

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTITUMORALE DE DAB-1,
UN ANTI-INFLAMMATOIRE DÉRIVÉ DE L'ACIDE AMINOBENZOÏQUE
SUR LES CELLULES DU CANCER DU SEIN

MÉMOIRE PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA
MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR
LAURIE FORTIN

FÉVRIER 2023

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire, de cette thèse ou de cet essai a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire, de sa thèse ou de son essai.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire, cette thèse ou cet essai. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire, de cette thèse et de son essai requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord exprimer ma reconnaissance pour mon directeur de recherche, le professeur Carlos Reyes-Moreno. Je le remercie de m'avoir accepté au sein de son laboratoire, pour réaliser ce projet de recherche et pour la suite de mon parcours. Je le remercie aussi pour sa disponibilité, son encouragement, sa patience, sa générosité; il nous fait tous sentir appréciés et les bienvenus dans son équipe.

Je remercie aussi mon codirecteur de recherche, Gervais Bérubé, pour sa confiance et pour son soutien; ce projet aurait été impossible sans lui et son équipe. Je tiens aussi à saluer son dévouement et sa passion pour la recherche, qui sont des qualités inspirantes pour les jeunes chercheurs.

J'ai eu la chance de côtoyer des personnes formidables tout au long de mon parcours, qui m'ont beaucoup aidé et ont rendu le tout plus agréable.

Plus spécialement, je tiens à remercier Julie pour son aide et sa patience, mais surtout pour son encouragement, son positivisme et sa bonne humeur; elle est toujours là pour nous remonter le moral quand les choses ne se passent pas comme prévu. Jovane, merci pour tes précieux conseils, ton aide, ton soutien, puis d'avoir cru en moi pour la suite de mon parcours.

Les membres du laboratoire, anciens et actuels : Julie, Jovane, Marion, Nihad, Farhan et Yassine, merci pour tous les beaux moments et les fous rires. Je suis choyée de faire partie d'une aussi belle équipe.

Finalement, j'exprime ma gratitude aux professeurs et étudiants des autres laboratoires pour leur aide et leurs conseils, ainsi que pour l'ambiance agréable à l'extérieur des laboratoires. Plus particulièrement, les professeurs Céline Van Themsche et Lionel Berthoux qui laissent à notre disposition du matériel et de l'équipement facilitant la réalisation de nos projets de recherche. Aussi, les professeurs Geneviève Pépin et Patrick Narbonne pour tout ce qui est en lien avec le groupe de recherche; c'est toujours agréable d'échanger et d'entendre les réalisations des autres laboratoires.

RÉSUMÉ

Il est déjà connu que l'inflammation chronique peut être responsable de l'initiation et la progression tumorales dans différents types de cancers, incluant le cancer du sein. Cela fait des médiateurs de l'inflammation une cible de choix pour développer de nouveaux traitements. Dans le microenvironnement tumoral, les macrophages (MØs) jouent un rôle clé dans l'induction et le maintien de l'état inflammatoire et ils interagissent continuellement avec les cellules cancéreuses. Ainsi, ils favorisent l'initiation et la progression tumorale en plus de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). La TEM, un processus crucial dans la cascade métastatique, permet aux cellules cancéreuses de phénotype épithélial de se différencier en cellules mésenchymateuses. La TEM augmente ainsi la migration et l'invasion des cellules cancéreuses, pour finalement favoriser la progression tumorale et le développement de métastases. D'ailleurs, les métastases représentent la plus grande cause de mortalité dans le cancer du sein, ce qui démontre l'importance de travailler à développer des traitements afin de prévenir et guérir les cancers métastatiques.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'effet d'un anti-inflammatoire dérivé de l'acide aminobenzoïque, DAB-1, dont l'activité antitumorale et anti-métastatique a déjà été confirmée à l'aide de modèles de cancer de la vessie *in vitro* et *in vivo*. Afin de démontrer son potentiel thérapeutique sur d'autres types de cancer, nous avons utilisé deux modèles cellulaires différents de cancer du sein humain: les lignées MCF-7 et MDA-MB-231 qui diffèrent au niveau de leur phénotype cellulaire ainsi que leur agressivité. En effet, les cellules MCF-7 représentent un cancer du sein luminal, dont l'état de différenciation est apparenté au phénotype épithélial de la glande mammaire. La lignée cellulaire MDA-MB-231 est représentative d'un cancer du sein triple négatif; les cellules expriment un phénotype mésenchymateux et sont beaucoup plus agressives et invasives que les cellules MCF-7.

Afin d'étudier l'influence de DAB-1 sur la TEM induite par l'inflammation, nous avons étudié la réponse des cellules MCF-7 stimulées avec des facteurs solubles sécrétés par des MØs pro-inflammatoires. La capacité à induire la TEM avec du milieu conditionné des MØs a été confirmée par l'observation d'une morphologie plus allongée et amincie, accompagnée d'une augmentation de l'expression de Snail1 et une diminution de E-cadhérine. Cependant, aucun effet régulateur n'a été observé après un traitement avec DAB-1 sur l'expression de Snail1 et de la E-cadhérine induite par le milieu conditionné des MØs. Nous avons donc étudié l'effet de DAB-1 sur d'autres paramètres liés à la TEM dans les cellules MCF-7, mais aussi dans les cellules MDA-MB-231. Les résultats montrent que DAB-1 inhibe l'invasion, la migration et l'expression de métalloprotéinases matricielles (MMPs) dans les deux lignées cellulaires. De plus, DAB-1 empêche l'activation de différentes voies de signalisation (TNF α /NF- κ B, IL-6/STAT3, TGF β /SMAD2) impliquées dans la progression tumorale et la TEM. Ainsi, la capacité de DAB-1 à empêcher les cellules cancéreuses d'acquérir les propriétés protumorales liées à la TEM pourrait être exploitée en clinique afin de bloquer la

progression de la maladie vers une forme métastatique et améliorer ainsi le taux de survie des patientes atteintes de cancer du sein.

Mots-clés : thérapie anti-cancer, molécules dérivées du PABA, cancer du sein, inflammation, macrophages, facteurs dérivés des macrophages, transition épithélio-mésenchymateuse.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	II
RÉSUMÉ.....	III
LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	VIII
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 Le cancer du sein	1
1.1.1 Prévalence du cancer du sein	1
1.1.1 Types de cancers du sein	1
1.1.2 Traitements de base	2
1.1.3 Traitements ciblés	3
1.2 L'inflammation et le cancer du sein	7
1.2.1 Qu'est-ce que l'inflammation?	7
1.2.2 Lien entre inflammation et développement du cancer	12
1.2.3 Cytokines inflammatoires et développement du cancer	13
1.2.4 Macrophages, inflammation et développement du cancer.....	19
1.2.5 Interactions DAMP/TLR et développement du cancer.....	19
1.2.6 La transition épithélio-mésenchymateuse.....	20
1.3 Molécules anti-inflammatoires dérivées de l'acide aminobenzoïque (DABs)23	
1.3.1 Synthèse des molécules	23
1.3.2 Effet anti-inflammatoire (<i>in vitro/in vivo</i>) de DAB-1	24
1.3.3 Effet antitumoral (<i>in vitro/in vivo</i>) de DAB-1	25
1.4 Problématique, hypothèse et objectifs	27
1.4.1 Problématique	27
1.4.2 Hypothèse	27
1.4.3 Objectifs.....	28
CHAPITRE II	
APPROCHES EXPÉRIMENTALES ET MÉTHODOLOGIQUES.....	29
2.1 Modèles expérimentaux.....	29
2.2 Culture cellulaire	29

2.3	Production du milieu conditionné de macrophages.....	30
2.4	Essai de viabilité cellulaire (MTT assay)	30
2.5	Test de formation de colonies.....	31
2.6	Induction de la TEM dans les cellules MCF-7	32
2.7	Immunobuvardage de type western	33
2.7.1	Lysats cellulaires pour les études de signalisation.....	34
2.8	Immunofluorescence.....	34
2.9	Test d'invasion en chambre de Boyden.....	35
2.10	Test de migration (<i>wound healing assay</i>).....	36
2.11	Zymographie sur gélatine	36
2.12	Analyses statistiques.....	38
CHAPITRE III		
RÉSULTATS.....		39
3.1	L'effet de DAB-1 sur la viabilité des cellules MCF-7 et leur prolifération lorsque stimulées avec les facteurs dérivés des macrophages	39
3.2	Effets des facteurs dérivés des macrophages et de DAB-1 sur l'induction du processus de TEM dans les cellules MCF-7.....	41
3.2.1	Induction de la TEM par les facteurs dérivés des macrophages	41
3.2.2	Effet de DAB-1 sur les paramètres cellulaires associés au processus de TEM	44
3.3	L'effet antitumoral de DAB-1 sur les cellules triple négatives MDA-MB-231	54
CHAPITRE IV		
DISCUSSION ET CONCLUSION.....		59
4.1	Interprétation des résultats	59
4.1.1	Analyse de la viabilité des cellules MCF-7 et leur prolifération lorsque stimulées avec les facteurs dérivés des macrophages	59
4.1.2	Études de l'effet de DAB-1 sur les différents paramètres cellulaires associés au processus de TEM dans les cellules MCF-7 et MDA-MB- 231	62
4.2	Perspectives	68
4.3	Conclusion.....	71
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		72

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Résumé des sous-types de cancer du sein et de leurs caractéristiques.	2
1.2 Illustration des mécanismes d'action de différentes thérapies ciblées du cancer du sein.	4
1.3 Illustration des signaux nécessaires pour l'activation d'un lymphocyte T auxiliaire naïf par une cellule dendritique.	10
1.4 Illustration des médiateurs inflammatoires impliqués dans le développement tumoral.	13
1.5 Illustration des voies de signalisation des cytokines IL-6 et TNF- α	15
1.6 Illustration du processus de transition épithélio-mésenchymateuse, les caractéristiques et marqueurs associés.	22
1.7 Schématisation de la synthèse de DAB-1	24
1.8 Résultats des études in vivo du modèle ectopique de cancer de la vessie murin avec la lignée cellulaire MB49-I	26
3.1 Effets de DAB-1 sur la viabilité et la survie des cellules MCF-7.	40
3.2 Effets des facteurs dérivés des macrophages sur la morphologie des cellules MCF-7 ainsi que sur l'expression de Snail1 et E-cadhérine par les MCF-7.	43
3.3 Effets de DAB-1 sur l'expression de Snail1 et de la E-cadhérine induite par les facteurs dérivés des macrophages dans les cellules MCF-7.	45
3.4 Effets de DAB-1 sur le potentiel invasif et la motilité des cellules MCF-7, puis sur l'activation et l'expression de MMP-9 induites par les facteurs dérivés des macrophages.	47
3.5 Effet de DAB-1 sur l'activation des voies de signalisation pro-tumorales induites par les facteurs dérivés des macrophages dans les cellules MCF-7.	49
3.6 Expression des marqueurs de la TEM dans les cellules MCF-7 stimulées par le réactif <i>StemXvivo</i> ®.	51
3.7 Effet de DAB-1 sur l'activation des voies de signalisation pro-tumorales induites par le réactif <i>StemXvivo</i> ® dans les cellules MCF-7.	53
3.8 Effets de DAB-1 sur l'invasion et la motilité, induites respectivement par les facteurs dérivés des macrophages IL-6, puis sur l'expression de MMP-9 induites par les facteurs dérivés des macrophages dans les cellules MDA-MB-231.	56
3.9 Effet de DAB-1 sur l'activation des voies de signalisation pro-tumorales induites par les facteurs dérivés des macrophages dans les cellules MDA-MB-231.	58

LISTE DES ABRÉVIATIONS

BRCA	<i>Breast cancer gene</i>
CM	Milieu conditionné
COX	Cyclooxygénase
CSF	<i>Colony stimulating factor</i>
DABs	Dérivés de l'acide aminobenzoïque
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ER	Récepteur à l'œstrogène
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
GAS	<i>Interferon-γ activated site</i>
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
HR	Récepteur hormonal
IFN- γ	Interféron gamma
IFNGR	<i>Interferon gamma receptor</i>
IKK	I-kappa-B kinase
IL	Interleukine
iNOS	<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
IRF1	<i>Interferon-regulatory factor 1</i>
JAK	Janus-activated kinase
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>

MMP	<i>Matrix metalloproteinase 9</i>
MØ	Macrophage
NK	Cellules tueuses naturelles
NO	Oxyde nitrique
NF-κB	Facteur nucléaire kappa B
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PR	Récepteur à la progestérone
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
RONS	Espèces réactives à l'oxygène et à l'azote
SERD	<i>Selective estrogen receptor degrader</i>
SERM	<i>Selective estrogen receptor modulator</i>
SMAD	<i>SMA protein and Mothers Against Decapentaplegic gene</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TGF-β RI/RII	<i>Type 1/type 2 TGF-β receptor</i>
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
TMEPAI	<i>Transmembrane prostate androgen induced protein</i>
TNBC	<i>Triple negative breast cancer</i>
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TRAIL	<i>Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

1 CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Le cancer du sein

1.1.1 Prévalence du cancer du sein

En 2022, la Société canadienne du cancer estime que 28 600 femmes recevront un diagnostic de cancer du sein et que 5 500 en décèderont. Ceci équivaut à 78 diagnostics et 15 décès tous les jours, ce qui fait du cancer du sein le type de cancer le plus fréquent et le deuxième plus mortel chez les Canadiennes (1). De manière générale, tous les types de cancers du sein confondus, le taux de survie après 5 ans est d'environ 90 %; cependant, celui-ci chute à 29 % dans des cas de cancers métastatiques (2). Ceci démontre l'importance de travailler à développer des traitements afin de prévenir et guérir les cancers métastatiques.

