'ajoute. Celle d'un fonctionnement cellulaire et notamment du sécrétome façonné par la répression de LRP-1 sur le long terme. En hypoxie, les fonctions mêmes du récepteur LRP-1 semblent particulièrement importantes pour limiter le potentiel invasif des cellules MDA-MB-231, alors qu'elles n'apparaissent pas décisives en normoxie. En effet, en hypoxie, lorsque les cellules sont traitées avec du RAP, la migration transendothéliale se voit favorisée. Ces données montrent que le récepteur LRP-1, entre autres LDLR (Campion et al., 2020), pourrait jouer un rôle plutôt anti-tumoral dans les phases tardives de la maladie tumorale mammaire, notamment sous l'effet de l'hypoxie. Les résultats de migration transendothéliale des cellules shLRP-1, qui présentent une tendance comparable, soulignent l'implication potentielle de LRP-1. Un environnement hypoxique, défavorable à la prolifération et à la survie des cellules, participe à la sélection de clones cellulaires ayant acquis, à la suite d'altérations génétiques et phénotypiques, une insensibilité à la privation en oxygène et en nutriments (Vaupel, 2004). De plus, lors de l'établissement du potentiel métastatique, les cellules subissent des modifications phénotypiques mais surtout génotypiques, leur permettant de survivre et de s'adapter à un environnement parfois hostile. Elles deviennent plus agressives en régulant positivement des gènes qui participent au développement métastatique et en régulant négativement ceux qui le limite, dont LRP-1 pourrait faire partie (dans les étapes tardives). Cette hypothèse pourrait expliquer pourquoi l'expression de LRP-1 se voit diminuer dans les cellules MDA-MB-231 Brain et ouvre de nombreuses pistes de réflexion quant à la régulation temporelle de LRP-1 au cours de la progression tumorale.

CONCLUSIONS
& PERSPECTIVES

Le cancer du sein triple négatif reste, aujourd'hui encore, une pathologie réfractaire aux avancées thérapeutiques conventionnelles qui nécessite l'identification de nouvelles cibles moléculaires afin d'enrichir les options thérapeutiques. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le développement et la progression de ce cancer dans sa globalité se veut indispensable pour envisager le développement de stratégies innovantes et/ou l'amélioration de l'efficacité de thérapies anti-cancéreuses existantes. Ces travaux s'inscrivent dans la compréhension globale du microenvironnement tumoral mammaire, en se focalisant sur le rôle pivot du récepteur matriciel, LRP-1. Ces dernières années, LRP-1 a émergé dans l'homéostasie vasculaire, un processus de régulation rigoureux qui nécessite une coordination intime d'un grand nombre d'effecteurs. En effet, un certain nombre de troubles physiologiques et fonctionnels vasculaires sont associés à des altérations de LRP-1. Ces travaux de thèse avaient pour objectifs de déterminer le rôle du récepteur LRP-1 dans la progression tumorale mammaire et dans le contrôle de l'angiogenèse associée. Pour finir, des expériences préliminaires ont été réalisées visant à préciser son rôle dans les phases tardives de la tumorigenèse.

Au travers d'une approche d'interférence à l'ARN (shARN) réalisée sur la lignée cellulaire de TNBC (MDA-MB-231), nous avons mis en évidence le rôle pro-tumorigène du récepteur LRP-1. Au travers de ces nombreuses fonctions, nous avons observé que LRP-1 modulait la prolifération cellulaire *in vitro* mais cette propriété entre les cellules réprimées ou non pour LRP-1 n'a pas été retrouvée *in vivo*, au regard des index mitotiques identiques dans les tumeurs. Parmi les caractéristiques déterminantes dans la cancérogenèse, la mise en place de l'angiogenèse se veut indispensable pour la croissance et la progression tumorale *in vivo*. Nous avons observé que le récepteur LRP-1 soutenait l'angiogenèse tumorale *in vivo* et *in vitro*. L'utilisation de tests angiogéniques nous ont permis de mettre en évidence que la répression de son expression dans un modèle de TNBC impacte la densité microvasculaire, la morphologie et par extension l'efficacité de perfusion des vaisseaux sanguins tumoraux. Puis, nous avons mis en évidence que le sécrétome issu des cellules tumorales n'exprimant pas LRP-1 était en mesure d'impacter le comportement des cellules endothéliales sur différents aspects : la prolifération, la migration, la formation de structures tubulaires et l'activité plasmine. Alors que le sécrétome des cellules tumorales exprimant LRP-1 limitent légèrement la prolifération des cellules endothéliales comparé au sécrétome des cellules réprimées, il soutient très nettement leur migration, la formation de structures tubulaires et l'activité plasmine. La caractérisation des sécrétomes, au moyen d'une approche de protéomique, nous a permis d'identifier un éventail d'acteurs moléculaires par l'intermédiaire desquelles LRP-1 est impliqué dans l'angiogenèse. Le modèle que nous proposons repose sur un équilibre angiogénique en faveur d'une diminution qualitative de l'angiogenèse plus que quantitative lorsque LRP-1 est réprimé. À première vue, au travers des acteurs moléculaires identifiés par l'analyse protéomique tels que le VEGF, PLAT, TGFB, et CTGF, nous aurions pu nous attendre à une signalisation pro-angiogénique et pro-tumorale dans les cellules réprimées pour LRP-1. Toutefois, i) elle semble contrecarrée par la présence d'inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse, comme les

TIMPs, PAI-1/2, THBS1 ou encore l'endostatine, et ii) elle pourrait ne pas engendrer de réponse cellulaire sans les récepteurs adéquats, notamment si la signalisation est dépendante de LRP-1. Une des caractéristiques observées dans les tumeurs n'exprimant pas LRP-1 concerne l'augmentation de l'hypoxie. Cela engendre des zones étendues de nécrose, et illustre l'incapacité des cellules réprimées pour LRP-1 à initier l'angiogenèse *in vivo*. Il est admis que ces caractéristiques qui limitent la croissance de la tumeur primaire, peuvent, néanmoins, conduire à une agressivité accrue des cellules tumorales qui tentent de s'échapper de la masse tumorale. Nous avons pu entrevoir ce phénomène dans les cellules réprimées pour LRP-1 lors d'expériences préliminaires de migration transendothéliale. En effet, nous avons pu observer une augmentation de la migration transendothéliale des cellules MDA-MB-231 en hypoxie lorsque la fonction du récepteur LRP-1 est inhibée par RAP, alors qu'aucune différence n'a pu être mesurée en normoxie. Nos résultats suggèrent que LRP-1 pourrait, en réponse à l'hypoxie, jouer un rôle divergeant temporellement et spatialement dans la progression tumorale mammaire. La diminution de l'expression de LRP-1 dans des cellules métastatiques dérivant des MDA-MB-231 (MDA-MB-231 *Brain*), conforte notre hypothèse et nous amène à penser qu'il pourrait subir une régulation négative lors des étapes cruciales de la dissémination pour permettre aux cellules de se soustraire de son rôle de mécanosenseur du microenvironnement, notamment face à l'hypoxie, auquel il répond. Nous pouvons nous demander si cette adaptation, qui semble limiter la sensibilité des cellules tumorales aux stimuli extérieurs, ne leur conférerait pas un avantage sélectif pour soutenir leur évaison de la tumeur primaire.

Aux vues des données susmentionnées, LRP-1 constitue un récepteur essentiel à la progression du cancer mammaire triple négatif *in vivo*. Il soutient la croissance tumorale primaire, par, entre autres, une régulation de l'angiogenèse tumorale. LRP-1 apparaît comme un acteur crucial dans le maintien d'une certaine homéostasie/fonctionnalité des vaisseaux sanguins, permettant la croissance tumorale d'un modèle de TNBC (MDA-MB-231). Ces résultats, encore jamais rapportés, place le récepteur LRP-1 en tant que potentiel biomarqueur dans le TNBC. Au vu de son rôle pivot et de ses nombreuses interactions avec l'environnement péricellulaire, son ciblage spécifique n'apparaît pas aujourd'hui comme une stratégie de choix dans le traitement du TNBC. Toutefois la compréhension de son rôle dans le cancer révèle une source inépuisable de potentielles cibles thérapeutiques, qu'il convient d'exploiter. Ces résultats ne sont que le point de départ de nouvelles orientations à approfondir concernant la régulation médiée par le récepteur LRP-1 dans le cancer ; en voici quelques perspectives :

Recherche translationnelle

- Le lien entre LRP-1 et TNBC nécessite un approfondissement. Bien qu'une publication ait déjà mis en évidence ce lien, il conviendrait d'étendre les résultats sur une cohorte plus importante. Dans cette idée, une étude anatomopathologique en collaboration avec l'Institut de Cancérologie de Lorraine (Prof. Jean Louis Merlin) est en cours pour tenter de corréler rétrospectivement l'expression de LRP-1 avec les sous-types de cancer mammaire avant tout traitement, leur évolution et leur survie à 5 ans.

Recherche fondamentale

- L'unicité de notre modèle cellulaire empêche la généralisation de nos résultats aux TNBC. Ces travaux nécessitent d'être soutenus par différentes lignées de TNBC, notamment des lignées avec pour origine la tumeur primaire, comme les BT-20 (Basal A), les HCC38 (Basal B) ou les Hs-578t (Basal B). Il pourrait également être intéressant de regarder le rôle de LRP-1 dans des lignées TNBC non basales, car environ 30% des TNBC ne le sont pas.

In vitro

- Les analyses protéomiques du sécrétome étant le point de départ d'investigations futures, le TGF- β fait partie des cibles de choix dans la régulation médiée par le récepteur LRP-1. Il semble pertinent de vérifier si cette modulation existe dans des cellules tumorales n'ayant pas encore totalement entrepris l'EMT comme les BT-20. Les cellules exprimant ou non LRP-1 pourraient être traitées avec du TGF- β recombinant ou un inhibiteur du récepteur TGFRI pendant 24 à 48 heures, afin d'observer les effets sur l'EMT. L'expression de marqueurs épithéliaux et mésenchymateux devra être mesurée au préalable et après le traitement. Il semble également important de regarder l'expression transcriptionnelle des facteurs de transcription impliqués dans l'EMT, comme ZEB, SNAIL et SLUG.

Il serait également intéressant de s'intéresser aux cibles anti-angiogéniques régulés à la hausse dans les MDA-MB-231 shLRP-1 comme le TIMP3, la SERPIN1 ou encore l'endostatine et de vérifier si LRP-1 les module également dans les différentes lignées de TNBC susmentionnées. Par la suite, il apparaît primordial de réaliser des tests fonctionnels pour vérifier leur implication dans les processus angiogéniques *in vitro* en utilisant des protéines recombinantes et des inhibiteurs pour évaluer le potentiel angiogénique de cellules endothéliales (HUVECs et HMVECs (*Human Microvascular Endothelial Cells*)). Si certaines cibles s'avèrent jouer un rôle significatif, il faudrait entreprendre de décrypter la ou les voies de signalisation associée.

Dans ces cas-là, une étude de phosphoprotéomique pourrait être réalisée sur les cellules endothéliales traitées avec les sécrétomes des cellules tumorales exprimant ou non LRP-1, mais également les cellules tumorales elle-même. La mise en parallèle de l'étude du sécrétome et des protéines phosphorylées pourraient nous fournir des pistes d'investigations concernant les voies de transduction privilégiées par les acteurs du sécrétome de manière autocrine et paracrine sur les cellules endothéliales.

- L'enrichissement en cellules souches cancéreuses (CSC), dont la présence est associée à un mauvais pronostic dans le cancer mammaire, est impliqué dans le processus métastatique (Bao et al., 2019). Étant donné que l'EMT est en mesure de moduler la proportion de CSC dans les TNBC, il semble intéressant de statuer sur le rôle de LRP-1 dans ce processus. L'analyse phénotypique des cellules tumorales pour déterminer la fraction de cellules CD44+/CD24- et l'activité ALDH par cytométrie en flux à partir de cellules réprimées ou non pour LRP-1 pourrait être réalisée. Un test fonctionnel de mammosphère en série pourra être réalisé pour évaluer la capacité d'auto-renouvellement des cellules réprimées ou non pour LRP-1 (Rota et al., 2012 ; Lombardo et al., 2015).
- L'impact de l'expression de LRP-1 sur la dissémination métastatique ne saurait être complètement illustrée par le sécrétome des cellules tumorales en monocouche, bien qu'il soit possible de les conditionner en l'hypoxie. Les mécanismes impliqués dans les phases tardives résultent d'une multitude d'interactions des cellules entre elles (en 3D) et avec leur microenvironnement. La réalisation de milieux conditionnés à partir de sphéroïdes pour nous rapprocher des conditions pathologiques en termes de disponibilité des nutriments et de gradient d'hypoxie.
- L'hypoxie au sein des tumeurs est un mécanisme complexe et dynamique. Il peut s'avérer compliqué à mettre en œuvre *in vitro* si on cherche à s'approcher des conditions *in vivo*. Certains auteurs développent des protocoles où les cellules subissent une hypoxie de manière intermittente sur plusieurs jours pour les conditionner à l'hypoxie qu'elles sont plus à même de rencontrer *in vivo*. Étant donné le rôle que LRP-1 semble jouer dans la réponse à l'hypoxie, un tel modèle pourrait être intéressant dans la compréhension du rôle de LRP-1. Il s'agirait de caractériser les cellules avant et après le traitement, mais également de les utiliser lors d'expériences fonctionnelles (prolifération, migration, invasion, migration transendothéliale, mammosphères) en les comparant à des cellules en normoxie.

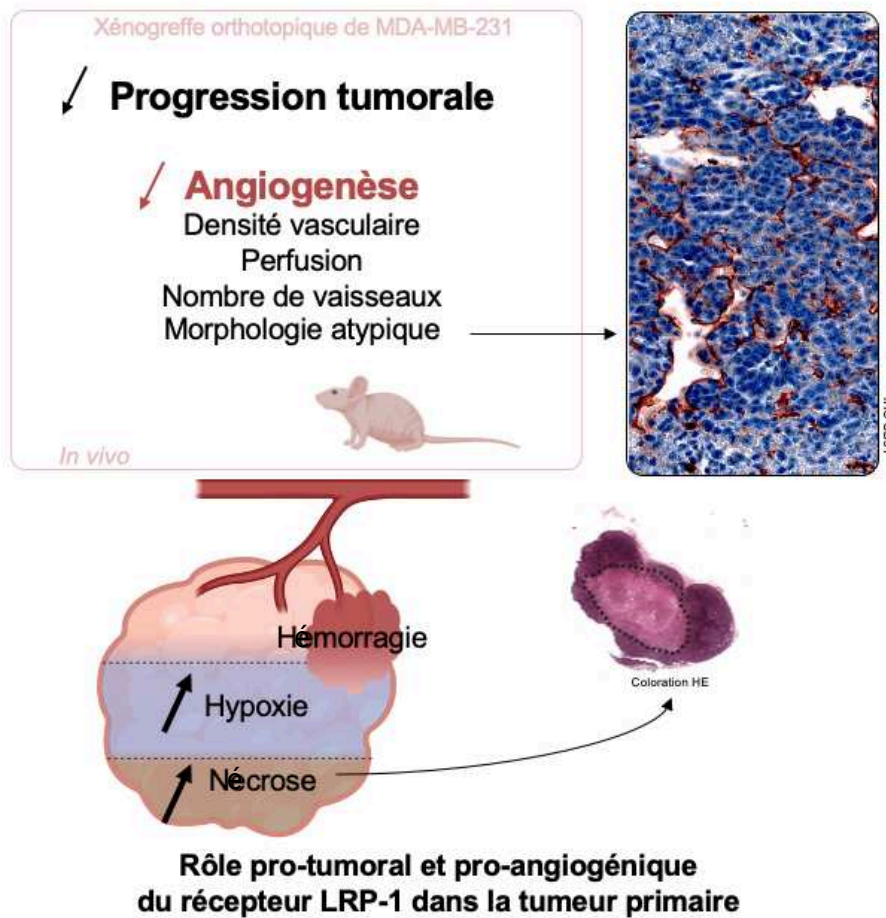
Alors que l'atmosphère humide utilisée dans la plupart des incubateurs de culture cellulaire affiche 21% d'oxygène, il serait intéressant de tester un niveau d'oxygène physiologiquement retrouvé dans les tissus. Il est estimé à 5% en moyenne, en raison du transport d'oxygène, de la consommation des tissus et de la diffusion de l'apport sanguin aux tissus (Sullivan et al., 2006 ; Hammond et al., 2014). Une étude a montré que le comportement de lignées cellulaires TNBC cultivées dans des conditions de faible teneur en oxygène (5% O₂) était comparable à celui des lignées cellulaires de cancer du sein couramment utilisées, dont les MDA-MB-231,

cultivées en conditions d'oxygène à 21% (Leung et al., 2018). Utiliser cette condition intermédiaire en complément de la condition normoxique, pour les comparer à l'hypoxie intermittente pourrait être un bon moyen d'enrichir nos connaissances sur la régulation de la réponse à l'hypoxie par LRP-1, tout en s'approchant des conditions *in vivo*.

In vivo

- L'évolution d'un carcinome canalaire *in situ* vers un carcinome invasif dans le cancer mammaire peut être reproduit chez la souris grâce au modèle MIND (*Mouse IntraDuctal*) pour l'évaluation de la dissémination métastatique spontanée *in vivo* (Kittrell et al., 2016). Les MDA-MB-231 ne se prêtant pas à ce modèle, il conviendrait d'utiliser d'autres lignées TNBC comme les BT-20 ou les HCC1806 (hautement métastatique) (Sflomos et al., 2016), ainsi que la lignée murine 4T1 (hautement métastatique) (Ghosh et al., 2018 ; Luo et al., 2020). La répression de LRP-1 au moyen d'un shARN stablement transfecté permettrait d'évaluer de manière très complète le rôle du récepteur LRP-1 dans les différentes phases de la tumorigenèse. L'utilisation de lignées pour lesquelles l'expression du shARN dirigé contre LRP-1 pourrait être inductible, apporterait une dimension supplémentaire dans la compréhension de la régulation temporelle de LRP-1 dans le contexte tumoral.
- L'utilisation du modèle de MDA-MB-231 *Brain* invalidé pour LRP-1 semble également plus que pertinent. Est-ce que les cellules réprimées pour l'expression de LRP-1 formeraient plus ou moins de métastases cérébrales ? Les cellules pourraient être suivies et quantifiées grâce à des techniques *ex vivo* en sacrifiant ponctuellement des animaux porteurs dans les étapes précoces. L'IRM pourrait être utilisée en tant qu'imagerie anatomique et fonctionnelle en présence de macro-métastases, au même titre que l'imagerie de fluorescence avec une sonde comme le Rediject 2-DG de chez Perkin Elmer. Par ailleurs, les cellules pourraient également être transfectées au préalable avec un plasmide exprimant la Luciferase pour permettre leur suivi longitudinal en bioluminescence.
- Pour mettre en évidence l'implication de LRP-1 dans l'enrichissement des CSC *in vivo* une expérience de xénogreffes en séries pourrait être réalisée afin d'identifier les cellules capables d'initier la croissance tumorale sur plusieurs générations. Cette expérience viendrait en complément de l'expérience de mammosphères *in vitro*, qui est limitée par la difficulté de saisir la complexité de la formation et du comportement des CSC dans leur niche *in vivo*. Une expérience de dilution limite peut également être intéressante pour déterminer la fréquence de cellules initiatrices de tumeurs (TIC) présente parmi les cellules tumorales réprimées ou non pour LRP-1. Dans cette expérience, des nombres décroissants de cellules tumorales sont injectés à des souris. Moins il faut de cellules pour engendrer la croissance tumorale, plus la fréquence des TIC est élevée dans la population cellulaire injectée.

Répression du récepteur LRP-1



Utilisation de milieux conditionnés tumoraux

- Potentiel angiogénique des HUVECs**
- Migration
 - Formation de pseudotubes
 - Activité plasmine

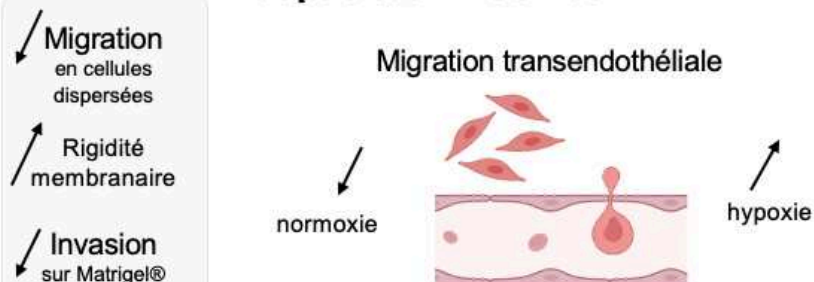
In vitro

Etude du sécrétome

Modulation du sécrétome angiogénique

In vitro

Capacités invasives



In vitro

Rôle bivalent dans les phases tardives en réponse à l'hypoxie ?

Répression du récepteur LRP-1 dans les MDA-MB-231

HYPOXIE

- Rôle anti-tumoral
- Rôle pro-tumoral
- Rôle dépendant du contexte
- Impliqué dans l'angiogenèse
- Impliqué dans la prolifération/survie
- Impliqué dans l'invasion/métastases
- * Ligand de LRP-1
- Capacité de séquestrer

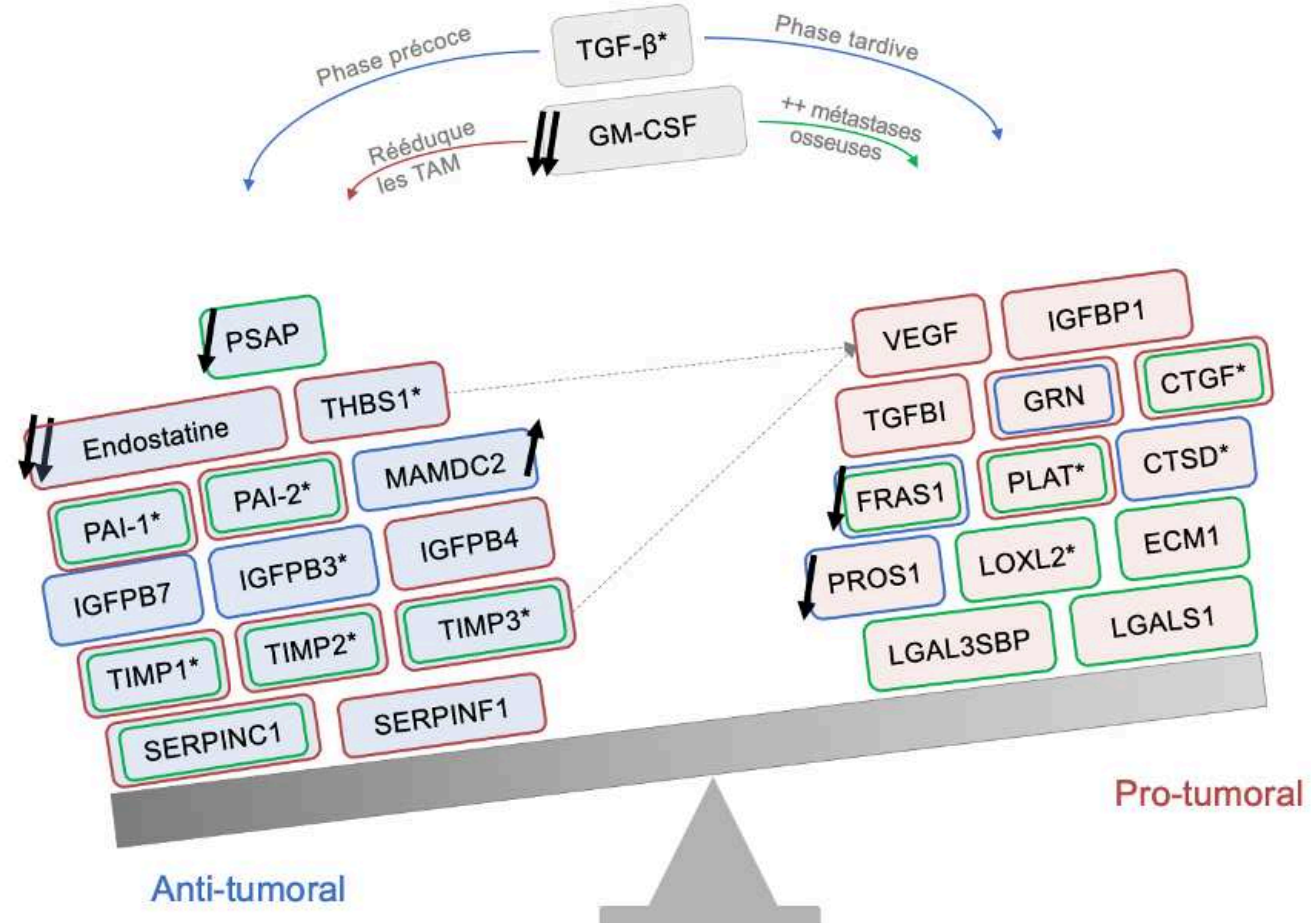


Figure 68 : Modulation du sécrétome des MDA-MB-231 réprimées pour LRP-1 en normoxie et en hypoxie

Publications internationales à comité de lecture

Campion O, Thevenard-Devy J, Billottet C, Schneider C, Etique N, Dupuy J-W, Raymond A-A, Marie Meunier M, Djermoune E, Lelièvre E, Wahart A, Bour C, Hachet C, Dedieu S, Devy J. LRP-1 matricellular receptor role in tumor angiogenesis in a triple negative breast cancer. *Br Journal of Cancer*. 2021 (En révision)

Campion O, Al Khalifa T, Langlois B, Thevenard-Devy J, Salesse S, Savary K, Schneider C, Etique N, Dedieu S, Devy J. Contribution of the Low-Density Lipoprotein Receptor Family to Breast Cancer Progression. *Front Oncol*. 2020 Jul 30;10:882. doi: 10.3389/fonc.2020.00882. PMID: 32850302; PMCID: PMC7406569.

Jiménez Sánchez G, Maury P, Stefancikova L, Campion O, Laurent G, Bouraleh Hoch F, Boschetti F, Denat F, Devy J, Porcel E. Fluorescent Radiosensitizing Gold Nanoparticles. *Int J Mol Sci*. 2019;20(18):4618. doi:10.3390/ijms20184618

Berquand A, Meunier M, Thevenard-Devy J, Ivaldi C, Campion O, Dedieu S, Milinari M, Devy J. A gentle approach to investigate the influence of LRP-1 silencing on the migratory behavior of breast cancer cells by atomic force microscopy and dynamic cell studies. *Nanomedicine*. 2019;18:359-370. doi:10.1016/j.nano.2018.10.012

Communications orales

Campion O., Laurent G., Bour C., Bazzi R., Roux S. and Devy J. Au@DTDTPA(Gd)-Cy5 nanoparticles for multimodality imaging in a Triple Negative Breast Cancer (TNBC) model. Imaging and therapeutic targeting in cancerology Workshop, 26-29 Septembre 2018, Le Bono, France.

Campion O., Bour C., Thevenard Devy J., Schneider C., Ethique N., Dedieu S., Devy J. Evaluation of the LRP-1 receptor contribution during tumor progression and angiogenesis in a triple negative breast cancer model. SFBMEc, 15-17 Mai 2019, Reims, France.

Campion O., Thevenard Devy J., Dedieu S., Devy J. The matricellular receptor LRP-1 acts as a pro-tumorigenic receptor by supporting tumor angiogenesis in a triple negative breast cancer model. ESMED World Conference on Cancer Research and Therapy, 2 Juillet 2021, conférence virtuelle.

Posters

Campion O., Bour C., Thevenard Devy J., Schneider C., Ethique N., Dedieu S., Devy J. Evaluation de la contribution du récepteur LRP-1 lors des processus d'angiogenèse tumorale dans un modèle de cancer mammaire triple négatif *in vivo*. 11ième forum du Canceropole Grand Est, 15-16 Novembre 2018, Reims. Prix du meilleur poster.

Campion O., Laurent G., Bour C., Bazzi R., Roux S. and Devy J. Advantages of Au@DTDTPA(Gd)-Cy5 nanoparticles for multimodality imaging. Groupement de recherche « Agent d'imagerie moléculaire » France Life Imaging WP1, 04-05 Juin 2018, Orléans, France.

Campion O., Bour C., Thevenard Devy J., Schneider C., Ethique N., Dedieu S., Devy J. EAA 2020 conference on Tumor Microenvironment, 02-04 Mars 2020, Lisbonne, Portugal.

Campion O., Thevenard Devy J., Ethique N., Raymond AA., Dupuy JW., Dedieu S., Devy J. The matricellular receptor LRP-1 acts as a pro-tumorigenic receptor by supporting tumor angiogenesis in a triple negative breast cancer model. AACR Virtual Special Conference on The Evolving Tumor Microenvironment in Cancer Progression; Mechanisms and Emerging Therapeutic Opportunities, 11-12 Janvier 2021, Conférence virtuelle.

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

- Aalders KC, Tryfonidis K, Senkus E, Cardoso F. Anti-angiogenic treatment in breast cancer: Facts, successes, failures, and future perspectives. *Cancer Treat Rev.* 2017;53:98-110. doi:10.1016/j.ctrv.2016.12.009
- Aaronson DS, Horvath CM. A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science.* 2002;296(5573):1653-1655. doi:10.1126/science.1071545
- Abd El-Rehim DM, Pinder SE, Paish CE, et al. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. *J Pathol.* 2004;203(2):661-671. doi:10.1002/path.1559
- Abdulkarim BS, Cuartero J, Hanson J, Deschênes J, Lesniak D, Sabri S. Increased risk of locoregional recurrence for women with T1-2N0 triple-negative breast cancer treated with modified radical mastectomy without adjuvant radiation therapy compared with breast-conserving therapy. *J Clin Oncol.* 2011;29(21):2852-2858. doi:10.1200/JCO.2010.33.4714
- Abkevich V, Timms KM, Hennessy BT, et al. Patterns of genomic loss of heterozygosity predict homologous recombination repair defects in epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer.* 2012;107(10):1776-1782. doi:10.1038/bjc.2012.451
- Abramczyk H, Surmacki J, Kopeć M, Olejnik AK, Lubecka-Pietruszewska K, Fabianowska-Majewska K. The role of lipid droplets and adipocytes in cancer. Raman imaging of cell cultures: MCF10A, MCF7, and MDA-MB-231 compared to adipocytes in cancerous human breast tissue. *Analyst.* 2015 Apr 7;140(7):2224-35. doi: 10.1039/c4an01875c. PMID: 25730442
- Acerbi I, Cassereau L, Dean I, et al. Human breast cancer invasion and aggression correlates with ECM stiffening and immune cell infiltration. *Integr Biol (Camb).* 2015;7(10):1120-1134. doi:10.1039/c5ib00040h
- Actis Dato V, Chiabrando GA. The Role of Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 in Lipid Metabolism, Glucose Homeostasis and Inflammation. *Int J Mol Sci.* 2018;19(6):1780. Published 2018 Jun 15. doi:10.3390/ijms19061780
- Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(6):464-478. doi:10.1038/nrm2183
- Adams S, Gray RJ, Demaria S, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. *J Clin Oncol.* 2014;32(27):2959-2966. doi:10.1200/JCO.2013.55.0491
- Adeca. Les performances d'un test de dépistage. 2015. <http://www.adeca68.fr/>
- Aggarwal BB, Vijayalekshmi RV, Sung B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clin Cancer Res.* 2009;15(2):425-430. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0149
- Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell.* 2004;6(3):203-208. doi:10.1016/j.ccr.2004.09.003
- Airoidi I, Cocco C, Giuliani N, et al. Constitutive expression of IL-12R beta 2 on human multiple myeloma cells delineates a novel therapeutic target. *Blood.* 2008;112(3):750-759. doi:10.1182/blood-2008-02-139378
- Akincilar SC, Unal B, Tergaonkar V. Reactivation of telomerase in cancer. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(8):1659-1670. doi:10.1007/s00018-016-2146-9
- Al Kafri N, Hafizi S. Tumour-Secreted Protein S (ProS1) Activates a Tyro3-Erk Signalling Axis and

- Protects Cancer Cells from Apoptosis. *Cancers (Basel)*. 2019;11(12):1843. Published 2019 Nov 22. doi:10.3390/cancers11121843
- Albo D, Berger DH, Wang TN, Hu X, Rothman V, Tuszynski GP. Thrombospondin-1 and transforming growth factor-beta 1 promote breast tumor cell invasion through up-regulation of the plasminogen/plasmin system. *Surgery*. 1997;122(2):493-500. doi:10.1016/s0039-6060(97)90043-x
- Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, et al. Signatures of mutational processes in human cancer [published correction appears in *Nature*. 2013 Oct 10;502(7470):258. Imielinski, Marcin [corrected to Imielinski, Marcin]]. *Nature*. 2013;500(7463):415-421. doi:10.1038/nature12477
- Alfandari D, Cousin H, Gaultier A et al. Les protéines de la famille ADAM : protéolyse, adhérence et signalisation. *médecine/sciences* 1999 ; 15 : 1148-51
- Ali IU, Hynes RO. Effects of cytochalasin B and colchicine on attachment of a major surface protein of fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*. 1977;471(1):16-24. doi:10.1016/0005-2736(77)90388-1
- Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature*. 2005;438(7070):946-953. doi:10.1038/nature04480
- Alkadhim M, Zoccali C, Abbasifard S, et al. The surgical vascular anatomy of the minimally invasive lateral lumbar interbody approach: a cadaveric and radiographic analysis. *Eur Spine J*. 2015;24 Suppl 7:906-911. doi:10.1007/s00586-015-4267-5
- Alkasalias T, Moyano-Galceran L, Arsenian-Henriksson M, Lehti K. Fibroblasts in the Tumor Microenvironment: Shield or Spear?. *Int J Mol Sci*. 2018;19(5):1532. Published 2018 May 21. doi:10.3390/ijms19051532
- Allavena P, Sica A, Vecchi A, Locati M, Sozzani S, Mantovani A. The chemokine receptor switch paradigm and dendritic cell migration: its significance in tumor tissues. *Immunol Rev*. 2000;177:141-149. doi:10.1034/j.1600-065x.2000.17714.x
- Alluri P, Newman LA. Basal-like and triple-negative breast cancers: searching for positives among many negatives [published correction appears in *Surg Oncol Clin N Am*. 2014 Oct;23(4):xv]. *Surg Oncol Clin N Am*. 2014;23(3):567-577. doi:10.1016/j.soc.2014.03.003
- Almendros I, Gozal D. Intermittent hypoxia and cancer: Undesirable bed partners?. *Respir Physiol Neurobiol*. 2018;256:79-86. doi:10.1016/j.resp.2017.08.008
- Almuhaideb A, Papathanasiou N, Bomanji J. 18F-FDG PET/CT imaging in oncology. *Ann Saudi Med*. 2011;31(1):3-13. doi:10.4103/0256-4947.75771
- Amemiya Y, Yang W, Benatar T, et al. Insulin like growth factor binding protein-7 reduces growth of human breast cancer cells and xenografted tumors. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;126(2):373-384. doi:10.1007/s10549-010-0921-0
- Amin DN, Hida K, Bielenberg DR, Klagsbrun M. Tumor endothelial cells express epidermal growth factor receptor (EGFR) but not ErbB3 and are responsive to EGF and to EGFR kinase inhibitors. *Cancer Res*. 2006;66(4):2173-2180. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3387
- Anant S, Ramamoorthy P, Tawfik O et al., Effects of Hsp90 Inhibitors on Patient Derived Triple Negative Breast Cancer (TNBC) Cells: BRCA1 as a Therapeutic Target for TNBC. 2017; doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2017.07.536
- Andarawewa KL, Motrescu ER, Chenard MP, et al. Stromelysin-3 is a potent negative regulator of adipogenesis participating to cancer cell-adipocyte interaction/crosstalk at the tumor invasive

- front. Cancer Res. 2005;65(23):10862-10871. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1231
- Anderberg C, Li H, Fredriksson L, et al. Paracrine signaling by platelet-derived growth factor-CC promotes tumor growth by recruitment of cancer-associated fibroblasts. *Cancer Res.* 2009;69(1):369-378. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2724
- Andor N, Maley CC, Ji HP. Genomic Instability in Cancer: Teetering on the Limit of Tolerance. *Cancer Res.* 2017;77(9):2179-2185. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-1553
- Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* 2008;22(10):1276-1312. doi:10.1101/gad.1653708
- Andreopoulou E, Kelly CM, McDaid HM. Therapeutic Advances and New Directions for Triple-Negative Breast Cancer. *Breast Care (Basel).* 2017;12(1):21-28. doi:10.1159/000455821
- Anwar M, Aslam HM, Anwar S. PARP inhibitors. *Hered Cancer Clin Pract.* 2015;13(1):4. Published 2015 Jan 17. doi:10.1186/s13053-014-0024-8
- Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell.* 2019;176(6):1248-1264. doi:10.1016/j.cell.2019.01.021
- Arai AL, Migliorini M, Au DT, et al. High-Affinity Binding of LDL Receptor-Related Protein 1 to Matrix Metalloprotease 1 Requires Protease:Inhibitor Complex Formation. *Biochemistry.* 2020;59(32):2922-2933. doi:10.1021/acs.biochem.0c00442
- Araki K, Miyoshi Y. Mechanism of resistance to endocrine therapy in breast cancer: the important role of PI3K/Akt/mTOR in estrogen receptor-positive, HER2-negative breast cancer. *Breast Cancer.* 2018;25(4):392-401. doi:10.1007/s12282-017-0812-x
- Arneth B. Tumor Microenvironment. *Medicina (Kaunas).* 2019;56(1):15. Published 2019 Dec 30. doi:10.3390/medicina56010015
- Arpino G, Bardou VJ, Clark GM, Elledge RM. Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumor characteristics and clinical outcome. *Breast Cancer Res.* 2004;6(3):R149-R156. doi:10.1186/bcr767
- Arpino V, Brock M, Gill SE. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biol.* 2015;44-46:247-254. doi:10.1016/j.matbio.2015.03.005
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997;275(5302):964-967. doi:10.1126/science.275.5302.964
- Asahara T, Takahashi T, Masuda H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J.* 1999;18(14):3964-3972. doi:10.1093/emboj/18.14.3964
- Ashraf Y, Mansouri H, Laurent-Matha V, et al. Immunotherapy of triple-negative breast cancer with cathepsin D-targeting antibodies. *J Immunother Cancer.* 2019;7(1):29. Published 2019 Feb 4. doi:10.1186/s40425-019-0498-z
- Ashworth A, Lord CJ. Synthetic lethal therapies for cancer: what's next after PARP inhibitors?. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018;15(9):564-576. doi:10.1038/s41571-018-0055-6
- Astorgues-Xerri L, Riveiro ME, Tijeras-Raballand A, et al. Unraveling galectin-1 as a novel therapeutic target for cancer. *Cancer Treat Rev.* 2014;40(2):307-319. doi:10.1016/j.ctrv.2013.07.007
- Astrof S, Hynes RO. Fibronectins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis.* 2009;12(2):165-175. doi:10.1007/s10456-009-9136-6

- Atchley DP, Albarracin CT, Lopez A, et al. Clinical and pathologic characteristics of patients with BRCA-positive and BRCA-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(26):4282-4288. doi:10.1200/JCO.2008.16.6231
- Atiya H, Frisbie L, Pressimone C, Coffman L. Mesenchymal Stem Cells in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1234:31-42. doi:10.1007/978-3-030-37184-5_3
- Attané C, Estève D, Chaoui K, et al. Human Bone Marrow Is Comprised of Adipocytes with Specific Lipid Metabolism. *Cell Rep.* 2020;30(4):949-958.e6. doi:10.1016/j.celrep.2019.12.089
- Au DT, Arai AL, Fondrie WE, Muratoglu SC, Strickland DK. Role of the LDL Receptor-Related Protein 1 in Regulating Protease Activity and Signaling Pathways in the Vasculature. *Curr Drug Targets.* 2018;19(11):1276-1288. doi:10.2174/1389450119666180511162048
- Auderset L, Landowski LM, Foa L, Young KM. Low Density Lipoprotein Receptor Related Proteins as Regulators of Neural Stem and Progenitor Cell Function. *Stem Cells Int.* 2016;2016:2108495. doi:10.1155/2016/2108495
- Augustin HG, Koh GY, Thurston G, Alitalo K. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(3):165-177. doi:10.1038/nrm2639
- Aumailley M, Bruckner-Tuderman L, Carter WG, et al. A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol.* 2005;24(5):326-332. doi:10.1016/j.matbio.2005.05.006
- Aumailley M. The laminin family. *Cell Adh Migr.* 2013;7(1):48-55. doi:10.4161/cam.22826
- Ausprunk DH, Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res.* 1977;14(1):53-65. doi:10.1016/0026-2862(77)90141-8
- Autiero M, Luttun A, Tjwa M, Carmeliet P. Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders. *J Thromb Haemost.* 2003;1(7):1356-1370. doi:10.1046/j.1538-7836.2003.00263.x
- Autiero M, Waltenberger J, Communi D, et al. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med.* 2003;9(7):936-943. doi:10.1038/nm884
- Ayoub NM, Al-Shami KM, Yaghan RJ. Immunotherapy for HER2-positive breast cancer: recent advances and combination therapeutic approaches. *Breast Cancer (Dove Med Press).* 2019;11:53-69. Published 2019 Jan 17. doi:10.2147/BCTT.S175360
- Azim HA Jr, Singhal S, Ignatiadis M, et al. Association between SPARC mRNA expression, prognosis and response to neoadjuvant chemotherapy in early breast cancer: a pooled in-silico analysis [published correction appears in *PLoS One.* 2013;8(12). doi:10.1371/annotation/3d5a5933-791f-4191-98f5-f559a872e404]. *PLoS One.* 2013;8(4):e62451. Published 2013 Apr 26. doi:10.1371/journal.pone.0062451
- Azzam, H., Kamal, R., El-Assaly, H. et al. The value of dynamic contrast-enhanced MRI in differentiating triple-negative breast cancer from other subtypes. *Egypt J Radiol Nucl Med* 50, 106; 2019. doi:10.1186/s43055-019-0118-4
- Azzi S, Gavard J. Vaisseaux sanguins et tumeurs ou l'art du dialogue [Blood vessels in cancer: can't stop whispering]. *Med Sci (Paris).* 2014;30(4):408-414. doi:10.1051/medsci/20143004015
- Baardsnes J, Hinck CS, Hinck AP, O'Connor-McCourt MD. TbetaR-II discriminates the high- and