1.1.1 Types de cancers du sein

Les cancers du sein peuvent se diviser en quatre sous-types moléculaires différents (3), présentés à la figure 1.1 (4). Les quatre sous-types diffèrent selon la présence ou l'absence des récepteurs hormonaux (HR) à la progestérone (PR) et à l'œstrogène (ER), ainsi que la présence augmentée du récepteur HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*), tant au niveau protéique que génique. Brièvement, les différents sous-types de cancer du sein sont : le luminal A (HR+/HER2-), luminal B (HR+/HER2+), HER2 (HR-/HER2+) et le triple négatif (TNBC; HR-/HER2-) (2). La majorité des cancers du sein sont dits hormono-dépendants et donc appartiennent aux sous-types luminal A et B. En effet, dans environ 80 % des cancers du sein, les cellules cancéreuses présentent des récepteurs hormonaux ER et/ou PR (2, 4, 5). L'activation de ces récepteurs par leur

ligand va induire la prolifération cellulaire et ainsi contribuer à la progression tumorale (6).

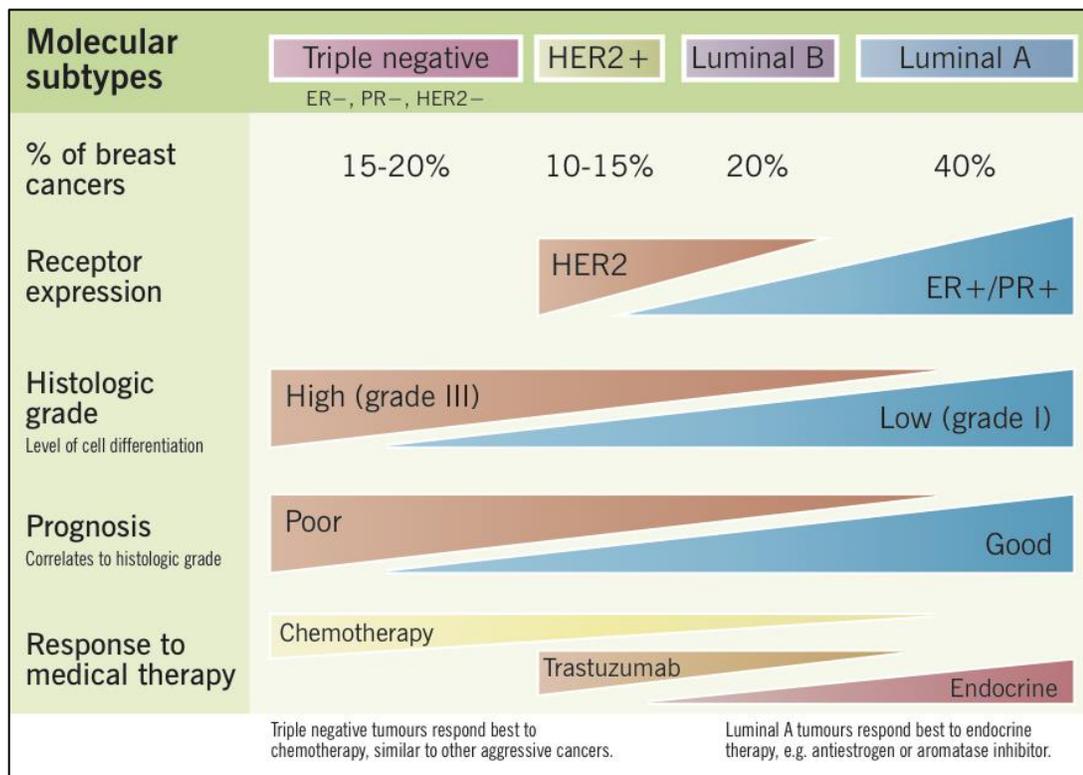


Figure 2.1 Résumé des sous-types de cancer du sein et de leurs caractéristiques.

L'illustration démontre les différents sous-types moléculaires de cancers du sein avec certaines caractéristiques cliniques, soit la proportion de chaque sous-type (%), l'expression des récepteurs hormonaux et HER2, leur grade histologique, leur pronostic relatif et leur réponse aux différents types de traitements. La figure est tirée de Wong et al., 2018 (4).

1.1.2 Traitements de base

Pour tous les types de cancer du sein, il y a tout d'abord des traitements de base qui incluent notamment la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie (2). Il y a deux types de chirurgies pouvant être effectuées, soit la mastectomie ou la chirurgie mammaire conservatrice. Dans le premier cas, la mastectomie implique une élimination complète du tissu mammaire et du fascia pectoral, qui peut aussi parfois inclure les ganglions lymphatiques. Dans le deuxième cas, la chirurgie mammaire conservatrice consiste à éliminer seulement la tumeur et une marge de tissu sain qui l'entoure (2).

Du côté de la chimiothérapie, il existe plusieurs familles d'agents chimiothérapeutiques qui agissent de manière différente pour induire la cytotoxicité. Il y a les agents alkylants (cyclophosphamides ; causent des bris d'ADN), les anti-métabolites (anthracyclines ; empêchent la synthèse d'ADN, d'ARN et de protéines (7, 8)) et les inhibiteurs de tubulines (taxanes; empêchent le désassemblage des microtubules, ce qui mène à l'arrêt du cycle cellulaire). La chimiothérapie peut être administrée avant la chirurgie pour tenter de réduire la taille de la tumeur et ainsi faciliter son excision ou lorsque la chirurgie est impossible, si la tumeur est inatteignable. Sinon, elle est administrée après la chirurgie aux patientes ayant des métastases aux ganglions lymphatiques ou ailleurs, ou ayant un haut risque de récurrence. La chimiothérapie est le traitement le plus efficace contre les TNBC (4). Cependant, elle cause beaucoup d'effets secondaires et les cellules cancéreuses parviennent souvent à développer une résistance aux agents chimiothérapeutiques (2).

Pour ce qui est de la radiothérapie, c'est un traitement qui consiste en une irradiation avec des rayons de haute énergie qui permet de détruire les cellules cancéreuses. La radiothérapie est normalement utilisée après la chirurgie et après la chimiothérapie, donc les rayons seront dirigés vers l'endroit où se trouvait la tumeur ainsi que vers les ganglions lymphatiques proximaux (2). La radiothérapie est efficace pour réduire les risques de récurrence ainsi que de mortalité pour les patientes ayant eu une chirurgie mammaire conservatrice ou une mastectomie, incluant les patientes atteintes au niveau des ganglions lymphatiques (9, 10). Cependant, les cancers plus avancés peuvent avoir une résistance à la radiothérapie et celle-ci peut avoir un effet important de cardiotoxicité, donc il est important de minimiser l'exposition du cœur aux rayons (2, 11).

1.1.3 Traitements ciblés

Actuellement, selon le sous-type de cancer, l'étendue de la tumeur, (stade; non-invasif, invasif, métastatique) et l'état de différenciation des cellules tumorales (grade) (12), le médecin traitant peut proposer des traitements ciblés qui peuvent être

administrés en combinaison ou séparément des traitements de base. Parmi les différents traitements ciblés, on retrouve les thérapies endocrines, les thérapies anti-HER2 et les inhibiteurs de PARP (*poly-ADP ribose polymerase*) (2), dont les mécanismes d'action sont illustrés dans les encadrés rouges de la figure 1.2 (13).

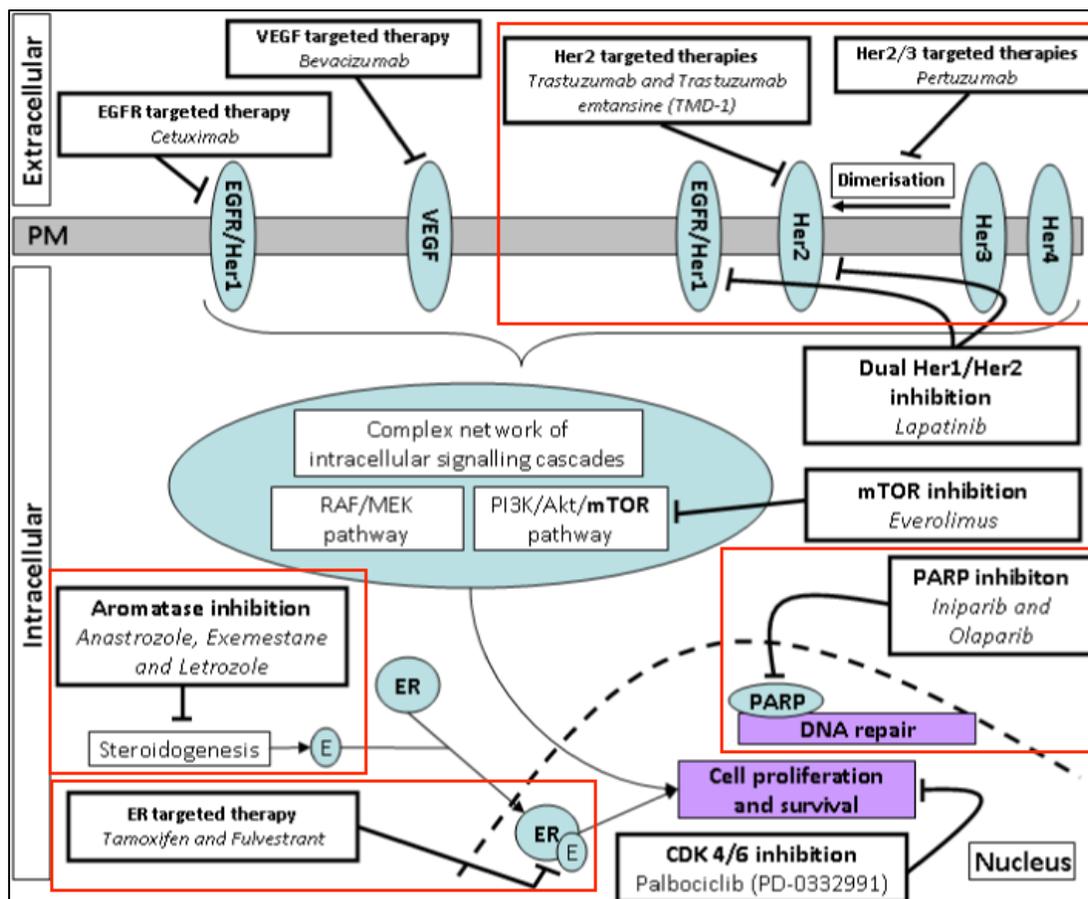


Figure 2.2 Illustration des mécanismes d'action de différentes thérapies ciblées du cancer du sein.