- low-affinity TGF-beta isoforms via two hydrogen-bonded ion pairs. *Biochemistry*. 2009;48(10):2146-2155. doi:10.1021/bi8019004
- Bachelot T, Ratel D, Menetrier-Caux C, Wion D, Blay JY, Berger F. Autoantibodies to endostatin in patients with breast cancer: correlation to endostatin levels and clinical outcome. *Br J Cancer*. 2006;94(7):1066-1070. doi:10.1038/sj.bjc.6603037
- Baek SH, Ohgi KA, Rose DW, Koo EH, Glass CK, Rosenfeld MG. Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF-kappaB and beta-amyloid precursor protein. *Cell*. 2002;110(1):55-67. doi:10.1016/s0092-8674(02)00809-7
- Bagegni NA, Tao Y, Ademuyiwa FO. Clinical outcomes with neoadjuvant versus adjuvant chemotherapy for triple negative breast cancer: A report from the National Cancer Database. *PLoS One*. 2019;14(9):e0222358. Published 2019 Sep 19. doi:10.1371/journal.pone.0222358
- Bai X, Ni J, Beretov J, Graham P, Li Y. Cancer stem cell in breast cancer therapeutic resistance. *Cancer Treat Rev*. 2018;69:152-163. doi:10.1016/j.ctrv.2018.07.004
- Bai X, Ni J, Beretov J, Graham P, Li Y. Triple-negative breast cancer therapeutic resistance: Where is the Achilles' heel?. *Cancer Lett*. 2021;497:100-111. doi:10.1016/j.canlet.2020.10.016
- Baim SB, Labow MA, Levine AJ, Shenk T. A chimeric mammalian transactivator based on the lac repressor that is regulated by temperature and isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(12):5072-5076. doi:10.1073/pnas.88.12.5072
- Balestrieri K, Kew K, McDaniel M, et al. Proteomic identification of tumor- and metastasis-associated galectin-1 in claudin-low breast cancer. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2021;1865(2):129784. doi:10.1016/j.bbagen.2020.129784
- Balko JM, Giltane JM, Wang K, et al. Molecular profiling of the residual disease of triple-negative breast cancers after neoadjuvant chemotherapy identifies actionable therapeutic targets. *Cancer Discov*. 2014;4(2):232-245. doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0286
- Baluk P, Hashizume H, McDonald DM. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2005;15(1):102-111. doi:10.1016/j.gde.2004.12.005
- Banerjee K, Resat H. Constitutive activation of STAT3 in breast cancer cells: A review. *Int J Cancer*. 2016;138(11):2570-2578. doi:10.1002/ijc.29923
- Bao B, Prasad AS. Targeting CSC in a Most Aggressive Subtype of Breast Cancer TNBC. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1152:311-334. doi:10.1007/978-3-030-20301-6_17
- Barbie TU, Alexe G, Aref AR, et al. Targeting an IKBKE cytokine network impairs triple-negative breast cancer growth. *J Clin Invest*. 2014;124(12):5411-5423. doi:10.1172/JCI75661
- Barch HP, Krutilina R, Brooks DL, et al. Abstract P2-02-01: Inhibition of creatine kinase metabolism represses invasion and sensitizes estrogen-receptor negative breast cancer cells to standard chemotherapies. *Cancer Res* February 15 2019;P2-02-01; doi: 10.1158/1538-7445.SABCS18-P2-02-01
- Bareche Y, Venet D, Ignatiadis M, et al. Unravelling triple-negative breast cancer molecular heterogeneity using an integrative multiomic analysis. *Ann Oncol*. 2018;29(4):895-902. doi:10.1093/annonc/mdy024
- Barkal AA, Brewer RE, Markovic M, et al. CD24 signalling through macrophage Siglec-10 is a target for cancer immunotherapy. *Nature*. 2019;572(7769):392-396. doi:10.1038/s41586-019-1456-0
- Barnes H, Ackermann EJ, van der Geer P. v-Src induces Shc binding to tyrosine 63 in the

- cytoplasmic domain of the LDL receptor-related protein 1. *Oncogene*. 2003;22(23):3589-3597. doi:10.1038/sj.onc.1206504
- Barry-Hamilton V, Spangler R, Marshall D, et al. Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment. *Nat Med*. 2010;16(9):1009-1017. doi:10.1038/nm.2208
- Bartelink H, Horiot JC, Poortmans PM, et al. Impact of a higher radiation dose on local control and survival in breast-conserving therapy of early breast cancer: 10-year results of the randomized boost versus no boost EORTC 22881-10882 trial. *J Clin Oncol*. 2007;25(22):3259-3265. doi:10.1200/JCO.2007.11.4991
- Baselga J, Albanell J, Ruiz A, et al. Phase II and tumor pharmacodynamic study of gefitinib in patients with advanced breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23(23):5323-5333. doi:10.1200/JCO.2005.08.326
- Baselga J, Gómez P, Greil R, et al. Randomized phase II study of the anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab with cisplatin versus cisplatin alone in patients with metastatic triple-negative breast cancer [published correction appears in *J Clin Oncol*. 2018 Jan 1;36(1):98]. *J Clin Oncol*. 2013;31(20):2586-2592. doi:10.1200/JCO.2012.46.2408
- Basu S, Binder RJ, Ramalingam T, Srivastava PK. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity*. 2001;14(3):303-313. doi:10.1016/s1074-7613(01)00111-x
- Bauer K, Mierke C, Behrens J. Expression profiling reveals genes associated with transendothelial migration of tumor cells: a functional role for α v β 3 integrin. *Int J Cancer*. 2007;121(9):1910-1918. doi:10.1002/ijc.22879
- Bauer TM, Patel MR, Infante JR. Targeting PI3 kinase in cancer. *Pharmacol Ther*. 2015;146:53-60. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.09.006
- Bauwens M, Wierls R, van Royen B, et al. Molecular imaging of brown adipose tissue in health and disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2014;41(4):776-791. doi:10.1007/s00259-013-2611-8
- Bax DV, Bernard SE, Lomas A, et al. Cell adhesion to fibrillin-1 molecules and microfibrils is mediated by α 5 β 1 and α v β 3 integrins. *J Biol Chem*. 2003;278(36):34605-34616. doi:10.1074/jbc.M303159200
- Beaujouin M, Prébois C, Derocq D, et al. Pro-cathepsin D interacts with the extracellular domain of the beta chain of LRP1 and promotes LRP1-dependent fibroblast outgrowth. *J Cell Sci*. 2010;123(Pt 19):3336-3346. doi:10.1242/jcs.070938
- Becht E, Giraldo NA, Germain C, et al. Immune Contexture, Immunoscore, and Malignant Cell Molecular Subgroups for Prognostic and Theranostic Classifications of Cancers. *Adv Immunol*. 2016;130:95-190. doi:10.1016/bs.ai.2015.12.002
- Beisiegel U, Weber W, Bengtsson-Olivecrona G. Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(19):8342-8346. doi:10.1073/pnas.88.19.8342
- Belkacemi Y, Debbi K, Loganadane G, et al. Radiothérapie adjuvante et néoadjuvante des cancers du sein : mise au point sur les données de la littérature disponibles en 2020 [Adjuvant and neoadjuvant radiotherapy in breast cancer: A literature review and update on the state of the evidence in 2020]. *Cancer Radiother*. 2020;24(6-7):482-492. doi:10.1016/j.canrad.2020.06.018
- Beloribi-Djefafila S, Vasseur S, Guillaumond F. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells.

- Oncogenesis. 2016;5(1):e189. Published 2016 Jan 25. doi:10.1038/oncsis.2015.49
- Bender CE, Fitzgerald P, Tait SW, et al. Mitochondrial pathway of apoptosis is ancestral in metazoans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(13):4904-4909. doi:10.1073/pnas.1120680109
- Benedito R, Roca C, Sörensen I, et al. The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. *Cell*. 2009;137(6):1124-1135. doi:10.1016/j.cell.2009.03.025
- Benes P, Jurajda M, Zaloudík J, Izakovicová-Hollá L, Vácha J. C766T low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) gene polymorphism and susceptibility to breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2003;5(3):R77-R81. doi:10.1186/bcr591
- BenEzra D. Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997;38(12):2433-2434
- Bentley K, Gerhardt H, Bates PA. Agent-based simulation of notch-mediated tip cell selection in angiogenic sprout initialisation. *J Theor Biol*. 2008;250(1):25-36. doi:10.1016/j.jtbi.2007.09.015
- Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(6):401-410. doi:10.1038/nrc1093 (a)
- Bergers G, Song S, Meyer-Morse N, Bergsland E, Hanahan D. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest*. 2003;111(9):1287-1295. doi:10.1172/JCI17929 (b)
- Bérout C, Soussi T. p53 gene mutation: software and database. *Nucleic Acids Res*. 1998;26(1):200-204. doi:10.1093/nar/26.1.200
- Berquand A, Meunier M, Thevenard-Devy J, et al. A gentle approach to investigate the influence of LRP-1 silencing on the migratory behavior of breast cancer cells by atomic force microscopy and dynamic cell studies. *Nanomedicine*. 2019;18:359-370. doi:10.1016/j.nano.2018.10.012
- Bertolini F, Shaked Y, Mancuso P, Kerbel RS. The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(11):835-845. doi:10.1038/nrc1971
- Bertucci F, Finetti P, Cervera N, et al. How basal are triple-negative breast cancers?. *Int J Cancer*. 2008;123(1):236-240. doi:10.1002/ijc.23518
- Bharadwaj U, Li M, Zhang R, Chen C, Yao Q. Elevated interleukin-6 and G-CSF in human pancreatic cancer cell conditioned medium suppress dendritic cell differentiation and activation. *Cancer Res*. 2007;67(11):5479-5488. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3963
- Bhinder B, Djaballah H. Systematic analysis of RNAi reports identifies dismal commonality at gene-level and reveals an unprecedented enrichment in pooled shRNA screens. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2013;16(9):665-681. doi:10.2174/13862073113169990045
- Bhola NE, Balko JM, Dugger TC, et al. TGF- β inhibition enhances chemotherapy action against triple-negative breast cancer. *J Clin Invest*. 2013;123(3):1348-1358. doi:10.1172/JCI65416
- Bi X, Lou P, Song Y, et al. Msi1 promotes breast cancer metastasis by regulating invadopodia-mediated extracellular matrix degradation via the Timp3-Mmp9 pathway [published online ahead of print, 2021 Jun 21]. *Oncogene*. 2021;10.1038/s41388-021-01873-8. doi:10.1038/s41388-021-01873-8
- Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG. Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues. *J Histochem Cytochem*. 1990;38(11):1549-1563. doi:10.1177/38.11.2212616

- Bindea G, Mlecnik B, Fridman WH, Pagès F, Galon J. Natural immunity to cancer in humans. *Curr Opin Immunol*. 2010;22(2):215-222. doi:10.1016/j.coi.2010.02.006
- Binder BR, Mihaly J, Prager GW. uPAR-uPA-PAI-1 interactions and signaling: a vascular biologist's view. *Thromb Haemost*. 2007;97(3):336-342.
- Binsfeld M, Muller J, Lamour V, et al. Granulocytic myeloid-derived suppressor cells promote angiogenesis in the context of multiple myeloma. *Oncotarget*. 2016;7(25):37931-37943. doi:10.18632/oncotarget.9270
- Birkbak NJ, Wang ZC, Kim JY, et al. Telomeric allelic imbalance indicates defective DNA repair and sensitivity to DNA-damaging agents [published correction appears in *Cancer Discov*. 2013 Aug;3(8):952]. *Cancer Discov*. 2012;2(4):366-375. doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0206
- Bjarnegård M, Enge M, Norlin J, et al. Endothelium-specific ablation of PDGFB leads to pericyte loss and glomerular, cardiac and placental abnormalities. *Development*. 2004;131(8):1847-1857. doi:10.1242/dev.01080
- Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet*. 2005;6(8):611-622. doi:10.1038/nrg1656
- Blasi F, Carmeliet P. uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(12):932-943. doi:10.1038/nrm977
- Blum Y, Belting HG, Ellertsdottir E, Herwig L, Lüders F, Affolter M. Complex cell rearrangements during intersegmental vessel sprouting and vessel fusion in the zebrafish embryo. *Dev Biol*. 2008;316(2):312-322. doi:10.1016/j.ydbio.2008.01.038
- Boareto M, Jolly MK, Lu M, Onuchic JN, Clementi C, Ben-Jacob E. Jagged-Delta asymmetry in Notch signaling can give rise to a Sender/Receiver hybrid phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(5):E402-E409. doi:10.1073/pnas.1416287112
- Bochet L, Meulle A, Imbert S, Salles B, Valet P, Muller C. Cancer-associated adipocytes promotes breast tumor radioresistance. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Jul 22;411(1):102-6. doi:10.1016/j.bbrc.2011.06.101. Epub 2011 Jun 25. PMID: 21712027
- Bohlsón SS, Fraser DA, Tenner AJ. Complement proteins C1q and MBL are pattern recognition molecules that signal immediate and long-term protective immune functions. *Mol Immunol*. 2007;44(1-3):33-43. doi:10.1016/j.molimm.2006.06.021
- Bohn KA, Adkins CE, Nounou MI, Lockman PR. Inhibition of VEGF and Angiopoietin-2 to Reduce Brain Metastases of Breast Cancer Burden. *Front Pharmacol*. 2017;8:193. Published 2017 Apr 11. doi:10.3389/fphar.2017.00193
- Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(12):786-801. doi:10.1038/nrm3904
- Boosani CS, Nalabothula N, Munugavada V, et al. FAK and p38-MAP kinase-dependent activation of apoptosis and caspase-3 in retinal endothelial cells by alpha1(IV)NC1. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(10):4567-4575. doi:10.1167/iovs.09-3473
- Boosani CS, Sudhakar YA. Proteolytically Derived Endogenous Angioinhibitors Originating from the Extracellular Matrix. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2011;4(12):1551-1577. doi:10.3390/ph4121551
- Borgman KJE, Flórez-Grau G, Ricci MA, Manzo C, et al. Membrane receptor MerTK is a newly identified transcriptional regulator that associates to chromatin as nanoclusters during human DC differentiation. *bioRxiv* 2020.04.16.044974. doi:

<https://doi.org/10.1101/2020.04.16.044974>

- Bos SA, Gill CM, Martinez-Salazar EL, Torriani M, Bredella MA. Preliminary investigation of brown adipose tissue assessed by PET/CT and cancer activity. *Skeletal Radiol.* 2019;48(3):413-419. doi:10.1007/s00256-018-3046-x
- Botelho MC, Alves H. Endothelial Progenitor Cells in Breast Cancer. *Int J Immunother Cancer Res.* 2016;2:1-2
- Botelho, M., Amendoeira, I., Diamond, J. et al. Breast tumors induce the recruitment of AC133+KDR+ endothelial precursor cells mobilized by plasma vascular endothelial growth factor. *Breast Cancer Res* 7, P5.06 (2005). <https://doi.org/10.1186/bcr1187>
- Boucher P, Gotthardt M, Li WP, Anderson RG, Herz J. LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis. *Science.* 2003;300(5617):329-332. doi:10.1126/science.1082095
- Boucher P, Liu P, Gotthardt M, Hiesberger T, Anderson RG, Herz J. Platelet-derived growth factor mediates tyrosine phosphorylation of the cytoplasmic domain of the low Density lipoprotein receptor-related protein in caveolae. *J Biol Chem.* 2002;277(18):15507-15513. doi:10.1074/jbc.M200428200
- Boulagnon-Rombi C, Schneider C, Leandri C, et al. LRP1 expression in colon cancer predicts clinical outcome. *Oncotarget.* 2018;9(10):8849-8869. Published 2018 Jan 13. doi:10.18632/oncotarget.24225
- Bourboulia D, Jensen-Taubman S, Rittler MR, et al. Endogenous angiogenesis inhibitor blocks tumor growth via direct and indirect effects on tumor microenvironment. *Am J Pathol.* 2011;179(5):2589-2600. doi:10.1016/j.ajpath.2011.07.035
- Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy [published correction appears in *Nat Cell Biol.* 2013 Aug;15(8):1017]. *Nat Cell Biol.* 2013;15(7):713-720. doi:10.1038/ncb2788
- Boyd NF, Guo H, Martin LJ, et al. Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. *N Engl J Med.* 2007;356(3):227-236. doi:10.1056/NEJMoa062790
- Brandhorst S, Choi IY, Wei M, et al. A Periodic Diet that Mimics Fasting Promotes Multi-System Regeneration, Enhanced Cognitive Performance, and Healthspan. *Cell Metab.* 2015;22(1):86-99. doi:10.1016/j.cmet.2015.05.012
- Brassart-Pasco S, Sénéchal K, Thevenard J, et al. Tetrastatin, the NC1 domain of the $\alpha 4$ (IV) collagen chain: a novel potent anti-tumor matrikine. *PLoS One.* 2012;7(4):e29587. doi:10.1371/journal.pone.0029587
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [published correction appears in *CA Cancer J Clin.* 2020 Jul;70(4):313]. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424. doi:10.3322/caac.21492
- Brew K, Dinakarpandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1477(1-2):267-283. doi:10.1016/s0167-4838(99)00279-4
- Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1803(1):55-71.

doi:10.1016/j.bbamcr.2010.01.003

- Bridgeman VL, Vermeulen PB, Foo S, et al. Vessel co-option is common in human lung metastases and mediates resistance to anti-angiogenic therapy in preclinical lung metastasis models. *J Pathol.* 2017;241(3):362-374. doi:10.1002/path.4845
- Bridges LC, Bowditch RD. ADAM-Integrin Interactions: potential integrin regulated ectodomain shedding activity. *Curr Pharm Des.* 2005;11(7):837-847. doi:10.2174/1381612053381747
- Brock A, Krause S, Ingber DE. Control of cancer formation by intrinsic genetic noise and microenvironmental cues. *Nat Rev Cancer.* 2015 Aug;15(8):499-509. doi: 10.1038/nrc3959. Epub 2015 Jul 9. PMID: 26156637
- Brophy ML, Dong Y, Tao H, et al. Myeloid-Specific Deletion of Epsins 1 and 2 Reduces Atherosclerosis by Preventing LRP-1 Downregulation. *Circ Res.* 2019;124(4):e6-e19. doi:10.1161/CIRCRESAHA.118.313028
- Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.* 1986;232(4746):34-47. doi:10.1126/science.3513311
- Brudno Y, Ennett-Shepard AB, Chen RR, Aizenberg M, Mooney DJ. Enhancing microvascular formation and vessel maturation through temporal control over multiple pro-angiogenic and pro-maturation factors. *Biomaterials.* 2013;34(36):9201-9209. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.08.007
- Bruegmann E, Gruemmer R, Neulen J, Motejlek K. Regulation of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 secretion from human endothelial cells by tissue inhibitor of metalloproteinase 1. *Mol Hum Reprod.* 2009;15(11):749-756. doi:10.1093/molehr/gap053
- Bryant DM, Mostov KE. From cells to organs: building polarized tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(11):887-901. doi:10.1038/nrm2523
- Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase [published correction appears in *Nature.* 2007 May 17;447(7142):346]. *Nature.* 2005;434(7035):913-917. doi:10.1038/nature03443
- Bu W, Chen J, Morrison GD, et al. Keratin 6a marks mammary bipotential progenitor cells that can give rise to a unique tumor model resembling human normal-like breast cancer. *Oncogene.* 2011;30(43):4399-4409. doi:10.1038/onc.2011.147
- Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol.* 2016;39(1):98-106. doi:10.1097/COC.0000000000000239
- Buckley CD, Doyonnas R, Newton JP, et al. Identification of alpha v beta 3 as a heterotypic ligand for CD31/PECAM-1. *J Cell Sci.* 1996;109 (Pt 2):437-445
- Buist DS, Porter PL, Lehman C, Taplin SH, White E. Factors contributing to mammography failure in women aged 40-49 years. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96(19):1432-1440. doi:10.1093/jnci/djh269
- Burkhart DL, Sage J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(9):671-682. doi:10.1038/nrc2399
- Burri PH, Hlushchuk R, Djonov V. Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev Dyn.* 2004;231(3):474-488. doi:10.1002/dvdy.20184
- Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, et al. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2015;21(7):1688-1698. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0432

- Burstyn-Cohen T, Heeb MJ, Lemke G. Lack of protein S in mice causes embryonic lethal coagulopathy and vascular dysgenesis. *J Clin Invest.* 2009;119(10):2942-2953. doi:10.1172/JCI39325
- Bussolati B, Assenzio B, Deregibus MC, Camussi G. The proangiogenic phenotype of human tumor-derived endothelial cells depends on thrombospondin-1 downregulation via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Mol Med (Berl).* 2006;84(10):852-863. doi:10.1007/s00109-006-0075-z
- Bussolati B, Deambrosio I, Russo S, Deregibus MC, Camussi G. Altered angiogenesis and survival in human tumor-derived endothelial cells. *FASEB J.* 2003;17(9):1159-1161. doi:10.1096/fj.02-0557fje
- Caffa I, Spagnolo V, Vernieri C, et al. Fasting-mimicking diet and hormone therapy induce breast cancer regression [published correction appears in *Nature*. 2020 Dec;588(7839):E33]. *Nature.* 2020;583(7817):620-624. doi:10.1038/s41586-020-2502-7
- Cailhier JF, Sirois I, Laplante P, et al. Caspase-3 activation triggers extracellular cathepsin L release and endorepellin proteolysis. *J Biol Chem.* 2008;283(40):27220-27229. doi:10.1074/jbc.M801164200
- Calabro NE, Barrett A, Chamorro-Jorganes A, et al. Thrombospondin-2 regulates extracellular matrix production, LOX levels, and cross-linking via downregulation of miR-29. *Matrix Biol.* 2019;82:71-85. doi:10.1016/j.matbio.2019.03.002
- Calvo F, Ege N, Grande-Garcia A, et al. Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nat Cell Biol.* 2013;15(6):637-646. doi:10.1038/ncb2756
- Calzada MJ, Zhou L, Sipes JM, et al. Alpha4beta1 integrin mediates selective endothelial cell responses to thrombospondins 1 and 2 in vitro and modulates angiogenesis in vivo. *Circ Res.* 2004;94(4):462-470. doi:10.1161/01.RES.0000115555.05668.93
- Campana WM, Li X, Dragojlovic N, Janes J, Gaultier A, Gonias SL. The low-density lipoprotein receptor-related protein is a pro-survival receptor in Schwann cells: possible implications in peripheral nerve injury. *J Neurosci.* 2006;26(43):11197-11207. doi:10.1523/JNEUROSCI.2709-06.2006
- Campion O, Al Khalifa T, Langlois B, et al. Contribution of the Low-Density Lipoprotein Receptor Family to Breast Cancer Progression. *Front Oncol.* 2020;10:882. Published 2020 Jul 30. doi:10.3389/fonc.2020.00882
- Cao C, Lawrence DA, Li Y, et al. Endocytic receptor LRP together with tPA and PAI-1 coordinates Mac-1-dependent macrophage migration. *EMBO J.* 2006;25(9):1860-1870. doi:10.1038/sj.emboj.7601082
- Cao Q, Hersl J, La H, et al. A pilot study of FDG PET/CT detects a link between brown adipose tissue and breast cancer. *BMC Cancer.* 2014;14:126. Published 2014 Feb 25. doi:10.1186/1471-2407-14-126
- Cao R, Bråkenhielm E, Li X, et al. Angiogenesis stimulated by PDGF-CC, a novel member in the PDGF family, involves activation of PDGFR-alphaalpha and -alphabeta receptors. *FASEB J.* 2002;16(12):1575-1583. doi:10.1096/fj.02-0319com
- Cao R, Farnebo J, Kurimoto M, Cao Y. Interleukin-18 acts as an angiogenesis and tumor suppressor. *FASEB J.* 1999;13(15):2195-2202. doi:10.1096/fasebj.13.15.2195

- Carding SR, Egan PJ. Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2002 May;2(5):336-45. doi: 10.1038/nri797. PMID: 12033739
- Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011;473(7347):298-307. doi:10.1038/nature10144
- Carmeliet P, Mackman N, Moons L, et al. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature*. 1996;383(6595):73-75. doi:10.1038/383073a0
- Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*. 2005;69 Suppl 3:4-10. doi:10.1159/000088478
- Carmi Y, Spitzer MH, Linde IL, et al. Allogeneic IgG combined with dendritic cell stimuli induce antitumour T-cell immunity. *Nature*. 2015;521(7550):99-104. doi:10.1038/nature14424
- Carpenter PM, Ziogas A, Markham EM, Cantillep AS, Yan R, Anton-Culver H. Laminin 332 expression and prognosis in breast cancer. *Hum Pathol*. 2018;82:289-296. doi:10.1016/j.humpath.2018.08.003
- Carra S, Foglia E, Cermenati S, et al. Ve-ptp modulates vascular integrity by promoting adherens junction maturation. *PLoS One*. 2012;7(12):e51245. doi:10.1371/journal.pone.0051245
- Carreca AP, Pravatà VM, Markham M, et al. TIMP-3 facilitates binding of target metalloproteinases to the endocytic receptor LRP-1 and promotes scavenging of MMP-1. *Sci Rep*. 2020;10(1):12067. Published 2020 Jul 21. doi:10.1038/s41598-020-69008-9
- Castellino FJ, McCance SG. The kringle domains of human plasminogen. *Ciba Found Symp*. 1997;212:46-65. doi:10.1002/9780470515457.ch4
- Castro MM, Kandasamy AD, Youssef N, Schulz R. Matrix metalloproteinase inhibitor properties of tetracyclines: therapeutic potential in cardiovascular diseases. *Pharmacol Res*. 2011;64(6):551-560. doi:10.1016/j.phrs.2011.05.005
- Catasús L, Llorente-Cortés V, Cuatrecasas M, Pons C, Espinosa I, Prat J. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1) is associated with highgrade, advanced stage and p53 and p16 alterations in endometrial carcinomas. *Histopathology*. 2011;59(3):567-571. doi:10.1111/j.1365-2559.2011.03942.x
- Ceccaldi R, Rondinelli B, D'Andrea AD. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends Cell Biol*. 2016;26(1):52-64. doi:10.1016/j.tcb.2015.07.009
- Chae SY, Ahn SH, Kim SB, et al. Diagnostic accuracy and safety of 16 α -[18F]fluoro-17 β -oestradiol PET-CT for the assessment of oestrogen receptor status in recurrent or metastatic lesions in patients with breast cancer: a prospective cohort study. *Lancet Oncol*. 2019;20(4):546-555. doi:10.1016/S1470-2045(18)30936-7
- Chajès V, Thiébaut AC, Rotival M, et al. Association between serum trans-monounsaturated fatty acids and breast cancer risk in the E3N-EPIC Study. *Am J Epidemiol*. 2008;167(11):1312-1320. doi:10.1093/aje/kwn069
- Chan SH, Wang LH. Regulation of cancer metastasis by microRNAs. *J Biomed Sci*. 2015;22(1):9. Published 2015 Jan 23. doi:10.1186/s12929-015-0113-7
- Chang-Qing Y, Jie L, Shi-Qi Z, et al. Recent treatment progress of triple negative breast cancer. *Prog Biophys Mol Biol*. 2020;151:40-53. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2019.11.007
- Chantrain C and DeClerck YA. Les métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs synthétiques dans la progression tumorale. *Med Sci (Paris)*, 18 5 (2002) 565-575. DOI: <https://doi.org/10.1051/medsci/2002185565>

- Chantrain CF, Henriët P, Jodele S, et al. Mechanisms of pericyte recruitment in tumour angiogenesis: a new role for metalloproteinases. *Eur J Cancer*. 2006;42(3):310-318. doi:10.1016/j.ejca.2005.11.010
- Chaudhuri O, Koshy ST, Branco da Cunha C, Shin JW, Verbeke CS, Allison KH, Mooney DJ. Extracellular matrix stiffness and composition jointly regulate the induction of malignant phenotypes in mammary epithelium. *Nat Mater*. 2014 Oct;13(10):970-8. doi: 10.1038/nmat4009. Epub 2014 Jun 15. PMID: 24930031
- Chaumet A, Wright GD, Seet SH, Tham KM, Gounko NV, Bard F. Nuclear envelope-associated endosomes deliver surface proteins to the nucleus. *Nat Commun*. 2015;6:8218. Published 2015 Sep 10. doi:10.1038/ncomms9218
- Chavey C, Mari B, Monthouel MN, Bonnaïfous S, Anglard P, Van Obberghen E, Tartare-Deckert S. Matrix metalloproteinases are differentially expressed in adipose tissue during obesity and modulate adipocyte differentiation. *J Biol Chem*. 2003 Apr 4;278(14):11888-96. doi: 10.1074/jbc.M209196200. Epub 2003 Jan 15. PMID: 12529376
- Chavez KJ, Garimella SV, Lipkowitz S. Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Dis*. 2010;32(1-2):35-48. doi:10.3233/BD-2010-0307
- Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res*. 2008;14(5):1368-1376. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1658
- Chen A, Sceneay J, Gödde N, Kinwel T, Ham S, Thompson EW, Humbert PO, Möller A. Intermittent hypoxia induces a metastatic phenotype in breast cancer. *Oncogene*. 2018 Aug;37(31):4214-4225. doi: 10.1038/s41388-018-0259-3. Epub 2018a May 1. PMID: 29713057
- Chen CF, Dou XW, Liang YK, et al. Notch3 overexpression causes arrest of cell cycle progression by inducing Cdh1 expression in human breast cancer cells. *Cell Cycle*. 2016;15(3):432-440. doi:10.1080/15384101.2015.1127474
- Chen G, Huang AC, Zhang W, et al. Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature*. 2018b ;560(7718):382-386. doi:10.1038/s41586-018-0392-8 (b)
- Chen J, Yuan W, Wu L, et al. PDGF-D promotes cell growth, aggressiveness, angiogenesis and EMT transformation of colorectal cancer by activation of Notch1/Twist1 pathway. *Oncotarget*. 2017;8(6):9961-9973. doi:10.18632/oncotarget.14283
- Chen W, Hoffmann AD, Liu H, Liu X. Organotropism: new insights into molecular mechanisms of breast cancer metastasis. *NPJ Precis Oncol*. 2018c ;2(1):4. Published 2018 Feb 16. doi:10.1038/s41698-018-0047-0
- Chen YY, Brown NJ, Jones R, et al. A peptide derived from TIMP-3 inhibits multiple angiogenic growth factor receptors and tumour growth and inflammatory arthritis in mice. *Angiogenesis*. 2014;17(1):207-219. doi:10.1007/s10456-013-9389-y
- Chien W, O'Kelly J, Lu D, et al. Expression of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in breast cancer cells is associated with increased migration and angiogenesis. *Int J Oncol*. 2011;38(6):1741-1747. doi:10.3892/ijo.2011.985
- Chillà A, Margheri F, Biagioni A, Del Rosso M, Fibbi G, Laurenzana A. Mature and progenitor

- endothelial cells perform angiogenesis also under protease inhibition: the amoeboid angiogenesis. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018;37(1):74. Published 2018 Apr 3. doi:10.1186/s13046-018-0742-2
- Chin YR, Yoshida T, Marusyk A, Beck AH, Polyak K, Toker A. Targeting Akt3 signaling in triple-negative breast cancer. *Cancer Res.* 2014;74(3):964-973. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2175
- Chkourko Gusky H, Diedrich J, MacDougald OA, Podgorski I. Omentum and bone marrow: how adipocyte-rich organs create tumour microenvironments conducive for metastatic progression. *Obes Rev.* 2016;17(11):1015-1029. doi:10.1111/obr.12450
- Choi J, Gyamfi J, Jang H, Koo JS. The role of tumor-associated macrophage in breast cancer biology. *Histol Histopathol.* 2018 Feb;33(2):133-145. doi: 10.14670/HH-11-916. Epub 2017 Jul 6. PMID: 28681373
- Chu YY, Yam C, Chen MK, et al. Blocking c-Met and EGFR reverses acquired resistance of PARP inhibitors in triple-negative breast cancer. *Am J Cancer Res.* 2020;10(2):648-661. Published 2020 Feb 1
- Chung A, Cui X, Audeh W, Giuliano A. Current status of anti-human epidermal growth factor receptor 2 therapies: predicting and overcoming herceptin resistance. *Clin Breast Cancer.* 2013;13(4):223-232. doi:10.1016/j.clbc.2013.04.001
- Claesson-Welsh L, Welsh M, Ito N, et al. Angiostatin induces endothelial cell apoptosis and activation of focal adhesion kinase independently of the integrin-binding motif RGD. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(10):5579-5583. doi:10.1073/pnas.95.10.5579
- Claesson-Welsh L. Vascular permeability--the essentials. *Ups J Med Sci.* 2015;120(3):135-143. doi:10.3109/03009734.2015.1064501
- Clara CA, Marie SK, de Almeida JR, et al. Angiogenesis and expression of PDGF-C, VEGF, CD105 and HIF-1 α in human glioblastoma. *Neuropathology.* 2014;34(4):343-352. doi:10.1111/neup.12111
- Clark CJ, Sage EH. A prototypic matricellular protein in the tumor microenvironment--where there's SPARC, there's fire. *J Cell Biochem.* 2008;104(3):721-732. doi:10.1002/jcb.21688
- Clemente M, Pérez-Alenza MD, Illera JC, Peña L. Histological, immunohistological, and ultrastructural description of vasculogenic mimicry in canine mammary cancer. *Vet Pathol.* 2010;47(2):265-274. doi:10.1177/0300985809353167
- Cocco C, Giuliani N, Di Carlo E, et al. Interleukin-27 acts as multifunctional antitumor agent in multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 2010;16(16):4188-4197. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0173
- Colorado PC, Torre A, Kamphaus G, et al. Anti-angiogenic cues from vascular basement membrane collagen. *Cancer Res.* 2000;60(9):2520-2526
- Comito G, Giannoni E, Di Gennaro P, Segura CP, Gerlini G, Chiarugi P. Stromal fibroblasts synergize with hypoxic oxidative stress to enhance melanoma aggressiveness. *Cancer Lett.* 2012 Nov 1;324(1):31-41. doi: 10.1016/j.canlet.2012.04.025. Epub 2012 Jun 1. PMID: 22659468
- Commisso C, Davidson SM, Soydaner-Azeloglu RG, et al. Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells. *Nature.* 2013;497(7451):633-637. doi:10.1038/nature12138
- Compagni A, Wilgenbus P, Impagnatiello MA, Cotten M, Christofori G. Fibroblast growth factors are required for efficient tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 2000;60(24):7163-7169

- Condamine T, Gabrilovich DI. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. *Trends Immunol.* 2011;32(1):19-25. doi:10.1016/j.it.2010.10.002
- Conley SJ, Gheordunescu E, Kakarala P, et al. Antiangiogenic agents increase breast cancer stem cells via the generation of tumor hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(8):2784-2789. doi:10.1073/pnas.1018866109
- Cooke JP. NO and angiogenesis. *Atheroscler Suppl.* 2003;4(4):53-60. doi:10.1016/s1567-5688(03)00034-5
- Corbett SA, Lee L, Wilson CL, Schwarzbauer JE. Covalent cross-linking of fibronectin to fibrin is required for maximal cell adhesion to a fibronectin-fibrin matrix. *J Biol Chem.* 1997 Oct 3;272(40):24999-5005. doi: 10.1074/jbc.272.40.24999. PMID: 9312106
- Cortazar P, Zhang L, Untch M, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis [published correction appears in *Lancet.* 2019 Mar 9;393(10175):986]. *Lancet.* 2014;384(9938):164-172. doi:10.1016/S0140-6736(13)62422-8
- Costanza B, Umelo IA, Bellier J, Castronovo V, Turtoi A. Stromal Modulators of TGF- β in Cancer. *J Clin Med.* 2017;6(1):7. Published 2017 Jan 6. doi:10.3390/jcm6010007
- Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002;420(6917):860-867. doi:10.1038/nature01322
- Craig J, Mikhailenko I, Noyes N, Migliorini M, Strickland DK. The LDL receptor-related protein 1 (LRP1) regulates the PDGF signaling pathway by binding the protein phosphatase SHP-2 and modulating SHP-2- mediated PDGF signaling events. *PLoS One.* 2013;8(7):e70432. Published 2013 Jul 26. doi:10.1371/journal.pone.0070432
- Crawford Y, Kasman I, Yu L, et al. PDGF-C mediates the angiogenic and tumorigenic properties of fibroblasts associated with tumors refractory to anti-VEGF treatment. *Cancer Cell.* 2009;15(1):21-34. doi:10.1016/j.ccr.2008.12.004
- Cristofanilli M, Pierga JY, Reuben J, et al. The clinical use of circulating tumor cells (CTCs) enumeration for staging of metastatic breast cancer (MBC): International expert consensus paper. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2019;134:39-45. doi:10.1016/j.critrevonc.2018.12.004
- Cristofanilli M, Turner NC, Bondarenko I, et al. Fulvestrant plus palbociclib versus fulvestrant plus placebo for treatment of hormone-receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer that progressed on previous endocrine therapy (PALOMA-3): final analysis of the multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial [published correction appears in *Lancet Oncol.* 2016 Apr;17 (4):e136] [published correction appears in *Lancet Oncol.* 2016 Jul;17 (7):e270]. *Lancet Oncol.* 2016;17(4):425-439. doi:10.1016/S1470-2045(15)00613-0
- Crosby JR, Kaminski WE, Schatteman G, et al. Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. *Circ Res.* 2000;87(9):728-730. doi:10.1161/01.res.87.9.728
- Cserni G, Chmielik E, Cserni B, Tot T. The new TNM-based staging of breast cancer. *Virchows Arch.* 2018;472(5):697-703. doi:10.1007/s00428-018-2301-9
- Cubie HA. Diseases associated with human papillomavirus infection. *Virology.* 2013 Oct;445(1-2):21-34. doi: 10.1016/j.virol.2013.06.007. Epub 2013 Aug 9. PMID: 23932731
- Curtis C, Shah SP, Chin SF, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature.* 2012;486(7403):346-352. Published 2012 Apr 18.

doi:10.1038/nature10983

- Czekay RP, Aertgeerts K, Curriden SA, Loskutoff DJ. Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins. *J Cell Biol.* 2003;160(5):781-791. doi:10.1083/jcb.200208117
- Czekay RP, Kuemmel TA, Orlando RA, Farquhar MG. Direct binding of occupied urokinase receptor (uPAR) to LDL receptor-related protein is required for endocytosis of uPAR and regulation of cell surface urokinase activity. *Mol Biol Cell.* 2001;12(5):1467-1479. doi:10.1091/mbc.12.5.1467
- Da Silva J, Lameiras P, Beljebbar A, et al. Structural characterization and *in vivo* pro-tumor properties of a highly conserved matrikine. *Oncotarget.* 2018;9(25):17839-17857. Published 2018 Apr 3. doi:10.18632/oncotarget.24894
- Da Silva JL, Cardoso Nunes NC, Izetti P, de Mesquita GG, de Melo AC. Triple negative breast cancer: A thorough review of biomarkers. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2020;145:102855. doi:10.1016/j.critrevonc.2019.102855
- Dai C, Sun F, Zhu C, Hu X. Tumor environmental factors glucose deprivation and lactic acidosis induce mitotic chromosomal instability--an implication in aneuploid human tumors. *PLoS One.* 2013;8(5):e63054. Published 2013 May 10. doi:10.1371/journal.pone.0063054
- Dalotto-Moreno T, Croci DO, Cerliani JP, et al. Targeting galectin-1 overcomes breast cancer-associated immunosuppression and prevents metastatic disease. *Cancer Res.* 2013;73(3):1107-1117. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2418
- Dang TP. Notch, apoptosis and cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2012;727:199-209. doi:10.1007/978-1-4614-0899-4_15
- Danussi C, Del Bel Belluz L, Pivetta E, et al. EMILIN1/ α 9 β 1 integrin interaction is crucial in lymphatic valve formation and maintenance. *Mol Cell Biol.* 2013;33(22):4381-4394. doi:10.1128/MCB.00872-13
- Darbon JM. Les voies des MAP Kinases : ERK, P38 et JNK. In *Thérapie ciblées des cancers : Les cibles intracytoplasmiques*. Edition John Libbey Eurotext., 2011
- David L, De Vos J. La reprogrammation, un jeu de hasard ? [Reprogramming equals gambling?]. *Med Sci (Paris).* 2013;29(4):405-410. doi:10.1051/medsci/2013294014
- Davids MS, Deng J, Wiestner A, et al. Decreased mitochondrial apoptotic priming underlies stroma-mediated treatment resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2012;120(17):3501-3509. doi:10.1182/blood-2012-02-414060
- Davidson LA, Keller R, DeSimone DW. Assembly and remodeling of the fibrillar fibronectin extracellular matrix during gastrulation and neurulation in *Xenopus laevis*. *Dev Dyn.* 2004 Dec;231(4):888-95. doi: 10.1002/dvdy.20217. PMID: 15517579
- Davis GE, Bayless KJ, Davis MJ, Meininger GA. Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules. *Am J Pathol.* 2000;156(5):1489-1498. doi:10.1016/S0002-9440(10)65020-1
- Davis GE, Senger DR. Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ Res.* 2005 Nov 25;97(11):1093-107. doi: 10.1161/01.RES.0000191547.64391.e3. PMID: 16306453
- Davis NM, Sokolosky M, Stadelman K, et al. Deregulation of the EGFR/PI3K/PTEN/Akt/mTORC1 pathway in breast cancer: possibilities for therapeutic

- intervention. *Oncotarget*. 2014;5(13):4603-4650. doi:10.18632/oncotarget.2209
- De Francesco EM, Lappano R, Santolla MF, Marsico S, Caruso A, Maggiolini M. HIF-1 α /GPER signaling mediates the expression of VEGF induced by hypoxia in breast cancer associated fibroblasts (CAFs). *Breast Cancer Res*. 2013;15(4):R64. doi:10.1186/bcr3458
- De Luca A, Maiello MR, D'Alessio A, Pergameno M, Normanno N. The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets*. 2012;16 Suppl 2:S17-S27. doi:10.1517/14728222.2011.639361
- De Sanctis F, Ugel S, Facciponte J, Facciabene A. The dark side of tumor-associated endothelial cells. *Semin Immunol*. 2018 Feb;35:35-47. doi: 10.1016/j.smim.2018.02.002. Epub 2018 Feb 26. PMID: 29490888
- De Silva HC, Lin MZ, Phillips L, Martin JL, Baxter RC. IGFBP-3 interacts with NONO and SFPQ in PARP-dependent DNA damage repair in triple-negative breast cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2019;76(10):2015-2030. doi:10.1007/s00018-019-03033-4
- De Smet F, Segura I, De Bock K, Hohensinner PJ, Carmeliet P. Mechanisms of vessel branching: filopodia on endothelial tip cells lead the way. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(5):639-649. doi:10.1161/ATVBAHA.109.185165
- De Vries TJ, Verheijen JH, de Bart AC, Weidle UH, Ruiter DJ, van Muijen GN. Decreased expression of both the low-density lipoprotein receptor-related protein/ α (2)-macroglobulin receptor and its receptor-associated protein in late stages of cutaneous melanocytic tumor progression. *Cancer Res*. 1996;56(6):1432-1439
- Deane R, Sagare A, Zlokovic BV. The role of the cell surface LRP and soluble LRP in blood-brain barrier Abeta clearance in Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des*. 2008;14(16):1601-1605. doi:10.2174/138161208784705487
- Dedieu S, Langlois B, Devy J, et al. LRP-1 silencing prevents malignant cell invasion despite increased pericellular proteolytic activities. *Mol Cell Biol*. 2008a ;28(9):2980-2995. doi:10.1128/MCB.02238-07
- Dedieu S, Langlois B. LRP-1: a new modulator of cytoskeleton dynamics and adhesive complex turnover in cancer cells. *Cell Adh Migr*. 2008b ;2(2):77-80. doi:10.4161/cam.2.2.6374
- Degryse B, Neels JG, Czekay RP, Aertgeerts K, Kamikubo Y, Loskutoff DJ. The low density lipoprotein receptor-related protein is a motogenic receptor for plasminogen activator inhibitor-1. *J Biol Chem*. 2004;279(21):22595-22604. doi:10.1074/jbc.M313004200
- Delerue F, White M, Ittner LM. Inducible, tightly regulated and non-leaky neuronal gene expression in mice. *Transgenic Res*. 2014;23(2):225-233. doi:10.1007/s11248-013-9767-7
- Deng M, Wang J, Chen Y, Zhang L, Liu D. Combination of SF1126 and gefitinib induces apoptosis of triple-negative breast cancer cells through the PI3K/AKT-mTOR pathway. *Anticancer Drugs*. 2015;26(4):422-427. doi:10.1097/CAD.0000000000000202
- Denton AE, Roberts EW, Fearon DT. Stromal Cells in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1060:99-114. doi: 10.1007/978-3-319-78127-3_6. PMID: 30155624
- Derocq D, Prébois C, Beaujouin M, et al. Cathepsin D is partly endocytosed by the LRP1 receptor and inhibits LRP1-regulated intramembrane proteolysis. *Oncogene*. 2012;31(26):3202-3212. doi:10.1038/onc.2011.501

- Desrosiers RR, Rivard ME, Grundy PE, Annabi B. Decrease in LDL receptor-related protein expression and function correlates with advanced stages of Wilms tumors. *Pediatr Blood Cancer*. 2006;46(1):40-49. doi:10.1002/pbc.20566
- Deugnier MA, Petit V, Taddéi-De La Hosseraye I, Faraldo M, Glukhova MA. Vers la caractérisation des cellules souches de la glande mammaire murine adulte [Characterization of stem cells from the murine adult mammary gland]. *Med Sci (Paris)*. 2007;23(12):1125-1131. doi:10.1051/medsci/200723121125
- Deutsch EW, Bandeira N, Sharma V, et al. The ProteomeXchange consortium in 2020: enabling 'big data' approaches in proteomics. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(D1):D1145-D1152. doi:10.1093/nar/gkz984
- Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman MJ, et al. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem*. 1999;274(17):11721-11726. doi:10.1074/jbc.274.17.11721
- Di Carlo E, Sorrentino C, Zorzoli A, et al. The antitumor potential of Interleukin-27 in prostate cancer. *Oncotarget*. 2014;5(21):10332-10341. doi:10.18632/oncotarget.1425
- Dias S, Boyd R, Balkwill F. IL-12 regulates VEGF and MMPs in a murine breast cancer model. *Int J Cancer*. 1998;78(3):361-365. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19981029)78:3<361::AID-IJC17>3.0.CO;2-9
- Diaz LA Jr, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol*. 2014;32(6):579-586. doi:10.1200/JCO.2012.45.2011
- Dickler MN, Rugo HS, Eberle CA, et al. A phase II trial of erlotinib in combination with bevacizumab in patients with metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14(23):7878-7883. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0141
- Dietrich MO, Spuch C, Antequera D, et al. Megalin mediates the transport of leptin across the blood-CSF barrier. *Neurobiol Aging*. 2008;29(6):902-912. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.01.008
- Dieu-Nosjean MC, Antoine M, Danel C, Heudes D, Wislez M, Poulot V, Rabbe N, Laurans L, Tartour E, de Chaisemartin L, Lebecque S, Fridman WH, Cadranel J. Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J Clin Oncol*. 2008 Sep 20;26(27):4410-7. doi: 10.1200/JCO.2007.15.0284. PMID: 18802153
- Dieu-Nosjean MC, Giraldo NA, Kaplon H, Germain C, Fridman WH, Sautès-Fridman C. Tertiary lymphoid structures, drivers of the anti-tumor responses in human cancers. *Immunol Rev*. 2016;271(1):260-275. doi:10.1111/imr.12405
- Ding S, Merkulova-Rainon T, Han ZC, Tobelem G. HGF receptor up-regulation contributes to the angiogenic phenotype of human endothelial cells and promotes angiogenesis in vitro. *Blood*. 2003;101(12):4816-4822. doi:10.1182/blood-2002-06-1731
- Ding Y, Xian X, Holland WL, Tsai S, Herz J. Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1 Protects Against Hepatic Insulin Resistance and Hepatic Steatosis. *EBioMedicine*. 2016;7:135-145. doi:10.1016/j.ebiom.2016.04.002
- Dirat B, Bochet L, Dabek M, Daviaud D, Dauvillier S, Majed B, Wang YY, Meulle A, Salles B, Le Gonidec S, Garrido I, Escourrou G, Valet P, Muller C. Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res*. 2011 Apr 1;71(7):2455-65. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3323. PMID: 21459803.
- Dirat BA, Bochet L, Escourrou G, Valet P, Muller C. Unraveling the obesity and breast cancer links:

- a role for cancer-associated adipocytes? *Endocr Dev.* 2010;19:45-52. doi: 10.1159/000316896. Epub 2010 Jun 15. PMID: 20551667
- Djonov V, Schmid M, Tschanz SA, Burri PH. Intussusceptive angiogenesis: its role in embryonic vascular network formation. *Circ Res.* 2000;86(3):286-292. doi:10.1161/01.res.86.3.286
- Do HS, Park SW, Im I, et al. Enhanced thrombospondin-1 causes dysfunction of vascular endothelial cells derived from Fabry disease-induced pluripotent stem cells. *EBioMedicine.* 2020;52:102633. doi:10.1016/j.ebiom.2020.102633
doi.org/10.1007/978-3-030-37184-5_2
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7. doi: 10.1080/14653240600855905. PMID: 16923606
- Dong H, Zou M, Bhatia A, et al. Breast Cancer MDA-MB-231 Cells Use Secreted Heat Shock Protein-90alpha (Hsp90 α) to Survive a Hostile Hypoxic Environment. *Sci Rep.* 2016;6:20605. Published 2016 Feb 5. doi:10.1038/srep20605
- Dong Q, Yang B, Han JG, et al. A novel hydrogen sulfide-releasing donor, HA-ADT, suppresses the growth of human breast cancer cells through inhibiting the PI3K/AKT/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways. *Cancer Lett.* 2019;455:60-72. doi:10.1016/j.canlet.2019.04.031
- Donnem T, Hu J, Ferguson M, et al. Vessel co-option in primary human tumors and metastases: an obstacle to effective anti-angiogenic treatment? *Cancer Med.* 2013;2(4):427-436. doi:10.1002/cam4.105
- Donohoe CL, Doyle SL, Reynolds JV. Visceral adiposity, insulin resistance and cancer risk. *Diabetol Metab Syndr.* 2011;3:12. Published 2011 Jun 22. doi:10.1186/1758-5996-3-12
- Downes NL, Laham-Karam N, Kaikkonen MU, Ylä-Herttua S. Differential but Complementary HIF1 α and HIF2 α Transcriptional Regulation. *Mol Ther.* 2018;26(7):1735-1745. doi:10.1016/j.ymthe.2018.05.004
- Downing AK, Knott V, Werner JM, Cardy CM, Campbell ID, Handford PA. Solution structure of a pair of calcium-binding epidermal growth factor-like domains: implications for the Marfan syndrome and other genetic disorders. *Cell.* 1996;85(4):597-605. doi:10.1016/s0092-8674(00)81259-3
- Draffin JE, McFarlane S, Hill A, Johnston PG, Waugh DJ. CD44 potentiates the adherence of metastatic prostate and breast cancer cells to bone marrow endothelial cells. *Cancer Res.* 2004;64(16):5702-5711. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0389
- Drápela S, Bouchal J, Jolly MK, Culig Z, Souček K. ZEB1: A Critical Regulator of Cell Plasticity, DNA Damage Response, and Therapy Resistance. *Front Mol Biosci.* 2020;7:36. Published 2020 Mar 19. doi:10.3389/fmolb.2020.00036
- Du WW, Fang L, Yang X, et al. The role of versican in modulating breast cancer cell self-renewal. *Mol Cancer Res.* 2013;11(5):443-455. doi:10.1158/1541-7786.MCR-12-0461
- Du Z, Lovly CM. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Mol Cancer.* 2018;17(1):58. Published 2018 Feb 19. doi:10.1186/s12943-018-0782-4
- Duband JL, Rocher S, Chen WT, Yamada KM, Thiery JP. Cell adhesion and migration in the early

- vertebrate embryo: location and possible role of the putative fibronectin receptor complex. *J Cell Biol.* 1986;102(1):160-178. doi:10.1083/jcb.102.1.160
- Duda DG, Sunamura M, Lozonschi L, et al. Direct in vitro evidence and in vivo analysis of the antiangiogenesis effects of interleukin 12. *Cancer Res.* 2000;60(4):1111-1116
- Duffy SW, Tabar L, Olsen AH, et al. Absolute numbers of lives saved and overdiagnosis in breast cancer screening, from a randomized trial and from the Breast Screening Programme in England [published correction appears in *J Med Screen.* 2010 Jun;17(2):106]. *J Med Screen.* 2010;17(1):25-30. doi:10.1258/jms.2009.009094
- Dumitrescu RG, Cotarlar I. Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005?. *J Cell Mol Med.* 2005;9(1):208-221. doi:10.1111/j.1582-4934.2005.tb00350.x
- Dumont N, Liu B, Defilippis RA, et al. Breast fibroblasts modulate early dissemination, tumorigenesis, and metastasis through alteration of extracellular matrix characteristics. *Neoplasia.* 2013;15(3):249-262. doi:10.1593/neo.121950
- Duong MN, Geneste A, Fallone F, Li X, Dumontet C, Muller C. The fat and the bad: Mature adipocytes, key actors in tumor progression and resistance. *Oncotarget.* 2017;8(34):57622-57641. Published 2017 May 20. doi:10.18632/oncotarget.18038
- Durkin SG, Glover TW. Chromosome fragile sites. *Annu Rev Genet.* 2007;41:169-92. doi:10.1146/annurev.genet.41.042007.165900. PMID: 17608616
- Dvorak HF. Rous-Whipple Award Lecture. How tumors make bad blood vessels and stroma. *Am J Pathol.* 2003;162(6):1747-1757. doi:10.1016/s0002-9440(10)64309-x
- Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med.* 1986 Dec 25;315(26):1650-9. doi:10.1056/NEJM198612253152606. PMID: 3537791
- Eales KL, Hollinshead KE, Tennant DA. Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. *Oncogenesis.* 2016;5(1):e190. Published 2016 Jan 25. doi:10.1038/oncsis.2015.50
- Edwards IJ. Proteoglycans in prostate cancer. *Nat Rev Urol.* 2012;9(4):196-206. Published 2012 Feb 21. doi:10.1038/nrurol.2012.19
- Eilertsen M, Andersen S, Al-Saad S, et al. Monocarboxylate transporters 1-4 in NSCLC: MCT1 is an independent prognostic marker for survival. *PLoS One.* 2014;9(9):e105038. Published 2014 Sep 16. doi:10.1371/journal.pone.0105038
- El Asmar Z, Terrand J, Jenty M, et al. Convergent Signaling Pathways Controlled by LRP1 (Receptor-related Protein 1) Cytoplasmic and Extracellular Domains Limit Cellular Cholesterol Accumulation. *J Biol Chem.* 2016;291(10):5116-5127. doi:10.1074/jbc.M116.714485
- Elbanna M, Orillion AR, Damayanti NP, et al. Dual Inhibition of Angiopoietin-TIE2 and MET Alters the Tumor Microenvironment and Prolongs Survival in a Metastatic Model of Renal Cell Carcinoma. *Mol Cancer Ther.* 2020;19(1):147-156. doi:10.1158/1535-7163.MCT-18-1202
- Elgundi Z, Papanicolaou M, Major G, et al. Cancer Metastasis: The Role of the Extracellular Matrix and the Heparan Sulfate Proteoglycan Perlecan. *Front Oncol.* 2020;9:1482. Published 2020 Jan 17. doi:10.3389/fonc.2019.01482
- Ell B, Qiu Q, Wei Y, et al. The microRNA-23b/27b/24 cluster promotes breast cancer lung metastasis by targeting metastasis-suppressive gene prosaposin. *J Biol Chem.* 2014;289(32):21888-21895. doi:10.1074/jbc.M114.582866
- Emens LA, Cruz C, Eder JP, et al. Long-term Clinical Outcomes and Biomarker Analyses of

- Atezolizumab Therapy for Patients With Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: A Phase 1 Study. *JAMA Oncol.* 2019;5(1):74-82. doi:10.1001/jamaoncol.2018.4224
- Emens LA. Breast cancer immunobiology driving immunotherapy: vaccines and immune checkpoint blockade. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2012;12(12):1597-1611. doi:10.1586/era.12.147
- Emens LA. Breast Cancer Immunotherapy: Facts and Hopes. *Clin Cancer Res.* 2018;24(3):511-520. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-3001
- Emonard H, Bellon G, Troeberg L, et al. Low density lipoprotein receptor-related protein mediates endocytic clearance of pro-MMP-2.TIMP-2 complex through a thrombospondin-independent mechanism. *J Biol Chem.* 2004;279(52):54944-54951. doi:10.1074/jbc.M406792200
- Emonard H, Th  ret L, Bennasroune AH, Dedieu S. Regulation of LRP-1 expression: make the point. *Pathol Biol (Paris).* 2014;62(2):84-90. doi:10.1016/j.patbio.2014.02.002
- Emonard, H. et Marbaix, E. Low-density lipoprotein receptor-related protein in metalloproteinase-mediated pathologies: recent insights. *Met. Med.* ume 2, 9 ; 2015
- Enderling H, Hlatky L, Hahnfeldt P. Migration rules: tumours are conglomerates of self-metastases. *Br J Cancer.* 2009;100(12):1917-1925. doi:10.1038/sj.bjc.6605071
- Eriksson A, Cao R, Pawliuk R, et al. Placenta growth factor-1 antagonizes VEGF-induced angiogenesis and tumor growth by the formation of functionally inactive PlGF-1/VEGF heterodimers. *Cancer Cell.* 2002;1(1):99-108. doi:10.1016/s1535-6108(02)00028-4
- Eroles P, Bosch A, P  rez-Fidalgo JA, Lluch A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev.* 2012;38(6):698-707. doi:10.1016/j.ctrv.2011.11.005
- Ethier JL, Desautels D, Templeton A, Shah PS, Amir E. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res.* 2017;19(1):2. Published 2017 Jan 5. doi:10.1186/s13058-016-0794-1
- Etique N, Verzeaux L, Dedieu S, Emonard H. LRP-1: a checkpoint for the extracellular matrix proteolysis. *Biomed Res Int.* 2013;2013:152163. doi:10.1155/2013/152163
- Etzioni R, Xia J, Hubbard R, Weiss NS, Gulati R. A reality check for overdiagnosis estimates associated with breast cancer screening. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(12):dju315. Published 2014 Oct 31. doi:10.1093/jnci/dju315
- Eubank TD, Roberts RD, Khan M, et al. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor inhibits breast cancer growth and metastasis by invoking an anti-angiogenic program in tumor-educated macrophages. *Cancer Res.* 2009;69(5):2133-2140. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1405
- Evans DG, Howell A. Are we ready for online tools in decision making for BRCA1/2 mutation carriers?. *J Clin Oncol.* 2012;30(5):471-473. doi:10.1200/JCO.2011.40.1562
- Faber K, Hvidberg V, Moestrup SK, Dahlb  ck B, Nielsen LB. Megalin is a receptor for apolipoprotein M, and kidney-specific megalin-deficiency confers urinary excretion of apolipoprotein M. *Mol Endocrinol.* 2006 Jan;20(1):212-8. doi: 10.1210/me.2005-0209. Epub 2005 Aug 11. PMID: 16099815
- Fang J, Nakamura H, Maeda H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63(3):136-151. doi:10.1016/j.addr.2010.04.009
- Farach-Carson MC, Warren CR, Harrington DA, Carson DD. Border patrol: insights into the unique role of perlecan/heparan sulfate proteoglycan 2 at cell and tissue borders. *Matrix Biol.*

- 2014;34:64-79. doi:10.1016/j.matbio.2013.08.004
- Fayard B, Bianchi F, Dey J, et al. The serine protease inhibitor protease nexin-1 controls mammary cancer metastasis through LRP-1-mediated MMP-9 expression. *Cancer Res.* 2009;69(14):5690-5698. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4573
- Fazavana JG, Muczynski V, Proulle V, et al. LDL receptor-related protein 1 contributes to the clearance of the activated factor VII-antithrombin complex. *J Thromb Haemost.* 2016;14(12):2458-2470. doi:10.1111/jth.13502
- Felding-Habermann B, Fransvea E, O'Toole TE, Manzuk L, Faha B, Hensler M. Involvement of tumor cell integrin alpha v beta 3 in hematogenous metastasis of human melanoma cells. *Clin Exp Metastasis.* 2002;19(5):427-436. doi:10.1023/a:1016377114119
- Felding-Habermann B, Fransvea E, O'Toole TE, Manzuk L, Faha B, Hensler M. Involvement of tumor cell integrin alpha v beta 3 in hematogenous metastasis of human melanoma cells. *Clin Exp Metastasis.* 2002;19(5):427-436. doi:10.1023/a:1016377114119
- Felipe Lima J, Nofech-Mozes S, Bayani J, Bartlett JM. EMT in Breast Carcinoma-A Review. *J Clin Med.* 2016;5(7):65. Published 2016 Jul 14. doi:10.3390/jcm5070065
- Feng C, Ding G, Ding Q, Wen H. Overexpression of low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) is associated with worsened prognosis and decreased cancer immunity in clear-cell renal cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;503(3):1537-1543. doi:10.1016/j.bbrc.2018.07.076
- Ferguson LR, Chen H, Collins AR, et al. Genomic instability in human cancer: Molecular insights and opportunities for therapeutic attack and prevention through diet and nutrition. *Semin Cancer Biol.* 2015;35 Suppl(Suppl):S5-S24. doi:10.1016/j.semcancer.2015.03.005
- Fernandez-Castaneda A, Arandjelovic S, Stiles TL, et al. Identification of the low density lipoprotein (LDL) receptor-related protein-1 interactome in central nervous system myelin suggests a role in the clearance of necrotic cell debris. *J Biol Chem.* 2013;288(7):4538-4548. doi:10.1074/jbc.M112.384693
- Ferrara N, Adamis AP. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2016;15(6):385-403. doi:10.1038/nrd.2015.17
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003;9(6):669-676. doi:10.1038/nm0603-669
- Ferreras M, Felbor U, Lenhard T, Olsen BR, Delaissé J. Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases. *FEBS Lett.* 2000;486(3):247-251. doi:10.1016/s0014-5793(00)02249-3
- Ferretti E, Di Carlo E, Cocco C, et al. Direct inhibition of human acute myeloid leukemia cell growth by IL-12. *Immunol Lett.* 2010;133(2):99-105. doi:10.1016/j.imlet.2010.08.002
- Fico F, Santamaria-Martínez A. TGFBI modulates tumour hypoxia and promotes breast cancer metastasis. *Mol Oncol.* 2020;14(12):3198-3210. doi:10.1002/1878-0261.12828
- Fiedler U, Scharpfenecker M, Koidl S, et al. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood.* 2004;103(11):4150-4156. doi:10.1182/blood-2003-10-3685
- Figueiredo AM, Villacampa P, Diéguez-Hurtado R, et al. Phosphoinositide 3-Kinase-Regulated Pericyte Maturation Governs Vascular Remodeling. *Circulation.* 2020;142(7):688-704. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.119.042354

- Finn RS, Crown JP, Lang I, et al. The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): a randomised phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2015;16(1):25-35. doi:10.1016/S1470-2045(14)71159-3
- Fisher DT, Appenheimer MM, Evans SS. The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment. *Semin Immunol.* 2014;26(1):38-47. doi:10.1016/j.smim.2014.01.008
- Foekens JA, Look MP, Bolt-de Vries J, Meijer-van Gelder ME, van Putten WL, Klijn JG. Cathepsin-D in primary breast cancer: prognostic evaluation involving 2810 patients. *Br J Cancer.* 1999;79(2):300-307. doi:10.1038/sj.bjc.6690048
- Foekens JA, Peters HA, Grebenchtchikov N, et al. High tumor levels of vascular endothelial growth factor predict poor response to systemic therapy in advanced breast cancer. *Cancer Res.* 2001;61(14):5407-5414.
- Folestad E, Kunath A, Wågsäter D. PDGF-C and PDGF-D signaling in vascular diseases and animal models. *Mol Aspects Med.* 2018;62:1-11. doi:10.1016/j.mam.2018.01.005
- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971;285(21):1182-1186. doi:10.1056/NEJM197111182852108
- Follain G, Osmani N, Azevedo AS, et al. Hemodynamic Forces Tune the Arrest, Adhesion, and Extravasation of Circulating Tumor Cells. *Dev Cell.* 2018;45(1):33-52.e12. doi:10.1016/j.devcel.2018.02.015
- Fonsato V, Buttiglieri S, Deregibus MC, Puntorieri V, Bussolati B, Camussi G. Expression of Pax2 in human renal tumor-derived endothelial cells sustains apoptosis resistance and angiogenesis. *Am J Pathol.* 2006;168(2):706-713. doi:10.2353/ajpath.2006.050776
- Forster JC, Harriss-Phillips WM, Douglass MJ, Bezak E. A review of the development of tumor vasculature and its effects on the tumor microenvironment. *Hypoxia (Auckl).* 2017;5:21-32. Published 2017 Apr 11. doi:10.2147/HPS133231
- Foster MW, Hess DT, Stamler JS. Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective. *Trends Mol Med.* 2009;15(9):391-404. doi:10.1016/j.molmed.2009.06.007
- Fougner C, Bergholtz H, Norum JH, Sørle T. Re-definition of claudin-low as a breast cancer phenotype. *Nat Commun.* 2020;11(1):1787. Published 2020 Apr 14. doi:10.1038/s41467-020-15574-5
- Francis SE, Goh KL, Hodivala-Dilke K, Bader BL, Stark M, Davidson D, Hynes RO. Central roles of alpha5beta1 integrin and fibronectin in vascular development in mouse embryos and embryoid bodies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002 Jun 1;22(6):927-33. doi:10.1161/01.atv.0000016045.93313.f2. PMID: 12067900
- Franses JW, Baker AB, Chitalia VC, Edelman ER. Stromal endothelial cells directly influence cancer progression. *Sci Transl Med.* 2011;3(66):66ra5. doi:10.1126/scitranslmed.3001542
- Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci.* 2010;123(Pt 24):4195-4200. doi:10.1242/jcs.023820
- Franzke CW, Bruckner-Tuderman L, Blobel CP. Shedding of collagen XVII/BP180 in skin depends on both ADAM10 and ADAM9. *J Biol Chem.* 2009;284(35):23386-23396. doi:10.1074/jbc.M109.034090
- Franzke CW, Tasanen K, Schäcke H, et al. Transmembrane collagen XVII, an epithelial adhesion

- protein, is shed from the cell surface by ADAMs. *EMBO J.* 2002;21(19):5026-5035. doi:10.1093/emboj/cdf532
- Fremd C, Stefanovic S, Beckhove P, et al. Mucin 1-specific B cell immune responses and their impact on overall survival in breast cancer patients. *Oncoimmunology*. 2015;5(1):e1057387. Published 2015 Jun 5. doi:10.1080/2162402X.2015.1057387
- Friedewald SM, Rafferty EA, Rose SL, et al. Breast cancer screening using tomosynthesis in combination with digital mammography. *JAMA*. 2014;311(24):2499-2507. doi:10.1001/jama.2014.6095
- Friedman JM, Fialkow PJ. Cell marker studies of human tumorigenesis. *Transplant Rev*. 1976;28:17-33. doi:10.1111/j.1600-065x.1976.tb00190.x
- Frisch SM, Screaton RA. Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol*. 2001;13(5):555-562. doi:10.1016/s0955-0674(00)00251-9
- Fujii T, Yajima R, Tatsuki H, Oosone K, Kuwano H. Implication of atypical supraclavicular F18-fluorodeoxyglucose uptake in patients with breast cancer: Association between brown adipose tissue and breast cancer. *Oncol Lett*. 2017;14(6):7025-7030. doi:10.3892/ol.2017.6768
- Fukuhara S, Sako K, Noda K, Zhang J, Minami M, Mochizuki N. Angiopoietin-1/Tie2 receptor signaling in vascular quiescence and angiogenesis. *Histol Histopathol*. 2010;25(3):387-396. doi:10.14670/HH-25.387
- Fukushi J, Makagiansar IT, Stallcup WB. NG2 proteoglycan promotes endothelial cell motility and angiogenesis via engagement of galectin-3 and alpha3beta1 integrin. *Mol Biol Cell*. 2004;15(8):3580-3590. doi:10.1091/mbc.e04-03-0236
- Furth PA, St Onge L, Böger H, et al. Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(20):9302-9306. doi:10.1073/pnas.91.20.9302
- Gabos Z, Sinha R, Hanson J, et al. Prognostic significance of human epidermal growth factor receptor positivity for the development of brain metastasis after newly diagnosed breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24(36):5658-5663. doi:10.1200/JCO.2006.07.0250
- Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(3):162-174. doi:10.1038/nri2506
- Gajewski TF, Schreiber H, Fu YX. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol*. 2013;14(10):1014-1022. doi:10.1038/ni.2703
- Gao D, Nolan DJ, Mellick AS, Bambino K, McDonnell K, Mittal V. Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. *Science*. 2008;319(5860):195-198. doi:10.1126/science.1150224
- Gao D, Vahdat LT, Wong S, Chang JC, Mittal V. Microenvironmental regulation of epithelial-mesenchymal transitions in cancer. *Cancer Res*. 2012;72(19):4883-4889. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-1223
- Gao JJ, Swain SM. Luminal A Breast Cancer and Molecular Assays: A Review. *Oncologist*. 2018;23(5):556-565. doi:10.1634/theoncologist.2017-0535
- Gardner A, de Mingo Pulido Á, Ruffell B. Dendritic Cells and Their Role in Immunotherapy. *Front Immunol*. 2020;11:924. Published 2020 May 21. doi:10.3389/fimmu.2020.00924
- Garufi G, Palazzo A, Paris I, et al. Neoadjuvant therapy for triple-negative breast cancer: potential predictive biomarkers of activity and efficacy of platinum chemotherapy, PARP- and immune-

- checkpoint-inhibitors. *Expert Opin Pharmacother.* 2020;21(6):687-699. doi:10.1080/14656566.2020.1724957
- Gaultier A, Arandjelovic S, Niessen S, et al. Regulation of tumor necrosis factor receptor-1 and the IKK-NF-kappaB pathway by LDL receptor-related protein explains the antiinflammatory activity of this receptor. *Blood.* 2008;111(11):5316-5325. doi:10.1182/blood-2007-12-127613
- Gaultier A, Salicioni AM, Arandjelovic S, Gonias SL. Regulation of the composition of the extracellular matrix by low density lipoprotein receptor-related protein-1: activities based on regulation of mRNA expression. *J Biol Chem.* 2006;281(11):7332-7340. doi:10.1074/jbc.M511857200
- Gaultier A, Simon G, Niessen S, et al. LDL receptor-related protein 1 regulates the abundance of diverse cell-signaling proteins in the plasma membrane proteome. *J Proteome Res.* 2010;9(12):6689-6695. doi:10.1021/pr1008288
- Gaultier A, Wu X, Le Moan N, et al. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 is an essential receptor for myelin phagocytosis. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 8):1155-1162. doi:10.1242/jcs.040717
- Gebala V, Collins R, Geudens I, Phng LK, Gerhardt H. Blood flow drives lumen formation by inverse membrane blebbing during angiogenesis in vivo. *Nat Cell Biol.* 2016;18(4):443-450. doi:10.1038/ncb3320
- Georges-Labouesse EN, George EL, Rayburn H, Hynes RO. Mesodermal development in mouse embryos mutant for fibronectin. *Dev Dyn.* 1996 Oct;207(2):145-56. doi: 10.1002/(SICI)1097-0177(199610)207:2<145::AID-AJA3>3.0.CO;2-H. PMID: 8906418
- Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol.* 2003;161(6):1163-1177. doi:10.1083/jcb.200302047
- Ghosh A, Sarkar S, Banerjee S, et al. MIND model for triple-negative breast cancer in syngeneic mice for quick and sequential progression analysis of lung metastasis. *PLoS One.* 2018;13(5):e0198143. Published 2018 May 29. doi:10.1371/journal.pone.0198143
- Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J.* 2011 Jan;278(1):16-27. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07919.x. Epub 2010 Nov 19. PMID: 21087457
- Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science.* 1999;285(5430):1028-1032. doi:10.1126/science.285.5430.1028
- Gianni sL, Pienkowski T, Im YH, et al. 5-year analysis of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in patients with locally advanced, inflammatory, or early-stage HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a multicentre, open-label, phase 2 randomised trial. *Lancet Oncol.* 2016;17(6):791-800. doi:10.1016/S1470-2045(16)00163-7
- Giatromanolaki A, Liousia M, Arelaki S, et al. Differential effect of hypoxia and acidity on lung cancer cell and fibroblast metabolism. *Biochem Cell Biol.* 2017;95(3):428-436. doi:10.1139/bcb-2016-0197
- Ginestier C. Les cellules souches cancéreuse : définition et techniques d'isolement. *Bulletin du Cancer, John Libbey Eurotext,* 2017, 104 (12), pp.1060 - 1063. doi:10.1016/j.bulcan.2017.10.009.hal-01792007
- Giordano SH, Temin S, Kirshner JJ, et al. Systemic therapy for patients with advanced human

- epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. *J Clin Oncol*. 2014;32(19):2078-2099. doi:10.1200/JCO.2013.54.0948
- Giuliano M, Hu H, Wang YC, et al. Upregulation of ER Signaling as an Adaptive Mechanism of Cell Survival in HER2-Positive Breast Tumors Treated with Anti-HER2 Therapy. *Clin Cancer Res*. 2015;21(17):3995-4003. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2728
- Gkretsi V, Stylianopoulos T. Cell Adhesion and Matrix Stiffness: Coordinating Cancer Cell Invasion and Metastasis. *Front Oncol*. 2018;8:145. Published 2018 May 4. doi:10.3389/fonc.2018.00145
- Gluz O, Liedtke C, Gottschalk N, Pusztai L, Nitz U, Harbeck N. Triple-negative breast cancer--current status and future directions. *Ann Oncol*. 2009;20(12):1913-1927. doi:10.1093/annonc/mdp492
- Godfrey DI, Berzins SP. Control points in NKT-cell development. *Nat Rev Immunol*. 2007 Jul;7(7):505-18. doi: 10.1038/nri2116. PMID: 17589542
- Goldstein JL, Brown MS. Molecular medicine. The cholesterol quartet. *Science*. 2001;292(5520):1310-1312. doi:10.1126/science.1061815
- Gómez-Contreras P, Ramiro-Díaz JM, Sierra A, et al. Extracellular matrix 1 (ECM1) regulates the actin cytoskeletal architecture of aggressive breast cancer cells in part via S100A4 and Rho-family GTPases. *Clin Exp Metastasis*. 2017;34(1):37-49. doi:10.1007/s10585-016-9827-5
- Gomis-Rüth FX. Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases. *J Biol Chem*. 2009;284(23):15353-15357. doi:10.1074/jbc.R800069200
- Gonias SL, Gaultier A, Jo M. Regulation of the urokinase receptor (uPAR) by LDL receptor-related protein-1 (LRP1). *Curr Pharm Des*. 2011;17(19):1962-1969. doi:10.2174/138161211796718224
- Gonzalez EM, Reed CC, Bix G, et al. BMP-1/Tolloid-like metalloproteases process endorepellin, the angiostatic C-terminal fragment of perlecan. *J Biol Chem*. 2005;280(8):7080-7087. doi:10.1074/jbc.M409841200
- González-González L, Alonso J. Periostin: A Matricellular Protein With Multiple Functions in Cancer Development and Progression. *Front Oncol*. 2018;8:225. Published 2018 Jun 12. doi:10.3389/fonc.2018.00225
- Gonzalez-Villalobos R, Klassen RB, Allen PL, et al. Megalin binds and internalizes angiotensin-(1-7). *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006;290(5):F1270-F1275. doi:10.1152/ajprenal.00164.2005
- Gopinathan G, Milagre C, Pearce OM, et al. Interleukin-6 Stimulates Defective Angiogenesis. *Cancer Res*. 2015;75(15):3098-3107. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-1227
- Gordon EJ, Fukuhara D, Weström S, et al. The endothelial adaptor molecule TSAd is required for VEGF-induced angiogenic sprouting through junctional c-Src activation. *Sci Signal*. 2016;9(437):ra72. Published 2016 Jul 19. doi:10.1126/scisignal.aad9256
- Gordts PL, Bartelt A, Nilsson SK, et al. Impaired LDL receptor-related protein 1 translocation correlates with improved dyslipidemia and atherosclerosis in apoE-deficient mice. *PLoS One*. 2012;7(6):e38330. doi:10.1371/journal.pone.0038330
- Gorovoy M, Gaultier A, Campana WM, Firestein GS, Gonias SL. Inflammatory mediators promote production of shed LRP1/CD91, which regulates cell signaling and cytokine expression by macrophages. *J Leukoc Biol*. 2010;88(4):769-778. doi:10.1189/jlb.0410220
- Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(12):5547-5551.

doi:10.1073/pnas.89.12.5547

- Gotink KJ, Verheul HM. Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action?. *Angiogenesis*. 2010;13(1):1-14. doi:10.1007/s10456-009-9160-6
- Goto T, Ishikawa H, Matsumoto K, et al. Tum-1, a tumstatin fragment, gene delivery into hepatocellular carcinoma suppresses tumor growth through inhibiting angiogenesis. *Int J Oncol*. 2008;33(1):33-40.
- Götte M, Kersting C, Radke I, Kiesel L, Wülfing P. An expression signature of syndecan-1 (CD138), E-cadherin and c-met is associated with factors of angiogenesis and lymphangiogenesis in ductal breast carcinoma in situ. *Breast Cancer Res*. 2007;9(1):R8. doi:10.1186/bcr1641
- Gotthardt M, Trommsdorff M, Nevitt MF, et al. Interactions of the low density lipoprotein receptor gene family with cytosolic adaptor and scaffold proteins suggest diverse biological functions in cellular communication and signal transduction. *J Biol Chem*. 2000;275(33):25616-25624. doi:10.1074/jbc.M000955200
- Goulet CR, Pouliot F. TGF β Signaling in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol*. 2021;1270:89-105. doi:10.1007/978-3-030-47189-7_6
- Graham KA, Kulawiec M, Owens KM, et al. NADPH oxidase 4 is an oncoprotein localized to mitochondria. *Cancer Biol Ther*. 2010;10(3):223-231. doi:10.4161/cbt.10.3.12207
- Green DR, Llamby F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(12):a006080. Published 2015 Dec 1. doi:10.1101/cshperspect.a006080
- Greenaway J, Lawler J, Moorehead R, Bornstein P, Lamarre J, Petrik J. Thrombospondin-1 inhibits VEGF levels in the ovary directly by binding and internalization via the low density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1). *J Cell Physiol*. 2007;210(3):807-818. doi:10.1002/jcp.20904
- Grivennikov SI, Karin M. Inflammation and oncogenesis: a vicious connection. *Curr Opin Genet Dev*. 2010;20(1):65-71. doi:10.1016/j.gde.2009.11.004
- Groppa E, Brkic S, Uccelli A, et al. EphrinB2/EphB4 signaling regulates non-sprouting angiogenesis by VEGF. *EMBO Rep*. 2018;19(5):e45054. doi:10.15252/embr.201745054
- Grosset AA, Labrie M, Vladoiu MC, Yousef EM, Gaboury L, St-Pierre Y. Galectin signatures contribute to the heterogeneity of breast cancer and provide new prognostic information and therapeutic targets. *Oncotarget*. 2016;7(14):18183-18203. doi:10.18632/oncotarget.7784
- Grueneisen J, Nagarajah J, Buchbender C, et al. Positron Emission Tomography/Magnetic Resonance Imaging for Local Tumor Staging in Patients With Primary Breast Cancer: A Comparison With Positron Emission Tomography/Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging. *Invest Radiol*. 2015;50(8):505-513. doi:10.1097/RLI.0000000000000197
- Grulich AE, van Leeuwen MT, Falster MO, Vajdic CM. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet*. 2007 Jul 7;370(9581):59-67. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61050-2. PMID: 17617273
- Grunewald M, Avraham I, Dor Y, et al. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells [published correction appears in *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):811. Yung, Steffen [corrected to Jung, Steffen]]. *Cell*. 2006;124(1):175-189. doi:10.1016/j.cell.2005.10.036
- Gu G, Dustin D, Fuqua SA. Targeted therapy for breast cancer and molecular mechanisms of resistance to treatment. *Curr Opin Pharmacol*. 2016;31:97-103. doi:10.1016/j.coph.2016.11.005