Les encadrés rouges qui ont été ajoutés indiquent les mécanismes d'action des thérapies ciblées présentées ci-dessous. Les inhibiteurs d'aromatase permettent de bloquer la synthèse de l'œstrogène, alors que les thérapies dirigées contre les ER permettent de moduler (Tamoxifen) ou dégrader (Fulvestrant) les ER, inhibant ainsi la signalisation par l'œstrogène. Pour ce qui est des thérapies anti-HER2, elles sont constituées d'anticorps anti-HER2 qui vont bloquer l'activité du récepteur (Trastuzumab) et/ou la dimérisation du HER2 avec HER3 (Pertuzumab). Les inhibiteurs de PARP quant à eux permettent d'inhiber l'activité de la poly-(ADP-ribose) polymérase, une enzyme impliquée dans la réparation de l'ADN dans l'organisme. La figure est tirée de Herper-Wynne C. et al., 2014. (13)

Les thérapies endocrines sont utilisées contre les cancers hormono-dépendants (ER+), puisqu'elles agissent sur l'activité et l'expression des récepteurs à l'œstrogène (SERMs/SERDs ; *selective estrogen receptor modulators / degraders*) ainsi que sur la synthèse de l'œstrogène (inhibiteurs d'aromatase). Le SERM le plus utilisé est le Tamoxifen. Par contre, une résistance à ce traitement est souvent développée par les cellules cancéreuses, qui se caractérise par une diminution de l'expression du récepteur à l'œstrogène ou sa perte de fonction. Cette résistance peut être contrée temporairement par l'utilisation d'un SERD comme le Fulvestrant. Cependant une résistance au Fulvestrant sera aussi souvent développée. Il en est de même pour les inhibiteurs d'aromatase (2).

Les thérapies anti-HER2 sont utilisées contre les cancers HER2+. Il y a différentes thérapies anti-HER2, soit : les anticorps contre HER2, les inhibiteurs de tyrosine kinase et les conjugués anticorps – drogue cytotoxique (Kadcyla)(2). En ce moment, le traitement le plus utilisé pour les cancers du sein HER2+ constitue une combinaison de deux anticorps monoclonaux anti-HER2 (trastuzumab et pertuzumab) et un agent chimiothérapeutique de la classe des taxanes (14, 15).

Pour ce qui est des inhibiteurs de PARP, ce sont les seuls traitements ciblés pouvant être utilisés contre les cancers du sein de type TNBC. Ceux-ci agissent sur la poly- (ADP-ribose) polymérase, une enzyme responsable de la réparation de l'ADN, et ont été développés pour induire la mort cellulaire des cellules cancéreuses par une accumulation de mutations géniques (2). Ces traitements sont surtout efficaces dans des cancers où les gènes BRCA1/2 (Breast cancer gene), aussi impliqués dans la réparation de l'ADN, sont mutés. En effet, les cellules cancéreuses n'arrivent plus à réparer les bris d'ADN lorsque PARP est inhibé et que BRCA1/2 sont mutés et donc subiront l'apoptose. (14)

Plusieurs traitements continuent de faire leur entrée sur le marché pharmaceutique, autant pour les cancers hormono-dépendants qu'hormono-indépendants (2). Par exemple, de nouveaux traitements agissant sur les points de contrôle immunitaires

commencent à être utilisés et ils semblent très prometteurs (15). Ces traitements sont basés sur l'interaction de la protéine PD-1 (*programmed cell death protein 1*) avec son ligand, PD-L1 (*programmed cell death ligand-1*). La PD-1 se retrouve à la surface de plusieurs cellules immunitaires, telles que les MØs, les cellules tueuses naturelles (NK) et les lymphocytes B; PD-L1, quant à elle, se retrouve à la surface des cellules cancéreuses. Une liaison de PD-1 avec son ligand mène à une inhibition de la prolifération des cellules exprimant PD-1, donc les MØs, cellules NK et lymphocytes B, ainsi qu'à une diminution de leur sécrétion de cytokines, tout en induisant l'apoptose de celles-ci. Donc, les cellules cancéreuses réussissent à échapper au système immunitaire via l'expression de PD-L1, qui inhibe l'activité antitumorale des diverses cellules immunitaires (16). Les inhibiteurs de point de contrôle immunitaire peuvent servir à empêcher le signal inhibiteur envoyé par les cellules cancéreuses en bloquant la liaison entre PD-1/PD-L1. Ils agissent en bloquant soit PD-1 (pembrolizumab) ou PD-L1 (atezolizumab) et ainsi favorisent l'élimination de la tumeur par le système immunitaire. Le cancer du sein de type TNBC est celui qui répond le mieux à ce type de traitement étant donné son haut taux de mutation, favorisant ainsi l'expression de nouveaux antigènes immunogènes, en plus de la présence accrue de lymphocytes au niveau de la tumeur (14, 15).

D'autres types de traitements encore en développement incluent des antagonistes des récepteurs d'androgènes, des inhibiteurs des récepteurs d'AKT-1 (14) et des inhibiteurs d'iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) (17). Effectivement, une étude clinique a démontré l'efficacité d'un traitement combinant un inhibiteur d'iNOS (le L-NMMA; NG-monométhyl-L-arginine) avec une taxane, contre le cancer du sein de type TNBC avancé ou métastatique résistant à la chimiothérapie. Le développement de ce nouveau plan de traitement est basé sur la corrélation entre l'expression d'iNOS et le mauvais pronostic de patientes atteintes du cancer du sein. Il a déjà été démontré qu'iNOS est associé au développement de métastases ainsi qu'à la résistance à différents traitements (17).

1.2 L'inflammation et le cancer du sein

1.2.1 Qu'est-ce que l'inflammation?

L'inflammation est une réaction induite par le système immunitaire lorsque les leucocytes détectent un stimulus qui a franchi la ligne de défense physique de l'organisme : la peau et les muqueuses (18). Le stimulus peut être exogène, lors d'une infection par un pathogène, ou endogène, lors d'une blessure tissulaire. Généralement, une réaction inflammatoire est caractérisée par la présence de : chaleur, rougeur, œdème et douleur. Lors de celle-ci, les cellules immunitaires travaillent ensemble afin d'éliminer la cause de la réaction et ainsi retourner le tissu infecté ou lésé à un état d'homéostasie. La réaction inflammatoire qui est déclenchée immédiatement après la perception du stimulus est dite aigüe, alors qu'elle devient chronique lorsqu'elle s'étale sur plusieurs jours, voire plusieurs mois (19, 20).

L'initiation d'une réaction inflammatoire peut être séparée en quatre étapes distinctes (20) :

- 1) La reconnaissance de patrons moléculaires spécifiques apparaissant à la surface des cellules lésées ou des pathogènes, par des cellules immunitaires qui expriment des récepteurs spécifiques à ces patrons
- 2) L'activation de voies de signalisation pro-inflammatoires dans les cellules immunitaires lorsqu'activées
- 3) La production et sécrétion de marqueurs pro-inflammatoires par ces dernières
- 4) Le recrutement des cellules immunitaires

1) La reconnaissance de patrons moléculaires spécifiques

La réaction inflammatoire est déclenchée par l'activation de PRR (*pattern recognition receptors*), dont fait partie la famille des TLRs (*Toll-like receptors*) (20). Les TLRs sont présents à la surface des cellules immunitaires, dont les MØs et les cellules dendritiques en plus des fibroblastes et des cellules

épithéliales. Ces récepteurs reconnaissent les patrons moléculaires associés aux pathogènes (*Pathogen-associated molecular patterns*; PAMPs) ou au dommage cellulaire (*Damage-associated molecular patterns*; DAMPs) (21). En premier lieu, ce sont les cellules dendritiques et les mastocytes qui résident au niveau du tissu affecté qui vont reconnaître les pathogènes ou la blessure par l'activation de leurs TLRs (22). Les mastocytes activés vont libérer de l'histamine, un médiateur inflammatoire responsable d'augmenter la perméabilité vasculaire des tissus. Ceci permettra l'arrivée de protéases plasmatiques, telles que les protéines du complément. Ces dernières pourront éliminer le pathogène soit par opsonisation, favorisant ainsi l'activation des phagocytes, ou par lyse cellulaire, via la formation d'un complexe d'attaque membranaire (23).

2) **L'activation de voies de signalisation pro-inflammatoires**

L'activation des TLRs va induire une cascade de signalisation intracellulaire dans les cellules immunitaires activées, qui ultimement va mener à l'activation de certains facteurs de transcription (19). Ces derniers se déplaceront au noyau afin d'induire l'expression et la production des médiateurs chimiques responsables d'activer des voies de signalisation pro-inflammatoires dans les cellules immunitaires (20). Les différentes voies de signalisation qui sont activées seront décrites plus loin.

3) **La production et sécrétion de marqueurs pro-inflammatoires**

L'activation de voies de signalisation pro-inflammatoires dans les cellules immunitaires va induire la production et la sécrétion de plusieurs molécules inflammatoires telles que des cytokines et chimiokines, des protéases, des espèces réactives à l'oxygène et à l'azote (RONS) et des facteurs de croissance (19, 20).

4) **Le recrutement des cellules immunitaires**

Parmi les différentes molécules inflammatoires qui sont produites, les cytokines et chimiokines vont permettre d'attirer d'autres cellules immunitaires au site de l'infection ou de la blessure. Les neutrophiles sont les premiers à migrer dans les tissus affectés en réponse aux médiateurs chimiques produits. Ils ont la capacité de

phagocyter les pathogènes, puis de produire des cytokines et chimiokines qui, à leur tour, attireront d'autres neutrophiles et des MØs. Les neutrophiles peuvent aussi sécréter des enzymes et des peptides capables de détruire des bactéries et autres microbes, en plus d'activer les enzymes responsables de la production d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) (24).

Bien que la réponse inflammatoire soit un processus normal et important du corps, celle-ci peut devenir néfaste lorsqu'elle se retrouve sous forme chronique, plutôt qu'aigüe. En effet, dans un contexte normal, lorsque le stimulus est éliminé il y a une phase de résolution de la réponse inflammatoire, caractérisée par la production de cytokines anti-inflammatoires, qui vient renverser l'inflammation de sorte que le tissu et le corps retrouvent leur état d'homéostasie. Cependant dans certains cas, le corps n'arrive pas à éliminer le stimulus et donc la réaction inflammatoire est maintenue de manière prolongée, ce qui mène à un état d'inflammation chronique (25, 26). Il peut y avoir plusieurs causes pour une inflammation chronique, incluant : des infections virales et bactériennes, des maladies auto-immunes, l'obésité ou encore les polluants environnementaux (27, 28). L'inflammation chronique peut être à l'origine de différentes maladies, telles que des maladies cardiovasculaires, le diabète de type 2, l'ostéoporose et le cancer (27).

Lors d'une inflammation chronique, il y a activation du système immunitaire adaptatif, qui est activé de manière adaptée, ou spécifique, au stimulus déclencheur (15). Lors de la réponse adaptative, les monocytes circulant dans le sang sont attirés dans les tissus affectés, où ils peuvent se différencier en MØs ou en cellules dendritiques. Ils pourront ensuite phagocyter les pathogènes, ou les cellules anormales (présentant des antigènes altérés ou une surexpression d'antigènes), pour présenter ces antigènes à d'autres cellules immunitaires et ainsi les activer pour une réponse spécifique (19, 29). Plus précisément, les cellules présentatrices d'antigènes (CPA; MØs ou cellules dendritiques) migrent vers les organes lymphoïdes secondaires, soit la rate et/ou les ganglions lymphatiques et présentent les antigènes étrangers phagocytés aux lymphocytes T auxiliaires naïfs (Thø), via le CMH-2. L'activation des Thø nécessite

plusieurs signaux, illustrés à la figure 1.3, notamment une reconnaissance de l'antigène présenté via un récepteur spécifique, le TCR (*T-cell receptor*), une interaction entre le CMH-2 de la CPA et la protéine CD4 du Th \emptyset , une costimulation par la CPA (CD28/B7), puis la présence de cytokines sécrétées par la CPA (30).

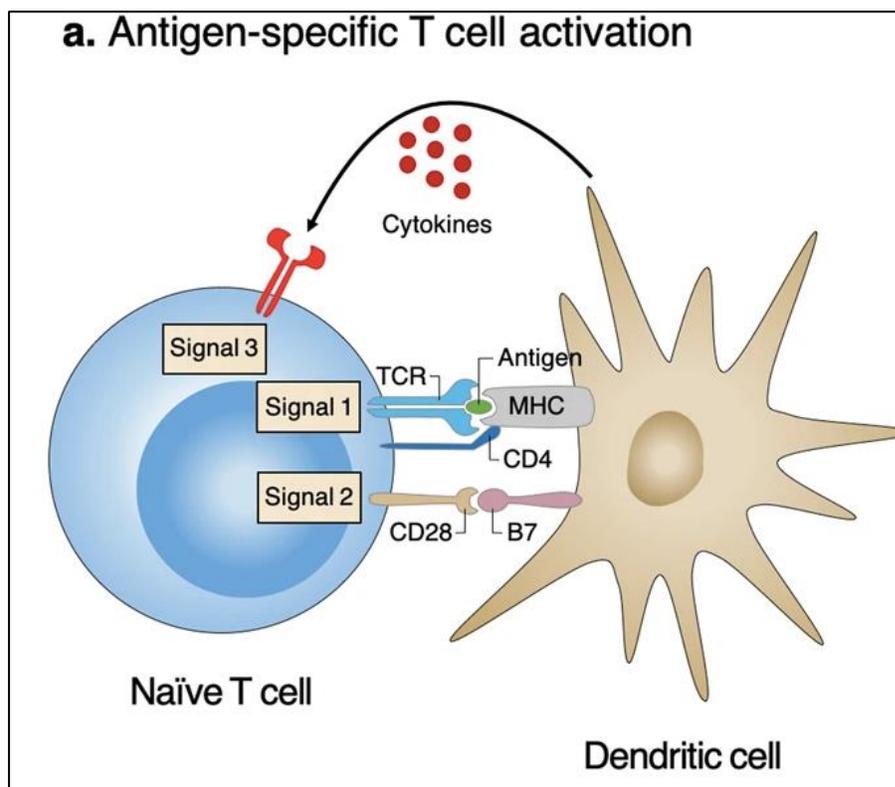


Figure 2.3 - Illustration des signaux nécessaires pour l'activation d'un lymphocyte T auxiliaire naïf par une cellule dendritique.

Afin d'activer les Th \emptyset , plusieurs signaux doivent être présents lors de leur interaction avec les cellules dendritiques (ou autres CPA). Le premier signal est la liaison entre le TCR du Th \emptyset et l'antigène présenté sur la molécule du CMH-2 de la CPA, ainsi que la liaison du CD4 du Th \emptyset avec cette même molécule. Le deuxième signal est celui de costimulation provenant d'une liaison entre la protéine CD28 du Th \emptyset et la protéine B7 de la CPA. Puis le troisième signal est la présence de cytokines produites par la CPA. La figure est tirée de Hong-Gyun Lee et al., 2020. (31)

Cet ensemble de signaux induit la production d'IL-2 par le Th \emptyset , qui agit de manière autocrine pour induire sa prolifération. Ensuite, les Th \emptyset sont différenciés, en lymphocytes T auxiliaires de type 1 ou 2 (Th1/ Th2) ou encore en lymphocytes T régulateurs, entre autres, dépendant des cytokines présentes dans l'environnement

inflammatoire. La présence d'IL-12 et d'IFN γ , sécrétées par les CPA et cellules NK, respectivement, en réponse à la présence de pathogènes intracellulaires, mène à une différenciation en Th1, une cellule effectrice de l'immunité cellulaire (15, 30, 32). La présence d'IL-4 mène à la différenciation en Th2, un type cellulaire impliqué dans l'immunité humorale notamment pour l'activation des lymphocytes B (30, 32). Il est suggéré que l'IL-4 est sécrétée par les cellules du système immunitaire en réponse à la présence de parasites (32), cependant on ignore toujours quelle est la source initiale précise de l'IL-4 (15, 30). Finalement, la présence de TGF- β , suite à une sécrétion par les macrophages entre autres, ou encore la reconnaissance d'antigènes du soi dans le thymus, mènent à la différenciation en lymphocytes T régulateurs, importants dans l'inhibition de la réponse immunitaire et ainsi la tolérance du soi (15, 32).

Comme mentionné plus tôt, la réaction immunitaire peut être séparée en deux catégories différentes, soit l'immunité cellulaire et l'immunité humorale. Du côté de l'immunité cellulaire, les Th1 peuvent activer les MØs, les cellules NK, et les lymphocytes T cytotoxiques, tous responsables de détruire les cellules infectées ou anormales (tumorales). L'immunité humorale, quant à elle, est assurée par les lymphocytes B de manière dépendante ou indépendante aux lymphocytes T selon le lieu de la réponse ainsi que du type d'antigène reconnu (15). La réponse humorale dépendante des lymphocytes T est plus spécifique et durable que la réponse indépendante. Lors de cette première, les lymphocytes T auxiliaires (Th) activés par la reconnaissance d'un antigène présenté par une CPA vont communiquer avec les lymphocytes B activés par le même antigène, via la liaison du ligand de CD40 qu'ils expriment à leur surface avec son récepteur (CD40) présent à la surface du lymphocyte B. Cette interaction mène à la prolifération des lymphocytes B et induit leur différenciation en plasmocytes, afin de permettre la sécrétion d'anticorps spécifiques à l'antigène (15). Le relâchement d'anticorps agit ensuite dans la réponse immunitaire de plusieurs façons, dont par neutralisation ou par opsonisation (15). Il est aussi important de noter qu'une portion de lymphocytes T et B est différenciée en cellules mémoire. Ces cellules mémoire restent dans l'organisme à long terme et permettent de reconnaître plus facilement et rapidement l'antigène dans le cas d'infections subséquentes (15).

1.2.2 Lien entre inflammation et développement du cancer

Le lien entre inflammation et cancer a été établi il y a déjà plusieurs années. En effet, c'est en 1863 que Rudolf Virchow a proposé qu'un cancer puisse se développer à un site d'inflammation chronique, suggérant que l'inflammation chronique a un rôle à jouer dans l'initiation du cancer (33). De plus, à la fin des années 1950, J.W. Berg a commencé à étudier le rôle de l'inflammation dans le cancer du sein (33, 34). Depuis ce temps, il a été démontré que l'inflammation chronique a un rôle important à jouer dans l'initiation, la promotion et la progression du cancer du sein (35).

L'état d'inflammation chronique provoque une accumulation de cytokines pro-inflammatoires dans les tissus, par l'activation prolongée des cellules immunitaires s'étant infiltrées. En réponse aux nombreuses cytokines, les MØs produisent des RONS qui vont induire des dommages à l'ADN des cellules épithéliales autour et ainsi favoriser la tumorigenèse (36, 37). Ce phénomène est illustré à la figure 1.4. Pour permettre une fine régulation de la durée de l'inflammation, lors d'une réaction inflammatoire il y a aussi présence de facteurs anti-inflammatoires ou immunosuppresseurs, produits entre autres par les MØs anti-inflammatoires et les lymphocytes T régulateurs, pour tenter de mettre fin à la réaction. Ceux-ci peuvent aider à la croissance tumorale en permettant aux cellules cancéreuses d'échapper au système immunitaire, en inhibant l'activité antitumorale des cellules NK et des lymphocytes B et T cytotoxiques (25, 38). L'inflammation chronique peut aussi mener à l'activation du système du complément et, paradoxalement, favoriser la progression tumorale. En effet, dans le cas du cancer ovarien (39) et du cancer du sein (40), il a été démontré que l'activation du système du complément à l'intérieur du microenvironnement tumoral peut augmenter la croissance tumorale ainsi que le développement de métastases, par un mécanisme impliquant une induction de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), un processus qui sera abordé en détails aux sections suivantes.

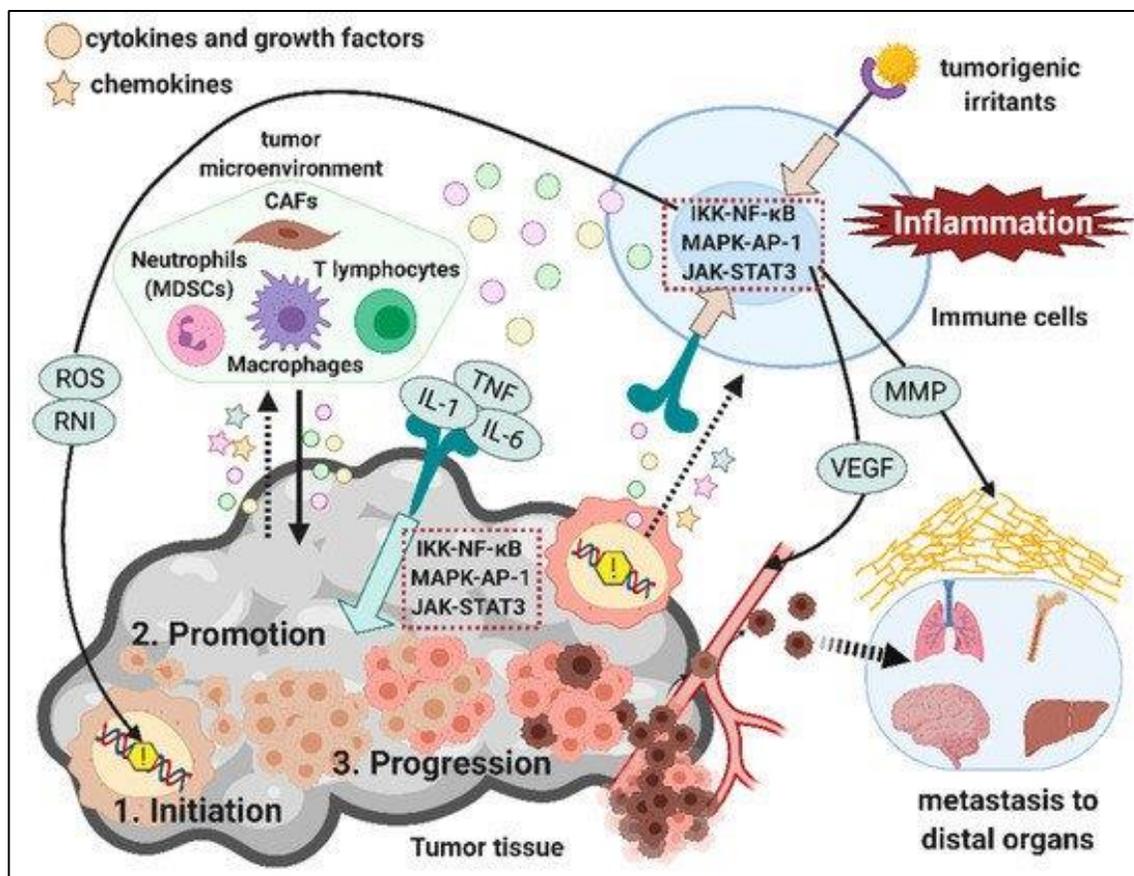


Figure 2.4 Illustration des médiateurs inflammatoires impliqués dans le développement tumoral.

Il y a plusieurs acteurs de l'inflammation qui sont présents au sein du microenvironnement tumoral et qui sont impliqués dans le développement tumoral. Les cellules immunitaires, par la sécrétion de cytokines et chimiokines, vont agir sur les cellules tumorales et ainsi participer à l'initiation, la promotion et la progression tumorales. La figure est tirée de Hibino S. et al., 2021. (35)

1.2.3 Cytokines inflammatoires et développement du cancer

Il y a plusieurs cytokines impliquées dans le déroulement efficace de la réponse inflammatoire, qui dans un contexte d'inflammation chronique peuvent contribuer favorablement aux différents stades du développement tumoral. Les cytokines inflammatoires les plus pertinentes à décrire dans cette étude et les voies de signalisation qu'elles activent seront abordées dans les sous-sections suivantes.