- Guaita-Esteruelas S, Gumà J, Masana L, Borràs J. The peritumoural adipose tissue microenvironment and cancer. The roles of fatty acid binding protein 4 and fatty acid binding protein 5. *Mol Cell Endocrinol*. 2018;462(Pt B):107-118. doi:10.1016/j.mce.2017.02.002
- Guan H, Lan Y, Wan Y, et al. PD-L1 mediated the differentiation of tumor-infiltrating CD19+ B lymphocytes and T cells in Invasive breast cancer. *Oncoimmunology*. 2015;5(2):e1075112. Published 2015 Aug 12. doi:10.1080/2162402X.2015.1075112
- Gubbiotti MA, Neill T, Iozzo RV. A current view of perlecan in physiology and pathology: A mosaic of functions. *Matrix Biol*. 2017;57-58:285-298. doi:10.1016/j.matbio.2016.09.003
- Guénette SY, Chang Y, Hyman BT, Tanzi RE, Rebeck GW. Low-density lipoprotein receptor-related protein levels and endocytic function are reduced by overexpression of the FE65 adaptor protein, FE65L1. *J Neurochem*. 2002;82(4):755-762. doi:10.1046/j.1471-4159.2002.01009.x
- Guido C, Whitaker-Menezes D, Capparelli C, et al. Metabolic reprogramming of cancer-associated fibroblasts by TGF- β drives tumor growth: connecting TGF- β signaling with "Warburg-like" cancer metabolism and L-lactate production. *Cell Cycle*. 2012;11(16):3019-3035. doi:10.4161/cc.21384
- Guo S, Liu M, Gonzalez-Perez RR. Role of Notch and its oncogenic signaling crosstalk in breast cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1815(2):197-213. doi:10.1016/j.bbcan.2010.12.002
- Guo WH, Frey MT, Burnham NA, Wang YL. Substrate rigidity regulates the formation and maintenance of tissues. *Biophys J*. 2006;90(6):2213-2220. doi:10.1529/biophysj.105.070144
- Gupta K, Gupta P, Wild R, Ramakrishnan S, Hebbel RP. Binding and displacement of vascular endothelial growth factor (VEGF) by thrombospondin: effect on human microvascular endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Angiogenesis*. 1999;3(2):147-158. doi:10.1023/a:1009018702832
- Gusterson BA, Stein T. Human breast development. *Semin Cell Dev Biol*. 2012;23(5):567-573. doi:10.1016/j.semcdb.2012.03.013
- Guthrie GJ, Charles KA, Roxburgh CS, Horgan PG, McMillan DC, Clarke SJ. The systemic inflammation-based neutrophil-lymphocyte ratio: experience in patients with cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013 Oct;88(1):218-30. doi: 10.1016/j.critrevonc.2013.03.010. Epub 2013 Apr 17. PMID: 23602134
- Gutierrez C, Schiff R. HER2: biology, detection, and clinical implications. *Arch Pathol Lab Med*. 2011;135(1):55-62. doi:10.5858/2010-0454-RAR.1
- Gutierrez MC, Detre S, Johnston S, et al. Molecular changes in tamoxifen-resistant breast cancer: relationship between estrogen receptor, HER-2, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Clin Oncol*. 2005;23(11):2469-2476. doi:10.1200/JCO.2005.01.172
- Guy CT, Cardiff RD, Muller WJ. Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease. *Mol Cell Biol*. 1992;12(3):954-961. doi:10.1128/mcb.12.3.954-961.1992
- Hahn-Dantona E, Ruiz JF, Bornstein P, Strickland DK. The low density lipoprotein receptor-related protein modulates levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) by mediating its cellular catabolism. *J Biol Chem*. 2001;276(18):15498-15503. doi:10.1074/jbc.M100121200
- Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science*. 2008;319(5868):1352-1355. doi:10.1126/science.1140735
- Hamano Y, Zeisberg M, Sugimoto H, et al. Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen

- IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin. *Cancer Cell*. 2003;3(6):589-601. doi:10.1016/s1535-6108(03)00133-8
- Hammond EM, Asselin MC, Forster D, O'Connor JP, Senra JM, Williams KJ. The meaning, measurement and modification of hypoxia in the laboratory and the clinic. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2014;26(5):277-288. doi:10.1016/j.clon.2014.02.002
- Hamzah J, Jugold M, Kiessling F, et al. Vascular normalization in Rgs5-deficient tumours promotes immune destruction. *Nature*. 2008;453(7193):410-414. doi:10.1038/nature06868
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70. doi:10.1016/s0092-8674(00)81683-9
- Haque W, Verma V, Hatch S, Suzanne Klimberg V, Brian Butler E, Teh BS. Response rates and pathologic complete response by breast cancer molecular subtype following neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2018;170(3):559-567. doi:10.1007/s10549-018-4801-3
- Harper J, Sainson RC. Regulation of the anti-tumour immune response by cancer-associated fibroblasts. *Semin Cancer Biol*. 2014;25:69-77. doi:10.1016/j.semcancer.2013.12.005
- Hartman ZC, Poage GM, den Hollander P, et al. Growth of triple-negative breast cancer cells relies upon coordinate autocrine expression of the proinflammatory cytokines IL-6 and IL-8. *Cancer Res*. 2013;73(11):3470-3480. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4524-T
- Hasegawa Y, Takanashi S, Kanehira Y, Tsushima T, Imai T, Okumura K. Transforming growth factor-beta1 level correlates with angiogenesis, tumor progression, and prognosis in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*. 2001;91(5):964-971
- Hashimoto T, Shibasaki F. Hypoxia-inducible factor as an angiogenic master switch. *Front Pediatr*. 2015;3:33. Published 2015 Apr 24. doi:10.3389/fped.2015.00033
- Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, et al. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol*. 2000;156(4):1363-1380. doi:10.1016/S0002-9440(10)65006-7
- Hassan IM, Sahweil A, Constantinides C, et al. Uptake and kinetics of Tc-99m hexakis 2-methoxy isobutyl isonitrile in benign and malignant lesions in the lungs. *Clin Nucl Med*. 1989;14(5):333-340. doi:10.1097/00003072-198905000-00005
- He MY, Rancoule C, Rehailia-Blanchard A, et al. Radiotherapy in triple-negative breast cancer: Current situation and upcoming strategies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2018;131:96-101. doi:10.1016/j.critrevonc.2018.09.004
- He X, Cheng R, Benyajati S, Ma JX. PEDF and its roles in physiological and pathological conditions: implication in diabetic and hypoxia-induced angiogenic diseases. *Clin Sci (Lond)*. 2015;128(11):805-823. doi:10.1042/CS20130463
- He Z, Wang G, Wu J, Tang Z, Luo M. The molecular mechanism of LRP1 in physiological vascular homeostasis and signal transduction pathways. *Biomed Pharmacother*. 2021;139:111667. doi:10.1016/j.biopha.2021.111667
- Hébert M, Lesept F, Vivien D, Macrez R. The story of an exceptional serine protease, tissue-type plasminogen activator (tPA). *Rev Neurol (Paris)*. 2016;172(3):186-197. doi:10.1016/j.neurol.2015.10.002

- Heldin CH, Moustakas A. Signaling Receptors for TGF- β Family Members. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016;8(8):a022053. Published 2016 Aug 1. doi:10.1101/cshperspect.a022053
- Hellberg C, Ostman A, Heldin CH. PDGF and vessel maturation. *Recent Results Cancer Res.* 2010;180:103-114. doi:10.1007/978-3-540-78281-0_7
- Hellström M, Kalén M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development.* 1999;126(14):3047-3055
- Hellström M, Phng LK, Hofmann JJ, et al. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature.* 2007;445(7129):776-780. doi:10.1038/nature05571
- Henriet E, Abou Hammoud A, Dupuy JW, et al. Argininosuccinate synthase 1 (ASS1): A marker of unclassified hepatocellular adenoma and high bleeding risk. *Hepatology.* 2017;66(6):2016-2028. doi:10.1002/hep.29336
- Héquet D, Mzoughi S, Rouzier R, Guccione E. Les récepteurs aux androgènes dans le cancer du sein : expression, valeur et perspectives thérapeutiques [Androgen receptors in breast cancer: Expression, value and therapeutic prospects]. *Bull Cancer.* 2017;104(4):363-369. doi:10.1016/j.bulcan.2017.01.005
- Herkenne S, Paques C, Nivelles O, et al. The interaction of uPAR with VEGFR2 promotes VEGF-induced angiogenesis [published correction appears in *Sci Signal.* 2015 Dec 8;8(406):er9]. *Sci Signal.* 2015;8(403):ra117. Published 2015 Nov 17. doi:10.1126/scisignal.aaa2403
- Herrera-Abreu MT, Palafox M, Asghar U, et al. Early Adaptation and Acquired Resistance to CDK4/6 Inhibition in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer [published correction appears in *Cancer Res.* 2016 Oct 1;76(19):5907]. *Cancer Res.* 2016;76(8):2301-2313. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-0728
- Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.* 2007;8(5):R76. doi:10.1186/gb-2007-8-5-r76
- Herwig L, Blum Y, Krudewig A, et al. Distinct cellular mechanisms of blood vessel fusion in the zebrafish embryo. *Curr Biol.* 2011;21(22):1942-1948. doi:10.1016/j.cub.2011.10.016
- Herz J, Hamann U, Rogne S, Myklebost O, Gausepohl H, Stanley KK. Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *EMBO J.* 1988;7(13):4119-4127
- Hida K, Hida Y, Amin DN, et al. Tumor-associated endothelial cells with cytogenetic abnormalities. *Cancer Res.* 2004;64(22):8249-8255. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1567
- Hilborn E, Gacic J, Fornander T, Nordenskjöld B, Stål O, Jansson A. Androgen receptor expression predicts beneficial tamoxifen response in oestrogen receptor- α -negative breast cancer. *Br J Cancer.* 2016;114(3):248-255. doi:10.1038/bjc.2015.464
- Hildenbrand R, Allgayer H, Marx A, Stroebel P. Modulators of the urokinase-type plasminogen activation system for cancer. *Expert Opin Investig Drugs.* 2010 May;19(5):641-52. doi:10.1517/13543781003767400. PMID: 20402599
- Hinshaw DC, Shevde LA. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Res.* 2019;79(18):4557-4566. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-3962
- Hlushchuk R, Barré S, Djonov V. Morphological Aspects of Tumor Angiogenesis. *Methods Mol Biol.* 2016;1464:13-24. doi:10.1007/978-1-4939-3999-2_2

- Hlushchuk R, Riesterer O, Baum O, et al. Tumor recovery by angiogenic switch from sprouting to intussusceptive angiogenesis after treatment with PTK787/ZK222584 or ionizing radiation. *Am J Pathol.* 2008;173(4):1173-1185. doi:10.2353/ajpath.2008.071131
- Hofer E, Schweighofer B. Signal transduction induced in endothelial cells by growth factor receptors involved in angiogenesis. *Thromb Haemost.* 2007;97(3):355-363
- Holtzman DM, Herz J, Bu G. Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors: normal biology and roles in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(3):a006312. doi:10.1101/cshperspect.a006312
- Hong J, Tobin NP, Rundqvist H, et al. Role of Tumor Pericytes in the Recruitment of Myeloid-Derived Suppressor Cells [published correction appears in *J Natl Cancer Inst.* 2016 Mar;108(3). pii: djv434. doi: 10.1093/jnci/djv434]. *J Natl Cancer Inst.* 2015;107(10):djv209. Published 2015 Aug 21. doi:10.1093/jnci/djv209
- Horak CE, Steeg PS. Metastasis gets site specific. *Cancer Cell.* 2005;8(2):93-95. doi:10.1016/j.ccr.2005.07.013
- Hori K, Saito S, Takahashi H, Sato H, Maeda H, Sato Y. Tumor-selective blood flow decrease induced by an angiotensin converting enzyme inhibitor, temocapril hydrochloride. *Jpn J Cancer Res.* 2000;91(2):261-269. doi:10.1111/j.1349-7006.2000.tb00940.x
- Hori K, Suzuki M, Tanda S, Saito S, Shinozaki M, Zhang QH. Fluctuations in tumor blood flow under normotension and the effect of angiotensin II-induced hypertension. *Jpn J Cancer Res.* 1991;82(11):1309-1316. doi:10.1111/j.1349-7006.1991.tb01797.x
- Hosaka K, Yang Y, Nakamura M, et al. Dual roles of endothelial FGF-2-FGFR1-PDGF-BB and perivascular FGF-2-FGFR2-PDGF β signaling pathways in tumor vascular remodeling. *Cell Discov.* 2018;4:3. Published 2018 Jan 16. doi:10.1038/s41421-017-0002-1
- Houssami N, Ciatto S. The evolving role of new imaging methods in breast screening. *Prev Med.* 2011;53(3):123-126. doi:10.1016/j.ypmed.2011.05.003
- How Kit A, Nielsen HM, Tost J. DNA methylation based biomarkers: practical considerations and applications. *Biochimie.* 2012;94(11):2314-2337. doi:10.1016/j.biochi.2012.07.014
- Hu CJ, Sataur A, Wang L, Chen H, Simon MC. The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α . *Mol Biol Cell.* 2007;18(11):4528-4542. doi:10.1091/mbc.e06-05-0419
- Hu K, Wu C, Mars WM, Liu Y. Tissue-type plasminogen activator promotes murine myofibroblast activation through LDL receptor-related protein 1-mediated integrin signaling. *J Clin Invest.* 2007;117(12):3821-3832. doi:10.1172/JCI32301
- Hu L, Zang MD, Wang HX, et al. Biglycan stimulates VEGF expression in endothelial cells by activating the TLR signaling pathway. *Mol Oncol.* 2016;10(9):1473-1484. doi:10.1016/j.molonc.2016.08.002
- Huang SS, Huang JS. TGF-beta control of cell proliferation. *J Cell Biochem.* 2005;96(3):447-462. doi:10.1002/jcb.20558
- Huang SS, Ling TY, Tseng WF, et al. Cellular growth inhibition by IGFBP-3 and TGF-beta1 requires LRP-1. *FASEB J.* 2003;17(14):2068-2081. doi:10.1096/fj.03-0256com
- Huang XY, Shi GM, Devbhandari RP, et al. Low level of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 predicts an unfavorable prognosis of hepatocellular carcinoma after curative resection.

- PLoS One. 2012;7(3):e32775. doi:10.1371/journal.pone.0032775
- Huang YC, Chen TB, Hsu CC, et al. The relationship between brown adipose tissue activity and neoplastic status: an (18)F-FDG PET/CT study in the tropics. *Lipids Health Dis.* 2011;10:238. Published 2011 Dec 20. doi:10.1186/1476-511X-10-238
- Humphrey JD, Milewicz DM, Tellides G, Schwartz MA. Cell biology. Dysfunctional mechanosensing in aneurysms. *Science.* 2014;344(6183):477-479. doi:10.1126/science.1253026
- Humphries JD, Humphries MJ. CD14 is a ligand for the integrin $\alpha 4 \beta 1$. *FEBS Lett.* 2007;581(4):757-763. doi:10.1016/j.febslet.2007.01.038
- Hung SP, Yang MH, Tseng KF, Lee OK. Hypoxia-induced secretion of TGF- $\beta 1$ in mesenchymal stem cell promotes breast cancer cell progression. *Cell Transplant.* 2013;22(10):1869-1882. doi:10.3727/096368912X657954
- Huttlin EL, Bruckner RJ, Paulo JA, et al. Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks. *Nature.* 2017;545(7655):505-509. doi:10.1038/nature22366
- Hynes RO. Fibronectins. *Sci Am.* 1986;254(6):42-51. doi:10.1038/scientificamerican0686-42
- Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 2002;110(6):673-687. doi:10.1016/s0092-8674(02)00971-6
- Ignatiadis M, Sledge GW, Jeffrey SS. Liquid biopsy enters the clinic - implementation issues and future challenges. *Nat Rev Clin Oncol.* 2021;18(5):297-312. doi:10.1038/s41571-020-00457-x
- Imamura T, Hikita A, Inoue Y. The roles of TGF- β signaling in carcinogenesis and breast cancer metastasis. *Breast Cancer.* 2012;19(2):118-124. doi:10.1007/s12282-011-0321-2
- Indraccolo S, Gola E, Rosato A, et al. Differential effects of angiostatin, endostatin and interferon- $\alpha(1)$ gene transfer on in vivo growth of human breast cancer cells. *Gene Ther.* 2002;9(13):867-878. doi:10.1038/sj.gt.3301703
- Inubushi T, Kawazoe A, Miyauchi M, et al. Molecular mechanisms of the inhibitory effects of bovine lactoferrin on lipopolysaccharide-mediated osteoclastogenesis. *J Biol Chem.* 2012;287(28):23527-23536. doi:10.1074/jbc.M111.324673
- Iozzo RV, Schaefer L. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol.* 2015;42:11-55. doi:10.1016/j.matbio.2015.02.003
- Iozzo RV, Zoeller JJ, Nyström A. Basement membrane proteoglycans: modulators Par Excellence of cancer growth and angiogenesis. *Mol Cells.* 2009;27(5):503-513. doi:10.1007/s10059-009-0069-0
- Iozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:609-652. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.609
- Iruela-Arispe ML, Luque A, Lee N. Thrombospondin modules and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(6):1070-1078. doi:10.1016/j.biocel.2004.01.025
- Isaacson KJ, Martin Jensen M, Subrahmanyam NB, Ghandehari H. Matrix-metalloproteinases as targets for controlled delivery in cancer: An analysis of upregulation and expression. *J Control Release.* 2017;259:62-75. doi:10.1016/j.jconrel.2017.01.034
- Isenberg JS, Martin-Manso G, Maxhimer JB, Roberts DD. Regulation of nitric oxide signalling by thrombospondin 1: implications for anti-angiogenic therapies. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(3):182-194. doi:10.1038/nrc2561
- Ito K, Stannard K, Gabutero E, et al. Galectin-1 as a potent target for cancer therapy: role in the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev.* 2012;31(3-4):763-778. doi:10.1007/s10555-

- Iyengar P, Espina V, Williams TW, et al. Adipocyte-derived collagen VI affects early mammary tumor progression in vivo, demonstrating a critical interaction in the tumor/stroma microenvironment. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1163-1176. doi:10.1172/JCI23424
- Jaber MI, Song B, Taylor C, et al. A deep learning image-based intrinsic molecular subtype classifier of breast tumors reveals tumor heterogeneity that may affect survival. *Breast Cancer Res*. 2020;22(1):12. Published 2020 Jan 28. doi:10.1186/s13058-020-1248-3
- Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009;461(7267):1071-1078. doi:10.1038/nature08467
- Jahani N, Cohen E, Hsieh MK, et al. Prediction of Treatment Response to Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer via Early Changes in Tumor Heterogeneity Captured by DCE-MRI Registration. *Sci Rep*. 2019;9(1):12114. Published 2019 Aug 20. doi:10.1038/s41598-019-48465-x
- Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med*. 2003 Jun;9(6):685-93. doi:10.1038/nm0603-685. PMID: 12778167.
- Jakhu H, Gill G, Singh A. Role of integrins in wound repair and its periodontal implications. *J Oral Biol Craniofac Res*. 2018;8(2):122-125. doi:10.1016/j.jobcr.2018.01.002
- Jakobsson L, Franco CA, Bentley K, et al. Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nat Cell Biol*. 2010;12(10):943-953. doi:10.1038/ncb2103
- James JJ, Tennant SL. Contrast-enhanced spectral mammography (CESM). *Clin Radiol*. 2018;73(8):715-723. doi:10.1016/j.crad.2018.05.005
- Jansen S, Gosens R, Wieland T, Schmidt M. Paving the Rho in cancer metastasis: Rho GTPases and beyond. *Pharmacol Ther*. 2018;183:1-21. doi:10.1016/j.pharmthera.2017.09.002
- Jansson M, Billing O, Herdenberg C, Lundin C, Tolockiene E, Nazemroaya A, Sund M. Expression and Circulating Levels of Perlecan in Breast Cancer - Implications for Oestrogen Dependent Stromal Remodeling. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2020 Mar;25(1):69-77. doi:10.1007/s10911-020-09447-2. Epub 2020 Mar 2. PMID: 32124140
- Jansson S, Aaltonen K, Bendahl PO, et al. The PDGF pathway in breast cancer is linked to tumour aggressiveness, triple-negative subtype and early recurrence. *Breast Cancer Res Treat*. 2018;169(2):231-241. doi:10.1007/s10549-018-4664-7
- Jensen F, Koprowski H, Pagano JS, et al., Autologous and Homologous Implantation of Human Cells Transformed In Vitro by Simian Virus 40, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, Volume 32, Issue 4, April 1964, Pages 917–937. doi:10.1093/jnci/32.4.917
- Jeziarska-Drutel A, Rosenzweig SA, Neumann CA. Role of oxidative stress and the microenvironment in breast cancer development and progression. *Adv Cancer Res*. 2013;119:107-125. doi:10.1016/B978-0-12-407190-2.00003-4
- Jia L, Lu Y, He S, Xie H, Zhong C, Yang C, Yang X, Suhong Y, Lian S, Li Y, Lin G, Zhang C. S-nitrosylation of CYR61 protein reduces triple-negative breast cancer metastasis ability. 2020 doi:10.21203/rs.3.rs-86057/v1. (en reviewing)
- Jiang B, Zhang R, Feng D, et al. A Tet-on and Cre-loxP Based Genetic Engineering System for Convenient Recycling of Selection Markers in *Penicillium oxalicum*. *Front Microbiol*. 2016;7:485. Published 2016 Apr 12. doi:10.3389/fmicb.2016.00485

- Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv Cancer Res.* 2009;102:19-65. doi:10.1016/S0065-230X(09)02002-8
- Jiang L, Weatherall PT, McColl RW, Tripathy D, Mason RP. Blood oxygenation level-dependent (BOLD) contrast magnetic resonance imaging (MRI) for prediction of breast cancer chemotherapy response: a pilot study. *J Magn Reson Imaging.* 2013;37(5):1083-1092. doi:10.1002/jmri.23891
- Jiang X, Wang J, Deng X, et al. The role of microenvironment in tumor angiogenesis. *J Exp Clin Cancer Res.* 2020;39(1):204. Published 2020 Sep 30. doi:10.1186/s13046-020-01709-5
- Jiang YZ, Ma D, Suo C, et al. Genomic and Transcriptomic Landscape of Triple-Negative Breast Cancers: Subtypes and Treatment Strategies. *Cancer Cell.* 2019;35(3):428-440.e5. doi:10.1016/j.ccell.2019.02.001
- Jiménez Sánchez G, Maury P, Stefancikova L, et al. Fluorescent Radiosensitizing Gold Nanoparticles. *Int J Mol Sci.* 2019;20(18):4618. Published 2019 Sep 18. doi:10.3390/ijms20184618
- Jing Z, Wei-Jie Y, Yi-Feng ZG, Jing H. Downregulation of Syndecan-1 induce glomerular endothelial cell dysfunction through modulating internalization of VEGFR-2. *Cell Signal.* 2016;28(8):826-837. doi:10.1016/j.cellsig.2016.04.001
- John H, Radtke K, Ständker L, Forssmann WG. Identification and characterization of novel endogenous proteolytic forms of the human angiogenesis inhibitors restin and endostatin. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1747(2):161-170. doi:10.1016/j.bbapap.2004.10.013
- Jonietz E. Mechanics: The forces of cancer. *Nature.* 2012;491(7425):S56-S57. doi:10.1038/491s56a
- Kabashima-Niibe A, Higuchi H, Takaishi H, et al. Mesenchymal stem cells regulate epithelial-mesenchymal transition and tumor progression of pancreatic cancer cells. *Cancer Sci.* 2013;104(2):157-164. doi:10.1111/cas.12059
- Kadler KE, Baldock C, Bella J, Boot-Handford RP. Collagens at a glance. *J Cell Sci.* 2007;120(Pt 12):1955-1958. doi:10.1242/jcs.03453
- Kaelin WG Jr, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell.* 2008;30(4):393-402. doi:10.1016/j.molcel.2008.04.009
- Kaelin WG Jr. The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O₂ sensing and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008 ;8(11):865-873. doi:10.1038/nrc2502
- Kaji T, Yamamoto C, Oh-i M, et al. The vascular endothelial growth factor VEGF165 induces perlecan synthesis via VEGF receptor-2 in cultured human brain microvascular endothelial cells. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1760(9):1465-1474. doi:10.1016/j.bbagen.2006.06.010
- Käll L, Canterbury JD, Weston J, Noble WS, MacCoss MJ. Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. *Nat Methods.* 2007;4(11):923-925. doi:10.1038/nmeth1113
- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Kurisu W, et al. ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(12):5321-5325. doi:10.1073/pnas.89.12.5321
- Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition [published correction appears in *J Clin Invest.* 2010 May 3;120(5):1786]. *J Clin Invest.* 2009;119(6):1420-1428. doi:10.1172/JCI39104
- Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(5):392-401.

doi:10.1038/nrc1877

- Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(6):422-433. doi:10.1038/nrc1094
- Kalscheuer S, Khanna V, Kim H, et al. Discovery of HSPG2 (Perlecan) as a Therapeutic Target in Triple Negative Breast Cancer. *Sci Rep*. 2019;9(1):12492. Published 2019 Aug 28. doi:10.1038/s41598-019-48993-6
- Kamata H, Honda S, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M. Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell*. 2005;120(5):649-661. doi:10.1016/j.cell.2004.12.041
- Kamel EM, Wyss MT, Fehr MK, von Schulthess GK, Goerres GW. [18F]-Fluorodeoxyglucose positron emission tomography in patients with suspected recurrence of breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2003;129(3):147-153. doi:10.1007/s00432-003-0424-z
- Kamphaus GD, Colorado PC, Panka DJ, et al. Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Biol Chem*. 2000;275(2):1209-1215. doi:10.1074/jbc.275.2.1209
- Kamphorst JJ, Cross JR, Fan J, et al. Hypoxic and Ras-transformed cells support growth by scavenging unsaturated fatty acids from lysophospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(22):8882-8887. doi:10.1073/pnas.1307237110
- Kamphorst JJ, Nofal M, Commisso C, et al. Human pancreatic cancer tumors are nutrient poor and tumor cells actively scavenge extracellular protein. *Cancer Res*. 2015;75(3):544-553. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-2211
- Kanalas JJ, Makker SP. Analysis of a 45-kDa protein that binds to the Heymann nephritis autoantigen GP330. *J Biol Chem*. 1993;268(11):8188-8192
- Kanat O, Ertas H. Existing anti-angiogenic therapeutic strategies for patients with metastatic colorectal cancer progressing following first-line bevacizumab-based therapy. *World J Clin Oncol*. 2019;10(2):52-61. doi:10.5306/wjco.v10.i2.52
- Kang HS, Kim J, Lee HJ, Kwon BM, Lee DK, Hong SH. LRP1-dependent pepsin clearance induced by 2'-hydroxycinnamaldehyde attenuates breast cancer cell invasion. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;53:15-23. doi:10.1016/j.biocel.2014.04.021
- Kang KH, Park SY, Rho SB, Lee JH. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 interacts with angiotensin II type 2 receptor and additively inhibits angiogenesis. *Cardiovasc Res*. 2008;79(1):150-160. doi:10.1093/cvr/cvn072
- Kang SY, Halvorsen OJ, Gravidal K, et al. Prosaposin inhibits tumor metastasis via paracrine and endocrine stimulation of stromal p53 and Tsp-1 [published correction appears in *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Sep 8;106(36):15513]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(29):12115-12120. doi:10.1073/pnas.0903120106
- Kaplan SS. Clinical utility of bilateral whole-breast US in the evaluation of women with dense breast tissue. *Radiology*. 2001;221(3):641-649. doi:10.1148/radiol.2213010364
- Kappas NC, Zeng G, Chappell JC, et al. The VEGF receptor Flt-1 spatially modulates Flk-1 signaling and blood vessel branching. *J Cell Biol*. 2008;181(5):847-858. doi:10.1083/jcb.200709114
- Karar J, Maity A. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. *Front Mol Neurosci*. 2011;4:51.

- Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*. 2006;441(7092):431-436. doi:10.1038/nature04870
- Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*. 2007;449(7162):557-563. doi:10.1038/nature06188
- Karsdal MA, Henriksen K, Leeming DJ, Woodworth T, Vassiliadis E, Bay-Jensen AC. Novel combinations of Post-Translational Modification (PTM) neo-epitopes provide tissue-specific biochemical markers--are they the cause or the consequence of the disease?. *Clin Biochem*. 2010;43(10-11):793-804. doi:10.1016/j.clinbiochem.2010.03.015
- Karthik S, Djukic T, Kim JD, et al. Synergistic interaction of sprouting and intussusceptive angiogenesis during zebrafish caudal vein plexus development [published correction appears in *Sci Rep*. 2019 Mar 6;9(1):4152]. *Sci Rep*. 2018;8(1):9840. Published 2018 Jun 29. doi:10.1038/s41598-018-27791-6
- Kaseda R, Iino N, Hosojima M, et al. Megalin-mediated endocytosis of cystatin C in proximal tubule cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;357(4):1130-1134. doi:10.1016/j.bbrc.2007.04.072
- Katz H, Alsharedi M. Immunotherapy in triple-negative breast cancer. *Med Oncol*. 2017;35(1):13. Published 2017 Dec 18. doi:10.1007/s12032-017-1071-6
- Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, et al. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell*. 2000;6(6):1365-1375. doi:10.1016/s1097-2765(00)00134-9
- Kawata K, Eguchi T, Kubota S, et al. Possible role of LRP1, a CCN2 receptor, in chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;345(2):552-559. doi:10.1016/j.bbrc.2006.04.109
- Kawata K, Kubota S, Eguchi T, et al. Role of LRP1 in transport of CCN2 protein in chondrocytes. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 12):2965-2972. doi:10.1242/jcs.101956
- Kazerounian S, Yee KO, Lawler J. Thrombospondins in cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(5):700-712. doi:10.1007/s00018-007-7486-z
- Keene DR, Sakai LY, Lunstrum GP, Morris NP, Burgeson RE. Type VII collagen forms an extended network of anchoring fibrils. *J Cell Biol*. 1987;104(3):611-621. doi:10.1083/jcb.104.3.611
- Kehlen A, Thiele K, Riemann D, Rainov N, Langner J. Interleukin-17 stimulates the expression of IkappaB alpha mRNA and the secretion of IL-6 and IL-8 in glioblastoma cell lines. *J Neuroimmunol*. 1999;101(1):1-6. doi:10.1016/s0165-5728(99)00111-3
- Keilty D, Nezafat Namini S, Swain M, et al. Patterns of Recurrence and Predictors of Survival in Breast Cancer Patients Treated with Neoadjuvant Chemotherapy, Surgery, and Radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2020;108(3):676-685. doi:10.1016/j.ijrobp.2020.04.044
- Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*. 2010;28(20):3271-3277. doi:10.1200/JCO.2009.25.9820
- Kerr MC, Teasdale RD. Defining macropinocytosis. *Traffic*. 2009;10(4):364-371. doi:10.1111/j.1600-0854.2009.00878.x
- Keskin D, Kim J, Cooke VG, et al. Targeting vascular pericytes in hypoxic tumors increases lung metastasis via angiopoietin-2. *Cell Rep*. 2015;10(7):1066-1081. doi:10.1016/j.celrep.2015.01.035
- Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 2010;141(1):52-67. doi:10.1016/j.cell.2010.03.015

- Ketis NV, Lawler J, Hoover RL, Karnovsky MJ. Effects of heat shock on the expression of thrombospondin by endothelial cells in culture. *J Cell Biol.* 1988;106(3):893-904. doi:10.1083/jcb.106.3.893
- Ketterer S, Mitschke J, Ketscher A, et al. Cathepsin D deficiency in mammary epithelium transiently stalls breast cancer by interference with mTORC1 signaling. *Nat Commun.* 2020;11(1):5133. Published 2020 Oct 12. doi:10.1038/s41467-020-18935-2
- Keung MY, Wu Y, Badar F, Vadgama JV. Response of Breast Cancer Cells to PARP Inhibitors Is Independent of BRCA Status. *J Clin Med.* 2020;9(4):940. Published 2020 Mar 30. doi:10.3390/jcm9040940
- Keyt BA, Nguyen HV, Berleau LT, et al. Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem.* 1996;271(10):5638-5646. doi:10.1074/jbc.271.10.5638
- Kim BG, An HJ, Kang S, et al. Laminin-332-rich tumor microenvironment for tumor invasion in the interface zone of breast cancer. *Am J Pathol.* 2011;178(1):373-381. doi:10.1016/j.ajpath.2010.11.028
- Kim KE, Song H, Kim TS, et al. Interleukin-18 is a critical factor for vascular endothelial growth factor-enhanced migration in human gastric cancer cell lines. *Oncogene.* 2007;26(10):1468-1476. doi:10.1038/sj.onc.1209926
- Kim NI, Kim GE, Park MH, Lee JS, Yoon JH. Up-regulation of SPARC is associated with tumor progression and epithelial SPARC expression is correlated with poor survival and MMP-2 expression in patients with breast carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2017;10(3):2675-2688
- Kim YM, Hwang S, Kim YM, et al. Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/Flk-1. *J Biol Chem.* 2002;277(31):27872-27879. doi:10.1074/jbc.M202771200
- Kimura H, Braun RD, Ong ET, et al. Fluctuations in red cell flux in tumor microvessels can lead to transient hypoxia and reoxygenation in tumor parenchyma. *Cancer Res.* 1996;56(23):5522-5528
- King TA, Morrow M. Surgical issues in patients with breast cancer receiving neoadjuvant chemotherapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2015;12(6):335-343. doi:10.1038/nrclinonc.2015.63
- Kinoshita A, Shah T, Tangredi MM, Strickland DK, Hyman BT. The intracellular domain of the low density lipoprotein receptor-related protein modulates transactivation mediated by amyloid precursor protein and Fe65. *J Biol Chem.* 2003;278(42):41182-41188. doi:10.1074/jbc.M306403200
- Kittrell F, Valdez K, Elsarraj H, Hong Y, Medina D, Behbod F. Mouse Mammary Intraductal (MIND) Method for Transplantation of Patient Derived Primary DCIS Cells and Cell Lines. *Bio Protoc.* 2016;6(5):e1744. doi:10.21769/bioprotoc.1744
- Klingberg F, Chow ML, Koehler A, et al. Prestress in the extracellular matrix sensitizes latent TGF- β 1 for activation. *J Cell Biol.* 2014;207(2):283-297. doi:10.1083/jcb.201402006
- Knapinska AM, Fields GB. The Expanding Role of MT1-MMP in Cancer Progression. *Pharmaceuticals (Basel).* 2019;12(2):77. Published 2019 May 20. doi:10.3390/ph12020077
- Kobayashi H, DeBusk LM, Babichev YO, Dumont DJ, Lin PC. Hepatocyte growth factor mediates angiopoietin-induced smooth muscle cell recruitment. *Blood.* 2006;108(4):1260-1266.

- doi:10.1182/blood-2005-09-012807
- Kobiyama K, Ley K. Atherosclerosis. *Circ Res.* 2018;123(10):1118-1120. doi:10.1161/CIRCRESAHA.118.313816
- Kolset SO, Prydz K, Pejler G. Intracellular proteoglycans. *Biochem J.* 2004;379(Pt 2):217-227. doi:10.1042/BJ20031230
- Kong Y, Qu F, Yuan X, Yan X, Yu W. Effect of Bicalutamide on the proliferation and invasion of human triple negative breast cancer MDA-MB-231 cells. *Medicine (Baltimore).* 2020;99(17):e19822. doi:10.1097/MD.00000000000019822
- Kounnas MZ, Moir RD, Rebeck GW, et al. LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted beta-amyloid precursor protein and mediates its degradation. *Cell.* 1995;82(2):331-340. doi:10.1016/0092-8674(95)90320-8
- Koyama H, Hibi T, Isogai Z, et al. Hyperproduction of hyaluronan in neu-induced mammary tumor accelerates angiogenesis through stromal cell recruitment: possible involvement of versican/PG-M. *Am J Pathol.* 2007;170(3):1086-1099. doi:10.2353/ajpath.2007.060793
- Krady MM, Zeng J, Yu J, et al. Thrombospondin-2 modulates extracellular matrix remodeling during physiological angiogenesis. *Am J Pathol.* 2008;173(3):879-891. doi:10.2353/ajpath.2008.080128
- Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell.* 2014 Mar 6;14(3):275-91. doi: 10.1016/j.stem.2014.02.006. PMID: 24607403.
- Kriege M, Brekelmans CT, Boetes C, et al. Efficacy of MRI and mammography for breast-cancer screening in women with a familial or genetic predisposition. *N Engl J Med.* 2004;351(5):427-437. doi:10.1056/NEJMoa031759
- Krishna BM, Jana S, Singhal J, et al. Notch signaling in breast cancer: From pathway analysis to therapy. *Cancer Lett.* 2019;461:123-131. doi:10.1016/j.canlet.2019.07.012
- Kuczynski EA, Vermeulen PB, Pezzella F, Kerbel RS, Reynolds AR. Vessel co-option in cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2019;16(8):469-493. doi:10.1038/s41571-019-0181-9
- Kudo Y, Iizuka S, Yoshida M, et al. Matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) directly and indirectly promotes tumor angiogenesis. *J Biol Chem.* 2012;287(46):38716-38728. doi:10.1074/jbc.M112.373159
- Kullander K, Klein R. Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(7):475-486. doi:10.1038/nrm856
- Kurz H, Gärtner T, Egli PS, Christ B. First blood vessels in the avian neural tube are formed by a combination of dorsal angioblast immigration and ventral sprouting of endothelial cells. *Dev Biol.* 1996;173(1):133-147. doi:10.1006/dbio.1996.0012
- Kuskunović-Vlahovljak S, Čamdžić N, Radović S et al. Is the expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, -9) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, -2, and -3) associated with angiogenesis and clinicopathological features for breast cancer? *Journal of Health Sciences* 2017;7(3):158-168. Doi:10.17532/jhsci.2017.460
- Kyriakides TR, Zhu YH, Smith LT, et al. Mice that lack thrombospondin 2 display connective tissue abnormalities that are associated with disordered collagen fibrillogenesis, an increased vascular density, and a bleeding diathesis. *J Cell Biol.* 1998;140(2):419-430. doi:10.1083/jcb.140.2.419
- Lafleur MA, Forsyth PA, Atkinson SJ, Murphy G, Edwards DR. Perivascular cells regulate endothelial membrane type-1 matrix metalloproteinase activity. *Biochem Biophys Res Commun.*

- 2001;282(2):463-473. doi:10.1006/bbrc.2001.4596
- Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ (eds.). WHO classification of tumours of the breast. 4th ed.IARC:Lyon 2012
- Lakhani SR, Reis-Filho JS, Fulford L, et al. Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. *Clin Cancer Res.* 2005;11(14):5175-5180. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-2424
- Lal M, Caplan M. Regulated intramembrane proteolysis: signaling pathways and biological functions. *Physiology (Bethesda).* 2011;26(1):34-44. doi:10.1152/physiol.00028.2010
- Lam DL, Houssami N, Lee JM. Imaging Surveillance After Primary Breast Cancer Treatment. *AJR Am J Roentgenol.* 2017;208(3):676-686. doi:10.2214/AJR.16.16300
- Lamallice L, Le Boeuf F, Huot J. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res.* 2007;100(6):782-794. doi:10.1161/01.RES.0000259593.07661.1e
- Lambert AW, Wong CK, Ozturk S, et al. Tumor Cell-Derived Periostin Regulates Cytokines That Maintain Breast Cancer Stem Cells. *Mol Cancer Res.* 2016;14(1):103-113. doi:10.1158/1541-7786.MCR-15-0079
- Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(3):178-196. doi:10.1038/nrm3758
- Lange C, Storkebaum E, de Almodóvar CR, Dewerchin M, Carmeliet P. Vascular endothelial growth factor: a neurovascular target in neurological diseases. *Nat Rev Neurol.* 2016;12(8):439-454. doi:10.1038/nrneurol.2016.88
- Langer EM, Kendsersky ND, Daniel CJ, et al. ZEB1-repressed microRNAs inhibit autocrine signaling that promotes vascular mimicry of breast cancer cells. *Oncogene.* 2018;37(8):1005-1019. doi:10.1038/onc.2017.356
- Langlois B, Emonard H, Martiny L, Dedieu S. Implications multiples du récepteur LRP-1 dans la progression tumorale [Multiple involvements of LRP-1 receptor in tumor progression]. *Pathol Biol (Paris).* 2009;57(7-8):548-554. doi:10.1016/j.patbio.2008.07.015
- Langlois B, Perrot G, Schneider C, et al. LRP-1 promotes cancer cell invasion by supporting ERK and inhibiting JNK signaling pathways. *PLoS One.* 2010;5(7):e11584. Published 2010 Jul 14. doi:10.1371/journal.pone.0011584
- Laplane L, Solary É. Identité des cellules souches normales et cancéreuses [The identity of normal and cancer stem cells]. *Med Sci (Paris).* 2017;33(10):899-904. doi:10.1051/medsci/20173310023
- Laplane L. Cancer stem cells: Philosophy and therapies. Cambridge, MA: Harvard University Press, 2016.
- Larsen M, Wei C, Yamada KM. Cell and fibronectin dynamics during branching morphogenesis. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 16):3376-3384. doi:10.1242/jcs.03079
- Lasfargues E, Ozzello L. Cultivation of human breast carcinomas. *J Natl Cancer Inst.* 1958;21(6):1131-1147.
- Latacz E, Caspani E, Barnhill R, et al. Pathological features of vessel co-option versus sprouting angiogenesis. *Angiogenesis.* 2020;23(1):43-54. doi:10.1007/s10456-019-09690-0
- Law RH, Abu-Ssaydeh D, Whisstock JC. New insights into the structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Curr Opin Struct Biol.* 2013;23(6):836-841. doi:10.1016/j.sbi.2013.10.006