1.2.3.1 L'interleukine-6 (IL-6)

L'IL-6 est produite en partie par les lymphocytes T et les monocytes lors de la réponse inflammatoire, au cours de laquelle elle joue un rôle important dans l'infiltration des leucocytes qui se produit entre la réaction inflammatoire aiguë et chronique, en inhibant le recrutement des neutrophiles tout en augmentant le recrutement des monocytes (41). Comme illustré dans la figure 1.5, la liaison d'IL-6 à son récepteur induit une dimérisation des récepteurs liés à une glycoprotéine 130, afin de former un complexe ligand-récepteur, puis l'activation de kinases de la famille JAK (*Janus-activated kinases*) (42). Les JAKs phosphorylent la partie cytosolique des récepteurs, ainsi que la protéine STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) qui se lie aux sites de phosphorylation du récepteur. STAT3 phosphorylé se détache du complexe puis forme un homodimère, qui peut ensuite transloquer au noyau et agir comme facteur de transcription donc induire la transcription de gènes cibles (42, 43). L'IL-6 peut alternativement induire l'activation d'autres voies de signalisation, notamment celles de la PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase)/AKT et des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) (43). Les gènes transcrits en réponse à l'IL-6 incluent ceux encodant pour les protéines cycline D1, Bcl-2, VEGF (*vascular endothelial growth factor*), MMP-9 (*matrix metalloproteinase 9*), vimentine et plusieurs autres (42). Dans le microenvironnement tumoral, l'activation de ces gènes contribue non seulement à conserver l'état inflammatoire, mais aussi à la prolifération et la survie cellulaire, l'angiogenèse, l'invasivité et l'acquisition de la capacité métastatique (42, 43). En effet, des niveaux élevés d'IL-6 (42) et de son récepteur (44) sont liés à des stades avancés de cancer et à la présence de métastases et peuvent servir de marqueur afin de déterminer le pronostic des patientes atteintes de cancer.

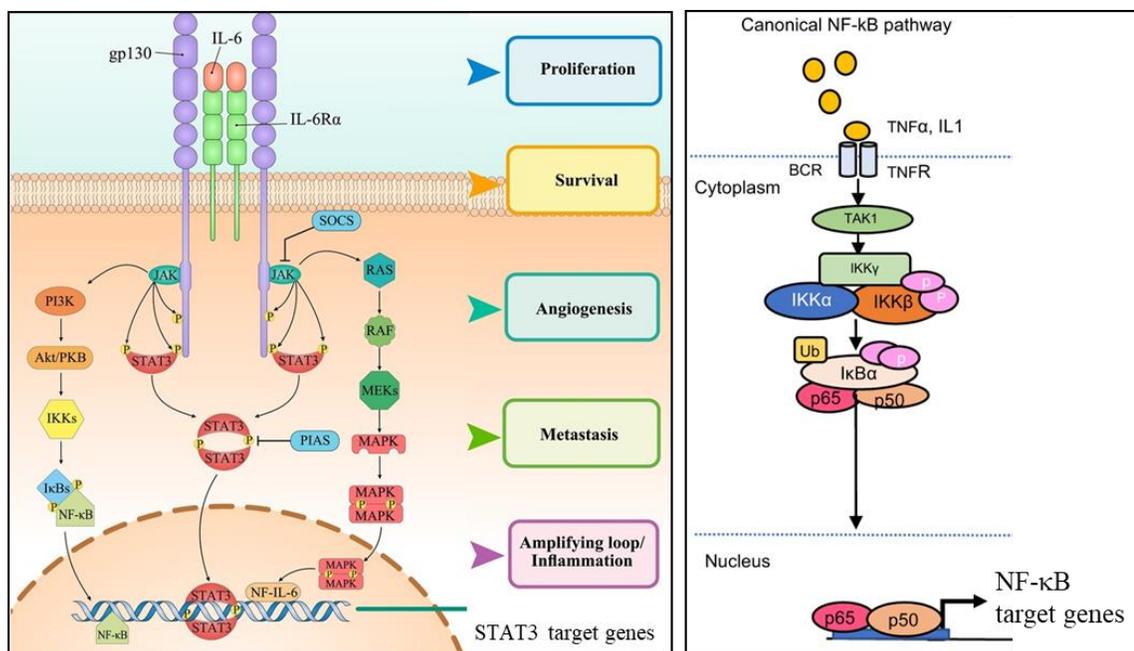


Figure 2.5 Illustration des voies de signalisation des cytokines IL-6 et TNF- α

Gauche : La liaison de l'IL-6 avec son récepteur à la surface des cellules cancéreuses induit plusieurs voies de signalisation pro-tumorales, incluant JAK/STAT3, PI3K/AKT et Ras/MAPK. Cette activation mène à l'expression de molécules impliquées dans la survie, la prolifération, l'invasion et la migration cellulaires, puis l'angiogenèse. Tirée de Masjedi A. et al., 2018 (43). Droite : La voie de signalisation canonique de NF- κ B est induite par plusieurs stimuli, dont le TNF α et l'IL-1, et sa cascade de signalisation est dépendante de la protéine IKK β . L'activation de cette voie mène à la phosphorylation de la protéine I κ B α , qui sera ensuite dégradée par le protéasome, relâchant ainsi le complexe NF- κ B (p65/p50) qui sera transloqué au noyau. Tirée de Khongthong et al., 2019 (45).

1.2.3.2 Le facteur nécrosant de tumeur alpha (TNF- α)

Le TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*) est produit par plusieurs types de cellules, mais majoritairement par les M ϕ s et les lymphocytes T. Connu pour induire l'apoptose via l'activation de la voie des caspases, le TNF- α se lie aux récepteurs TNFR, qui se retrouvent à la surface de toutes les cellules nucléées, et active la voie de signalisation NF- κ B (41). Dans un contexte d'inflammation associée au cancer, c'est surtout la voie NF- κ B qui est impliquée ; elle contribue d'ailleurs à la promotion tumorale induite par TNF- α (46). Brièvement, le mécanisme d'activation de la voie TNF- α /NF- κ B est le suivant (Figure 1.5) : lorsque le TNF- α se lie à son récepteur, le complexe de kinase I κ B (IKK) est recruté, qui va phosphoryler la protéine inhibitrice I κ B. La protéine I κ B est

ensuite ubiquitinée, ce qui va mener à sa dégradation, relâchant ainsi le NF- κ B (p65/p50) qu'elle inhibe normalement (46). Ainsi, lorsque le facteur de transcription NF- κ B est libre, il pourra se déplacer au noyau et interagir avec l'ADN pour induire la transcription de différents gènes, tels que ceux encodant les protéines IL-6, TNF- α , COX-2 (cyclooxygénase-2), les MMPs et divers facteurs de croissance (47). NF- κ B régule plusieurs mécanismes importants dans la carcinogenèse, incluant la prolifération et la survie cellulaires, l'angiogenèse, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses (46, 48). Il contribue aussi à induire la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) dans les cellules cancéreuses, via l'activation des facteurs de transcription pro-TEM Snail1 ou ZEB1/2 (46). Lors de la réponse inflammatoire aigüe et l'inflammation associée au cancer, le TNF- α peut aussi induire la vasodilatation par le NO et certaines prostaglandines via la surexpression des enzymes iNOS et COX-2, respectivement. Il induit aussi une augmentation de l'expression des protéines E-sélectine et ICAM-1 à la surface des cellules endothéliales afin de permettre l'attachement et l'extravasation des neutrophiles et monocytes (41).

1.2.3.3 L'interféron gamma (IFN- γ)

L'interféron gamma (IFN- γ) est produit principalement par les cellules NK, puis les lymphocytes T cytotoxiques et auxiliaires lors de la réponse immunitaire. L'IFN- γ se lie à son récepteur, le IFNGR (*Interferon gamma receptor*), ce qui active les protéines JAKs et STAT1. Une fois rendu au noyau, le STAT1 actif sous forme d'homodimère se liera à un site de l'ADN nommé GAS (*interferon- γ activated site*) pour induire la transcription de plusieurs gènes (49). En réponse à l'activation de STAT1, l'expression du facteur de transcription IRF1 (*Interferon-regulatory factor 1*) est induite. IRF1 va induire la transcription de gènes à son tour, tels que ceux encodant pour les protéines TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*), caspase-8 et FADD (*Fas-associated protein with death domain*) (50). De cette manière, l'IFN γ peut induire l'apoptose des cellules tumorales (51, 52) et de manière limitée celle des cellules infectées (53). L'IFN- γ peut aussi induire l'activation des voies de signalisation MAP

kinases, PI3K/AKT et NF- κ B (54). Dans un environnement inflammatoire, l'IFN- γ peut agir sur les MØs afin de les polariser vers un phénotype pro-inflammatoire et augmenter leur production de NO. L'IFN- γ permet aussi d'augmenter la sensibilité des MØs aux médiateurs solubles de l'inflammation, incluant le TNF- α (49). Lors de la réponse inflammatoire associée au cancer, l'effet de l'IFN- γ est plutôt contradictoire ; il peut jouer un rôle suppresseur de tumeur, mais aussi un rôle protumoral. Tout d'abord, IFN- γ peut inhiber la progression tumorale en induisant l'apoptose et des dommages à l'ADN, ainsi qu'en induisant l'arrêt du cycle cellulaire et en stimulant la réponse immunitaire (50, 55). Notamment, l'IFN- γ peut induire la surexpression du CMH de classe 1 à la surface des cellules cancéreuses, augmentant ainsi leur antigénicité. D'un autre côté, IFN- γ peut favoriser la progression tumorale en induisant l'expression de PD-L1 à la surface des cellules tumorales, leur permettant d'échapper à l'immunité antitumorale (54, 56). De plus, il a été démontré qu'une exposition chronique à l'IFN- γ favorise la croissance tumorale et le développement de métastases (57). En bref, l'IFN- γ peut contribuer autant à l'immunité antitumorale qu'à la progression tumorale. Son rôle varie selon le contexte micro-environnemental ; c'est-à-dire sa concentration, le temps d'expression, le type cellulaire, etc. (54). Dans le cancer du sein spécifiquement, son rôle varie aussi selon le sous-type moléculaire du cancer (58).

1.2.3.4 Le facteur de croissance transformant bêta (TGF- β)

De façon similaire à l'IFN- γ , la cytokine TGF- β (*Transforming growth factor β*) joue aussi des rôles contradictoires dans la carcinogenèse. Cette cytokine est sécrétée par plusieurs types cellulaires, incluant les MØs et les cellules cancéreuses (59). Le TGF- β se lie à son récepteur TGF- β RII (*type 2 TGF- β receptor*), ce qui induit la phosphorylation du TGF- β RI (*type 1 TGF- β receptor*) et la formation d'un complexe incluant les deux types de récepteurs. La formation du complexe active ensuite par phosphorylation les facteurs de transcription de la famille des SMADs (*SMA protein and Mothers Against Decapentaplegic gene*), plus précisément SMAD2 et SMAD3. Les protéines SMAD2 et SMAD3 forment un dimère qui se déplace au noyau, où il se lie à

SMAD4, pour induire la transcription de plusieurs gènes (60). Un des gènes cibles du complexe SMAD est celui encodant pour la protéine TMEPAI (*transmembrane prostate androgen induced protein*); qui agit en diminuant l'expression de PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*) et augmentant celle des kinases PI3K et AKT (61). D'autres gènes induits par les SMADs sont les facteurs de transcription pro-TEM (Snail1, ZEB1/2, Twist1, etc.) (62). Le TGF- β peut aussi induire l'activation des voies PI3K/AKT et MAP kinases, de manière indépendante aux protéines SMADs (63). Le rôle du TGF- β dans le cancer varie selon le type cellulaire et le stade des tumeurs. En temps normal, le TGF- β joue un rôle suppresseur de tumeur en inhibant le cycle cellulaire, via l'inhibition de la formation de complexes cycline D-CDK4/6 (64), et en favorisant l'apoptose. Cependant, dans les cellules pré-cancéreuses et cancéreuses, il joue un rôle d'oncogène en favorisant la TEM ainsi que la migration, l'invasion et le développement des métastases (59, 60, 65). Ceci est en partie causé par la désensibilisation des cellules cancéreuses aux signaux antiprolifératifs envoyés par le TGF- β . Des études ont démontré que dans certaines lignées cellulaires du cancer du sein, cette désensibilisation serait attribuable à une diminution dans l'expression du récepteur TGF- β RII (65). De plus, un taux élevé de TGF- β dans un cancer du sein est associé à un mauvais pronostic et à la résistance aux traitements (59). Tout comme l'IFN- γ , des études montrent que le TGF- β contribue à l'échappement des cellules tumorales au système immunitaire en induisant une surexpression des protéines PD-1 et PD-L1 dans les lymphocytes T et les cellules cancéreuses, respectivement. D'ailleurs, des études ont été effectuées en utilisant une combinaison d'un inhibiteur de TGF- β avec un anticorps anti-PD-1 ou anti-PD-L1 pour traiter différents types de cancers (59). Les résultats de ces études montrent une augmentation de l'immunité antitumorale en utilisant cette combinaison, dans un modèle murin d'allogreffe avec une lignée cellulaire du cancer du sein (66), puis un modèle murin de tumeur primaire du cancer du côlon (67).