- Law RH, Zhang Q, McGowan S, et al. An overview of the serpin superfamily. *Genome Biol.* 2006;7(5):216. doi:10.1186/gb-2006-7-5-216
- Lawler J, Weinstein R, Hynes RO. Cell attachment to thrombospondin: the role of ARG-GLY-ASP, calcium, and integrin receptors. *J Cell Biol.* 1988;107(6 Pt 1):2351-2361. doi:10.1083/jcb.107.6.2351
- Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(11):750-761. Published 2011 Oct 25. doi:10.1038/nri3088
- Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(5):383-396. Published 2012 Apr 25. doi:10.1038/nri3209
- Le Blanc K. Mesenchymal stromal cells: Tissue repair and immune modulation. *Cytotherapy.* 2006;8(6):559-561. doi:10.1080/14653240601045399
- Le Bourhis X, Romon R, Hondermarck H. Role of endothelial progenitor cells in breast cancer angiogenesis: from fundamental research to clinical ramifications. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;120(1):17-24. doi:10.1007/s10549-009-0686-5
- Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science.* 1996;271(5256):1734-1736. doi:10.1126/science.271.5256.1734
- LeBleu VS, Macdonald B, Kalluri R. Structure and function of basement membranes. *Exp Biol Med (Maywood).* 2007;232(9):1121-1129. doi:10.3181/0703-MR-72
- Lebrand C, Dent EW, Strasser GA, et al. Critical role of Ena/VASP proteins for filopodia formation in neurons and in function downstream of netrin-1. *Neuron.* 2004;42(1):37-49. doi:10.1016/s0896-6273(04)00108-4
- Lee H, Park BC, Soon Kang J, Cheon Y, Lee S, Jae Maeng P. MAM domain containing 2 is a potential breast cancer biomarker that exhibits tumour-suppressive activity. *Cell Prolif.* 2020;53(9):e12883. doi:10.1111/cpr.12883
- Lee KC, Moffat BA, Schott AF, et al. Prospective early response imaging biomarker for neoadjuvant breast cancer chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2007;13(2 Pt 1):443-450. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1888
- Lee KM, Nam K, Oh S, et al. Extracellular matrix protein 1 regulates cell proliferation and trastuzumab resistance through activation of epidermal growth factor signaling [published correction appears in *Breast Cancer Res.* 2019 Mar 26;21(1):45]. *Breast Cancer Res.* 2014;16(6):479. Published 2014 Dec 11. doi:10.1186/s13058-014-0479-6
- Lee Y, Jung WH, Koo JS. Adipocytes can induce epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2015;153(2):323-335. doi:10.1007/s10549-015-3550-9
- Lefort S, Joffre C, Kieffer Y, et al. Inhibition of autophagy as a new means of improving chemotherapy efficiency in high-LC3B triple-negative breast cancers. *Autophagy.* 2014;10(12):2122-2142. doi:10.4161/15548627.2014.981788
- Lehman CD. Role of MRI in screening women at high risk for breast cancer. *J Magn Reson Imaging.* 2006;24(5):964-970. doi:10.1002/jmri.20752
- Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest.* 2011;121(7):2750-2767. doi:10.1172/JCI45014
- Lehmann BD, Bauer JA, Schafer JM, et al. PIK3CA mutations in androgen receptor-positive triple

- negative breast cancer confer sensitivity to the combination of PI3K and androgen receptor inhibitors. *Breast Cancer Res.* 2014;16(4):406. Published 2014 Aug 8. doi:10.1186/s13058-014-0406-x
- Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, et al. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PLoS One.* 2016;11(6):e0157368. Published 2016 Jun 16. doi:10.1371/journal.pone.0157368
- Lenard A, Ellertsdottir E, Herwig L, et al. In vivo analysis reveals a highly stereotypic morphogenetic pathway of vascular anastomosis. *Dev Cell.* 2013;25(5):492-506. doi:10.1016/j.devcel.2013.05.010
- Leslie PL, Franklin DA, Liu Y, Zhang Y. p53 Regulates the Expression of LRP1 and Apoptosis through a Stress Intensity-Dependent MicroRNA Feedback Loop. *Cell Rep.* 2018;24(6):1484-1495. doi:10.1016/j.celrep.2018.07.010
- Leung EY, Askarian-Amiri ME, Singleton DC, et al. Derivation of Breast Cancer Cell Lines Under Physiological (5%) Oxygen Concentrations. *Front Oncol.* 2018;8:425. Published 2018 Oct 12. doi:10.3389/fonc.2018.00425
- Lev S. Targeted therapy and drug resistance in triple-negative breast cancer: the EGFR axis. *Biochem Soc Trans.* 2020;48(2):657-665. doi:10.1042/BST20191055
- Levental KR, Yu H, Kass L, et al. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell.* 2009;139(5):891-906. doi:10.1016/j.cell.2009.10.027
- Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol.* 2003;170(6):3369-3376. doi:10.4049/jimmunol.170.6.3369
- Li G, Jin R, Norris RA, et al. Periostin mediates vascular smooth muscle cell migration through the integrins α 5 β 3 and α 5 β 1 and focal adhesion kinase (FAK) pathway. *Atherosclerosis.* 2010;208(2):358-365. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.07.046
- Li H, Qiu Z, Li F, Wang C. The relationship between MMP-2 and MMP-9 expression levels with breast cancer incidence and prognosis. *Oncol Lett.* 2017;14(5):5865-5870. doi:10.3892/ol.2017.6924
- Li J, Stanger BZ. The tumor as organizer model. *Science.* 2019;363(6431):1038-1039. doi:10.1126/science.aau9861
- Li Q, Lao X, Pan Q, et al. Adoptive transfer of tumor reactive B cells confers host T-cell immunity and tumor regression. *Clin Cancer Res.* 2011;17(15):4987-4995. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0207
- Li RX, Chen ZH, Chen ZK. The role of EPH receptors in cancer-related epithelial-mesenchymal transition. *Chin J Cancer.* 2014;33(5):231-240. doi:10.5732/cjc.013.10108
- Li Y, Marzolo MP, van Kerkhof P, Strous GJ, Bu G. The YXXL motif, but not the two NPXY motifs, serves as the dominant endocytosis signal for low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem.* 2000;275(22):17187-17194. doi:10.1074/jbc.M000490200
- Li Z, Dai J, Zheng H, Liu B, Caudill M. An integrated view of the roles and mechanisms of heat shock protein gp96-peptide complex in eliciting immune response. *Front Biosci.* 2002;7:d731-d751. Published 2002 Mar 1. doi:10.2741/a808
- Li ZY, Zhang Z, Cao XZ, Feng Y, Ren SS. Platinum-based neoadjuvant chemotherapy for triple-

- negative breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Int Med Res.* 2020;48(10):300060520964340. doi:10.1177/0300060520964340
- Liao D, Johnson RS. Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2007;26(2):281-290. doi:10.1007/s10555-007-9066-y
- Lillis AP, Greenlee MC, Mikhailenko I, et al. Murine low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP) is required for phagocytosis of targets bearing LRP ligands but is not required for C1q-triggered enhancement of phagocytosis. *J Immunol.* 2008b ;181(1):364-373. doi:10.4049/jimmunol.181.1.364
- Lillis AP, Mikhailenko I, Strickland DK. Beyond endocytosis: LRP function in cell migration, proliferation and vascular permeability. *J Thromb Haemost.* 2005;3(8):1884-1893. doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01371.x
- Lillis AP, Muratoglu SC, Au DT, et al. LDL Receptor-Related Protein-1 (LRP1) Regulates Cholesterol Accumulation in Macrophages [published correction appears in *PLoS One.* 2016;11(1):e0147457]. *PLoS One.* 2015;10(6):e0128903. Published 2015 Jun 10. doi:10.1371/journal.pone.0128903
- Lillis AP, Van Duyn LB, Murphy-Ullrich JE, Strickland DK. LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiol Rev.* 2008a ;88(3):887-918. doi:10.1152/physrev.00033.2007
- Lim SO, Li CW, Xia W, et al. EGFR Signaling Enhances Aerobic Glycolysis in Triple-Negative Breast Cancer Cells to Promote Tumor Growth and Immune Escape. *Cancer Res.* 2016;76(5):1284-1296. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-2478
- Lin EY, Jones JG, Li P, et al. Progression to malignancy in the polyoma middle T oncoprotein mouse breast cancer model provides a reliable model for human diseases. *Am J Pathol.* 2003;163(5):2113-2126. doi:10.1016/S0002-9440(10)63568-7
- Lin P, Wang W, Sun BC, et al. Vasculogenic mimicry is a key prognostic factor for laryngeal squamous cell carcinoma: a new pattern of blood supply. *Chin Med J (Engl).* 2012;125(19):3445-3449
- Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest.* 2000;105(1):71-77. doi:10.1172/JCI8071
- Lindhahl P, Johansson BR, Levéen P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science.* 1997;277(5323):242-245. doi:10.1126/science.277.5323.242
- Linderholm B, Tavelin B, Grankvist K, Henriksson R. Does vascular endothelial growth factor (VEGF) predict local relapse and survival in radiotherapy-treated node-negative breast cancer?. *Br J Cancer.* 1999;81(4):727-732. doi:10.1038/sj.bjc.6690755
- Linderholm BK, Hellborg H, Johansson U, et al. Significantly higher levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and shorter survival times for patients with primary operable triple-negative breast cancer. *Ann Oncol.* 2009;20(10):1639-1646. doi:10.1093/annonc/mdp062
- Lindsten T, Ross AJ, King A, et al. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell.* 2000;6(6):1389-1399. doi:10.1016/s1097-2765(00)00136-2
- Lisle JE, Mertens-Walker I, Rutkowski R, Herington AC, Stephenson SA. Eph receptors and their ligands: promising molecular biomarkers and therapeutic targets in prostate cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1835(2):243-257. doi:10.1016/j.bbcan.2013.01.003

- Litton JK, Rugo HS, Ettl J, et al. Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline BRCA Mutation. *N Engl J Med*. 2018;379(8):753-763. doi:10.1056/NEJMoa1802905
- Litvin J, Selim AH, Montgomery MO, et al. Expression and function of periostin-isoforms in bone. *J Cell Biochem*. 2004;92(5):1044-1061. doi:10.1002/jcb.20115
- Liu CX, Ranganathan S, Robinson S, Strickland DK. gamma-Secretase-mediated release of the low density lipoprotein receptor-related protein 1B intracellular domain suppresses anchorage-independent growth of neuroglioma cells. *J Biol Chem*. 2007;282(10):7504-7511. doi:10.1074/jbc.M608088200
- Liu J, Liao S, Huang Y, et al. PDGF-D improves drug delivery and efficacy via vascular normalization, but promotes lymphatic metastasis by activating CXCR4 in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2011a ;17(11):3638-3648. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2456
- Liu J, Liu Q, Li Y, et al. Efficacy and safety of camrelizumab combined with apatinib in advanced triple-negative breast cancer: an open-label phase II trial. *J Immunother Cancer*. 2020 ;8(1):e000696. doi:10.1136/jitc-2020-000696
- Liu L, Wang Y, Miao L, et al. Combination Immunotherapy of MUC1 mRNA Nano-vaccine and CTLA-4 Blockade Effectively Inhibits Growth of Triple Negative Breast Cancer. *Mol Ther*. 2018b ;26(1):45-55. doi:10.1016/j.ymthe.2017.10.020
- Liu R, Yang K, Meng C, Zhang Z, Xu Y. Vasculogenic mimicry is a marker of poor prognosis in prostate cancer. *Cancer Biol Ther*. 2012 ;13(7):527-533. doi:10.4161/cbt.19602
- Liu S, Ginestier C, Ou SJ, et al. Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks [published correction appears in *Cancer Res*. 2011 Mar 15;71(6):2407]. *Cancer Res*. 2011b ;71(2):614-624. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0538
- Liu S, González-Prieto R, Zhang M, et al. Deubiquitinase Activity Profiling Identifies UCHL1 as a Candidate Oncoprotein That Promotes TGF β -Induced Breast Cancer Metastasis. *Clin Cancer Res*. 2020;26(6):1460-1473. doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-1373
- Liu T, Zhou L, Li D, Andl T, Zhang Y. Cancer-Associated Fibroblasts Build and Secure the Tumor Microenvironment. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:60. Published 2019 Apr 24. doi:10.3389/fcell.2019.00060
- Liu Y, Cao X. Characteristics and Significance of the Pre-metastatic Niche. *Cancer Cell*. 2016;30(5):668-681. doi:10.1016/j.ccell.2016.09.011
- Liu Y, Islam EA, Jarvis GA, Gray-Owen SD, Russell MW. *Neisseria gonorrhoeae* selectively suppresses the development of Th1 and Th2 cells, and enhances Th17 cell responses, through TGF- β -dependent mechanisms. *Mucosal Immunol*. 2012a ;5(3):320-331. doi:10.1038/mi.2012.12
- Liu Z, Li M, Jiang Z, Wang X. A Comprehensive Immunologic Portrait of Triple-Negative Breast Cancer. *Transl Oncol*. 2018a ;11(2):311-329. doi:10.1016/j.tranon.2018.01.011
- Lo CM, Wang HB, Dembo M, Wang YL. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J*. 2000;79(1):144-152. doi:10.1016/S0006-3495(00)76279-5
- Locatelli M, Curigliano G. Notch inhibitors and their role in the treatment of triple negative breast cancer: promises and failures. *Curr Opin Oncol*. 2017a ;29(6):411-427. doi:10.1097/CCO.0000000000000406
- Locatelli MA, Aftimos P, Dees EC, et al. Phase I study of the gamma secretase inhibitor PF-

- 03084014 in combination with docetaxel in patients with advanced triple-negative breast cancer. *Oncotarget*. 2017b ;8(2):2320-2328. doi:10.18632/oncotarget.13727
- Loibl S, Weber KE, Timms KM, et al. Survival analysis of carboplatin added to an anthracycline/taxane-based neoadjuvant chemotherapy and HRD score as predictor of response-final results from GeparSixto. *Ann Oncol*. 2018;29(12):2341-2347. doi:10.1093/annonc/mdy460
- Lombardo Y, de Giorgio A, Coombes CR, Stebbing J, Castellano L. Mammosphere formation assay from human breast cancer tissues and cell lines. *J Vis Exp*. 2015;(97):52671. Published 2015 Mar 22. doi:10.3791/52671
- Loo JM, Scherl A, Nguyen A, et al. Extracellular metabolic energetics can promote cancer progression. *Cell*. 2015;160(3):393-406. doi:10.1016/j.cell.2014.12.018
- López-Otín C, Bond JS. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J Biol Chem*. 2008;283(45):30433-30437. doi:10.1074/jbc.R800035200
- Lord CJ, Tutt AN, Ashworth A. Synthetic lethality and cancer therapy: lessons learned from the development of PARP inhibitors. *Annu Rev Med*. 2015;66:455-470. doi:10.1146/annurev-med-050913-022545
- Loukinova E, Ranganathan S, Kuznetsov S, et al. Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced tyrosine phosphorylation of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence for integrated co-receptor function between LRP and the PDGF. *J Biol Chem*. 2002;277(18):15499-15506. doi:10.1074/jbc.M200427200
- Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature*. 2004;432(7015):307-315. doi:10.1038/nature03098
- Lu CW, Lo YH, Chen CH, et al. VLDL and LDL, but not HDL, promote breast cancer cell proliferation, metastasis and angiogenesis. *Cancer Lett*. 2017;388:130-138. doi:10.1016/j.canlet.2016.11.033
- Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(12):a005058. Published 2011 Dec 1. doi:10.1101/cshperspect.a005058
- Lu X, Kang Y. Organotropism of breast cancer metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2007 Sep;12(2-3):153-62. doi: 10.1007/s10911-007-9047-3. PMID: 17566854.
- Lu Z, Jiao D, Qiao J, et al. Restin suppressed epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis in breast cancer cells through upregulating mir-200a/b expression via association with p73. *Mol Cancer*. 2015;14:102. Published 2015 May 14. doi:10.1186/s12943-015-0370-9
- Luen SJ, Savas P, Fox SB, Salgado R, Loi S. Tumour-infiltrating lymphocytes and the emerging role of immunotherapy in breast cancer. *Pathology*. 2017;49(2):141-155. doi:10.1016/j.pathol.2016.10.010
- Lugano R, Ramachandran M, Dimberg A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell Mol Life Sci*. 2020;77(9):1745-1770. doi:10.1007/s00018-019-03351-7
- Lugo-Cintrón KM, Gong MM, Ayuso JM, et al. Breast Fibroblasts and ECM Components Modulate Breast Cancer Cell Migration Through the Secretion of MMPs in a 3D Microfluidic Co-Culture Model. *Cancers (Basel)*. 2020;12(5):1173. Published 2020 May 6. doi:10.3390/cancers12051173
- Lukashev ME, Werb Z. ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell*

- Biol. 1998;8(11):437-441. doi:10.1016/s0962-8924(98)01362-2
- Lum JJ, Bauer DE, Kong M, et al. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*. 2005;120(2):237-248. doi:10.1016/j.cell.2004.11.046
- Luo L, Gao W, Wang J, et al. Study on the Mechanism of Cell Cycle Checkpoint Kinase 2 (CHEK2) Gene Dysfunction in Chemotherapeutic Drug Resistance of Triple Negative Breast Cancer Cells. *Med Sci Monit*. 2018;24:3176-3183. Published 2018a May 15. doi:10.12659/MSM.907256
- Luo L, Wall AA, Tong SJ, et al. TLR Crosstalk Activates LRP1 to Recruit Rab8a and PI3K γ for Suppression of Inflammatory Responses. *Cell Rep*. 2018b ;24(11):3033-3044. doi:10.1016/j.celrep.2018.08.028
- Luo M, Hou L, Li J, et al. VEGF/NRP-1axis promotes progression of breast cancer via enhancement of epithelial-mesenchymal transition and activation of NF- κ B and β -catenin. *Cancer Lett*. 2016;373(1):1-11. doi:10.1016/j.canlet.2016.01.010
- Luo XL, Lin L, Hu H, et al. Development and characterization of mammary intraductal (MIND) spontaneous metastasis models for triple-negative breast cancer in syngeneic mice. *Sci Rep*. 2020;10(1):4681. Published 2020 Mar 13. doi:10.1038/s41598-020-61679-8
- Ma Z, Thomas KS, Webb DJ, et al. Regulation of Rac1 activation by the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Cell Biol*. 2002;159(6):1061-1070. doi:10.1083/jcb.200207070
- Madu CO, Wang S, Madu CO, Lu Y. Angiogenesis in Breast Cancer Progression, Diagnosis, and Treatment. *J Cancer*. 2020;11(15):4474-4494. Published 2020 May 18. doi:10.7150/jca.44313
- Maeda H, Akaike T. Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochemistry (Mosc)*. 1998;63(7):854-865
- Maeda H, Fang J, Inutsuka T, Kitamoto Y. Vascular permeability enhancement in solid tumor: various factors, mechanisms involved and its implications. *Int Immunopharmacol*. 2003;3(3):319-328. doi:10.1016/S1567-5769(02)00271-0
- Maeda H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Adv Enzyme Regul*. 2001;41:189-207. doi:10.1016/s0065-2571(00)00013-3
- Maeshima Y, Colorado PC, Torre A, et al. Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane. *J Biol Chem*. 2000;275(28):21340-21348. doi:10.1074/jbc.M001956200
- Maeshima Y, Manfredi M, Reimer C, et al. Identification of the anti-angiogenic site within vascular basement membrane-derived tumstatin. *J Biol Chem*. 2001;276(18):15240-15248. doi:10.1074/jbc.M007764200
- Maeshima Y, Sudhakar A, Lively JC, et al. Tumstatin, an endothelial cell-specific inhibitor of protein synthesis. *Science*. 2002;295(5552):140-143. doi:10.1126/science.1065298
- Maffey A, Storini C, Diceglie C, et al. Mesenchymal stem cells from tumor microenvironment favour breast cancer stem cell proliferation, cancerogenic and metastatic potential, via ionotropic purinergic signalling. *Sci Rep*. 2017;7(1):13162. Published 2017 Oct 13. doi:10.1038/s41598-017-13460-7
- Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico MG. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(20):9267-9271. doi:10.1073/pnas.88.20.9267

- Magnon C, Galaup A, Mullan B, et al. Canstatin acts on endothelial and tumor cells via mitochondrial damage initiated through interaction with $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha 5\beta 3$ integrins [published correction appears in *Cancer Res.* 2005 Jul 1;65(13):5989. Bouquet, Céline [added]]. *Cancer Res.* 2005;65(10):4353-4361. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3536
- Majewski IJ, Nuciforo P, Mitternpergher L, et al. PIK3CA mutations are associated with decreased benefit to neoadjuvant human epidermal growth factor receptor 2-targeted therapies in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2015;33(12):1334-1339. doi:10.1200/JCO.2014.55.2158
- Malagobadan S, Nagoor NH. Evaluation of MicroRNAs Regulating Anoikis Pathways and Its Therapeutic Potential. *Biomed Res Int.* 2015;2015:716816. doi:10.1155/2015/716816
- Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(3):153-166. doi:10.1038/nrc2602
- Mamoor S. Laminin 4 is differentially expressed in metastatic breast cancer, both in metastases to the brain and to the lymph nodes. [Internet]. OSF Preprints; 2020. Available from: osf.io/b4kdr
- Mana G, Clapero F, Panieri E, et al. PPFIA1 drives active $\alpha 5\beta 1$ integrin recycling and controls fibronectin fibrillogenesis and vascular morphogenesis. *Nat Commun.* 2016;7:13546. Published 2016 Nov 23. doi:10.1038/ncomms13546
- Mancuso MR, Davis R, Norberg SM, et al. Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition. *J Clin Invest.* 2006;116(10):2610-2621. doi:10.1172/JCI24612
- Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.* 2008;133(4):704-715. doi:10.1016/j.cell.2008.03.027
- Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol.* 1999;155(3):739-752. doi:10.1016/S0002-9440(10)65173-5
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature.* 2008 Jul 24;454(7203):436-44. doi: 10.1038/nature07205. PMID: 18650914
- Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today.* 1992 Jul;13(7):265-70. doi: 10.1016/0167-5699(92)90008-U. PMID: 1388654
- Mantovani A. Cancer: inflammation by remote control. *Nature.* 2005;435(7043):752-753. doi:10.1038/435752a
- Mao H, Lockyer P, Townley-Tilson WH, Xie L, Pi X. LRP1 Regulates Retinal Angiogenesis by Inhibiting PARP-1 Activity and Endothelial Cell Proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016;36(2):350-360. doi:10.1161/ATVBAHA.115.306713
- Maquart FX, Siméon A, Pasco S, Monboisse JC. Régulation de l'activité cellulaire par la matrice extracellulaire: le concept de matrikines [Regulation of cell activity by the extracellular matrix: the concept of matrikines]. *J Soc Biol.* 1999;193(4-5):423-428.
- Margosio B, Marchetti D, Vergani V, et al. Thrombospondin 1 as a scavenger for matrix-associated fibroblast growth factor 2. *Blood.* 2003;102(13):4399-4406. doi:10.1182/blood-2003-03-0893
- Mariman EC, Wang P. Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(8):1277-1292. doi:10.1007/s00018-010-0263-4
- Marinovich ML, Hunter KE, Macaskill P, Houssami N. Breast Cancer Screening Using Tomosynthesis or Mammography: A Meta-analysis of Cancer Detection and Recall. *J Natl Cancer Inst.* 2018;110(9):942-949. doi:10.1093/jnci/djy121

- Marion Jenty. Rôle de la signalisation LRP1/Wnt5a dans le métabolisme du cholestérol. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Strasbourg, 2016. Français. NNT : 2016STRAJ025 . tel-01492892
- Marsico G, Russo L, Quondamatteo F, Pandit A. Glycosylation and Integrin Regulation in Cancer. Trends Cancer. 2018 Aug;4(8):537-552. doi: 10.1016/j.trecan.2018.05.009. Epub 2018 Jun 22. PMID: 30064662
- Martin TA, Ye L, Sanders AJ, et al. Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective. In: Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK164700/>
- Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 2014;6:13. Published 2014 Mar 3. doi:10.12703/P6-13
- Martinez-Ledesma E, Verhaak RG, Treviño V. Identification of a multi-cancer gene expression biomarker for cancer clinical outcomes using a network-based algorithm. Sci Rep. 2015;5:11966. Published 2015 Jul 23. doi:10.1038/srep11966
- Martiny-Baron G, Holzer P, Billy E, et al. The small molecule specific EphB4 kinase inhibitor NVP-BHG712 inhibits VEGF driven angiogenesis. Angiogenesis. 2010;13(3):259-267. doi:10.1007/s10456-010-9183-z
- Marusyk A, Almendro V, Polyak K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer?. Nat Rev Cancer. 2012;12(5):323-334. Published 2012 Apr 19. doi:10.1038/nrc3261
- Matsuda K, Ohga N, Hida Y, et al. Isolated tumor endothelial cells maintain specific character during long-term culture. Biochem Biophys Res Commun. 2010;394(4):947-954. doi:10.1016/j.bbrc.2010.03.089
- Matsumoto Y, Nichols JW, Toh K, et al. Vascular bursts enhance permeability of tumour blood vessels and improve nanoparticle delivery. Nat Nanotechnol. 2016;11(6):533-538. doi:10.1038/nnano.2015.342
- Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. Cancer Res. 1986;46(12 Pt 1):6387-6392.
- Matsuo Y, Ochi N, Sawai H, et al. CXCL8/IL-8 and CXCL12/SDF-1alpha co-operatively promote invasiveness and angiogenesis in pancreatic cancer. Int J Cancer. 2009;124(4):853-861. doi:10.1002/ijc.24040
- Maxhimer JB, Shih HB, Isenberg JS, Miller TW, Roberts DD. Thrombospondin-1/CD47 blockade following ischemia-reperfusion injury is tissue protective. Plast Reconstr Surg. 2009;124(6):1880-1889. doi:10.1097/PRS.0b013e3181bceec3
- Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM, et al. Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(15):8104-8109. doi:10.1073/pnas.94.15.8104
- May P, Woldt E, Matz RL, Boucher P. The LDL receptor-related protein (LRP) family: an old family of proteins with new physiological functions. Ann Med. 2007;39(3):219-228. doi:10.1080/07853890701214881
- May P. The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 in inflammation. Curr Opin Lipidol. 2013;24(2):134-137. doi:10.1097/MOL.0b013e32835e809c

- Mazzieri R, Pucci F, Moi D, et al. Targeting the ANG2/TIE2 axis inhibits tumor growth and metastasis by impairing angiogenesis and disabling rebounds of proangiogenic myeloid cells. *Cancer Cell*. 2011;19(4):512-526. doi:10.1016/j.ccr.2011.02.005
- McCormack VA, dos Santos Silva I. Breast density and parenchymal patterns as markers of breast cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15(6):1159-1169. doi:10.1158/1055-9965.EPI-06-0034
- McCubrey JA, Davis NM, Abrams SL, et al. Targeting breast cancer initiating cells: advances in breast cancer research and therapy. *Adv Biol Regul*. 2014;56:81-107. doi:10.1016/j.jbior.2014.05.003
- McDonald DM, Baluk P. Imaging of angiogenesis in inflamed airways and tumors: newly formed blood vessels are not alike and may be wildly abnormal: Parker B. Francis lecture. *Chest*. 2005;128(6 Suppl):602S-608S. doi:10.1378/chest.128.6_suppl.602S-a
- McDonald JA, Quade BJ, Broekelmann TJ, et al. Fibronectin's cell-adhesive domain and an amino-terminal matrix assembly domain participate in its assembly into fibroblast pericellular matrix. *J Biol Chem*. 1987;262(7):2957-2967.
- McGarvey T, Hussain MM, Stearns ME. In situ hybridization studies of alpha 2-macroglobulin receptor and receptor-associated protein in human prostate carcinoma. *Prostate*. 1996;28(5):311-317. doi:10.1002/(SICI)1097-0045(199605)28:5<311::AID-PROS7>3.0.CO;2-E
- McMahon B, Block J, Block T, et al. Hepatitis-Associated Liver Cancer: Gaps and Opportunities to Improve Care. *J Natl Cancer Inst*. 2015;108(4):djv359. Published 2015 Nov 30. doi:10.1093/jnci/djv359
- Mecham RP, Gibson MA. The microfibril-associated glycoproteins (MAGPs) and the microfibrillar niche. *Matrix Biol*. 2015;47:13-33. doi:10.1016/j.matbio.2015.05.003
- Meng H, Chen G, Zhang X, et al. Stromal LRP1 in lung adenocarcinoma predicts clinical outcome. *Clin Cancer Res*. 2011;17(8):2426-2433. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2385
- Meng L, Xu Y, Xu C, Zhang W. Biomarker discovery to improve prediction of breast cancer survival: using gene expression profiling, meta-analysis, and tissue validation. *Onco Targets Ther*. 2016;9:6177-6185. Published 2016 Oct 11. doi:10.2147/OTT.S113855
- Merdzhanova G, Gout S, Keramidas M, et al. The transcription factor E2F1 and the SR protein SC35 control the ratio of pro-angiogenic versus antiangiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor-A to inhibit neovascularization in vivo. *Oncogene*. 2010;29(39):5392-5403. doi:10.1038/onc.2010.281
- Merhi M, Raynal H, Cahuzac E, Vinson F, Cravedi JP, Gamet-Payrastre L. Occupational exposure to pesticides and risk of hematopoietic cancers: meta-analysis of case-control studies. *Cancer Causes Control*. 2007;18(10):1209-1226. doi:10.1007/s10552-007-9061-1
- Merritt WM, Kamat AA, Hwang JY, et al. Clinical and biological impact of EphA2 overexpression and angiogenesis in endometrial cancer. *Cancer Biol Ther*. 2010;10(12):1306-1314. doi:10.4161/cbt.10.12.13582
- Michea P, Noël F, Zakine E, Czerwinska U, Sirven P, Abouzid O, Goudot C, Scholer-Dahirel A, Vincent-Salomon A, Reyat F, Amigorena S, Guillot-Delost M, Segura E, Soumelis V. Adjustment of dendritic cells to the breast-cancer microenvironment is subset specific. *Nat Immunol*. 2018 Aug;19(8):885-897. doi: 10.1038/s41590-018-0145-8. Epub 2018 Jul 16. PMID: 30013147

- Michmerhuizen AR, Chandler B, Olsen E, et al. Seviteronel, a Novel CYP17 Lyase Inhibitor and Androgen Receptor Antagonist, Radiosensitizes AR-Positive Triple Negative Breast Cancer Cells. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:35. Published 2020 Feb 11. doi:10.3389/fendo.2020.00035
- Mierke CT. Role of the endothelium during tumor cell metastasis: is the endothelium a barrier or a promoter for cell invasion and metastasis?. *J Biophys*. 2008;2008:183516. doi:10.1155/2008/183516
- Milewicz DM, Trybus KM, Guo DC, et al. Altered Smooth Muscle Cell Force Generation as a Driver of Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections [published correction appears in *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017 Feb;37(2):e12]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(1):26-34. doi:10.1161/ATVBAHA.116.303229
- Miliol HH, Tishchenko I, Riveros C, Berretta R, Moscato P. Basal-like breast cancer: molecular profiles, clinical features and survival outcomes. *BMC Med Genomics*. 2017;10(1):19. Published 2017 Mar 28. doi:10.1186/s12920-017-0250-9
- Miller F, Kentsis A, Osman R, Pan ZQ. Inactivation of VHL by tumorigenic mutations that disrupt dynamic coupling of the pVHL-hypoxia-inducible transcription factor-1 α complex. *J Biol Chem*. 2005;280(9):7985-7996. doi:10.1074/jbc.M413160200
- Mills MN, Yang GQ, Oliver DE, et al. Histologic heterogeneity of triple negative breast cancer: A National Cancer Centre Database analysis. *Eur J Cancer*. 2018;98:48-58. doi:10.1016/j.ejca.2018.04.011
- Mirochnik Y, Kwiatek A, Volpert OV. Thrombospondin and apoptosis: molecular mechanisms and use for design of complementation treatments. *Curr Drug Targets*. 2008;9(10):851-862. doi:10.2174/138945008785909347
- Mitra A, Mishra L, Li S. EMT, CTCs and CSCs in tumor relapse and drug-resistance. *Oncotarget*. 2015;6(13):10697-10711. doi:10.18632/oncotarget.4037
- Mittal S, Sharma A, Balaji SA, et al. Coordinate hyperactivation of Notch1 and Ras/MAPK pathways correlates with poor patient survival: novel therapeutic strategy for aggressive breast cancers. *Mol Cancer Ther*. 2014;13(12):3198-3209. doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-0280
- Mittendorf EA, Philips AV, Meric-Bernstam F, et al. PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol Res*. 2014;2(4):361-370. doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0127
- Moestrup SK, Gliemann J, Pallesen G. Distribution of the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues. *Cell Tissue Res*. 1992;269(3):375-382. doi:10.1007/BF00353892
- Moestrup SK, Verroust PJ. Megalin- and cubilin-mediated endocytosis of protein-bound vitamins, lipids, and hormones in polarized epithelia. *Annu Rev Nutr*. 2001;21:407-428. doi:10.1146/annurev.nutr.21.1.407
- Mohammed RA, Ellis IO, Mahmmod AM, et al. Lymphatic and blood vessels in basal and triple-negative breast cancers: characteristics and prognostic significance. *Mod Pathol*. 2011;24(6):774-785. doi:10.1038/modpathol.2011.4
- Molema G. Heterogeneity in endothelial responsiveness to cytokines, molecular causes, and pharmacological consequences. *Semin Thromb Hemost*. 2010;36(3):246-264. doi:10.1055/s-0030-1253448

- Monboisse JC, Oudart JB, Ramont L, Brassart-Pasco S, Maquart FX. Matrikines from basement membrane collagens: a new anti-cancer strategy. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1840(8):2589-2598. doi:10.1016/j.bbagen.2013.12.029
- Mongiat M, Sweeney SM, San Antonio JD, Fu J, Iozzo RV. Endorepellin, a novel inhibitor of angiogenesis derived from the C terminus of perlecan. *J Biol Chem*. 2003;278(6):4238-4249. doi:10.1074/jbc.M210445200
- Montel V, Gaultier A, Lester RD, Campana WM, Gonias SL. The low-density lipoprotein receptor-related protein regulates cancer cell survival and metastasis development. *Cancer Res*. 2007;67(20):9817-9824. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0683
- Moon JJ, Lu A, Moon C. Role of genomic instability in human carcinogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2019;244(3):227-240. doi:10.1177/1535370219826031
- Moore-Smith L, Pasche B. TGFBR1 signaling and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2011;16(2):89-95. doi:10.1007/s10911-011-9216-2
- Moreno MJ, Ball M, Rukhlova M, et al. IGFBP-4 anti-angiogenic and anti-tumorigenic effects are associated with anti-cathepsin B activity. *Neoplasia*. 2013;15(5):554-567. doi:10.1593/neo.13212
- Moretti FA, Chauhan AK, Iaconcig A, Porro F, Baralle FE, Muro AF. A major fraction of fibronectin present in the extracellular matrix of tissues is plasma-derived. *J Biol Chem*. 2007 Sep 21;282(38):28057-62. doi: 10.1074/jbc.M611315200. Epub 2007 Jul 19. PMID: 17644525
- Morgan MR, Humphries MJ, Bass MD. Synergistic control of cell adhesion by integrins and syndecans. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(12):957-969. doi:10.1038/nrm2289
- Mori K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 2000; 101 : 451–4.
- Morozevich GE, Kozlova NI, Chubukina AN, Berman AE. Role of integrin alphavbeta3 in substrate-dependent apoptosis of human intestinal carcinoma cells. *Biochemistry (Mosc)*. 2003;68(4):416-423. doi:10.1023/a:1023699829927
- Morrow ES, Roseweir A, Edwards J. The role of gamma delta T lymphocytes in breast cancer: a review. *Transl Res*. 2019 Jan;203:88-96. doi: 10.1016/j.trsl.2018.08.005. Epub 2018 Aug 18. PMID: 30194922
- Motrescu ER, Blaise S, Etique N, Messaddeq N, Chenard MP, Stoll I, Tomasetto C, Rio MC. Matrix metalloproteinase-11/stromelysin-3 exhibits collagenolytic function against collagen VI under normal and malignant conditions. *Oncogene*. 2008 Oct 23;27(49):6347-55. doi: 10.1038/onc.2008.218. Epub 2008 Jul 14. PMID: 18622425
- Mougiakakos D, Choudhury A, Lladser A, Kiessling R, Johansson CC. Regulatory T cells in cancer. *Adv Cancer Res*. 2010;107:57-117. doi: 10.1016/S0065-230X(10)07003-X. PMID: 20399961
- Mouw JK, Ou G, Weaver VM. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(12):771-785. doi:10.1038/nrm3902
- Mu Q, Wang H, Zhang M. Nanoparticles for imaging and treatment of metastatic breast cancer. *Expert Opin Drug Deliv*. 2017;14(1):123-136. doi:10.1080/17425247.2016.1208650
- Mughal WA, Khalid S, Naseem N, Nagi AH. SPARC in breast carcinomas: a critical review. *Biomedica*. 2020; 36 (2): 109-17
- Muiznieks LD, Weiss AS, Keeley FW. Structural disorder and dynamics of elastin. *Biochem Cell Biol*. 2010;88(2):239-250. doi:10.1139/o09-161
- Mulligan AM, Pinnaduwaage D, Bull SB, O'Malley FP, Andrulis IL. Prognostic effect of basal-like

- breast cancers is time dependent: evidence from tissue microarray studies on a lymph node-negative cohort. *Clin Cancer Res.* 2008;14(13):4168-4174. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4543
- Mumin NH, Drobnitzky N, Patel A, et al. Overcoming acquired resistance to HSP90 inhibition by targeting JAK-STAT signalling in triple-negative breast cancer. *BMC Cancer.* 2019;19(1):102. Published 2019 Jan 24. doi:10.1186/s12885-019-5295-z
- Muratoglu SC, Belgrave S, Hampton B, et al. LRP1 protects the vasculature by regulating levels of connective tissue growth factor and HtrA1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(9):2137-2146. doi:10.1161/ATVBAHA.113.301893
- Muratoglu SC, Belgrave S, Lillis AP, et al. Macrophage LRP1 suppresses neo-intima formation during vascular remodeling by modulating the TGF- β signaling pathway. *PLoS One.* 2011;6(12):e28846. doi:10.1371/journal.pone.0028846
- Muratoglu SC, Mikhailenko I, Newton C, Migliorini M, Strickland DK. Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) forms a signaling complex with platelet-derived growth factor receptor-beta in endosomes and regulates activation of the MAPK pathway. *J Biol Chem.* 2010;285(19):14308-14317. doi:10.1074/jbc.M109.046672
- Murdoch AD, Dodge GR, Cohen I, Tuan RS, Iozzo RV. Primary structure of the human heparan sulfate proteoglycan from basement membrane (HSPG2/perlecan). A chimeric molecule with multiple domains homologous to the low density lipoprotein receptor, laminin, neural cell adhesion molecules, and epidermal growth factor. *J Biol Chem.* 1992;267(12):8544-8557
- Murphy AN, Unsworth EJ, Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits bFGF-induced human microvascular endothelial cell proliferation. *J Cell Physiol.* 1993;157(2):351-358. doi:10.1002/jcp.1041570219
- Murphy MP, LeVine H 3rd. Alzheimer's disease and the amyloid-beta peptide. *J Alzheimers Dis.* 2010;19(1):311-323. doi:10.3233/JAD-2010-1221
- Murphy-Ullrich JE, Iozzo RV. Thrombospondins in physiology and disease: new tricks for old dogs. *Matrix Biol.* 2012;31(3):152-154. doi:10.1016/j.matbio.2012.01.002
- Murphy-Ullrich JE, Sage EH. Revisiting the matricellular concept. *Matrix Biol.* 2014;37:1-14. doi:10.1016/j.matbio.2014.07.005
- Murphy-Ullrich JE, Suto MJ. Thrombospondin-1 regulation of latent TGF- β activation: A therapeutic target for fibrotic disease. *Matrix Biol.* 2018;68-69:28-43. doi:10.1016/j.matbio.2017.12.009
- Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckl).* 2015;3:83-92. Published 2015 Dec 11. doi:10.2147/HPS93413
- Na TY, Schecterson L, Mendonsa AM, Gumbiner BM. The functional activity of E-cadherin controls tumor cell metastasis at multiple steps. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(11):5931-5937. doi:10.1073/pnas.1918167117
- Nachman MW, Crowell SL. Estimate of the mutation rate per nucleotide in humans. *Genetics.* 2000;156(1):297-304.
- Nadeem T, Bogue W, Bigit B, Cuervo H. Deficiency of Notch signaling in pericytes results in arteriovenous malformations. *JCI Insight.* 2020;5(21):e125940. Published 2020 Nov 5.

doi:10.1172/jci.insight.125940

- Nagaraju GP, Dontula R, El-Rayes BF, Lakka SS. Molecular mechanisms underlying the divergent roles of SPARC in human carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2014;35(5):967-973. doi:10.1093/carcin/bgu072
- Nagelkerke A, Bussink J, Rowan AE, Span PN. The mechanical microenvironment in cancer: How physics affects tumours. *Semin Cancer Biol*. 2015;35:62-70. doi:10.1016/j.semcancer.2015.09.001
- Nahta R, O'Regan RM. Therapeutic implications of estrogen receptor signaling in HER2-positive breast cancers. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;135(1):39-48. doi:10.1007/s10549-012-2067-8
- Najafi M, Farhood B, Mortezaee K. Cancer stem cells (CSCs) in cancer progression and therapy. *J Cell Physiol*. 2019;234(6):8381-8395. doi:10.1002/jcp.27740
- Nakai K, Hung MC, Yamaguchi H. A perspective on anti-EGFR therapies targeting triple-negative breast cancer. *Am J Cancer Res*. 2016;6(8):1609-1623. Published 2016 Aug 1.
- Nakajima C, Kulik A, Frotscher M, et al. Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) modulates N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-dependent intracellular signaling and NMDA-induced regulation of postsynaptic protein complexes. *J Biol Chem*. 2013;288(30):21909-21923. doi:10.1074/jbc.M112.444364
- Nakamura H, Fang J, Maeda H. Development of next-generation macromolecular drugs based on the EPR effect: challenges and pitfalls [published correction appears in *Expert Opin Drug Deliv*. 2015 Apr;12(4):691. Jun, Fang [corrected to Fang, Jun]]. *Expert Opin Drug Deliv*. 2015;12(1):53-64. doi:10.1517/17425247.2014.955011
- Nakerakanti SS, Bujor AM, Trojanowska M. CCN2 is required for the TGF- β induced activation of Smad1-Erk1/2 signaling network. *PLoS One*. 2011;6(7):e21911. doi:10.1371/journal.pone.0021911
- Nanobashvili J, Jozkowicz A, Neumayer C. et al. Comparison of Angiogenic Potential of Human Microvascular Endothelial Cells and Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Eur Surg J*. 35, 214–219 (2003) doi:10.1007/s10353-003-0012-0
- Naoum GE, Morkos M, Kim B, Arafat W. Novel targeted therapies and immunotherapy for advanced thyroid cancers. *Mol Cancer*. 2018;17(1):51. Published 2018 Feb 19. doi:10.1186/s12943-018-0786-0
- Nassar E, Hassan N, El-Ghonaimy EA, et al. Syndecan-1 Promotes Angiogenesis in Triple-Negative Breast Cancer through the Prognostically Relevant Tissue Factor Pathway and Additional Angiogenic Routes. *Cancers (Basel)*. 2021;13(10):2318. Published 2021 May 12. doi:10.3390/cancers13102318
- Nastase MV, Young MF, Schaefer L. Biglycan: a multivalent proteoglycan providing structure and signals. *J Histochem Cytochem*. 2012;60(12):963-975. doi:10.1369/0022155412456380
- Nedeljković M, Damjanović A. Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer-How We Can Rise to the Challenge. *Cells*. 2019;8(9):957. Published 2019 Aug 22. doi:10.3390/cells8090957
- Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(3):220-228. doi:10.1038/nrm2858
- Negus RP, Stamp GW, Hadley J, Balkwill FR. Quantitative assessment of the leukocyte infiltrate in ovarian cancer and its relationship to the expression of C-C chemokines. *Am J Pathol*.

1997;150(5):1723-1734

- Neill T, Schaefer L, Iozzo RV. Instructive roles of extracellular matrix on autophagy. *Am J Pathol.* 2014;184(8):2146-2153. doi:10.1016/j.ajpath.2014.05.010
- Nguyen TV, Sleiman M, Moriarty T, Herrick WG, Peyton SR. Sorafenib resistance and JNK signaling in carcinoma during extracellular matrix stiffening. *Biomaterials.* 2014;35(22):5749-5759. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.03.058
- Ni Chonghaile T, Sarosiek KA, Vo TT, et al. Pretreatment mitochondrial priming correlates with clinical response to cytotoxic chemotherapy. *Science.* 2011;334(6059):1129-1133. doi:10.1126/science.1206727
- Nielsen MS, Gustafsen C, Madsen P, et al. Sorting by the cytoplasmic domain of the amyloid precursor protein binding receptor SorLA. *Mol Cell Biol.* 2007;27(19):6842-6851. doi:10.1128/MCB.00815-07
- Nieman KM, Kenny HA, Penicka CV, et al. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med.* 2011;17(11):1498-1503. Published 2011 Oct 30. doi:10.1038/nm.2492
- Nijaguna MB, Patil V, Urbach S, et al. Glioblastoma-derived Macrophage Colony-stimulating Factor (MCSF) Induces Microglial Release of Insulin-like Growth Factor-binding Protein 1 (IGFBP1) to Promote Angiogenesis. *J Biol Chem.* 2015;290(38):23401-23415. doi:10.1074/jbc.M115.664037
- Nik-Zainal S, Davies H, Staaf J, et al. Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences [published correction appears in *Nature.* 2019 Feb;566(7742):E1]. *Nature.* 2016;534(7605):47-54. doi:10.1038/nature17676
- Nolan DJ, Ciarrocchi A, Mellick AS, et al. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization. *Genes Dev.* 2007;21(12):1546-1558. doi:10.1101/gad.436307
- Noman MZ, Messai Y, Carré T, et al. Microenvironmental hypoxia orchestrating the cell stroma cross talk, tumor progression and antitumor response. *Crit Rev Immunol.* 2011;31(5):357-377. doi:10.1615/critrevimmunol.v31.i5.10
- Noren NK, Lu M, Freeman AL, Koolpe M, Pasquale EB. Interplay between EphB4 on tumor cells and vascular ephrin-B2 regulates tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(15):5583-5588. doi:10.1073/pnas.0401381101
- Noriega-Guerra H, Cruz MC, Ribeiro PRL, et al. ADAMTS-1 disrupts HGF/c-MET signaling and HGF-stimulated cellular processes in fibrosarcoma. *Exp Cell Res.* 2018;363(2):271-282. doi:10.1016/j.yexcr.2018.01.017
- Noriega-Guerra H, Freitas VM. Extracellular Matrix Influencing HGF/c-MET Signaling Pathway: Impact on Cancer Progression. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11):3300. Published 2018 Oct 24. doi:10.3390/ijms19113300
- Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science.* 1976;194(4260):23-28. doi:10.1126/science.959840
- Nyberg P, Xie L, Kalluri R. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res.* 2005;65(10):3967-3979. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2427
- Nyberg P, Xie L, Sugimoto H, et al. Characterization of the anti-angiogenic properties of arresten,

- an $\alpha 1\beta 1$ integrin-dependent collagen-derived tumor suppressor. *Exp Cell Res.* 2008;314(18):3292-3305. doi:10.1016/j.yexcr.2008.08.011
- Nykjaer A, Conese M, Christensen EI, et al. Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA:serpin complexes. *EMBO J.* 1997;16(10):2610-2620. doi:10.1093/emboj/16.10.2610
- Nykjaer A, Nielsen M, Lookene A, et al. A carboxyl-terminal fragment of lipoprotein lipase binds to the low density lipoprotein receptor-related protein and inhibits lipase-mediated uptake of lipoprotein in cells. *J Biol Chem.* 1994;269(50):31747-31755
- O'Brien CA, Kreso A, Dick JE. Cancer stem cells in solid tumors: an overview. *Semin Radiat Oncol.* 2009;19(2):71-77. doi:10.1016/j.semradonc.2008.11.001
- O'Dwyer PJ. Axillary dissection in primary breast cancer. *BMJ.* 1991;302(6773):360-361. doi:10.1136/bmj.302.6773.360
- O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell.* 1997;88(2):277-285. doi:10.1016/s0092-8674(00)81848-6
- O'Reilly MS, Holmgren L, Chen C, Folkman J. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat Med.* 1996;2(6):689-692. doi:10.1038/nm0696-689
- O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell.* 1994;79(2):315-328. doi:10.1016/0092-8674(94)90200-3
- Odermatt R, Wolfer A, Zaman K. Hormonothérapie dans le cancer du sein: efficacité et effets adverses [Endocrine therapy in breast cancer: efficacy and adverse events]. *Rev Med Suisse.* 2013;9(387):1090-1094
- Oderup C, Cederbom L, Makowska A, Cilio CM, Ivars F. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology.* 2006;118(2):240-249. doi:10.1111/j.1365-2567.2006.02362.x
- Offeddu GS, Hajal C, Foley CR, et al. The cancer glycocalyx mediates intravascular adhesion and extravasation during metastatic dissemination. *Commun Biol.* 2021;4(1):255. Published 2021 Feb 26. doi:10.1038/s42003-021-01774-2
- Oh J, Diaz T, Wei B, Chang H, Noda M, Stetler-Stevenson WG. TIMP-2 upregulates RECK expression via dephosphorylation of paxillin tyrosine residues 31 and 118. *Oncogene.* 2006;25(30):4230-4234. doi:10.1038/sj.onc.1209444
- Ohga N, Ishikawa S, Maishi N, et al. Heterogeneity of tumor endothelial cells: comparison between tumor endothelial cells isolated from high- and low-metastatic tumors. *Am J Pathol.* 2012;180(3):1294-1307. doi:10.1016/j.ajpath.2011.11.035
- Öhlund D, Handly-Santana A, Biffi G, et al. Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *J Exp Med.* 2017;214(3):579-596. doi:10.1084/jem.20162024
- Ojima K, Oe M, Nakajima I, Muroya S, Nishimura T. Dynamics of protein secretion during adipocyte differentiation. *FEBS Open Bio.* 2016;6(8):816-826. Published 2016 Jun 15. doi:10.1002/2211-5463.12091
- Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(1):a001008.

- doi:10.1101/cshperspect.a001008
- Olson LE, Soriano P. PDGFR β signaling regulates mural cell plasticity and inhibits fat development. *Dev Cell*. 2011;20(6):815-826. doi:10.1016/j.devcel.2011.04.019
- Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(5):359-371. doi:10.1038/nrm1911
- Olsson E, Winter C, George A, et al. Serial monitoring of circulating tumor DNA in patients with primary breast cancer for detection of occult metastatic disease. *EMBO Mol Med*. 2015;7(8):1034-1047. doi:10.15252/emmm.201404913
- Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. 2005;121(3):335-348. doi:10.1016/j.cell.2005.02.034
- Orlando RA, Rader K, Authier F, et al. Megalin is an endocytic receptor for insulin. *J Am Soc Nephrol*. 1998;9(10):1759-1766. doi:10.1681/ASN.V9101759
- Ornitz DM, Itoh N. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2015;4(3):215-266. doi:10.1002/wdev.176
- Orth K, Madison EL, Gething MJ, Sambrook JF, Herz J. Complexes of tissue-type plasminogen activator and its serpin inhibitor plasminogen-activator inhibitor type 1 are internalized by means of the low density lipoprotein receptor-related protein/ α 2-macroglobulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(16):7422-7426. doi:10.1073/pnas.89.16.7422
- Oshi M, Asaoka M, Tokumaru Y, et al. CD8 T Cell Score as a Prognostic Biomarker for Triple Negative Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 2020b ;21(18):6968. Published 2020 Sep 22. doi:10.3390/ijms21186968
- Oshi M, Newman S, Murthy V, et al. ITPKC as a Prognostic and Predictive Biomarker of Neoadjuvant Chemotherapy for Triple Negative Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020a ;12(10):2758. Published 2020 Sep 25. doi:10.3390/cancers12102758
- Osman A, Afify SM, Hassan G, Fu X, Seno A, Seno M. Revisiting Cancer Stem Cells as the Origin of Cancer-Associated Cells in the Tumor Microenvironment: A Hypothetical View from the Potential of iPSCs. *Cancers (Basel)*. 2020;12(4):879. Published 2020 Apr 4. doi:10.3390/cancers12040879
- Ostman A, Heldin CH. PDGF receptors as targets in tumor treatment. *Adv Cancer Res*. 2007;97:247-274. doi:10.1016/S0065-230X(06)97011-0
- Otsu K, Das S, Houser SD, Quadri SK, Bhattacharya S, Bhattacharya J. Concentration-dependent inhibition of angiogenesis by mesenchymal stem cells. *Blood*. 2009;113(18):4197-4205. doi:10.1182/blood-2008-09-176198
- Otto AM. Warburg effect(s)-a biographical sketch of Otto Warburg and his impacts on tumor metabolism. *Cancer Metab*. 2016;4:5. Published 2016 Mar 8. doi:10.1186/s40170-016-0145-9
- Overton CD, Yancey PG, Major AS, Linton MF, Fazio S. Deletion of macrophage LDL receptor-related protein increases atherogenesis in the mouse. *Circ Res*. 2007;100(5):670-677. doi:10.1161/01.RES.0000260204.40510.aa
- Pace L, Nicolai E, Basso L, Garbino N, Soricelli A, Salvatore M. Brown Adipose Tissue in Breast Cancer Evaluated by [18F] FDG-PET/CT. *Mol Imaging Biol*. 2020;22(4):1111-1115. doi:10.1007/s11307-020-01482-z

- Padua D, Zhang XH, Wang Q, et al. TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell*. 2008;133(1):66-77. doi:10.1016/j.cell.2008.01.046
- Padua D, Zhang XH, Wang Q, et al. TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell*. 2008;133(1):66-77. doi:10.1016/j.cell.2008.01.046
- Paduch R. The role of lymphangiogenesis and angiogenesis in tumor metastasis. *Cell Oncol (Dordr)*. 2016;39(5):397-410. doi:10.1007/s13402-016-0281-9
- Paku S, Paweletz N. First steps of tumor-related angiogenesis. *Lab Invest*. 1991;65(3):334-346
- Pålsson-McDermott EM, O'Neill LA. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology*. 2004;113(2):153-162. doi:10.1111/j.1365-2567.2004.01976.x
- Pampusch MS, Kamanga-Sollo E, Hathaway MR, White ME, Dayton WR. Low-density lipoprotein-related receptor protein 1 (LRP-1) is not required for insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3) to suppress L6 myogenic cell proliferation. *Domest Anim Endocrinol*. 2011;40(4):197-204. doi:10.1016/j.domaniend.2011.01.001
- Pandya S, Moore RG. Breast development and anatomy. *Clin Obstet Gynecol*. 2011;54(1):91-95. doi:10.1097/GRF.0b013e318207ffe9
- Panka DJ, Mier JW. Canstatin inhibits Akt activation and induces Fas-dependent apoptosis in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2003;278(39):37632-37636. doi:10.1074/jbc.M307339200
- Paoli P, Giannoni E, Chiarugi P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833(12):3481-3498. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.06.026
- Papadas A, Arauz G, Cicala A, Wiesner J, Asimakopoulos F. Versican and Versican-matrikines in Cancer Progression, Inflammation, and Immunity. *J Histochem Cytochem*. 2020;68(12):871-885. doi:10.1369/0022155420937098
- Papke CL, Yanagisawa H. Fibulin-4 and fibulin-5 in elastogenesis and beyond: Insights from mouse and human studies. *Matrix Biol*. 2014;37:142-149. doi:10.1016/j.matbio.2014.02.004
- Pardali E, Goumans MJ, ten Dijke P. Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease. *Trends Cell Biol*. 2010;20(9):556-567. doi:10.1016/j.tcb.2010.06.006
- Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):252-264. Published 2012 Mar 22. doi:10.1038/nrc3239
- Park BK, Zhang H, Zeng Q, et al. NF-kappaB in breast cancer cells promotes osteolytic bone metastasis by inducing osteoclastogenesis via GM-CSF. *Nat Med*. 2007;13(1):62-69. doi:10.1038/nm1519
- Park H-, Helfman DM. Up-regulated fibronectin in 3D culture facilitates spreading of triple negative breast cancer cells on 2D through integrin β -5 and Src. *Sci Rep*. 2019;9(1):19950. Published 2019 Dec 27. doi:10.1038/s41598-019-56276-3
- Park J, Morley TS, Scherer PE. Inhibition of endotrophin, a cleavage product of collagen VI, confers cisplatin sensitivity to tumours. *EMBO Mol Med*. 2013;5(6):935-948. doi:10.1002/emmm.201202006
- Park J, Scherer PE. Adipocyte-derived endotrophin promotes malignant tumor progression. *J Clin Invest*. 2012;122(11):4243-4256. doi:10.1172/JCI63930
- Park JY, Yi SY, Park HJ, et al. Breast-specific gamma imaging: correlations with mammographic and clinicopathologic characteristics of breast cancer. *AJR Am J Roentgenol*. 2014;203(1):223-228. doi:10.2214/AJR.13.11566

- Parr C, Watkins G, Jiang WG. The possible correlation of Notch-1 and Notch-2 with clinical outcome and tumour clinicopathological parameters in human breast cancer. *Int J Mol Med*. 2004;14(5):779-786. doi:10.3892/ijmm.14.5.779
- Passalidou E, Trivella M, Singh N, et al. Vascular phenotype in angiogenic and non-angiogenic lung non-small cell carcinomas. *Br J Cancer*. 2002;86(2):244-249. doi:10.1038/sj.bjc.6600015
- Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab*. 2016;23(1):27-47. doi:10.1016/j.cmet.2015.12.006
- Pearlstein E, Gold LI, Garcia-Pardo A. Fibronectin: a review of its structure and biological activity. *Mol Cell Biochem*. 1980;29(2):103-128. doi:10.1007/BF00220304
- Peeney D, Jensen SM, Castro NP, et al. TIMP-2 suppresses tumor growth and metastasis in murine model of triple-negative breast cancer. *Carcinogenesis*. 2020;41(3):313-325. doi:10.1093/carcin/bgz172
- Peng F, Setyawati MI, Tee JK, et al. Nanoparticles promote in vivo breast cancer cell intravasation and extravasation by inducing endothelial leakiness. *Nat Nanotechnol*. 2019;14(3):279-286. doi:10.1038/s41565-018-0356-z
- Peng L, Malloy PJ, Feldman D. Identification of a functional vitamin D response element in the human insulin-like growth factor binding protein-3 promoter. *Mol Endocrinol*. 2004;18(5):1109-1119. doi:10.1210/me.2003-0344
- Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-752. doi:10.1038/35021093
- Perrot G, Langlois B, Devy J, et al. LRP-1--CD44, a new cell surface complex regulating tumor cell adhesion. *Mol Cell Biol*. 2012;32(16):3293-3307. doi:10.1128/MCB.00228-12
- Petersen OW, Rønnov-Jessen L, Howlett AR, Bissell MJ. Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells [published correction appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Mar 15;90(6):2556]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(19):9064-9068. doi:10.1073/pnas.89.19.9064
- Peterson TE, Kirkpatrick ND, Huang Y, et al. Dual inhibition of Ang-2 and VEGF receptors normalizes tumor vasculature and prolongs survival in glioblastoma by altering macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(16):4470-4475. doi:10.1073/pnas.1525349113
- Petitclerc E, Boutaud A, Prestayko A, et al. New functions for non-collagenous domains of human collagen type IV. Novel integrin ligands inhibiting angiogenesis and tumor growth in vivo. *J Biol Chem*. 2000;275(11):8051-8061. doi:10.1074/jbc.275.11.8051
- Petrucelli N, Daly MB, Pal T. BRCA1- and BRCA2-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer. 1998 Sep 4 [updated 2016 Dec 15]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya A, editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2020. PMID: 20301425.
- Pfannenberger C, Werner MK, Ripkens S, et al. Impact of age on the relationships of brown adipose tissue with sex and adiposity in humans. *Diabetes*. 2010;59(7):1789-1793. doi:10.2337/db10-0004
- Phillips J, Mihai G, Hassonjee SE, et al. Comparative Dose of Contrast-Enhanced Spectral Mammography (CESM), Digital Mammography, and Digital Breast Tomosynthesis. *AJR Am J Roentgenol*. 2018a ;211(4):839-846. doi:10.2214/AJR.17.19036

- Phillips J, Steinkeler J, Talati K, et al. Workflow Considerations for Incorporation of Contrast-Enhanced Spectral Mammography Into a Breast Imaging Practice. *J Am Coll Radiol*. 2018b ;15(6):881-885. doi:10.1016/j.jacr.2018.02.012
- Phng LK, Stanchi F, Gerhardt H. Filopodia are dispensable for endothelial tip cell guidance. *Development*. 2013;140(19):4031-4040. doi:10.1242/dev.097352
- PI3K Inhibitor Improves PFS in BELLE-2 Trial. *Cancer Discov*. 2016;6(2):115-116. doi:10.1158/2159-8290.CD-NB2015-176
- Piccolo E, Tinari N, Semeraro D, et al. LGALS3BP, lectin galactoside-binding soluble 3 binding protein, induces vascular endothelial growth factor in human breast cancer cells and promotes angiogenesis. *J Mol Med (Berl)*. 2013;91(1):83-94. doi:10.1007/s00109-012-0936-6
- Pierobon M, Frankenfeld CL. Obesity as a risk factor for triple-negative breast cancers: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2013 Jan;137(1):307-14. doi: 10.1007/s10549-012-2339-3. Epub 2012 Nov 20. PMID: 23179600
- Pinho SS, Reis CA. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer*. 2015 Sep;15(9):540-55. doi: 10.1038/nrc3982. Epub 2015 Aug 20. PMID: 26289314
- Pinker K, Moy L, Sutton EJ, et al. Diffusion-Weighted Imaging With Apparent Diffusion Coefficient Mapping for Breast Cancer Detection as a Stand-Alone Parameter: Comparison With Dynamic Contrast-Enhanced and Multiparametric Magnetic Resonance Imaging. *Invest Radiol*. 2018;53(10):587-595. doi:10.1097/RLI.0000000000000465
- Pisarsky L, Bill R, Fagiani E, et al. Targeting Metabolic Symbiosis to Overcome Resistance to Anti-angiogenic Therapy. *Cell Rep*. 2016;15(6):1161-1174. doi:10.1016/j.celrep.2016.04.028
- Pohlmann PR, Mayer IA, Mernaugh R. Resistance to Trastuzumab in Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15(24):7479-7491. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0636
- Polavarapu R, An J, Zhang C, Yepes M. Regulated intramembrane proteolysis of the low-density lipoprotein receptor-related protein mediates ischemic cell death. *Am J Pathol*. 2008;172(5):1355-1362. doi:10.2353/ajpath.2008.070975
- Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2004 Jan;4(1):71-8. doi: 10.1038/nrc1256. PMID: 14708027
- Popova T, Manié E, Rieunier G, et al. Ploidy and large-scale genomic instability consistently identify basal-like breast carcinomas with BRCA1/2 inactivation. *Cancer Res*. 2012;72(21):5454-5462. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-1470
- Pradeu T, Laplane L, Prévot K, et al. Defining "Development". *Curr Top Dev Biol*. 2016;117:171-183. doi:10.1016/bs.ctdb.2015.10.012
- Prado-Garcia H, Campa-Higareda A, Romero-Garcia S. Lactic Acidosis in the Presence of Glucose Diminishes Warburg Effect in Lung Adenocarcinoma Cells. *Front Oncol*. 2020;10:807. Published 2020 Jun 12. doi:10.3389/fonc.2020.00807
- Prager GW, Breuss JM, Steurer S, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-2-induced initial endothelial cell migration depends on the presence of the urokinase receptor. *Circ Res*. 2004;94(12):1562-1570. doi:10.1161/01.RES.0000131498.36194.6b
- Prat A, Parker JS, Karginova O, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010;12(5):R68. doi:10.1186/bcr2635
- Prat A, Pineda E, Adamo B, et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast*. 2015;24 Suppl 2:S26-S35. doi:10.1016/j.breast.2015.07.008

- Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16(2):159-178. doi:10.1016/j.cytogfr.2005.01.004
- Proebstl D, Voisin MB, Woodfin A, et al. Pericytes support neutrophil subendothelial cell crawling and breaching of venular walls in vivo. *J Exp Med.* 2012;209(6):1219-1234. doi:10.1084/jem.20111622
- Provenzano PP, Inman DR, Eliceiri KW, et al. Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. *BMC Med.* 2008;6:11. Published 2008 Apr 28. doi:10.1186/1741-7015-6-11
- Puliti D, Duffy SW, Miccinesi G, et al. Overdiagnosis in mammographic screening for breast cancer in Europe: a literature review. *J Med Screen.* 2012;19 Suppl 1:42-56. doi:10.1258/jms.2012.012082
- Puri MC, Rossant J, Alitalo K, Bernstein A, Partanen J. The receptor tyrosine kinase TIE is required for integrity and survival of vascular endothelial cells. *EMBO J.* 1995;14(23):5884-5891
- Putti TC, Pinder SE, Elston CW, Lee AH, Ellis IO. Breast pathology practice: most common problems in a consultation service. *Histopathology.* 2005;47(5):445-457. doi:10.1111/j.1365-2559.2005.02246.x
- Pytlík M, Vargová V, Mechírová V. Matrix metalloproteinases and their role in oncogenesis: a review. *Onkologie.* 2012;35(1-2):49-53. doi: 10.1159/000336304. Epub 2012 Jan 23. PMID: 22310347.
- Qi JH, Anand-Apte B. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP3) promotes endothelial apoptosis via a caspase-independent mechanism. *Apoptosis.* 2015;20(4):523-534. doi:10.1007/s10495-014-1076-y
- Qi JH, Ebrahim Q, Moore N, et al. A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. *Nat Med.* 2003;9(4):407-415. doi:10.1038/nm846
- Qiao L, Xu ZL, Zhao TJ, Ye LH, Zhang XD. Dkk-1 secreted by mesenchymal stem cells inhibits growth of breast cancer cells via depression of Wnt signalling. *Cancer Lett.* 2008 Sep 28;269(1):67-77. doi: 10.1016/j.canlet.2008.04.032. Epub 2008 Jun 20. PMID: 18571836.
- Quinn KA, Pye VJ, Dai YP, Chesterman CN, Owensby DA. Characterization of the soluble form of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *Exp Cell Res.* 1999;251(2):433-441. doi:10.1006/excr.1999.4590
- Qutub AA, Mac Gabhann F, Karagiannis ED, Vempati P, Popel AS. Multiscale models of angiogenesis [published correction appears in *IEEE Eng Med Biol Mag.* 2009 May-Jun;28(3):65]. *IEEE Eng Med Biol Mag.* 2009;28(2):14-31. doi:10.1109/MEMB.2009.931791
- Rahim B, O'Regan R. AR Signaling in Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 2017;9(3):21. Published 2017 Feb 24. doi:10.3390/cancers9030021
- Rahman M, Chan AP, Tang M, Tai IT. A peptide of SPARC interferes with the interaction between caspase8 and Bcl2 to resensitize chemoresistant tumors and enhance their regression in vivo [published correction appears in *PLoS One.* 2015;10(4):e0127226]. *PLoS One.* 2011;6(11):e26390. doi:10.1371/journal.pone.0026390
- Rajwani A, Ezzat V, Smith J, et al. Increasing circulating IGFBP1 levels improves insulin sensitivity, promotes nitric oxide production, lowers blood pressure, and protects against atherosclerosis.

- Diabetes. 2012;61(4):915-924. doi:10.2337/db11-0963
- Rakic JM, Maillard C, Jost M, et al. Role of plasminogen activator-plasmin system in tumor angiogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60(3):463-473. doi:10.1007/s000180300039
- Ramanathan R, Olex AL, Dozmorov M, Bear HD, Fernandez LJ, Takabe K. Angiopoietin pathway gene expression associated with poor breast cancer survival. *Breast Cancer Res Treat.* 2017;162(1):191-198. doi:10.1007/s10549-017-4102-2
- Ramchandani D, Mittal V. Thrombospondin in Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1272:133-147. doi: 10.1007/978-3-030-48457-6_8. PMID: 32845506
- Ramchandran R, Dhanabal M, Volk R, et al. Antiangiogenic activity of restin, NC10 domain of human collagen XV: comparison to endostatin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;255(3):735-739. doi:10.1006/bbrc.1999.0248
- Ramont L, Brassart-Pasco S, Thevenard J, Deshorgue A, Venteo L, Laronze JY, Pluot M, Monboisse JC, Maquart FX. The NC1 domain of type XIX collagen inhibits in vivo melanoma growth. *Mol Cancer Ther.* 2007 Feb;6(2):506-14. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0207. PMID: 17308049
- Ramovs V, Te Molder L, Sonnenberg A. The opposing roles of laminin-binding integrins in cancer. *Matrix Biol.* 2017 Jan;57-58:213-243. doi: 10.1016/j.matbio.2016.08.007. Epub 2016 Aug 22. PMID: 27562932.
- Ratushnyy A, Ezdakova M, Buravkova L. Secretome of Senescent Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Negatively Regulates Angiogenesis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(5):1802. Published 2020 Mar 5. doi:10.3390/ijms21051802
- Raval A, Trivedi S. Breast cancer: Role of IGF-1 and IGFBP-3 expression in prognostication. *Indian J Exp Biol.* 2016;54(10):619-629
- Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(Database issue):D227-D233. doi:10.1093/nar/gkp971
- Raza A, Franklin MJ, Dudek AZ. Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis. *Am J Hematol.* 2010;85(8):593-598. doi:10.1002/ajh.21745
- Rebustini IT, Myers C, Lassiter KS, et al. MT2-MMP-dependent release of collagen IV NC1 domains regulates submandibular gland branching morphogenesis. *Dev Cell.* 2009;17(4):482-493. doi:10.1016/j.devcel.2009.07.016
- Reedijk M, Odorcic S, Chang L, et al. High-level coexpression of JAG1 and NOTCH1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival. *Cancer Res.* 2005;65(18):8530-8537. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1069
- Reekmans SM, Pflanzner T, Gordts PL, et al. Inactivation of the proximal NPXY motif impairs early steps in LRP1 biosynthesis. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(1):135-145. doi:10.1007/s00018-009-0171-7
- Rege TA, Stewart J Jr, Dranka B, Benveniste EN, Silverstein RL, Gladson CL. Thrombospondin-1-induced apoptosis of brain microvascular endothelial cells can be mediated by TNF-R1. *J Cell Physiol.* 2009;218(1):94-103. doi:10.1002/jcp.21570
- Reig B, Heacock L, Lewin A, Cho N, Moy L. Role of MRI to Assess Response to Neoadjuvant Therapy for Breast Cancer. *J Magn Reson Imaging.* 2020;52(6):10.1002/jmri.27145. doi:10.1002/jmri.27145
- Ren B, Yee KO, Lawler J, Khosravi-Far R. Regulation of tumor angiogenesis by thrombospondin-

1. Biochim Biophys Acta. 2006;1765(2):178-188. doi:10.1016/j.bbcan.2005.11.002
- Rensen PC, Jong MC, van Vark LC, et al. Apolipoprotein E is resistant to intracellular degradation in vitro and in vivo. Evidence for retroendocytosis. J Biol Chem. 2000;275(12):8564-8571. doi:10.1074/jbc.275.12.8564
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature. 2001 Nov 1;414(6859):105-11. doi: 10.1038/35102167. PMID: 11689955
- Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Correction: Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. J Clin Invest. 2008;118(11):3813. doi:10.1172/JCI14327C1
- Reymond N, Im JH, Garg R, et al. RhoC and ROCKs regulate cancer cell interactions with endothelial cells. Mol Oncol. 2015;9(6):1043-1055. doi:10.1016/j.molonc.2015.01.004
- Ribatti D, Crivellato E. "Sprouting angiogenesis", a reappraisal. Dev Biol. 2012;372(2):157-165. doi:10.1016/j.ydbio.2012.09.018
- Ribatti D, Nico B, Crivellato E. The role of pericytes in angiogenesis. Int J Dev Biol. 2011;55(3):261-8. doi: 10.1387/ijdb.103167dr. PMID: 21710434
- Ribatti D. Interleukins as modulators of angiogenesis and anti-angiogenesis in tumors. Cytokine. 2019;118:3-7. doi:10.1016/j.cyto.2018.10.022
- Ribeiro RJ, Monteiro CP, Cunha VF, et al. Tumor cell-educated periprostatic adipose tissue acquires an aggressive cancer-promoting secretory profile. Cell Physiol Biochem. 2012;29(1-2):233-240. doi:10.1159/000337604
- Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(1):a004978. Published 2011 Jan 1. doi:10.1101/cshperspect.a004978
- Ricciardelli C, Brooks JH, Suwihat S, Sakko AJ, Mayne K, Raymond WA, Seshadri R, LeBaron RG, Horsfall DJ. Regulation of stromal versican expression by breast cancer cells and importance to relapse-free survival in patients with node-negative primary breast cancer. Clin Cancer Res. 2002 Apr;8(4):1054-60. PMID: 11948113.
- Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, et al. Cell migration: integrating signals from front to back. Science. 2003;302(5651):1704-1709. doi:10.1126/science.1092053
- Riedel F, Heil J, Golatta M, et al. Changes of breast and axillary surgery patterns in patients with primary breast cancer during the past decade. Arch Gynecol Obstet. 2019;299(4):1043-1053. doi:10.1007/s00404-018-4982-3
- Riet FG, Fayard F, Arriagada R, et al. Preoperative radiotherapy in breast cancer patients: 32 years of follow-up. Eur J Cancer. 2017;76:45-51. doi:10.1016/j.ejca.2017.01.022
- Rimawi MF, Schiff R, Osborne CK. Targeting HER2 for the treatment of breast cancer. Annu Rev Med. 2015;66:111-128. doi:10.1146/annurev-med-042513-015127
- Ringa V, Fournier A. La diminution de l'utilisation du traitement hormonal de la ménopause a-t-elle fait baisser l'incidence du cancer du sein en France (et ailleurs)? [Did the decrease in use of menopausal hormone therapy induce a decrease in the incidence of breast cancer in France (and elsewhere)?]. Rev Epidemiol Sante Publique. 2008;56(5):297-301. doi:10.1016/j.respe.2008.07.085
- Ripple MO, Kim N, Springett R. Acute mitochondrial inhibition by mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK) 1/2 inhibitors regulates proliferation.

- J Biol Chem. 2013;288(5):2933-2940. doi:10.1074/jbc.M112.430082
- Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997;386(6626):671-674. doi:10.1038/386671a0
- Ritty TM, Broekelmann TJ, Werneck CC, Mecham RP. Fibrillin-1 and -2 contain heparin-binding sites important for matrix deposition and that support cell attachment. *Biochem J*. 2003;375(Pt 2):425-432. doi:10.1042/BJ20030649
- Rizza S, Filomeni G. Exploiting S-nitrosylation for cancer therapy: facts and perspectives. *Biochem J*. 2020 Oct 16;477(19):3649-3672. doi: 10.1042/BCJ20200064. PMID: 33017470
- Robson M, Im SA, Senkus E, et al. Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation [published correction appears in *N Engl J Med*. 2017 Oct 26;377(17):1700]. *N Engl J Med*. 2017;377(6):523-533. doi:10.1056/NEJMoa1706450
- Robson ME, Tung N, Conte P, et al. OlympiAD final overall survival and tolerability results: Olaparib versus chemotherapy treatment of physician's choice in patients with a germline BRCA mutation and HER2-negative metastatic breast cancer. *Ann Oncol*. 2019;30(4):558-566. doi:10.1093/annonc/mdz012
- Rodini CO, Gonçalves da Silva PB, Assoni AF, Carvalho VM, Okamoto OK. Mesenchymal stem cells enhance tumorigenic properties of human glioblastoma through independent cell-cell communication mechanisms. *Oncotarget*. 2018;9(37):24766-24777. Published 2018 May 15. doi:10.18632/oncotarget.25346
- Rodríguez D, Morrison CJ, Overall CM. Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Jan;1803(1):39-54. doi: 10.1016/j.bbamcr.2009.09.015. Epub 2009 Oct 1. PMID: 19800373.
- Roma-Rodrigues C, Mendes R, Baptista PV, Fernandes AR. Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci*. 2019;20(4):840. Published 2019 Feb 15. doi:10.3390/ijms20040840
- Romero-Garcia S, Lopez-Gonzalez JS, Báez-Viveros JL, Aguilar-Cazares D, Prado-Garcia H. Tumor cell metabolism: an integral view. *Cancer Biol Ther*. 2011;12(11):939-948. doi:10.4161/cbt.12.11.18140
- Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science*. 2015;348(6230):62-68. doi:10.1126/science.aaa4967
- Rosini S, Pugh N, Bonna AM, Hulmes DJS, Farndale RW, Adams JC. Thrombospondin-1 promotes matrix homeostasis by interacting with collagen and lysyl oxidase precursors and collagen cross-linking sites. *Sci Signal*. 2018 May 29;11(532):eaar2566. doi: 10.1126/scisignal.aar2566. PMID: 29844053
- Rosset EM, Trombetta-eSilva J, Hepfer G, Yao H, Bradshaw AD. SPARC and the N-propeptide of collagen I influence fibroblast proliferation and collagen assembly in the periodontal ligament. *PLoS One*. 2017;12(2):e0173209. Published 2017 Feb 28. doi:10.1371/journal.pone.0173209
- Rossi V, Berchialla P, Giannarelli D, et al. Should All Patients With HR-Positive HER2-Negative Metastatic Breast Cancer Receive CDK 4/6 Inhibitor As First-Line Based Therapy? A Network Meta-Analysis of Data from the PALOMA 2, MONALEESA 2, MONALEESA 7, MONARCH 3, FALCON, SWOG and FACT Trials. *Cancers (Basel)*. 2019;11(11):1661. Published 2019 Oct 26. doi:10.3390/cancers11111661
- Rota LM, Lazzarino DA, Ziegler AN, LeRoith D, Wood TL. Determining mammosphere-forming

- potential: application of the limiting dilution analysis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2012;17(2):119-123. doi:10.1007/s10911-012-9258-0
- Rousseau C, Bourbouloux E, Campion L, Fleury N, Bridji B, Chatal JF, Resche I, Campone M. Brown fat in breast cancer patients: analysis of serial (18)F-FDG PET/CT scans. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2006 Jul;33(7):785-91. doi: 10.1007/s00259-006-0066-x. Epub 2006 Apr 5. PMID: 16596378.
- Roazanov DV, Hahn-Dantona E, Strickland DK, Strongin AY. The low density lipoprotein receptor-related protein LRP is regulated by membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) proteolysis in malignant cells. *J Biol Chem*. 2004;279(6):4260-4268. doi:10.1074/jbc.M311569200
- Rudenko G, Henry L, Henderson K, et al. Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH. *Science*. 2002;298(5602):2353-2358. doi:10.1126/science.1078124
- Rudno-Rudzińska J, Kielan W, Frejlich E, et al. A review on Eph/ephrin, angiogenesis and lymphangiogenesis in gastric, colorectal and pancreatic cancers. *Chin J Cancer Res*. 2017;29(4):303-312. doi:10.21147/j.issn.1000-9604.2017.04.03
- Ruffell B, DeNardo DG, Affara NI, Coussens LM. Lymphocytes in cancer development: polarization towards pro-tumor immunity. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21(1):3-10. doi:10.1016/j.cytogfr.2009.11.002
- Ruhrberg C, Gerhardt H, Golding M, et al. Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev*. 2002;16(20):2684-2698. doi:10.1101/gad.242002
- Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med*. 2005;9(2):267-285. doi:10.1111/j.1582-4934.2005.tb00355.x
- Runz S, Mierke CT, Joumaa S, Behrens J, Fabry B, Altevogt P. CD24 induces localization of beta1 integrin to lipid raft domains. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;365(1):35-41. doi:10.1016/j.bbrc.2007.10.139
- Russo J, Russo IH. Development of the human breast. *Maturitas*. 2004;49(1):2-15. doi:10.1016/j.maturitas.2004.04.011
- Ryan BM, Faupel-Badger JM. The hallmarks of premalignant conditions: a molecular basis for cancer prevention. *Semin Oncol*. 2016;43(1):22-35. doi:10.1053/j.seminoncol.2015.09.007
- Saharinen P, Tammela T, Karkkainen MJ, Alitalo K. Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. *Trends Immunol*. 2004;25(7):387-395. doi:10.1016/j.it.2004.05.003
- Sahu D, Zhao Z, Tsen F, et al. A potentially common peptide target in secreted heat shock protein-90 α for hypoxia-inducible factor-1 α -positive tumors. *Mol Biol Cell*. 2012;23(4):602-613. doi:10.1091/mbc.E11-06-0575
- Sakamoto H, Broekelmann T, Cheresh DA, Ramirez F, Rosenbloom J, Mecham RP. Cell-type specific recognition of RGD- and non-RGD-containing cell binding domains in fibrillin-1. *J Biol Chem*. 1996 Mar 1;271(9):4916-22. PMID: 8617764
- Salicioni AM, Gaultier A, Brownlee C, Cheezum MK, Gonias SL. Low density lipoprotein receptor-related protein-1 promotes beta1 integrin maturation and transport to the cell surface. *J Biol Chem*. 2004;279(11):10005-10012. doi:10.1074/jbc.M306625200