1.2.4 Macrophages, inflammation et développement du cancer

Comme mentionné précédemment, l'inflammation chronique est caractérisée par une infiltration de cellules immunitaires au niveau des tissus affectés; incluant les monocytes, qui pourront se différencier en cellules dendritiques ou en MØs. Parmi les cellules immunitaires qui peuvent infiltrer les tumeurs, les MØs sont les plus abondants, pouvant occuper jusqu'à 50 % de la masse tumorale (68). Bien que le rôle des MØs devrait consister à éliminer les cellules anormales (ou cancéreuses), dans ce contexte de microenvironnement tumoral, ils adoptent plutôt un rôle de support pour les cellules cancéreuses. Effectivement, il est bien établi que dans le microenvironnement tumoral, les MØs favorisent la survie et l'invasion des cellules cancéreuses via la production de nombreux médiateurs inflammatoires qui participent au remodelage de la matrice extracellulaire, à l'angiogenèse et à la suppression des réponses immunes antitumorales (25, 68). Les facteurs dérivés des MØs seraient également responsables d'agir sur les cellules cancéreuses et favoriser les caractéristiques typiques d'une TEM, notamment l'activation des facteurs de transcription pro-TEM (Twist1, Snail et ZEB) associée à une perte d'expression d'E-cadhérine et une augmentation de vimentine, ainsi qu'une augmentation du potentiel invasif via l'expression des MMP-2 et/ou MMP-9 (68-70).

1.2.5 Interactions DAMP/TLR et développement du cancer

La dérégulation de l'expression des différents TLRs est très fréquente dans divers cancers, incluant le cancer du sein (48). En effet, un autre élément à souligner en relation avec l'inflammation associée au cancer est que certains DAMPs peuvent se retrouver dans le microenvironnement tumoral lorsque la croissance tumorale endommage les cellules saines à proximité des cellules cancéreuses dans le microenvironnement tumoral, ce qui cause une activation des TLRs à la surface des MØs ayant infiltré la tumeur et des cellules cancéreuses (71). Il a été démontré que les TLRs à la surface des cellules cancéreuses ont un rôle important à jouer dans la progression du cancer du sein. Des études ont montré que dans la lignée cellulaire du cancer du sein triple négatives MDA-MB-231, l'activation du TLR2 augmente l'activité de NF- κ B ainsi que les

niveaux d'expression d'IL-6, de TGF- β , de VEGF et de MMP-9 (48). Aussi, l'activation du TLR9 rend cette lignée cellulaire hautement invasive (48). Ceci suggère que l'expression des récepteurs TLR2 et TLR9, entre autres, est impliquée dans la capacité d'invasion des cellules cancéreuses.

1.2.6 La transition épithélio-mésenchymateuse

Les cancers du sein sont majoritairement des carcinomes, ce qui veut dire qu'ils sont développés à partir de cellules épithéliales dans l'organisme ; cela est le cas dans 80 à 90 % des cancers (72). Les cellules cancéreuses d'origine épithéliale ont la capacité d'adopter un phénotype plus agressif en se transformant via le processus de TEM. Lors de celle-ci, les cellules cancéreuses vont perdre leur polarité apicale/basale et certaines jonctions cellulaires, afin d'adopter une morphologie ressemblant plus aux cellules mésenchymateuses : polarité avant-arrière, forme allongée, migration/invasion accrue. Toutefois, il faut comprendre que la TEM, dans le contexte du cancer, représente plutôt un spectre avec divers états transitoires, résultant le plus souvent en une transformation incomplète (54). D'ailleurs, il est très rare qu'une cellule traverse une transition complète afin de devenir mésenchymateuse et perdre la totalité de ses marqueurs épithéliaux. Au contraire, les cellules auront souvent un mélange de marqueurs épithéliaux et mésenchymateux (68, 73). La TEM est cruciale dans le développement des métastases puisqu'elle augmente la capacité invasive des cellules cancéreuses et leur résistance à l'apoptose, tout en leur permettant d'acquérir des propriétés ressemblant à celles de cellules souches dont une activité proliférative soutenue (68). Ceci facilite leur intravasation, c'est-à-dire leur déplacement à l'intérieur des vaisseaux sanguins ou lymphatiques, permettant ainsi aux cellules tumorales de se propager à travers l'organisme et de coloniser les tissus adjacents, une étape préalable à la formation des métastases distantes qui sont la cause principale des décès associés au cancer du sein (74). Les voies de signalisation impliquées dans la TEM sont souvent considérées comme des cibles clés dans les traitements contre le cancer, permettant d'éviter la progression du cancer vers une forme plus agressive, c'est-à-dire le cancer métastatique (68).

Les principales voies de signalisation connues pour favoriser la TEM, en particulier dans les cellules du cancer du sein, incluent celles de TGF- β /SMAD, de TNF- α /NF- κ B et d'IL-6/STAT3, dont le mode d'action implique l'activation des facteurs de transcription pro-TEM : Twist1 ainsi que ceux des familles Snail (Snail1/Slug/Smuc) et ZEB (ZEB1/ZEB2). Ces facteurs de transcription sont responsables d'induire l'expression de protéines ou de marqueurs dits mésenchymateux, tout en inhibant l'expression de protéines spécifiques aux cellules épithéliales, comme il est présenté à la figure 1.6 (75, 76). D'une part, il a été démontré que NF- κ B, activé de manière dépendante ou indépendante aux signaux de TNF- α , peut jouer un rôle dans la surexpression de MMPs, dont MMP-2 et MMP-9, ainsi que de la vimentine, une protéine qui compose les filaments intermédiaires des cellules mésenchymateuses (77), via le facteur de transcription Snail1. En effet, NF- κ B est capable soit de stabiliser l'expression de Snail1 en empêchant sa dégradation ou bien de se lier au promoteur de Snail1, induisant ainsi sa transcription (63). D'autre part, il a été démontré que les facteurs de transcription Snail1 et Twist1 peuvent être activés par l'IL-6 dans le cancer du sein. L'activation de ces derniers peut inhiber l'expression de la E-cadhérine, une protéine présente dans les jonctions adhérentes des épithéliums, en plus d'induire l'expression de la vimentine et de la N-cadhérine (78, 79). D'autres protéines épithéliales pouvant être régulées négativement par les facteurs de transcription pro-TEM incluent l'occludine et les claudines, des protéines présentes dans les jonctions serrées (75).

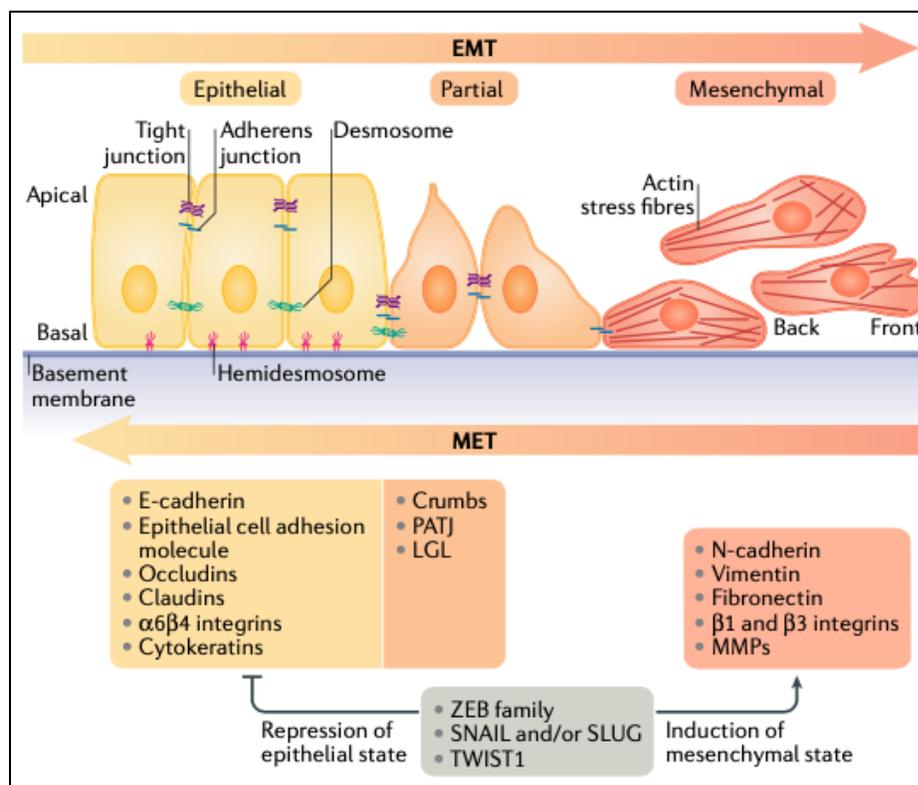


Figure 2.6 Illustration du processus de transition épithélio-mésenchymateuse, les caractéristiques et marqueurs associés

Les cellules épithéliales avec une polarité apicale-basale sont maintenues ensemble par des jonctions serrées, des jonctions adhérentes et des desmosomes, puis elles sont liées à la membrane basale par des hémidesmosomes. Ces cellules expriment des molécules associées au phénotype épithélial et des molécules qui aident à conserver la polarité cellulaire, qui sont nommées dans les encadrés jaune et orange, respectivement, dans la partie gauche de la figure. L'induction de la TEM mène à l'expression de facteurs de transcription pro-TEM (ZEB, SNAIL et TWIST), qui inhibent l'expression de gènes associés au phénotype épithélial (encadré jaune) tout en activant l'expression de gènes associés au phénotype mésenchymateux (encadré rouge dans la partie droite de la figure). La figure est tirée de Dongre A. et Weinberg R. A., 2018 (75).

En plus des facteurs présentés précédemment, il a été démontré que la suractivation de COX-2 dans les lignées cellulaires de cancer du sein peut induire la TEM (79), en activant la voie PI3K/AKT via la production de prostaglandines, entre autres (80). En effet, en utilisant la lignée cellulaire du cancer du sein humain luminal, MCF-7, il a été établi qu'une surexpression de COX-2 induit une TEM, caractérisée par une diminution d'E-cadhérine et une augmentation de vimentine, de N-cadhérine, de Twist1, de Snail1 et de ZEB1. L'induction de la TEM a été confirmée par une augmentation de l'invasion, de la migration et de la prolifération des cellules MCF-7 ainsi que par le développement de métastases *in vivo* (81). Dans le même ordre d'idées, une autre étude a montré qu'une surexpression de COX-2 dans la lignée cellulaire du cancer du sein MCF-7 favorise, en plus de la TEM, une production intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Dans ces mêmes cellules, la surexpression de COX-2 a aussi induit une perte de E-cadhérine, puis une augmentation de la N-cadhérine et de la capacité invasive des cellules. Il a été démontré que ces effets peuvent être empêchés par un prétraitement avec du Celecoxib, un inhibiteur de COX-2. La même étude a aussi montré qu'un traitement de Celecoxib inhibe l'invasion des cellules MDA-MB-231 et leur production de ROS (80). En bref, il est suggéré que le Celecoxib empêche la TEM et l'invasion en inhibant la production intracellulaire de ROS, dépendante de COX-2, dans les lignées cellulaires du cancer du sein humain MDA-MB-231 et MCF-7.