- Samouillan V, Dandurand J, Nasarre L, Badimon L, Lacabanne C, Llorente-Cortés V. Lipid loading of human vascular smooth muscle cells induces changes in tropoelastin protein levels and physical structure. *Biophys J*. 2012;103(3):532-540. doi:10.1016/j.bpj.2012.06.034
- San Antonio JD, Des Parkin J, Savige J, Orgel JPRO, Jacenko O. Collagen interactomes: mapping functional domains and mutations on fibrillar and network-forming collagens, in: N.K. Karamanos (Ed.) *Extracellular Matrix: Pathobiology and Signaling*, Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, Berlin/Boston, 2012, pp. 575-591
- Sands M, Howell K, Costello CM, McLoughlin P. Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor B expression in the hypoxic lung. *Respir Res*. 2011;12(1):17. Published 2011 Jan 25. doi:10.1186/1465-9921-12-17
- Santarpia L, Lippman SM, El-Naggar AK. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2012;16(1):103-119. doi:10.1517/14728222.2011.645805
- Santos TG, Martins VR, Hajj GNM. Unconventional Secretion of Heat Shock Proteins in Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017;18(5):946. Published 2017 Apr 29. doi:10.3390/ijms18050946
- Sarmiento-Salinas FL, Delgado-Magallón A, Montes-Alvarado JB, et al. Breast Cancer Subtypes Present a Differential Production of Reactive Oxygen Species (ROS) and Susceptibility to Antioxidant Treatment. *Front Oncol*. 2019;9:480. Published 2019 Jun 7. doi:10.3389/fonc.2019.00480
- Sasaki T, Collagen-binding proteins, in: N.K. Karamanos (Ed.) *Extracellular Matrix: Pathobiology and Signaling*, Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, Berlin/Boston, 2012, pp. 592–602
- Sauteur L, Affolter M, Belting HG. Distinct and redundant functions of Esam and VE-cadherin during vascular morphogenesis. *Development*. 2017;144(8):1554-1565. doi:10.1242/dev.140038
- Sauteur L, Krudewig A, Herwig L, et al. Cdh5/VE-cadherin promotes endothelial cell interface elongation via cortical actin polymerization during angiogenic sprouting. *Cell Rep*. 2014;9(2):504-513. doi:10.1016/j.celrep.2014.09.024
- Sawaki M, Shien T, Iwata H. TNM classification of malignant tumors (Breast Cancer Study Group). *Jpn J Clin Oncol*. 2019;49(3):228-231. doi:10.1093/jjco/hyy182
- Schaefer L, Iozzo RV. Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction. *J Biol Chem*. 2008;283(31):21305-21309. doi:10.1074/jbc.R800020200
- Schaefer L, Schaefer RM. Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res*. 2010 Jan;339(1):237-46. doi: 10.1007/s00441-009-0821-y. Epub 2009 Jun 10. PMID: 19513755
- Schaftenaar F, Frodermann V, Kuiper J, Lutgens E. Atherosclerosis: the interplay between lipids and immune cells. *Curr Opin Lipidol*. 2016;27(3):209-215. doi:10.1097/MOL.0000000000000302
- Schatteman GC, Dunnwald M, Jiao C. Biology of bone marrow-derived endothelial cell precursors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292(1):H1-H18. doi:10.1152/ajpheart.00662.2006
- Schiemann BJ, Neil JR, Schieman WP. SPARC inhibits epithelial cell proliferation in part through stimulation of the transforming growth factor-beta-signaling system. *Mol Biol Cell*. 2003;14(10):3977-3988. doi:10.1091/mbc.e03-01-0001
- Schlumberger W, Thie M, Rauterberg J, Robenek H. Collagen synthesis in cultured aortic smooth muscle cells. Modulation by collagen lattice culture, transforming growth factor-beta 1, and

- epidermal growth factor. *Arterioscler Thromb.* 1991;11(6):1660-1666. doi:10.1161/01.atv.11.6.1660
- Schmid P, Adams S, Rugo HS, et al. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2018;379(22):2108-2121. doi:10.1056/NEJMoa1809615
- Schmitt M, Goretzki L, Jänicke F, et al. Biological and clinical relevance of the urokinase-type plasminogen activator (uPA) in breast cancer. *Biomed Biochim Acta.* 1991;50(4-6):731-741
- Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science.* 2015 Apr 3;348(6230):69-74. doi: 10.1126/science.aaa4971. PMID: 25838375
- Schwarzbauer JE, DeSimone DW. Fibronectins, their fibrillogenesis, and in vivo functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(7):a005041. Published 2011 Jul 1. doi:10.1101/cshperspect.a005041
- Scilabra SD, Pignoni M, Pravata V, et al. Increased TIMP-3 expression alters the cellular secretome through dual inhibition of the metalloprotease ADAM10 and ligand-binding of the LRP-1 receptor. *Sci Rep.* 2018;8(1):14697. Published 2018 Oct 2. doi:10.1038/s41598-018-32910-4
- Scilabra SD, Troeberg L, Yamamoto K, et al. Differential regulation of extracellular tissue inhibitor of metalloproteinases-3 levels by cell membrane-bound and shed low density lipoprotein receptor-related protein 1. *J Biol Chem.* 2013;288(1):332-342. doi:10.1074/jbc.M112.393322
- Scott IC, Imamura Y, Pappano WN, Troedel JM, Recklies AD, Roughley PJ, Greenspan DS. Bone morphogenetic protein-1 processes probiglycan. *J Biol Chem.* 2000 Sep 29;275(39):30504-11. doi: 10.1074/jbc.M004846200. PMID: 10896944
- Scroyen I, Jacobs F, Cosmans L, De Geest B, Lijnen HR. Blood vessel density in de novo formed adipose tissue is decreased upon overexpression of TIMP-1. *Obesity (Silver Spring).* 2010;18(3):638-640. doi:10.1038/oby.2009.279
- Seaman S, Stevens J, Yang MY, Logsdon D, Graff-Cherry C, St Croix B. Genes that distinguish physiological and pathological angiogenesis. *Cancer Cell.* 2007;11(6):539-554. doi:10.1016/j.ccr.2007.04.017
- Selbonne S, Azibani F, Iatmanen S, et al. In vitro and in vivo antiangiogenic properties of the serpin protease nexin-1. *Mol Cell Biol.* 2012;32(8):1496-1505. doi:10.1128/MCB.06554-11
- Selvais C, D'Auria L, Tyteca D, et al. Cell cholesterol modulates metalloproteinase-dependent shedding of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) and clearance function. *FASEB J.* 2011;25(8):2770-2781. doi:10.1096/fj.10-169508
- Selvais C, Gaide Chevonnay HP, Lemoine P, et al. Metalloproteinase-dependent shedding of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 ectodomain decreases endocytic clearance of endometrial matrix metalloproteinase-2 and -9 at menstruation. *Endocrinology.* 2009;150(8):3792-3799. doi:10.1210/en.2009-0015
- Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene.* 2010;29(5):625-634. doi:10.1038/onc.2009.441
- Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell.* 2012;148(3):399-408. doi:10.1016/j.cell.2012.01.021
- Semenza GL. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. *Annu Rev Pathol.* 2014;9:47-71. doi:10.1146/annurev-pathol-012513-104720

- Şen Ö, Emanet M, Ciofani G. Nanotechnology-Based Strategies to Evaluate and Counteract Cancer Metastasis and Neoangiogenesis. *Adv Healthc Mater.* 2021;10(10):e2002163. doi:10.1002/adhm.202002163
- Sengle G, Sakai LY. The fibrillin microfibril scaffold: A niche for growth factors and mechanosensation? *Matrix Biol.* 2015 Sep;47:3-12. doi: 10.1016/j.matbio.2015.05.002. Epub 2015 May 7. PMID: 25957947
- Seo DW, Li H, Guedez L, et al. TIMP-2 mediated inhibition of angiogenesis: an MMP-independent mechanism. *Cell.* 2003;114(2):171-180. doi:10.1016/s0092-8674(03)00551-8
- Seo DW, Li H, Qu CK, et al. Shp-1 mediates the antiproliferative activity of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in human microvascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 2006;281(6):3711-3721. doi:10.1074/jbc.M509932200
- Serrero G, Hawkins DM, Yue B, et al. Progranulin (GP88) tumor tissue expression is associated with increased risk of recurrence in breast cancer patients diagnosed with estrogen receptor positive invasive ductal carcinoma. *Breast Cancer Res.* 2012;14(1):R26. Published 2012 Feb 8. doi:10.1186/bcr3111
- Setyawati MI, Tay CY, Bay BH, Leong DT. Gold Nanoparticles Induced Endothelial Leakiness Depends on Particle Size and Endothelial Cell Origin. *ACS Nano.* 2017;11(5):5020-5030. doi:10.1021/acsnano.7b01744
- Setyawati MI, Tay CY, Leong DT. The gap between endothelial cells: key to the quick escape of nanomaterials?. *Nanomedicine (Lond).* 2014;9(11):1591-1594. doi:10.2217/nnm.14.104
- Sflomos G, Dormoy V, Metsalu T, et al. A Preclinical Model for ER α -Positive Breast Cancer Points to the Epithelial Microenvironment as Determinant of Luminal Phenotype and Hormone Response. *Cancer Cell.* 2016;29(3):407-422. doi:10.1016/j.ccell.2016.02.002
- Shao R, Bao S, Bai X, et al. Acquired expression of periostin by human breast cancers promotes tumor angiogenesis through up-regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2 expression. *Mol Cell Biol.* 2004;24(9):3992-4003. doi:10.1128/MCB.24.9.3992-4003.2004
- Shao Z, Zhang WF, Chen XM, Shang ZJ. Expression of EphA2 and VEGF in squamous cell carcinoma of the tongue: correlation with the angiogenesis and clinical outcome. *Oral Oncol.* 2008;44(12):1110-1117. doi:10.1016/j.oraloncology.2008.01.018
- Sharma N, Seftor RE, Seftor EA, et al. Prostatic tumor cell plasticity involves cooperative interactions of distinct phenotypic subpopulations: role in vasculogenic mimicry. *Prostate.* 2002;50(3):189-201. doi:10.1002/pros.10048
- Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science.* 2015 Apr 3;348(6230):56-61. doi: 10.1126/science.aaa8172. PMID: 25838373
- Sharma P, Klemp JR, Kimler BF, et al. Germline BRCA mutation evaluation in a prospective triple-negative breast cancer registry: implications for hereditary breast and/or ovarian cancer syndrome testing. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;145(3):707-714. doi:10.1007/s10549-014-2980-0
- Shen M, Jiang YZ, Wei Y, et al. Tinagl1 Suppresses Triple-Negative Breast Cancer Progression and Metastasis by Simultaneously Inhibiting Integrin/FAK and EGFR Signaling. *Cancer Cell.* 2019;35(1):64-80.e7. doi:10.1016/j.ccell.2018.11.016
- Shen M, Wang J, Ren X. New Insights into Tumor-Infiltrating B Lymphocytes in Breast Cancer: Clinical Impacts and Regulatory Mechanisms. *Front Immunol.* 2018;9:470. Published 2018 Mar 8.

doi:10.3389/fimmu.2018.00470

- Shi F, Sottile J. Caveolin-1-dependent beta1 integrin endocytosis is a critical regulator of fibronectin turnover. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 14):2360-2371. doi:10.1242/jcs.014977
- Shi J, Liu F, Song Y. Progress: Targeted Therapy, Immunotherapy, and New Chemotherapy Strategies in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Manag Res.* 2020;12:9375-9387. Published 2020 Sep 30. doi:10.2147/CMAR.S272685
- Shi M, Zhu J, Wang R, et al. Latent TGF- β structure and activation. *Nature.* 2011;474(7351):343-349. Published 2011 Jun 15. doi:10.1038/nature10152
- Shields BJ, Wiede F, Gurzov EN, et al. TCPTP regulates SFK and STAT3 signaling and is lost in triple-negative breast cancers. *Mol Cell Biol.* 2013;33(3):557-570. doi:10.1128/MCB.01016-12
- Shiga K, Hara M, Nagasaki T, Sato T, Takahashi H, Takeyama H. Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth. *Cancers (Basel).* 2015;7(4):2443-2458. Published 2015 Dec 11. doi:10.3390/cancers7040902
- Shim WS, Ho IA, Wong PE. Angiopoietin: a TIE(d) balance in tumor angiogenesis. *Mol Cancer Res.* 2007;5(7):655-665. doi:10.1158/1541-7786.MCR-07-0072
- Shimo T, Kubota S, Yoshioka N, et al. Pathogenic role of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in osteolytic metastasis of breast cancer. *J Bone Miner Res.* 2006;21(7):1045-1059. doi:10.1359/jbmr.060416
- Shimoda M, Ohtsuka T, Okada Y, Kanai Y. Stromal metalloproteinases: Crucial contributors to the tumor microenvironment. *Pathol Int.* 2021;71(1):1-14. doi:10.1111/pin.13033
- Shinohara M, Tachibana M, Kanekiyo T, Bu G. Role of LRP1 in the pathogenesis of Alzheimer's disease: evidence from clinical and preclinical studies. *J Lipid Res.* 2017;58(7):1267-1281. doi:10.1194/jlr.R075796
- Shirakawa K, Tsuda H, Heike Y, et al. Absence of endothelial cells, central necrosis, and fibrosis are associated with aggressive inflammatory breast cancer. *Cancer Res.* 2001;61(2):445-451
- Shoemark DK, Ziegler B, Watanabe H, et al. Emergence of a Thrombospondin Superfamily at the Origin of Metazoans. *Mol Biol Evol.* 2019;36(6):1220-1238. doi:10.1093/molbev/msz060
- Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:929-958. doi:10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833
- Siemann DW. The unique characteristics of tumor vasculature and preclinical evidence for its selective disruption by Tumor-Vascular Disrupting Agents. *Cancer Treat Rev.* 2011;37(1):63-74. doi:10.1016/j.ctrv.2010.05.001
- Sigurbjörnsdóttir S, Mathew R, Leptin M. Molecular mechanisms of de novo lumen formation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(10):665-676. doi:10.1038/nrm3871
- Sinevici N, Atacina B, Zehnder V, et al. HER3 Differentiates Basal From Claudin Type Triple Negative Breast Cancer and Contributes to Drug and Microenvironmental Induced Resistance. *Front Oncol.* 2020;10:554704. Published 2020 Nov 20. doi:10.3389/fonc.2020.554704
- Singh N, Baby D, Rajguru JP, Patil PB, Thakkannavar SS, Pujari VB. Inflammation and cancer. *Ann Afr Med.* 2019;18(3):121-126. doi:10.4103/aam.aam_56_18
- Singh P, Carraher C, Schwarzbauer JE. Assembly of fibronectin extracellular matrix. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2010;26:397-419. doi:10.1146/annurev-cellbio-100109-104020
- Singh P, Schwarzbauer JE. Fibronectin and stem cell differentiation - lessons from chondrogenesis.

- J Cell Sci.* 2012;125(Pt 16):3703-3712. doi:10.1242/jcs.095786
- Singh V, Ram M, Kumar R, Prasad R, Roy BK, Singh KK. Phosphorylation: Implications in Cancer. *Protein J.* 2017 Feb;36(1):1-6. doi: 10.1007/s10930-017-9696-z. PMID: 28108801
- Singla T, Singla G, Ranga S, Singla S, Arora R. Role of platelet aggregation in metastatic breast cancer patients. *Indian J Pathol Microbiol.* 2020 Oct-Dec;63(4):564-569. doi: 10.4103/IJPM.IJPM_817_19. PMID: 33154306
- Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017;14(9):531-548. doi:10.1038/nrclinonc.2017.14
- Sitas F. Twenty five years since the first prospective study by Forman et al. (1991) on *Helicobacter pylori* and stomach cancer risk. *Cancer Epidemiol.* 2016 Apr;41:159-64. doi: 10.1016/j.canep.2016.02.002. Epub 2016 Feb 26. PMID: 2692217
- Sivori S, Vacca P, Del Zotto G, Munari E, Mingari MC, Moretta L. Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications. *Cell Mol Immunol.* 2019;16(5):430-441. doi:10.1038/s41423-019-0206-4
- Slamon D, Eiermann W, Robert N, et al. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2011;365(14):1273-1283. doi:10.1056/NEJMoa0910383
- Slater T, Haywood NJ, Matthews C, Cheema H, Wheatcroft SB. Insulin-like growth factor binding proteins and angiogenesis: from cancer to cardiovascular disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2019;46:28-35. doi:10.1016/j.cytogfr.2019.03.005
- Smid M, Wang Y, Zhang Y, et al. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res.* 2008;68(9):3108-3114. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5644
- Smith ML, Gourdon D, Little WC, et al. Force-induced unfolding of fibronectin in the extracellular matrix of living cells. *PLoS Biol.* 2007;5(10):e268. doi:10.1371/journal.pbio.0050268
- Snoek-van Beurden PA, Von den Hoff JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques.* 2005 Jan;38(1):73-83. doi: 10.2144/05381RV01. PMID: 15679089.
- Sobierajska K, Ciszewski WM, Sacewicz-Hofman I, Niewiarowska J. Endothelial Cells in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1234:71-86. doi: 10.1007/978-3-030-37184-5_6. PMID: 32040856.
- Son HN, Nam JO, Kim S, Kim IS. Multiple FAS1 domains and the RGD motif of TGFBI act cooperatively to bind $\alpha v \beta 3$ integrin, leading to anti-angiogenic and anti-tumor effects. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1833(10):2378-2388. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.06.012
- Song H, Li Y, Lee J, Schwartz AL, Bu G. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 promotes cancer cell migration and invasion by inducing the expression of matrix metalloproteinases 2 and 9. *Cancer Res.* 2009;69(3):879-886. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3379
- Song S, Ewald AJ, Stallcup W, Werb Z, Bergers G. PDGFRbeta+ perivascular progenitor cells in tumours regulate pericyte differentiation and vascular survival. *Nat Cell Biol.* 2005;7(9):870-879. doi:10.1038/ncb1288
- Song S, Rosen KM, Corfas G. Biological function of nuclear receptor tyrosine kinase action. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(7):a009001. Published 2013 Jul 1. doi:10.1101/cshperspect.a009001
- Sonveaux P, Végran F, Schroeder T, et al. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic

- tumor cells in mice. *J Clin Invest.* 2008;118(12):3930-3942. doi:10.1172/JCI36843
- Sood AK, Seftor EA, Fletcher MS, et al. Molecular determinants of ovarian cancer plasticity. *Am J Pathol.* 2001;158(4):1279-1288. doi:10.1016/S0002-9440(10)64079-5
- Sottile J, Chandler J. Fibronectin matrix turnover occurs through a caveolin-1-dependent process. *Mol Biol Cell.* 2005;16(2):757-768. doi:10.1091/mbc.e04-08-0672
- Sottile J, Hocking DC. Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions. *Mol Biol Cell.* 2002;13(10):3546-3559. doi:10.1091/mbc.e02-01-0048
- Span PN, Lindberg RL, Manders P, et al. Tissue inhibitors of metalloproteinase expression in human breast cancer: TIMP-3 is associated with adjuvant endocrine therapy success. *J Pathol.* 2004;202(4):395-402. doi:10.1002/path.1528
- Speers C, Zhao SG, Kothari V, et al. Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase (MELK) as a Novel Mediator and Biomarker of Radioresistance in Human Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2016;22(23):5864-5875. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2711
- Spoelgen R, Hammes A, Anzenberger U, Zechner D, Andersen OM, Jerchow B, Willnow TE. LRP2/megalin is required for patterning of the ventral telencephalon. *Development.* 2005 Jan;132(2):405-14. doi: 10.1242/dev.01580. PMID: 15623804
- Sporn MB, Liby KT. NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(8):564-571. Published 2012 Jul 19. doi:10.1038/nrc3278
- Spring H, Schöler T, Arnold B, Hämmerling GJ, Ganss R. Chemokines direct endothelial progenitors into tumor neovessels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(50):18111-18116. doi:10.1073/pnas.0507158102
- Staaf J, Glodzik D, Bosch A, et al. Whole-genome sequencing of triple-negative breast cancers in a population-based clinical study. *Nat Med.* 2019;25(10):1526-1533. doi:10.1038/s41591-019-0582-4
- Stadlbauer A, Zimmermann M, Bennani-Baiti B, et al. Development of a Non-invasive Assessment of Hypoxia and Neovascularization with Magnetic Resonance Imaging in Benign and Malignant Breast Tumors: Initial Results. *Mol Imaging Biol.* 2019;21(4):758-770. doi:10.1007/s11307-018-1298-4
- Stefanelli VL, Choudhury S, Hu P, et al. Citrullination of fibronectin alters integrin clustering and focal adhesion stability promoting stromal cell invasion. *Matrix Biol.* 2019;82:86-104. doi:10.1016/j.matbio.2019.04.002
- Stefansson S, Chappell DA, Argraves KM, Strickland DK, Argraves WS. Glycoprotein 330/low density lipoprotein receptor-related protein-2 mediates endocytosis of low density lipoproteins via interaction with apolipoprotein B100. *J Biol Chem.* 1995;270(33):19417-19421. doi:10.1074/jbc.270.33.19417
- Steinman RM. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:1-22. doi: 10.1146/annurev-immunol-100311-102839. Epub 2011 Nov 17. PMID: 22136168
- Stenina-Adognravi O, Plow EF. Thrombospondin-4 in tissue remodeling. *Matrix Biol.* 2019;75-76:300-313. doi:10.1016/j.matbio.2017.11.006
- Stenzel D, Lundkvist A, Sauvaget D, et al. Integrin-dependent and -independent functions of

- astrocytic fibronectin in retinal angiogenesis. *Development*. 2011;138(20):4451-4463. doi:10.1242/dev.071381
- Stevic I, Müller V, Weber K, et al. Specific microRNA signatures in exosomes of triple-negative and HER2-positive breast cancer patients undergoing neoadjuvant therapy within the GeparSixto trial. *BMC Med*. 2018;16(1):179. Published 2018 Oct 10. doi:10.1186/s12916-018-1163-y
- Stirzaker C, Zotenko E, Song JZ, et al. Methylome sequencing in triple-negative breast cancer reveals distinct methylation clusters with prognostic value. *Nat Commun*. 2015;6:5899. Published 2015 Feb 2. doi:10.1038/ncomms6899
- Stolarek RA, Potargowicz E, Seklewska E, Jakubik J, Lewandowski M, Jeziorski A, Nowak D. Increased H₂O₂ level in exhaled breath condensate in primary breast cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010 Jun;136(6):923-30. doi: 10.1007/s00432-009-0734-x. Epub 2009 Dec 5. PMID: 19967414
- Storm C, Pastore JJ, MacKintosh FC, Lubensky TC, Janmey PA. Nonlinear elasticity in biological gels. *Nature*. 2005 May 12;435(7039):191-4. doi: 10.1038/nature03521. PMID: 15889088
- Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature*. 2009;458(7239):719-724. doi:10.1038/nature07943
- Stravodimou A, Voutsadakis IA. The Future of ER+/HER2- Metastatic Breast Cancer Therapy: Beyond PI3K Inhibitors. *Anticancer Res*. 2020;40(9):4829-4841. doi:10.21873/anticancer.14486
- Strickland DK, Ashcom JD, Williams S, Burgess WH, Migliorini M, Argraves WS. Sequence identity between the alpha 2-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor. *J Biol Chem*. 1990;265(29):17401-17404
- Strilić B, Kucera T, Eglinger J, et al. The molecular basis of vascular lumen formation in the developing mouse aorta. *Dev Cell*. 2009;17(4):505-515. doi:10.1016/j.devcel.2009.08.011
- Stubbs M, McSheehy PM, Griffiths JR, Bashford CL. Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment. *Mol Med Today*. 2000;6(1):15-19. doi:10.1016/s1357-4310(99)01615-9
- Styp-Rekowska B, Hlushchuk R, Pries AR, Djonov V. Intussusceptive angiogenesis: pillars against the blood flow. *Acta Physiol (Oxf)*. 2011;202(3):213-223. doi:10.1111/j.1748-1716.2011.02321.x
- Subramanian C, Grogan PT, Wang T, et al. Novel C-terminal heat shock protein 90 inhibitors target breast cancer stem cells and block migration, self-renewal, and epithelial-mesenchymal transition. *Mol Oncol*. 2020;14(9):2058-2068. doi:10.1002/1878-0261.12686
- Subramanian M, Hayes CD, Thome JJ, et al. An AXL/LRP-1/RANBP9 complex mediates DC efferocytosis and antigen cross-presentation in vivo. *J Clin Invest*. 2014;124(3):1296-1308. doi:10.1172/JCI72051
- Suchting S, Freitas C, le Noble F, et al. The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(9):3225-3230. doi:10.1073/pnas.0611177104
- Sugiyama A, Mitsui A, Okada M, Yamawaki H. Cathepsin S degrades arresten and canstatin in infarcted area after myocardial infarction in rats. *J Vet Med Sci*. 2019;81(4):522-531. doi:10.1292/jvms.18-0674
- Sullivan LB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer Metab*. 2014;2:17. Published 2014 Nov 28. doi:10.1186/2049-3002-2-17

- Sullivan M, Galea P, Latif S. What is the appropriate oxygen tension for in vitro culture?. *Mol Hum Reprod.* 2006;12(11):653. doi:10.1093/molehr/gal081
- Suman S, Das TP, Damodaran C. Silencing NOTCH signaling causes growth arrest in both breast cancer stem cells and breast cancer cells. *Br J Cancer.* 2013;109(10):2587-2596. doi:10.1038/bjc.2013.642
- Sun B, Zhang D, Zhao N, Zhao X. Epithelial-to-endothelial transition and cancer stem cells: two cornerstones of vasculogenic mimicry in malignant tumors. *Oncotarget.* 2017;8(18):30502-30510. doi:10.18632/oncotarget.8461
- Sunderland, Ashley James (2020) Transcriptomic Profiling and Molecular Characterisation of Dormant and Proliferating Breast Cancer Cells in the Brain. PhD thesis, University of Leeds
- Sung JS, Kang CW, Kang S, et al. ITGB4-mediated metabolic reprogramming of cancer-associated fibroblasts. *Oncogene.* 2020;39(3):664-676. doi:10.1038/s41388-019-1014-0
- Sung JS, Malak SF, Bajaj P, Alis R, Dershaw DD, Morris EA. Screening breast MR imaging in women with a history of lobular carcinoma in situ. *Radiology.* 2011;261(2):414-420. doi:10.1148/radiol.11110091
- Sung JS, Stamler S, Brooks J, et al. Breast Cancers Detected at Screening MR Imaging and Mammography in Patients at High Risk: Method of Detection Reflects Tumor Histopathologic Results. *Radiology.* 2016;280(3):716-722. doi:10.1148/radiol.2016151419
- Suri C, Jones PF, Patan S, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell.* 1996;87(7):1171-1180. doi:10.1016/s0092-8674(00)81813-9
- Sutton TL, Schlitt A, Gardiner SK, Johnson N, Garreau JR. Time to surgery following neoadjuvant chemotherapy for breast cancer impacts residual cancer burden, recurrence, and survival. *J Surg Oncol.* 2020;122(8):1761-1769. doi:10.1002/jso.26216
- Suzuki K, Sun R, Origuchi M, et al. Mesenchymal stromal cells promote tumor growth through the enhancement of neovascularization. *Mol Med.* 2011;17(7-8):579-587. doi:10.2119/molmed.2010.00157
- Suzuki M, Hori K, Abe I, Saito S, Sato H. A new approach to cancer chemotherapy: selective enhancement of tumor blood flow with angiotensin II. *J Natl Cancer Inst.* 1981;67(3):663-669
- Svensson L, Oldberg A, Heinegård D. Collagen binding proteins. *Osteoarthritis Cartilage.* 2001;9 Suppl A:S23-8. doi: 10.1053/joca.2001.0440. PMID: 11680683
- Swain SM, Baselga J, Kim SB, et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2015;372(8):724-734. doi:10.1056/NEJMoa1413513
- Swinnen J, Keupers M, Soens J, Lavens M, Postema S, Van Ongeval C. Breast imaging surveillance after curative treatment for primary non-metastasised breast cancer in non-high-risk women: a systematic review. *Insights Imaging.* 2018;9(6):961-970. doi:10.1007/s13244-018-0667-5
- Szattmári T, Ötvös R, Hjerpe A, Dobra K. Syndecan-1 in Cancer: Implications for Cell Signaling, Differentiation, and Prognostication. *Dis Markers.* 2015;2015:796052. doi:10.1155/2015/796052
- Szomolay B, Eubank TD, Roberts RD, Marsh CB, Friedman A. Modeling the inhibition of breast cancer growth by GM-CSF. *J Theor Biol.* 2012;303:141-151. doi:10.1016/j.jtbi.2012.03.024
- Szymborska A, Gerhardt H. Hold Me, but Not Too Tight-Endothelial Cell-Cell Junctions in

- Angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018;10(8):a029223. Published 2018 Aug 1. doi:10.1101/cshperspect.a029223
- Taddei ML, Giannoni E, Fiaschi T, Chiarugi P. Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases. *J Pathol.* 2012;226(2):380-393. doi:10.1002/path.3000
- Takahashi T, Takase Y, Yoshino T, Saito D, Tadokoro R, Takahashi Y. Angiogenesis in the developing spinal cord: blood vessel exclusion from neural progenitor region is mediated by VEGF and its antagonists. *PLoS One.* 2015;10(1):e0116119. Published 2015 Jan 13. doi:10.1371/journal.pone.0116119
- Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, Shibuya M. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J.* 2001;20(11):2768-2778. doi:10.1093/emboj/20.11.2768
- Takayama Y, May P, Anderson RG, Herz J. Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) controls endocytosis and c-CBL-mediated ubiquitination of the platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFR beta). *J Biol Chem.* 2005;280(18):18504-18510. doi:10.1074/jbc.M410265200
- Takeshita S, Kikuno R, Tezuka K, Amann E. Osteoblast-specific factor 2: cloning of a putative bone adhesion protein with homology with the insect protein fasciclin I. *Biochem J.* 1993;294 (Pt 1)(Pt 1):271-278. doi:10.1042/bj2940271
- Talks KL, Turley H, Gatter KC, et al. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol.* 2000;157(2):411-421. doi:10.1016/s0002-9440(10)64554-3
- Tallerico R, Conti L, Lanzardo S, et al. NK cells control breast cancer and related cancer stem cell hematological spread. *Oncoimmunology.* 2017;6(3):e1284718. Published 2017 Feb 23. doi:10.1080/2162402X.2017.1284718
- Tammela T, Zarkada G, Nurmi H, et al. VEGFR-3 controls tip to stalk conversion at vessel fusion sites by reinforcing Notch signalling. *Nat Cell Biol.* 2011;13(10):1202-1213. Published 2011 Sep 11. doi:10.1038/ncb2331
- Tang N, Wang L, Esko J, et al. Loss of HIF-1alpha in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis. *Cancer Cell.* 2004;6(5):485-495. doi:10.1016/j.ccr.2004.09.026
- Tangkeangsirisin W, Serrero G. PC cell-derived growth factor (PCDGF/GP88, progranulin) stimulates migration, invasiveness and VEGF expression in breast cancer cells. *Carcinogenesis.* 2004;25(9):1587-1592. doi:10.1093/carcin/bgh171
- Tattersall IW, Du J, Cong Z, et al. In vitro modeling of endothelial interaction with macrophages and pericytes demonstrates Notch signaling function in the vascular microenvironment. *Angiogenesis.* 2016;19(2):201-215. doi:10.1007/s10456-016-9501-1
- Tawada M, Hayashi S, Ikegame Y, Nakashima S, Yoshida K. Possible involvement of tumor-producing VEGF-A in the recruitment of lymphatic endothelial progenitor cells from bone marrow. *Oncol Rep.* 2014;32(6):2359-2364. doi:10.3892/or.2014.3499
- Tayebi N, Lopez G, Do J, Sidransky E. Pro-cathepsin D, Prosaposin, and Progranulin: Lysosomal Networks in Parkinsonism. *Trends Mol Med.* 2020;26(10):913-923. doi:10.1016/j.molmed.2020.07.004
- Taylor MA, Parvani JG, Schiemann WP. The pathophysiology of epithelial-mesenchymal transition

- induced by transforming growth factor-beta in normal and malignant mammary epithelial cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2010;15(2):169-190. doi:10.1007/s10911-010-9181-1
- Telli ML, Timms KM, Reid J, et al. Homologous Recombination Deficiency (HRD) Score Predicts Response to Platinum-Containing Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. 2016;22(15):3764-3773. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2477
- Templeton ZS, Lie WR, Wang W, et al. Breast Cancer Cell Colonization of the Human Bone Marrow Adipose Tissue Niche. *Neoplasia*. 2015;17(12):849-861. doi:10.1016/j.neo.2015.11.005
- Testino G, Ancarani O, Scafato E. Bevande alcoliche e cancro: uso, abuso o consumo? [Alcohol consumption and cancer risk]. *Recenti Prog Med*. 2011;102(10):399-406. doi:10.1701/955.10455
- Thangavelu PU, Krenács T, Dray E, Duijf PH. In epithelial cancers, aberrant *COL17A1* promoter methylation predicts its misexpression and increased invasion. *Clin Epigenetics*. 2016;8:120. Published 2016 Nov 18. doi:10.1186/s13148-016-0290-6
- Theocharis AD, Gialeli C, Hascall VC, Karamanos NK. Extracellular matrix: a functional scaffold, in: N.K. Karamanos (Ed.) *Extracellular Matrix: Pathobiology and Signaling*, Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, Berlin/Boston, 2012, pp. 3-20
- Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016 Feb 1;97:4-27. doi: 10.1016/j.addr.2015.11.001. Epub 2015 Nov 10. PMID: 26562801
- Theret L, Jeanne A, Langlois B, et al. Identification of LRP-1 as an endocytosis and recycling receptor for β 1-integrin in thyroid cancer cells. *Oncotarget*. 2017;8(45):78614-78632. Published 2017 Aug 10. doi:10.18632/oncotarget.20201
- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009 Nov 25;139(5):871-90. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.007. PMID: 19945376
- Thornton P, McColl BW, Greenhalgh A, Denes A, Allan SM, Rothwell NJ. Platelet interleukin-1 α drives cerebrovascular inflammation. *Blood*. 2010;115(17):3632-3639. doi:10.1182/blood-2009-11-252643
- Tian Y, Wang C, Chen S, Liu J, Fu Y, Luo Y. Extracellular Hsp90 α and clusterin synergistically promote breast cancer epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis via LRP1. *J Cell Sci*. 2019;132(15):jcs228213. Published 2019 Jul 31. doi:10.1242/jcs.228213
- Tiedemann K, Bätge B, Müller PK, Reinhardt DP. Interactions of fibrillin-1 with heparin/heparan sulfate, implications for microfibrillar assembly. *J Biol Chem*. 2001 Sep 21;276(38):36035-42. doi: 10.1074/jbc.M104985200. Epub 2001 Jul 18. PMID: 11461921
- To WS, Midwood KS. Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2011;4:21. Published 2011 Sep 16. doi:10.1186/1755-1536-4-21
- Toffoli S, Michiels C. Intermittent hypoxia is a key regulator of cancer cell and endothelial cell interplay in tumours. *FEBS J*. 2008 Jun;275(12):2991-3002. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06454.x. Epub 2008 Apr 25. PMID: 18445039.
- Toh TB, Lee DK, Hou W, et al. Nanodiamond-mitoxantrone complexes enhance drug retention in chemoresistant breast cancer cells. *Mol Pharm*. 2014;11(8):2683-2691. doi:10.1021/mp5001108
- Toledano A, Garaud P, Serin D, et al. Concurrent administration of adjuvant chemotherapy and

- radiotherapy after breast-conserving surgery enhances late toxicities: long-term results of the ARCOSEIN multicenter randomized study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006;65(2):324-332. doi:10.1016/j.ijrobp.2005.12.020
- Tomes L, Emberley E, Niu Y, et al. Necrosis and hypoxia in invasive breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat.* 2003;81(1):61-69. doi:10.1023/A:1025476722493
- Tong Z, Yang XO, Yan H, et al. A protective role by interleukin-17F in colon tumorigenesis. *PLoS One.* 2012;7(4):e34959. doi:10.1371/journal.pone.0034959
- Toussey T, Thathiah A, Jorissen E, et al. ADAM10, the rate-limiting protease of regulated intramembrane proteolysis of Notch and other proteins, is processed by ADAMS-9, ADAMS-15, and the gamma-secretase. *J Biol Chem.* 2009;284(17):11738-11747. doi:10.1074/jbc.M805894200
- Traina TA, Miller K, Yardley DA, et al. Enzalutamide for the Treatment of Androgen Receptor-Expressing Triple-Negative Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2018;36(9):884-890. doi:10.1200/JCO.2016.71.3495
- Tran KT, Lamb P, Deng JS. Matrikines and matricryptins: Implications for cutaneous cancers and skin repair. *J Dermatol Sci.* 2005;40(1):11-20. doi:10.1016/j.jdermsci.2005.05.001
- Treps L, Gavard J. L'angiogenèse tumorale - Quand l'arbre de vie tourne mal [Tumor angiogenesis: when the Tree of Life turns bad]. *Med Sci (Paris).* 2015;31(11):989-995. doi:10.1051/medsci/20153111013
- Troeberg L, Fushimi K, Scilabra SD, et al. The C-terminal domains of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 promote association with N-TIMP-3. *Matrix Biol.* 2009;28(8):463-469. doi:10.1016/j.matbio.2009.07.005
- Trommsdorff M, Borg JP, Margolis B, Herz J. Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein. *J Biol Chem.* 1998;273(50):33556-33560. doi:10.1074/jbc.273.50.33556
- Truffi M, Sorrentino L, Corsi F. Fibroblasts in the Tumor Microenvironment. In: Birbrair A. (eds) *Tumor Microenvironment.* 2020. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1234. Springer, Cham.
- Truffi M, Sorrentino L, Monieri M, et al. Inhibition of Fibroblast Activation Protein Restores a Balanced Extracellular Matrix and Reduces Fibrosis in Crohn's Disease Strictures Ex Vivo. *Inflamm Bowel Dis.* 2018;24(2):332-345. doi:10.1093/ibd/izx008
- Tseng CW, Kuo WH, Chan SH, Chan HL, Chang KJ, Wang LH. Transketolase Regulates the Metabolic Switch to Control Breast Cancer Cell Metastasis via the α -Ketoglutarate Signaling Pathway. *Cancer Res.* 2018;78(11):2799-2812. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-2906
- Tsidulko AY, Matskova L, Astakhova LA, Ernberg I, Grigorieva EV. Proteoglycan expression correlates with the phenotype of malignant and non-malignant EBV-positive B-cell lines. *Oncotarget.* 2015;6(41):43529-43539. doi:10.18632/oncotarget.5984
- Tsubakihara Y, Moustakas A. Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis under the Control of Transforming Growth Factor β . *Int J Mol Sci.* 2018;19(11):3672. Published 2018 Nov 20. doi:10.3390/ijms19113672
- Tsuchiya K, Hida K, Hida Y, et al. Adrenomedullin antagonist suppresses tumor formation in renal cell carcinoma through inhibitory effects on tumor endothelial cells and endothelial progenitor mobilization. *Int J Oncol.* 2010;36(6):1379-1386. doi:10.3892/ijo_00000622

- Tsukada T, Yoshida S, Kito K, et al. TGF β signaling reinforces pericyte properties of the non-endocrine mouse pituitary cell line TtT/GF. *Cell Tissue Res.* 2018;371(2):339-350. doi:10.1007/s00441-017-2758-x
- Tsutsui S, Ohno S, Murakami S, Kataoka A, Kinoshita J, Hachitanda Y. Prognostic significance of the coexpression of p53 protein and c-erbB2 in breast cancer. *Am J Surg.* 2003;185(2):165-167. doi:10.1016/s0002-9610(02)01203-5
- Tubiana M, Koscielny S. The natural history of breast cancer: implications for a screening strategy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1990;19(5):1117-1120. doi:10.1016/0360-3016(90)90213-4
- Tumbarello DA, Andrews MR, Brenton JD. SPARC Regulates Transforming Growth Factor Beta Induced (TGFBI) Extracellular Matrix Deposition and Paclitaxel Response in Ovarian Cancer Cells. *PLoS One.* 2016;11(9):e0162698. Published 2016 Sep 13. doi:10.1371/journal.pone.0162698
- Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(2):116-129. doi:10.1038/nrc2780
- Tutt A, Bertwistle D, Valentine J, et al. Mutation in Brca2 stimulates error-prone homology-directed repair of DNA double-strand breaks occurring between repeated sequences. *EMBO J.* 2001;20(17):4704-4716. doi:10.1093/emboj/20.17.4704
- Twardowski T, Fertala A, Orgel JP, San Antonio JD. Type I collagen and collagen mimetics as angiogenesis promoting superpolymers. *Curr Pharm Des.* 2007;13(35):3608-21. doi:10.2174/138161207782794176. PMID: 18220798
- Ulaner GA, Goldman DA, Gönen M, et al. Initial Results of a Prospective Clinical Trial of 18F-Fluciclovine PET/CT in Newly Diagnosed Invasive Ductal and Invasive Lobular Breast Cancers. *J Nucl Med.* 2016;57(9):1350-1356. doi:10.2967/jnumed.115.170456
- Ulbricht A, Eppler FJ, Tapia VE, van der Ven PF, Hampe N, Hersch N, Vakeel P, Stadel D, Haas A, Saftig P, Behrends C, Fürst DO, Volkmer R, Hoffmann B, Kolanus W, Höhfeld J. Cellular mechanotransduction relies on tension-induced and chaperone-assisted autophagy. *Curr Biol.* 2013 Mar 4;23(5):430-5. doi: 10.1016/j.cub.2013.01.064. Epub 2013 Feb 21. PMID: 23434281
- Ulevy PG, Beers J, Mikhailenko I, et al. Modulation of beta-amyloid precursor protein processing by the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence that LRP contributes to the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 2000;275(10):7410-7415. doi:10.1074/jbc.275.10.7410
- Umeda S, Kanda M, Miwa T, et al. Fraser extracellular matrix complex subunit 1 promotes liver metastasis of gastric cancer. *Int J Cancer.* 2020;146(10):2865-2876. doi:10.1002/ijc.32705
- Ungefroren H, Witte D, Lehnert H. The role of small GTPases of the Rho/Rac family in TGF- β -induced EMT and cell motility in cancer. *Dev Dyn.* 2018;247(3):451-461. doi:10.1002/dvdy.24505
- Urano T, Castellino FJ, Suzuki Y. Regulation of plasminogen activation on cell surfaces and fibrin [published online ahead of print, 2018 May 20]. *J Thromb Haemost.* 2018;16(8):1487-1497. doi:10.1111/jth.14157
- Urbich C, Aicher A, Heeschen C, et al. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;39(5):733-742. doi:10.1016/j.yjmcc.2005.07.003