1.3 Molécules anti-inflammatoires dérivées de l'acide aminobenzoïque (DABs)

1.3.1 Synthèse des molécules

Étant donné le lien serré entre l'inflammation, la TEM et la progression tumorale, il y a un intérêt particulier à l'utilisation de traitements anti-inflammatoires pour notamment les cancers de la vessie (82-84) et du sein (85), dans lesquels des voies de signalisation et médiateurs pro-inflammatoires semblables sont activés. Ainsi, une collaboration avec le laboratoire du Pr Gervais Bérubé, un chimiste médicinal, a permis de développer un potentiel traitement anti-inflammatoire. Une molécule, nommée DAB-1, a été synthétisée à partir d'acide para-aminobenzoïque, comme schématisé à la figure

1.7, puis caractérisée par des études *in vitro* et *in vivo*. Plusieurs actions très importantes de DAB-1 ont été découvertes, dont un effet anti-inflammatoire et antitumoral (82-84). De plus, des études ont permis de trouver quelles structures ou composantes de la molécule sont responsables de son activité sur les cellules du cancer de la vessie. (82).

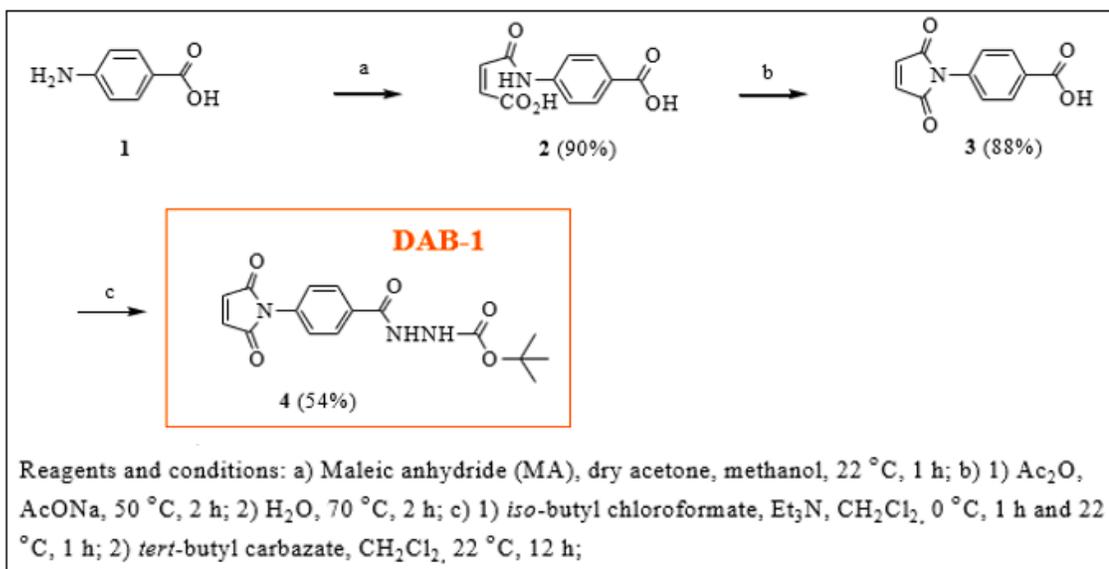


Figure 2.7 Schématisation de la synthèse de DAB-1(82).

Les réactifs et les conditions nécessaires pour la synthèse de DAB-1 sont nommés dans le bas de la figure. Le haut de la figure illustre les molécules obtenues à la fin de chaque réaction effectuée pour la synthèse de DAB-1.

1.3.2 Effet anti-inflammatoire (*in vitro/in vivo*) de DAB-1

Tout d'abord, l'activité anti-inflammatoire a été évaluée *in vitro* via l'utilisation de MØs humains et murins (82). Dans les MØs humains, DAB-1 s'est avéré capable d'inhiber l'activation des voies de signalisation IFN- γ /STAT1 et IL-6/STAT3, deux voies à la fois pro-inflammatoires et pro-tumorales, ainsi que la migration des MØs (82). Dans une lignée cellulaire du cancer de la vessie murin, les MB49-I, DAB-1 est capable d'inhiber l'activation des voies pro-inflammatoires TNF- α /NF- κ B et IL-6/STAT3 (83, 84). Il inhibe aussi la production d'oxyde nitrique (NO), un médiateur de l'inflammation ayant un rôle important à jouer dans la progression tumorale, dans cette lignée (84) ainsi

que dans des lignées de MØs humains et murins (82). De plus, l'activité anti-inflammatoire a été évaluée *in vivo* à l'aide d'un modèle murin d'inflammation de la patte. Les études ont démontré que le DAB-1 est capable d'inhiber l'inflammation de la patte médiée autant par iNOS que COX-2 ; soit respectivement la première et la seconde phase de la réponse inflammatoire induite par la carraghénane (84). D'ailleurs, la capacité de DAB-1 à inhiber iNOS et COX-2 a été confirmée *ex vivo*, en utilisant des MØs péritonéaux isolés des souris, puis activés avec l'IFN- γ et le TNF- α (84).

1.3.3 Effet antitumoral (*in vitro/in vivo*) de DAB-1

Étant donné l'efficacité de DAB-1 à inhiber plusieurs voies de signalisation primordiales au développement et à la progression tumorale, des études *in vivo* ont été réalisées à l'aide d'un modèle murin orthotopique (vessie) et ectopique (sous-cutané) du cancer de la vessie (83), dont l'inflammation chronique est un important facteur étiologique (86). Ces études ont démontré que DAB-1 inhibe la croissance tumorale autant dans le modèle orthotopique qu'ectopique, en plus d'inhiber le développement de métastases dans ce dernier, ce qui est présenté à la figure 1.8. De plus, DAB-1 n'a démontré aucune toxicité pour les souris, même à très haute concentration (300 μ M) après des injections répétées pendant 20-25 jours; ce qui a été évalué par la mesure du poids des souris ainsi que par l'analyse histologique du foie, de la rate et des reins. Il a été démontré que DAB-1 obtient son potentiel antitumoral via l'inhibition des voies TNF- α /NF- κ B et iNOS/NO (83, 84).

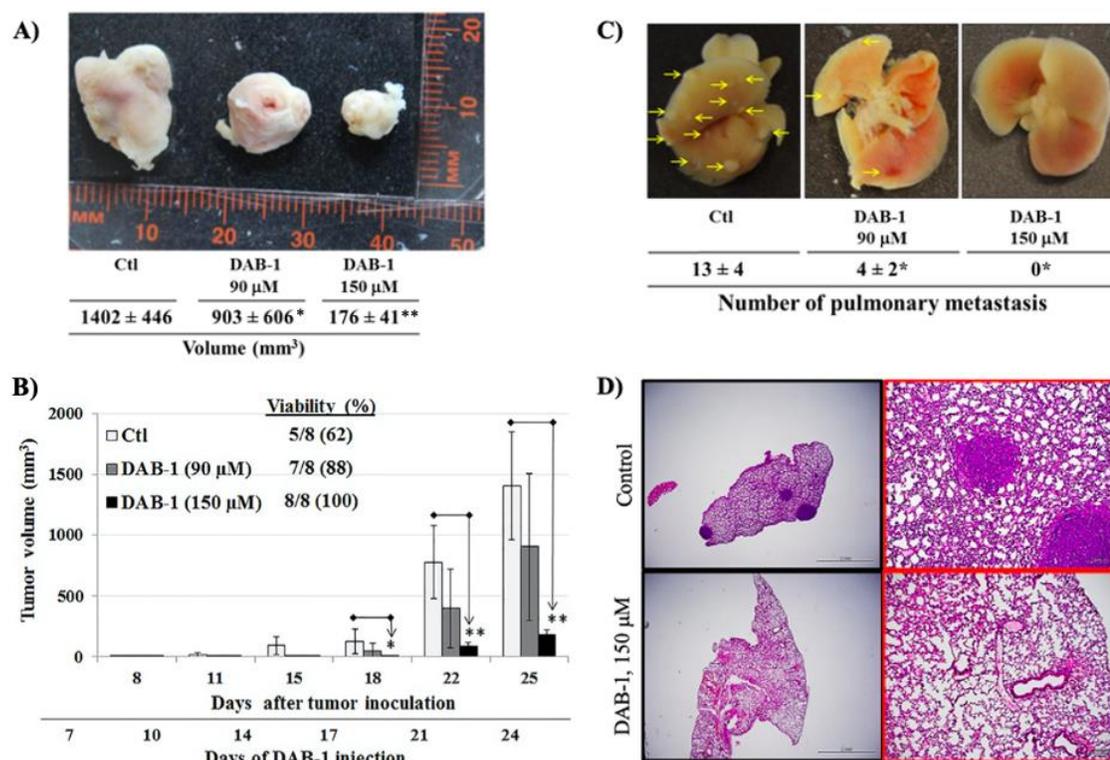


Figure 2.8 Résultats des études in vivo du modèle ectopique de cancer de la vessie murin avec la lignée cellulaire MB49-I (83).

Les cellules murines du cancer de la vessie ont été implantées dans le flanc gauche de souris C57Bl/6J mâles. Les souris ont été traitées avec DAB-1 (90-150μM) ou PBS par injections i.p. à tous les 2 jours pendant 26 jours, à partir du 4^e jour suivant l'inoculation. Après l'euthanasie, les tumeurs, foies, reins, cœurs et poumons ont été récoltés pour analyses. **A)** Analyse macroscopique des tumeurs ectopiques à la fin de l'expérience, les valeurs représentent la moyenne ± SEM (*standard error of the mean*) de chaque groupe (n=8). Analyses statistiques : *p < 0,05 et **p < 0,01 par ANOVA à deux voies et post-test Bonferroni par rapport au groupe contrôle. **B)** Analyse graphique représentatives de la croissance tumorale pendant l'expérience pour chaque groupe de souris. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de chaque groupe (n=8). Analyses statistiques : *p < 0,05 et **p < 0,01 par *unpaired two-tailed Student's t-test*. **C)** Analyse macroscopique des poumons de souris dans chaque groupe, pour évaluer la présence de métastases à la surface. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de chaque groupe (n=8). Analyse statistique : *p < 0,05 et **p < 0,01 par ANOVA à deux voies et post-test Bonferroni, par rapport au groupe contrôle. **D)** Analyse histologique des sections de poumon avec (haut) et sans (bas) foyer métastatique.

1.4 Problématique, hypothèse et objectifs

1.4.1 Problématique

En 2020, environ 685 000 femmes sont décédées du cancer du sein au niveau mondial (87). La première cause de décès chez ces femmes est la présence de métastases (88). De plus, très peu de traitements existent pour traiter les cancers du sein triple négatifs, qui sont les plus agressifs et les plus fréquents chez les jeunes femmes. Le taux de survie après 5 ans des patientes atteintes de cancer du sein métastatique est de 29 %, alors que celui-ci chute à 12 % lorsqu'il s'agit d'un cancer du sein métastatique triple négatif (2). Il est évident qu'il faut s'attarder à trouver des traitements pouvant prévenir les métastases, qui s'appliqueront à plusieurs sous-types de cancers incluant le triple négatif, afin d'améliorer le pronostic des patientes affligées par le cancer du sein.

1.4.2 Hypothèse

Bien que le mécanisme d'action précis de DAB-1 dans les cellules cancéreuses et dans le microenvironnement tumoral soit encore à déterminer, les différentes propriétés de DAB-1 qui ont été mises à l'avant suggèrent que le mode d'action de cette molécule serait associé à une inhibition de l'activation de voies de signalisation ou de l'expression des médiateurs moléculaires à la fois pro-inflammatoires et pro-tumoraux. De plus, l'effet de DAB-1 sur les cellules du cancer du sein, caractérisées par l'activité de voies et propriétés pro-inflammatoire, n'a pas encore été étudié.

Notre hypothèse générale est que DAB-1 pourrait être utilisé pour traiter le cancer du sein, puisque le développement et l'avancement de celui-ci vers une forme métastatique sont associés avec une inflammation chronique. Ce principe est d'autant plus plausible après l'obtention de résultats encourageants dans un contexte de cancer de la vessie dont les cellules tumorales profitent pratiquement des mêmes voies de signalisation et médiateurs pro-inflammatoires que celles du cancer du sein pour favoriser leur progression.

L'hypothèse de travail spécifique que nous posons dans cette étude est que DAB-1 pourrait agir sur les cellules de cancer du sein en inhibant les voies inflammatoires clés impliquées dans la progression tumorale et le développement de métastases. DAB-1 agirait en particulier sur celles activées par les facteurs dérivés des MØs et qui favorisent le processus de TEM, ainsi que la migration et l'invasion tumorale.