- Vagia E, Mahalingam D, Cristofanilli M. The Landscape of Targeted Therapies in TNBC. *Cancers* (Basel). 2020;12(4):916. Published 2020 Apr 8. doi:10.3390/cancers12040916
- Vahdat LT, Layman R, Yardley DA, et al. Randomized Phase II Study of Ramucirumab or Icrucumab in Combination with Capecitabine in Patients with Previously Treated Locally Advanced or Metastatic Breast Cancer. *Oncologist*. 2017;22(3):245-254. doi:10.1634/theoncologist.2016-0265
- Valdivia A, Mingo G, Aldana V, et al. Fact or Fiction, It Is Time for a Verdict on Vasculogenic Mimicry?. *Front Oncol*. 2019;9:680. Published 2019 Aug 2. doi:10.3389/fonc.2019.00680
- Valent P, Bonnet D, De Maria R, et al. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(11):767-775. doi:10.1038/nrc3368
- Valentin MD, da Silva SD, Privat M, Alaoui-Jamali M, Bignon YJ. Molecular insights on basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;134(1):21-30. doi:10.1007/s10549-011-1934-z
- Van der Leij F, Bosma SC, van de Vijver MJ, et al. First results of the preoperative accelerated partial breast irradiation (PAPBI) trial. *Radiother Oncol*. 2015;114(3):322-327. doi:10.1016/j.radonc.2015.02.002
- Van Dijk CG, Nieuweboer FE, Pei JY, et al. The complex mural cell: pericyte function in health and disease. *Int J Cardiol*. 2015;190:75-89. doi:10.1016/j.ijcard.2015.03.258
- Van Eijk M, Boosman RJ, Schinkel AH, Huitema ADR, Beijnen JH. Cytochrome P450 3A4, 3A5, and 2C8 expression in breast, prostate, lung, endometrial, and ovarian tumors: relevance for resistance to taxanes. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2019;84(3):487-499. doi:10.1007/s00280-019-03905-3
- Van Gool B, Dedieu S, Emonard H, Roebroek AJ. The Matricellular Receptor LRP1 Forms an Interface for Signaling and Endocytosis in Modulation of the Extracellular Tumor Environment. *Front Pharmacol*. 2015;6:271. Published 2015 Nov 10. doi:10.3389/fphar.2015.00271
- Van Goor H, Melenhorst WB, Turner AJ, Holgate ST. Adamalysins in biology and disease. *J Pathol*. 2009 Nov;219(3):277-86. doi: 10.1002/path.2594. PMID: 19662664
- Van Hinsbergh VW, Koolwijk P. Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead. *Cardiovasc Res*. 2008;78(2):203-212. doi:10.1093/cvr/cvm102
- Van Kempen LC, Rijntjes J, Mamor-Cornelissen I, Vincent-Naulleau S, Gerritsen MJ, Ruiter DJ, van Dijk MC, Geffrotin C, van Muijen GN. Type I collagen expression contributes to angiogenesis and the development of deeply invasive cutaneous melanoma. *Int J Cancer*. 2008 Mar 1;122(5):1019-29. doi: 10.1002/ijc.23147. PMID: 17957794.
- Van Leeuwen EM, Emri E, Merle BMJ, et al. A new perspective on lipid research in age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res*. 2018;67:56-86. doi:10.1016/j.preteyeres.2018.04.006
- Van Meurs M, Kùmpers P, Ligtenberg JJ, Meertens JH, Molema G, Zijlstra JG. Bench-to-bedside review: Angiopoietin signalling in critical illness - a future target?. *Crit Care*. 2009;13(2):207. doi:10.1186/cc7153
- Van Meurs M, Kùmpers P, Ligtenberg JJ, Meertens JH, Molema G, Zijlstra JG. Bench-to-bedside review: Angiopoietin signalling in critical illness - a future target?. *Crit Care*. 2009;13(2):207. doi:10.1186/cc7153
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009;324(5930):1029-1033. doi:10.1126/science.1160809

- Vandeweyer E, Hertens D. Quantification of glands and fat in breast tissue: an experimental determination. *Ann Anat.* 2002;184(2):181-184. doi:10.1016/S0940-9602(02)80016-4
- Vardaki I, Ceder S, Rutishauser D, Baltatzis G, Foukakis T, Panaretakis T. Periostin is identified as a putative metastatic marker in breast cancer-derived exosomes. *Oncotarget.* 2016;7(46):74966-74978. doi:10.18632/oncotarget.11663
- Vaupel P, Harrison L. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *Oncologist.* 2004;9 Suppl 5:4-9. doi:10.1634/theoncologist.9-90005-4
- Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res.* 1989;49(23):6449-6465
- Vautrin-Glabik A, Devy J, Bour C, et al. Angiogenesis Inhibition by a Short 13 Amino Acid Peptide Sequence of Tetrastatin, the $\alpha 4$ (IV) NC1 Domain of Collagen IV. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:775. Published 2020 Aug 11. doi:10.3389/fcell.2020.00775
- Vennin C, Méléne C, Rouet R, et al. CAF hierarchy driven by pancreatic cancer cell p53-status creates a pro-metastatic and chemoresistant environment via perlecan. *Nat Commun.* 2019;10(1):3637. Published 2019 Aug 12. doi:10.1038/s41467-019-10968-6
- Vera-Badillo FE, Templeton AJ, de Gouveia P, et al. Androgen receptor expression and outcomes in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(1):djt319. doi:10.1093/jnci/djt319
- Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR. Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif.* 2003;36(3):165-175. doi:10.1046/j.1365-2184.2003.00267.x
- Vermeulen L, de Sousa e Melo F, Richel DJ, Medema JP. The developing cancer stem-cell model: clinical challenges and opportunities. *Lancet Oncol.* 2012 Feb;13(2):e83-9. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70257-1. PMID: 22300863.
- Vihervuori H, Autere TA, Repo H, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and CD8⁺ T cells predict survival of triple-negative breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2019;145(12):3105-3114. doi:10.1007/s00432-019-03036-5
- Vihinen P, Kähäri VM. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int J Cancer.* 2002 May 10;99(2):157-66. doi: 10.1002/ijc.10329. PMID: 11979428
- Villman K, Sjöström J, Heikkilä R, et al. TOP2A and HER2 gene amplification as predictors of response to anthracycline treatment in breast cancer. *Acta Oncol.* 2006;45(5):590-596. doi:10.1080/02841860500543182
- Vimalraj S, Bhuvaneswari S, Lakshmikirupa S, Jyothsna G, Chatterjee S. Nitric oxide signaling regulates tumor-induced intussusceptive-like angiogenesis. *Microvasc Res.* 2018;119:47-59. doi:10.1016/j.mvr.2018.04.001
- Vinayak S, Tolaney SM, Schwartzberg L, et al. Open-label Clinical Trial of Niraparib Combined With Pembrolizumab for Treatment of Advanced or Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *JAMA Oncol.* 2019;5(8):1132-1140. doi:10.1001/jamaoncol.2019.1029
- Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003 May 2;92(8):827-39. doi: 10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D. PMID: 12730128.
- Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(10):755-768. doi:10.1038/nrc2499

- Vo TT, Ryan J, Carrasco R, et al. Relative mitochondrial priming of myeloblasts and normal HSCs determines chemotherapeutic success in AML. *Cell*. 2012;151(2):344-355. doi:10.1016/j.cell.2012.08.038
- Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013;339(6127):1546-1558. doi:10.1126/science.1235122
- Voronov E, Carmi Y, Apte RN. The role IL-1 in tumor-mediated angiogenesis. *Front Physiol*. 2014;5:114. Published 2014 Mar 28. doi:10.3389/fphys.2014.00114
- Voura EB, English JL, Yu HY, et al. Proteolysis during tumor cell extravasation in vitro: metalloproteinase involvement across tumor cell types. *PLoS One*. 2013;8(10):e78413. Published 2013 Oct 23. doi:10.1371/journal.pone.0078413
- Wade M, Wahl GM. c-Myc, genome instability, and tumorigenesis: the devil is in the details. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;302:169-203. doi:10.1007/3-540-32952-8_7
- Wagenseil JE, Mecham RP. New insights into elastic fiber assembly. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2007 Dec;81(4):229-40. doi: 10.1002/bdrc.20111. PMID: 18228265.
- Wahba HA, El-Hadaad HA. Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer. *Cancer Biol Med*. 2015;12(2):106-116. doi:10.7497/j.issn.2095-3941.2015.0030
- Wajih N, Sane DC. Angiostatin selectively inhibits signaling by hepatocyte growth factor in endothelial and smooth muscle cells. *Blood*. 2003;101(5):1857-1863. doi:10.1182/blood-2002-02-0582
- Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA*. 2019;321(3):288-300. doi:10.1001/jama.2018.19323
- Walia A, Yang JF, Huang YH, Rosenblatt MI, Chang JH, Azar DT. Endostatin's emerging roles in angiogenesis, lymphangiogenesis, disease, and clinical applications. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1850(12):2422-2438. doi:10.1016/j.bbagen.2015.09.007
- Walimbe T, Panitch A. Proteoglycans in Biomedicine: Resurgence of an Underexploited Class of ECM Molecules. *Front Pharmacol*. 2020;10:1661. Published 2020 Jan 29. doi:10.3389/fphar.2019.01661
- Wang HB, Dembo M, Wang YL. Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000 Nov;279(5):C1345-50. doi: 10.1152/ajpcell.2000.279.5.C1345. PMID: 11029281.
- Wang J, Li D, Cang H, Guo B. Crosstalk between cancer and immune cells: Role of tumor-associated macrophages in the tumor microenvironment. *Cancer Med*. 2019;8(10):4709-4721. doi:10.1002/cam4.2327
- Wang S, Blois A, El Rayes T, et al. Development of a prosaposin-derived therapeutic cyclic peptide that targets ovarian cancer via the tumor microenvironment. *Sci Transl Med*. 2016;8(329):329ra34. doi:10.1126/scitranslmed.aad5653
- Wang T, Gilkes DM, Takano N, et al. Hypoxia-inducible factors and RAB22A mediate formation of microvesicles that stimulate breast cancer invasion and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(31):E3234-E3242. doi:10.1073/pnas.1410041111
- Wang X, Lee SR, Arai K, et al. Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator. *Nat Med*. 2003;9(10):1313-1317. doi:10.1038/nm926
- Wang Y, Liu Y, Du Y, Yin W, Lu J. The predictive role of phosphatase and tensin homolog (PTEN)

- loss, phosphoinositol-3 (PI3) kinase (PIK3CA) mutation, and PI3K pathway activation in sensitivity to trastuzumab in HER2-positive breast cancer: a meta-analysis. *Curr Med Res Opin.* 2013;29(6):633-642. doi:10.1185/03007995.2013.794775
- Wang Y, Nakayama M, Pitulescu ME, et al. Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature.* 2010;465(7297):483-486. doi:10.1038/nature09002
- Wang Y, Rehemian A, Spring CM, et al. Plasma fibronectin supports hemostasis and regulates thrombosis. *J Clin Invest.* 2014;124(10):4281-4293. doi:10.1172/JCI74630
- Wang Y, Yin H, Chen P, Xie L, Wang Y. Inhibitory effect of canstatin in alkali burn-induced corneal neovascularization. *Ophthalmic Res.* 2011 ;46(2):66-72. doi:10.1159/000322804
- Wang Z, Cummins JM, Shen D, et al. Three classes of genes mutated in colorectal cancers with chromosomal instability. *Cancer Res.* 2004;64(9):2998-3001. doi:10.1158/0008-5472.can-04-0587
- Watson CA, Camera-Benson L, Palmer-Crocker R, Pober JS. Variability among human umbilical vein endothelial cultures. *Science.* 1995;268(5209):447-448. doi:10.1126/science.7716553
- Weaver AM, Hussaini IM, Mazar A, Henkin J, Gonias SL. Embryonic fibroblasts that are genetically deficient in low density lipoprotein receptor-related protein demonstrate increased activity of the urokinase receptor system and accelerated migration on vitronectin. *J Biol Chem.* 1997;272(22):14372-14379. doi:10.1074/jbc.272.22.14372
- Ween MP, Oehler MK, Ricciardelli C. Role of versican, hyaluronan and CD44 in ovarian cancer metastasis. *Int J Mol Sci.* 2011;12(2):1009-1029. Published 2011 Jan 31. doi:10.3390/ijms12021009
- Wei M, Brandhorst S, Shelehchi M, et al. Fasting-mimicking diet and markers/risk factors for aging, diabetes, cancer, and cardiovascular disease. *Sci Transl Med.* 2017;9(377):eaai8700. doi:10.1126/scitranslmed.aai8700
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science.* 2001;292(5517):727-730. doi:10.1126/science.1059108
- Wells JM, Gaggar A, Blalock JE. MMP generated matrikines. *Matrix Biol.* 2015;44-46:122-129. doi:10.1016/j.matbio.2015.01.016
- Wen G, Partridge MA, Li B, et al. TGFBI expression reduces in vitro and in vivo metastatic potential of lung and breast tumor cells. *Cancer Lett.* 2011;308(1):23-32. doi:10.1016/j.canlet.2011.04.010
- Wheatcroft SB, Kearney MT, Shah AM, et al. Vascular endothelial function and blood pressure homeostasis in mice overexpressing IGF binding protein-1. *Diabetes.* 2003;52(8):2075-2082. doi:10.2337/diabetes.52.8.2075
- Whiteman DC, Wilson LF. The fractions of cancer attributable to modifiable factors: A global review. *Cancer Epidemiol.* 2016;44:203-221. doi:10.1016/j.canep.2016.06.013
- Wierzbicka-Patynowski I, Schwarzbauer JE. The ins and outs of fibronectin matrix assembly. *J Cell Sci.* 2003 Aug 15;116(Pt 16):3269-76. doi: 10.1242/jcs.00670. PMID: 12857786
- Wijelath ES, Rahman S, Namekata M, et al. Heparin-II domain of fibronectin is a vascular endothelial growth factor-binding domain: enhancement of VEGF biological activity by a singular growth factor/matrix protein synergism. *Circ Res.* 2006;99(8):853-860. doi:10.1161/01.RES.0000246849.17887.66

- Williams JL, Cartland D, Hussain A, Egginton S. A differential role for nitric oxide in two forms of physiological angiogenesis in mouse. *J Physiol.* 2006;570(Pt 3):445-454. doi:10.1113/jphysiol.2005.095596
- Willnow TE. The low-density lipoprotein receptor gene family: multiple roles in lipid metabolism. *J Mol Med (Berl).* 1999;77(3):306-315. doi:10.1007/s001090050356
- Wilson CB, Rowell E, Sekimata M. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol.* 2009 Feb;9(2):91-105. doi: 10.1038/nri2487. PMID: 19151746
- Winer JP, Oake S, Janmey PA. Non-linear elasticity of extracellular matrices enables contractile cells to communicate local position and orientation. *PLoS One.* 2009;4(7):e6382. Published 2009 Jul 24. doi:10.1371/journal.pone.0006382
- Winkler F. Hostile takeover: how tumours hijack pre-existing vascular environments to thrive. *J Pathol.* 2017;242(3):267-272. doi:10.1002/path.4904
- Wirapati P, Sotiriou C, Kunkel S, et al. Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. *Breast Cancer Res.* 2008;10(4):R65. doi:10.1186/bcr2124
- Wishart AL, Conner SJ, Guarin JR, et al. Decellularized extracellular matrix scaffolds identify full-length collagen VI as a driver of breast cancer cell invasion in obesity and metastasis. *Sci Adv.* 2020;6(43):eabc3175. Published 2020 Oct 21. doi:10.1126/sciadv.abc3175
- Wishart GC, Greenberg DC, Britton PD, et al. Screen-detected vs symptomatic breast cancer: is improved survival due to stage migration alone?. *Br J Cancer.* 2008;98(11):1741-1744. doi:10.1038/sj.bjc.6604368
- Woldt E, Matz RL, Terrand J, et al. Differential signaling by adaptor molecules LRP1 and ShcA regulates adipogenesis by the insulin-like growth factor-1 receptor. *J Biol Chem.* 2011;286(19):16775-16782. doi:10.1074/jbc.M110.212878
- Wong GL, Abu Jalboush S, Lo HW. Exosomal MicroRNAs and Organotropism in Breast Cancer Metastasis. *Cancers (Basel).* 2020;12(7):1827. Published 2020 Jul 7. doi:10.3390/cancers12071827
- Woodall BP, Nyström A, Iozzo RA, et al. Integrin alpha2beta1 is the required receptor for endorepellin angiostatic activity. *J Biol Chem.* 2008;283(4):2335-2343. doi:10.1074/jbc.M708364200
- Woods A, Couchman JR. Syndecans: synergistic activators of cell adhesion. *Trends Cell Biol.* 1998 May;8(5):189-92. doi: 10.1016/s0962-8924(98)01244-6. PMID: 9695837
- Wu C, Bauer JS, Juliano RL, McDonald JA. The alpha 5 beta 1 integrin fibronectin receptor, but not the alpha 5 cytoplasmic domain, functions in an early and essential step in fibronectin matrix assembly. *J Biol Chem.* 1993 Oct 15;268(29):21883-8. PMID: 7691819
- Wu H, Ying M, Hu X. Lactic acidosis switches cancer cells from aerobic glycolysis back to dominant oxidative phosphorylation. *Oncotarget.* 2016;7(26):40621-40629. doi:10.18632/oncotarget.9746
- Wu L, Gonias SL. The low-density lipoprotein receptor-related protein-1 associates transiently with lipid rafts. *J Cell Biochem.* 2005;96(5):1021-1033. doi:10.1002/jcb.20596
- Wu M, Wu ZF, Kumar-Sinha C, Chinnaiyan A, Merajver SD. RhoC induces differential expression of genes involved in invasion and metastasis in MCF10A breast cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2004;84(1):3-12. doi:10.1023/B:BREA.0000018426.76893.21
- Wu Q, Li J, Zhu S, et al. Breast cancer subtypes predict the preferential site of distant metastases: a

- SEER based study. *Oncotarget*. 2017;8(17):27990-27996. doi:10.18632/oncotarget.15856
- Wu Y, Cain-Hom C, Choy L, et al. Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors. *Nature*. 2010;464(7291):1052-1057. doi:10.1038/nature08878
- Wu Y, Ge G. Complexity of type IV collagens: from network assembly to function. *Biol Chem*. 2019;400(5):565-574. doi:10.1515/hsz-2018-0317
- Wu YH, Hong CW, Wang YC, et al. A novel histone deacetylase inhibitor TMU-35435 enhances etoposide cytotoxicity through the proteasomal degradation of DNA-PKcs in triple-negative breast cancer. *Cancer Lett*. 2017;400:79-88. doi:10.1016/j.canlet.2017.04.023
- Wujak L, Böttcher RT, Pak O, et al. Low density lipoprotein receptor-related protein 1 couples β 1 integrin activation to degradation. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(9):1671-1685. doi:10.1007/s00018-017-2707-6
- Wujak L, Markart P, Wygrecka M. The low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) 1 and its function in lung diseases. *Histol Histopathol*. 2016;31(7):733-745. doi:10.14670/HH-11-746
- Wullkopf L, Jensen LE, Horton ER, Mayorca Guiliani AE, and Madsen CD, Cox TR, Reuten R, Erler JT. Breast Cancer-Secreted Laminin γ 2 Promotes Metastatic Progression Through Attraction of Blood Vessels. Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=3631394> or <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3631394>
- Wykosky J, Debinski W. The EphA2 receptor and ephrinA1 ligand in solid tumors: function and therapeutic targeting. *Mol Cancer Res*. 2008;6(12):1795-1806. doi:10.1158/1541-7786.MCR-08-0244
- Xian X, Ding Y, Dieckmann M, et al. LRP1 integrates murine macrophage cholesterol homeostasis and inflammatory responses in atherosclerosis. *Elife*. 2017;6:e29292. Published 2017 Nov 16. doi:10.7554/eLife.29292
- Xie J, Wu H, Dai C, et al. Beyond Warburg effect--dual metabolic nature of cancer cells. *Sci Rep*. 2014;4:4927. Published 2014 May 13. doi:10.1038/srep04927
- Xie Y, Sheng W, Xiang J, Ye Z, Yang J. Interleukin-17F suppresses hepatocarcinoma cell growth via inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Invest*. 2010;28(6):598-607. doi:10.3109/07357900903287030
- Xu H, Tian Y, Yuan X, et al. Enrichment of CD44 in basal-type breast cancer correlates with EMT, cancer stem cell gene profile, and prognosis. *Onco Targets Ther*. 2016;9:431-444. Published 2016 Jan 21. doi:10.2147/OTT.S97192
- Xu L, Tong R, Cochran DM, Jain RK. Blocking platelet-derived growth factor-D/platelet-derived growth factor receptor beta signaling inhibits human renal cell carcinoma progression in an orthotopic mouse model. *Cancer Res*. 2005;65(13):5711-5719. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-4313
- Xu R, Xin L, Zhang JM, Li ZP, Gan RB. Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai). 2002;34(5):571-575
- Xu Z, Li XF, Zou H, Sun X, Shen B. 18F-Fluoromisonidazole in tumor hypoxia imaging. *Oncotarget*. 2017;8(55):94969-94979. Published 2017 Oct 7. doi:10.18632/oncotarget.21662
- Yamamoto H, Ehling M, Kato K, et al. Integrin β 1 controls VE-cadherin localization and blood vessel stability. *Nat Commun*. 2015;6:6429. Published 2015 Mar 10. doi:10.1038/ncomms7429
- Yamamoto K, Okano H, Miyagawa W, et al. MMP-13 is constitutively produced in human

- chondrocytes and co-endocytosed with ADAMTS-5 and TIMP-3 by the endocytic receptor LRP1. *Matrix Biol.* 2016;56:57-73. doi:10.1016/j.matbio.2016.03.007
- Yamashita T, Ohneda K, Nagano M, et al. Hypoxia-inducible transcription factor-2alpha in endothelial cells regulates tumor neovascularization through activation of ephrin A1. *J Biol Chem.* 2008;283(27):18926-18936. doi:10.1074/jbc.M709133200
- Yana I, Sagara H, Takaki S, et al. Crosstalk between neovessels and mural cells directs the site-specific expression of MT1-MMP to endothelial tip cells. *J Cell Sci.* 2007;120(Pt 9):1607-1614. doi:10.1242/jcs.000679
- Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity.* 2008 May;28(5):639-50. doi: 10.1016/j.immuni.2008.03.017. PMID: 18482568.
- Yancey PG, Ding Y, Fan D, et al. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 prevents early atherosclerosis by limiting lesional apoptosis and inflammatory Ly-6Chigh monocytosis: evidence that the effects are not apolipoprotein E dependent. *Circulation.* 2011;124(4):454-464. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.032268
- Yang J, Lu Y, Lin YY, Zheng ZY, Fang JH, He S, Zhuang SM. Vascular mimicry formation is promoted by paracrine TGF- β and SDF1 of cancer-associated fibroblasts and inhibited by miR-101 in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2016 Dec 1;383(1):18-27. doi: 10.1016/j.canlet.2016.09.012. Epub 2016a Sep 28. PMID: 27693460
- Yang JP, Liao YD, Mai DM, et al. Tumor vasculogenic mimicry predicts poor prognosis in cancer patients: a meta-analysis. *Angiogenesis.* 2016b ;19(2):191-200. doi:10.1007/s10456-016-9500-2
- Yang L, Pang Y, Moses HL. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol.* 2010;31(6):220-227. doi:10.1016/j.it.2010.04.002
- Yang W, Ahn H, Hinrichs M, Torry RJ, Torry DS. Evidence of a novel isoform of placenta growth factor (PlGF-4) expressed in human trophoblast and endothelial cells. *J Reprod Immunol.* 2003;60(1):53-60. doi:10.1016/s0165-0378(03)00082-2
- Yang YC, Zhang N, Van Crombruggen K, Hu GH, Hong SL, Bachert C. Transforming growth factor-beta1 in inflammatory airway disease: a key for understanding inflammation and remodeling. *Allergy.* 2012;67(10):1193-1202. doi:10.1111/j.1398-9995.2012.02880.x
- Yang Z, Strickland DK, Bornstein P. Extracellular matrix metalloproteinase 2 levels are regulated by the low density lipoprotein-related scavenger receptor and thrombospondin 2. *J Biol Chem.* 2001 Mar 16;276(11):8403-8. doi: 10.1074/jbc.M008925200. Epub 2000 Dec 11. PMID: 11113133
- Yankeelov TE, Lepage M, Chakravarthy A, et al. Integration of quantitative DCE-MRI and ADC mapping to monitor treatment response in human breast cancer: initial results. *Magn Reson Imaging.* 2007;25(1):1-13. doi:10.1016/j.mri.2006.09.006
- Yao J, Wu X, Zhuang G, et al. Expression of a functional VEGFR-1 in tumor cells is a major determinant of anti-PlGF antibodies efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(28):11590-11595. doi:10.1073/pnas.1109029108
- Yao Y, Chu Y, Xu B, Hu Q, Song Q. Radiotherapy after surgery has significant survival benefits for patients with triple-negative breast cancer. *Cancer Med.* 2019;8(2):554-563. doi:10.1002/cam4.1954

- Yao Y. Laminin: loss-of-function studies. *Cell Mol Life Sci.* 2017 Mar;74(6):1095-1115. doi: 10.1007/s00018-016-2381-0. Epub 2016 Oct 1. PMID: 27696112
- Yau C, Esserman L, Moore DH, Waldman F, Sninsky J, Benz CC. A multigene predictor of metastatic outcome in early stage hormone receptor-negative and triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010;12(5):R85. doi:10.1186/bcr2753
- Yazlovitskaya EM, Viquez OM, Tu T, et al. The laminin binding $\alpha 3$ and $\alpha 6$ integrins cooperate to promote epithelial cell adhesion and growth. *Matrix Biol.* 2019;77:101-116. doi:10.1016/j.matbio.2018.08.010
- Yee AJ, Akens M, Yang BL, et al. The effect of versican G3 domain on local breast cancer invasiveness and bony metastasis. *Breast Cancer Res.* 2007;9(4):R47. doi:10.1186/bcr1751
- Yin L, Duan JJ, Bian XW, Yu SC. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Res.* 2020;22(1):61. Published 2020 Jun 9. doi:10.1186/s13058-020-01296-5
- Yoneda T, Williams PJ, Hiraga T, Niewolna M, Nishimura R. A bone-seeking clone exhibits different biological properties from the MDA-MB-231 parental human breast cancer cells and a brain-seeking clone in vivo and in vitro. *J Bone Miner Res.* 2001;16(8):1486-1495. doi:10.1359/jbmr.2001.16.8.1486
- Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature.* 1991;352(6333):345-347. doi:10.1038/352345a0
- Yu P, Wilhelm K, Dubrac A, et al. FGF-dependent metabolic control of vascular development. *Nature.* 2017;545(7653):224-228. doi:10.1038/nature22322
- Yuan HT, Khankin EV, Karumanchi SA, Parikh SM. Angiopoietin 2 is a partial agonist/antagonist of Tie2 signaling in the endothelium [published correction appears in *Mol Cell Biol.* 2009 Jun;29(12):3451]. *Mol Cell Biol.* 2009;29(8):2011-2022. doi:10.1128/MCB.01472-08
- Yue W, Yager JD, Wang JP, Jupe ER, Santen RJ. Estrogen receptor-dependent and independent mechanisms of breast cancer carcinogenesis. *Steroids.* 2013;78(2):161-170. doi:10.1016/j.steroids.2012.11.001
- Yue WY, Chen ZP. Does vasculogenic mimicry exist in astrocytoma? *J Histochem Cytochem.* 2005;53(8):997-1002. doi:10.1369/jhc.4A6521.2005
- Yue Z, Moulton SE, Cook M, O'Leary S, Wallace GG. Controlled delivery for neuro-bionic devices. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(4):559-569. doi:10.1016/j.addr.2012.06.002
- Yunker CK, Golembieski W, Lemke N, et al. SPARC-induced increase in glioma matrix and decrease in vascularity are associated with reduced VEGF expression and secretion. *Int J Cancer.* 2008;122(12):2735-2743. doi:10.1002/ijc.23450
- Zeisberg EM, Zeisberg M. The role of promoter hypermethylation in fibroblast activation and fibrogenesis. *J Pathol.* 2013 Jan;229(2):264-73. doi: 10.1002/path.4120. PMID: 23097091
- Zeisberg M, Kalluri R. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 1. Common and organ-specific mechanisms associated with tissue fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2013;304(3):C216-C225. doi:10.1152/ajpcell.00328.2012
- Zen K, Liu DQ, Guo YL, et al. CD44v4 is a major E-selectin ligand that mediates breast cancer cell transendothelial migration. *PLoS One.* 2008;3(3):e1826. Published 2008 Mar 19.

doi:10.1371/journal.pone.0001826

- Zhan X, Stamova B, Sharp FR. Lipopolysaccharide Associates with Amyloid Plaques, Neurons and Oligodendrocytes in Alzheimer's Disease Brain: A Review. *Front Aging Neurosci.* 2018;10:42. Published 2018 Feb 22. doi:10.3389/fnagi.2018.00042
- Zhang F, Tang Z, Hou X, et al. VEGF-B is dispensable for blood vessel growth but critical for their survival, and VEGF-B targeting inhibits pathological angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 ;106(15):6152-6157. doi:10.1073/pnas.0813061106
- Zhang G, Cai X, López-Guisa JM, Collins SJ, Eddy AA. Mitogenic signaling of urokinase receptor-deficient kidney fibroblasts: actions of an alternative urokinase receptor and LDL receptor-related protein. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(8):2090-2102. doi:10.1097/01.ASN.0000135057.41526.2C
- Zhang H, Lee JM, Wang Y, et al. Mutational analysis of the FXNPXY motif within LDL receptor-related protein 1 (LRP1) reveals the functional importance of the tyrosine residues in cell growth regulation and signal transduction. *Biochem J.* 2008 ;409(1):53-64. doi:10.1042/BJ20071127
- Zhang L, Wang H, Li C, et al. VEGF-A/Neuropilin 1 Pathway Confers Cancer Stemness via Activating Wnt/ β -Catenin Axis in Breast Cancer Cells. *Cell Physiol Biochem.* 2017;44(3):1251-1262. doi:10.1159/000485455
- Zhang Y, Eliav Y, Shin SU, Schreiber TH, Podack ER, Tadmor T, Rosenblatt JD. B lymphocyte inhibition of anti-tumor response depends on expansion of Treg but is independent of B-cell IL-10 secretion. *Cancer Immunol Immunother.* 2013 Jan;62(1):87-99. doi: 10.1007/s00262-012-1313-6. Epub 2012 Jul 8. PMID: 22772949
- Zhang Y, Morgan R, Chen C, et al. Mammary-tumor-educated B cells acquire LAP/TGF- β and PD-L1 expression and suppress anti-tumor immune responses. *Int Immunol.* 2016;28(9):423-433. doi:10.1093/intimm/dxw007
- Zhang Y, Morgan R, Podack ER, Rosenblatt J. B cell regulation of anti-tumor immune response. *Immunol Res.* 2013 Dec;57(1-3):115-24. doi: 10.1007/s12026-013-8472-1. PMID: 24293009
- Zhang Z, Imani S, Shasaltaneh MD, et al. The role of vascular mimicry as a biomarker in malignant melanoma: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer.* 2019;19(1):1134. Published 2019 Nov 21. doi:10.1186/s12885-019-6350-5
- Zhang Z, Miao L, Wang L. Inflammation amplification by Versican: the first mediator. *Int J Mol Sci.* 2012;13(6):6873-6882. doi:10.3390/ijms13066873
- Zhao S, Ma D, Xiao Y, Jiang YZ, Shao ZM. Clinicopathologic features and prognoses of different histologic types of triple-negative breast cancer: A large population-based analysis. *Eur J Surg Oncol.* 2018;44(4):420-428. doi:10.1016/j.ejso.2017.11.027
- Zhao S, Zuo WJ, Shao ZM, Jiang YZ. Molecular subtypes and precision treatment of triple-negative breast cancer. *Ann Transl Med.* 2020;8(7):499. doi:10.21037/atm.2020.03.194
- Zhao X, Liu J, Ge S, et al. Saikosaponin A Inhibits Breast Cancer by Regulating Th1/Th2 Balance. *Front Pharmacol.* 2019;10:624. Published 2019 Jun 4. doi:10.3389/fphar.2019.00624
- Zhao Z, Cheng CF, Kim R, Chen M, Woodley DT, Li W. Targeting secreted heat shock protein-90 α (Hsp90 α) to prevent breast cancer progression. *BMC Proc.* 2010;4(Suppl 2):O14. Published 2010 Sep 24.
- Zheng H, Shao F, Martin S, Xu X, Deng CX. WEE1 inhibition targets cell cycle checkpoints for

- triple negative breast cancers to overcome cisplatin resistance. *Sci Rep.* 2017;7:43517. Published 2017a Mar 6. doi:10.1038/srep43517
- Zheng H, Zou W, Shen J, et al. Opposite Effects of Coinjection and Distant Injection of Mesenchymal Stem Cells on Breast Tumor Cell Growth. *Stem Cells Transl Med.* 2016;5(9):1216-1228. doi:10.5966/sctm.2015-0300
- Zheng XY, Yu BL, Xie YF, Zhao SP, Wu CL. Apolipoprotein A5 regulates intracellular triglyceride metabolism in adipocytes. *Mol Med Rep.* 2017b ;16(5):6771-6779. doi:10.3892/mmr.2017.7461
- Zhong L, Simoneau B, Huot J, Simard MJ. p38 and JNK pathways control E-selectin-dependent extravasation of colon cancer cells by modulating miR-31 transcription. *Oncotarget.* 2017;8(1):1678-1687. doi:10.18632/oncotarget.13779
- Zhou M, Tang W, Fu Y, et al. Progranulin protects against renal ischemia/reperfusion injury in mice. *Kidney Int.* 2015;87(5):918-929. doi:10.1038/ki.2014.403
- Zhou W, Yuan J. Necroptosis in health and diseases. *Semin Cell Dev Biol.* 2014;35:14-23. doi:10.1016/j.semcdb.2014.07.013
- Zhou X, Rowe RG, Hiraoka N, et al. Fibronectin fibrillogenesis regulates three-dimensional neovessel formation. *Genes Dev.* 2008;22(9):1231-1243. doi:10.1101/gad.1643308
- Zhou Y, Wu C, Lu G, Hu Z, Chen Q, Du X. FGF/FGFR signaling pathway involved resistance in various cancer types. *J Cancer.* 2020;11(8):2000-2007. Published 2020 Feb 3. doi:10.7150/jca.40531
- Zilberberg A, Yaniv A, Gazit A. The low density lipoprotein receptor-1, LRP1, interacts with the human frizzled-1 (HFz1) and down-regulates the canonical Wnt signaling pathway. *J Biol Chem.* 2004;279(17):17535-17542. doi:10.1074/jbc.M311292200
- Zoeller JJ, Whitelock JM, Iozzo RV. Perlecan regulates developmental angiogenesis by modulating the VEGF-VEGFR2 axis. *Matrix Biol.* 2009;28(5):284-291. doi:10.1016/j.matbio.2009.04.010
- Zonneville J, Safina A, Truskinovsky AM, Arteaga CL, Bakin AV. TGF- β signaling promotes tumor vasculature by enhancing the pericyte-endothelium association. *BMC Cancer.* 2018;18(1):670. Published 2018 Jun 19. doi:10.1186/s12885-018-4587-z
- Zurhove K, Nakajima C, Herz J, Bock HH, May P. Gamma-secretase limits the inflammatory response through the processing of LRP1. *Sci Signal.* 2008;1(47):ra15. Published 2008 Nov 25. doi:10.1126/scisignal.1164263

Rôle du récepteur LRP-1 dans la croissance tumorale et l'angiogenèse associée dans un modèle de cancer mammaire triple négatif

Le récepteur LRP-1 (*Low-density lipoprotein receptor-related protein 1*), appartenant aux LDLR, régule de nombreuses fonctions cellulaires. Défini comme un « mécano-senseur » du microenvironnement, LRP-1 est impliqué dans la dynamique du protéome membranaire, élément central de la progression tumorale. Par une approche d'interférence à l'ARN réalisée sur une lignée de MDA-MB-231, le rôle pro-tumorigène du récepteur LRP-1 *in vivo* a été établi. Un retard de croissance de 60% a été observé dans les tumeurs réprimées pour LRP-1. Ces effets résultent, en autres, d'une modulation de l'angiogenèse tumorale. Des tests angiogéniques (Matrigel plug® et CAMs assay) associés à l'utilisation d'imageries précliniques et d'analyses IHC ont révélés que la répression de LRP-1 régule la densité microvasculaire, la morphologie et l'efficacité de perfusion des vaisseaux sanguins tumoraux. Les tumeurs réprimées pour LRP-1 présentent une hypoxie et une nécrose supérieures aux tumeurs contrôles, illustrant l'incapacité des tumeurs réprimées pour LRP-1 à induire une angiogenèse adéquate. Nous avons montré que le sécrétome issu des cellules tumorales réprimées pour LRP-1 module le comportement des HUVECs sur différents aspects *in vitro* tels que la prolifération, la migration, la formation de structures tubulaires et l'activité plasmin. La caractérisation des sécrétomes par une approche de protéomique nous a permis d'identifier des acteurs moléculaires grâce auxquels LRP-1 pourrait soutenir l'angiogenèse ; notamment en régulant la voie du TGF- β et certains acteurs de l'angiogenèse (PAI-1/-2, TIMPs ou THBS1). Ainsi, LRP-1 apparaît crucial dans la fonctionnalité et de l'organisation des vaisseaux sanguins tumoraux nécessaires à la croissance tumorale mammaire. Des expériences de migration transendothéliale associée à une analyse protéomique en hypoxie révèlent que LRP-1 pourrait être impliqué de manière bivalente dans les phases tardives du cancer en réponse à l'hypoxie.

LRP-1; Cancer mammaire triple négatif; Angiogenèse; Croissance tumorale; Imagerie préclinique

LRP-1 receptor role in tumor growth and associated angiogenesis in a triple negative breast cancer model

The LRP-1 receptor (Low-density lipoprotein receptor-related protein 1), part of the LDLR family, regulates many cellular functions through its interactions with various pericellular, transmembrane or intracellular proteins. Defined as a “mechanosensor” of the microenvironment, LRP-1 is involved in the membrane proteome dynamics, which are decisive for tumor progression. Through an shRNA interference approach used on the MDA-MB-231 TNBC cell line, we have demonstrated the pro-tumorigenic role of LRP-1 *in vivo*. A 60% growth delay was observed in LRP-1-repressed tumors, resulting from the modulation of tumor angiogenesis. Carrying out *in vivo* angiogenic tests (Matrigel plug® and CAMs assay) completed by the use of preclinical imaging and immunohistochemical analyzes allowed us to demonstrate the impact of LRP-1 repression on microvascular density, morphology and perfusion efficiency of tumor blood vessels. LRP-1-repressed tumors showed hypoxia, generating necrosis areas, which illustrates the tumors incapacity to induce adequate angiogenesis to meet their exacerbated needs. We have shown that the secretome of LRP-1-repressed cells modulates the angiogenic potential of endothelial cells *in vitro* through their proliferation, migration, formation of tubular structures and plasmin activity. Using a proteomic approach, we have identified numerous molecular actors through which LRP-1 could support angiogenesis, including the TGF- β signaling amongst many actors directly involved in angiogenesis such as PAI-1/-2, TIMPs or thrombospondin-1. Thus, the LRP-1 receptor appears to be a crucial actor in supporting a TNBC model progression through the angiogenesis modulation. Preliminary experiments of transendothelial migration associated with a proteomic analysis of secretomes in hypoxia allowed us to foresee that LRP-1 could be involved in a bivalent manner in the late stages of the disease, particularly in response to hypoxia.

LRP-1; TNBC; Angiogenesis; Tumor growth; Preclinical imaging

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : ASPECTS CELLULAIRES ET MOLECULAIRES DE LA BIOLOGIE

Université de Reims Champagne-Ardenne

MEDYC - UMR CNRS 7369

UFR Sciences Exactes et Naturelles,

Campus Moulin de la Housse,

BP 1039 51687 Reims cedex 2, France.