1.4.3 Objectifs

L'objectif général de ce projet est d'étudier l'effet de DAB-1 sur le processus de TEM, la migration et l'invasion des cellules du cancer du sein, de type luminal et triple négatif, stimulées avec les facteurs dérivés des MØs.

Les objectifs spécifiques de ce projet sont :

- 1) Déterminer si DAB-1 affecte la viabilité et la survie des cellules MCF-7 et leur capacité clonogénique induite par les facteurs dérivés des MØs
- 2) Confirmer si les facteurs dérivés des MØs induisent le processus de TEM dans les cellules MCF-7 et si DAB-1 affecte les paramètres et les voies de signalisation associés à la TEM dans ce contexte
- 3) Déterminer si DAB-1 inhibe l'activation de voies et de propriétés pro-tumorales induite par les facteurs dérivés des MØs dans les cellules MDA-MB-231

CHAPITRE II

APPROCHES EXPÉRIMENTALES ET MÉTHODOLOGIQUES

2.1 Modèles expérimentaux

Pour cette étude, une lignée cellulaire de monocytes humains, THP-1, a été utilisée pour produire le milieu conditionné de macrophages, afin de représenter l'activité des macrophages au sein du microenvironnement tumoral. La lignée cellulaire de monocytes humains, THP-1, est un modèle largement utilisé pour représenter les MØs issus de monocytes sanguins (82). Pour ce qui est des lignées cellulaires du cancer du sein humain, la lignée cellulaire MCF-7 est utilisée pour représenter les cancers de type luminal A, des cellules cancéreuses différenciées se rapprochant du phénotype sain d'une cellule épithéliale de la glande mammaire. La lignée cellulaire MDA-MB-231, celle-ci représente un cancer triple négatif plus agressif et invasif. Les cellules sont plus dédifférenciées et se rapprochent d'un phénotype mésenchymateux (89, 90). Elles ont été utilisées dans cette étude pour représenter des cellules ayant subi une certaine dédifférenciation vers un phénotype mésenchymateux. En effet, les cellules MDA-MB-231 sont déjà à un état avancé de la TEM, caractérisé entre autres par une absence de la E-cadhérine, une surexpression de la vimentine, une capacité de migration augmentée, par rapport à la lignée MCF10A (91), ou encore la lignée MCF-7.

2.2 Culture cellulaire

Les lignées cellulaires du cancer du sein humain MCF-7 et MDA-MB-231 ainsi que la lignée cellulaire de monocyte humain THP-1 ont été achetées chez ATCC (*American Type Culture Collection*). Les cellules ont été gardées en culture dans du milieu RPMI-1640, complété avec 10 % de sérum de veau fœtal (FBS) inactivé à la chaleur (56°C, 30 minutes), 1 mM de pyruvate de sodium, 10 mM de HEPES et 50 µg/mL de gentamicine, puis les lavages ont été effectués avec du HBSS. Les passages

ont été effectués lorsque les cellules étaient à 70-80% de confluence et elles ont été diluées à 1 :6, puis conservées pour un maximum de 20 passages. Les cellules ont été gardées dans un milieu humide à 37 °C avec 5 % de CO₂. Tous les milieux de culture, HBSS (*Hank's Balanced Salt solution*), le PBS (*Phosphate buffered saline*), le sérum et les réactifs ont été achetés chez Wisent Bioproducts (Saint-Bruno, Canada).

2.3 Production du milieu conditionné de macrophages

Du milieu conditionné de MØs activés et non activés a été produit pour pouvoir stimuler les cellules cancéreuses dans plusieurs expériences. Tout d'abord, pour différencier les monocytes THP-1 en MØs, les cellules ont été placées dans une plaque 6-puits (3 x 10⁶ cellules/puits) et traitées avec 80 ng/mL de phorbol-12-myristate-13-acétate (PMA, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) dans du RPMI-1640 complet, pendant 48 h. Par la suite, les MØs ont été polarisés vers un phénotype pro-inflammatoire avec un milieu de culture complet contenant 5 ng/mL d'IFN- γ et 25 ng/mL de TNF- α (PeproTech Inc., Montréal, Canada), pendant 24 h. Pour les MØs non activés, le milieu de culture contenant le PMA a été remplacé par du milieu de culture complet frais (sans PMA et cytokines). Ensuite, le milieu de culture a été changé pour du milieu frais, sans sérum, dans lequel les cellules ont été incubées pendant 48 h. Après incubation, le surnageant a été récolté, ce qui a donné le milieu conditionné de MØs activés (CM-MØ) et le milieu conditionné de MØs non activés, qui a servi de contrôle (CM-Ctl).

2.4 Essai de viabilité cellulaire (MTT assay)

Des essais MTT (tetrazolium 3,(4,5-dimethylthiazol2-yl)-2,5-diphényltetrazolium bromide) ont été effectués pour évaluer l'effet de DAB-1, à différentes concentrations, sur la viabilité cellulaire des cellules MCF-7, comme décrit précédemment (82). Brièvement, les cellules ont été mises en plaque 96-puits (5 x 10³ cellules/puits) puis incubées pour les laisser adhérer. Le lendemain, elles ont été traitées avec DAB-1 pendant 24 h à des concentrations variant entre 2,5 et 90 μ M, dans du milieu de culture

avec 10 % de FBS. Les concentrations ont été choisies en se basant sur des études précédentes effectuées sur une lignée du cancer de la vessie murin, qui ont montrées qu'un effet de DAB-1 est observé à des concentrations entre 10 et 50 μM , au-delà desquels la molécule est toxique pour les cellules. Ensuite, le composé MTT (Sigma Chemical Company, Oakville, Canada) a été ajouté à chaque puits, de manière à obtenir une concentration finale de 0,5 mg/mL, et la plaque a été incubée pendant 3 h. Pendant cette période d'incubation, les cellules viables réduisent le MTT en cristaux de formazan pourpre, non solubles en milieu aqueux. Après 3 h d'incubation, le surnageant a été aspiré et 100 μL d'une solution de solubilisation acide à base d'isopropanol a été ajoutée dans chaque puits, permettant de solubiliser les cristaux et produire une solution homogène dont l'intensité de coloration pourpre a été quantifiée par colorimétrie à l'aide d'un spectrophotomètre (Biotek, synergy HT) en utilisant une longueur d'onde à 580 nm. Dans cet essai, la densité optique est proportionnelle au nombre des cellules viables (ou métaboliquement actives) dans chaque puits.

2.5 Test de formation de colonies

Un test de formation de colonies a été effectué afin d'évaluer la survie et l'activité clonogénique des cellules cancéreuses en réponse aux facteurs dérivés des MØs et l'influence de DAB-1 sur ce processus. La pertinence du test de formation de colonies (ou test clonogénique) est qu'il s'agit d'un essai *in vitro* de survie cellulaire basé sur la capacité d'une seule cellule à survivre, à proliférer et à se développer en une grande colonie par expansion clonale. Pour quantifier l'activité clonogénique des cellules à l'étude, la colonie à dénombrer a été définie comme étant un amas cellulaire d'au moins 50 cellules provenant toutes de la division d'une seule et même cellule. Pour ce faire, les cellules ont d'abord été mises en culture dans des plaques 24-puits ($1,5 \times 10^5$ cellules / puits) et incubées pendant 48 h dans 500 μL de CM-Ctl et CM-MØ dilués à 1 :3 dans du milieu de culture contenant 10 % de FBS. Après 48 h d'incubation, les cellules ont été traitées avec du DAB-1 (30 μM) ou son véhicule (DMSO à 0,1 %) pendant 1 h et ensuite récoltées et comptées. Les cellules traitées ont été mises en culture dans une plaque 6-puits (200 cellules/puits) et incubées pendant 21 jours dans 1,5 mL de milieu de culture

contenant 10 % de FBS pour permettre aux cellules adhérentes de former des colonies. Au bout de 3 semaines, les colonies ont été fixées avec une solution de formaline (10 % v/v), colorées avec une solution de crystal violet (0,01 % v/v), puis comptées à l'aide d'un microscope optique à contraste de phase.

2.6 Induction de la TEM dans les cellules MCF-7

Un protocole a été mis en place pour induire la TEM dans les cellules MCF-7 avec les milieux conditionnés de MØs, ainsi qu'avec le réactif *StemXvivo*® (*EMT inducing media supplement*, R&D Systems). Le *StemXvivo*® est un supplément à ajouter au milieu de culture conçu spécifiquement pour induire la TEM de plusieurs lignées cellulaires (92), dont les cellules MCF-7. Ainsi, il a été utilisé comme méthode alternative pour induire la TEM afin de comparer l'effet du milieu conditionné de MØs. Les cellules MCF-7 ont été mises en culture dans des plaques 6-puits ($1,75 \times 10^5$ cellules/puits) et incubées avec 1,5 mL de CM-Ctl et CM-MØ dilués 1 :3 ou de *StemXvivo*® et PBS dilué 1 :100 avec du milieu de culture contenant 2,5 % de FBS, pendant 7 jours, en remplaçant par une dilution fraîche au 4^e jour. L'évolution de la TEM dans les cellules MCF-7 a été vérifiée au cours de l'expérience en observant la morphologie des cellules, puis des photos ont été prises par microscopie à contraste de phase à un grossissement de 20x. Après 7 jours, les cellules ont été récupérées par traitement avec de la trypsine et lysées dans un tampon de lyse à base de TNE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0), contenant 0,1 % (v/v) de Triton X-100 et des inhibiteurs de protéases. Ensuite, les protéines dans les lysats cellulaires ont été dosées par colorimétrie (*DC protein assay kit*) avant de procéder à l'immunodétection des protéines d'intérêt par immunobuvardage de type western où 40 µg de protéines ont été migrés sur gel. Le même protocole a été suivi pour vérifier l'expression d'E-cadhérine dans les cellules incubées avec les cytokines TNF-α (25 ng/mL), TGF-β1 (5 ng/mL) et TNF-α + TGF-β1 ou avec le réactif *StemXvivo*® (1 :100). Pour vérifier l'expression de Snail1, les cellules ont été mises en culture dans des plaques 24-puits ($2,0 \times 10^5$ cellules/puits) et incubées avec du CM-Ctl, CM-MØ, PBS, TNF-α (25 ng/mL), TGF-β1 (5 ng/mL), TNF-α + TGF-β1 ou *StemXvivo*® pour une durée de 6 h.

Les cytokines choisies (TNF α et TGF- β 1) ont agi à titre de contrôles puisqu'elles sont connues pour induire la TEM dans différentes lignées cellulaires (93-98). Pour étudier l'expression de MMP-9, les cellules ont été incubées avec le CM-Ctl et le CM-MØ pendant 24 h. Dans certaines expériences, un prétraitement avec DAB-1 à 30 μ M ou son véhicule (DMSO à 0,1 %) pendant 1 h a été effectué avant l'incubation avec les milieux conditionnés des MØs ou les cytokines.

2.7 Immunobuvardage de type western

L'immunobuvardage de type western a été utilisé pour confirmer l'induction de la TEM dans les cellules MCF-7 par le CM-MØ et pour réaliser des études de signalisation dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231. Les lysats cellulaires ont été préparés différemment en fonction de l'expérience. La préparation des lysats cellulaires pour vérifier l'induction de la TEM est décrite plus haut (section 2.6), puis celle pour les études de signalisation plus bas (section 2.7.1). Les protéines dans les lysats cellulaires ont été séparées dans un gel de polyacrylamide à 10 %, puis transférées sur membrane de PVDF comme décrit précédemment (82). Les membranes ont été lavées avec une solution de PBS 1X + Tween (1% v/v), puis bloquées avec la même solution à laquelle 5 % (m/v) de lait en poudre a été ajouté. Les anticorps primaires contre E-cadhérine (#3195, 1 :1000), Snail1 (#3879, 1 :1000), MMP-9 (#13667, 1 :1000), p-STAT3 (#9145, 1 :2000)/STAT3 (#4904, 1 :1000), p-NF- κ B (#3033, 1 :1000)/NF- κ B (#8242, 1 :1000), p-AKT (#9271, 1 :1000)/AKT (#4691, 1 :1000), p-SMAD2 (#3108, 1 :1000)/SMAD2 (#5339, 1 :1000) et p-CREB (#9198, 1 :1000)/CREB (#4820, 1 :1000) ont été achetés chez Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) et la β -actine chez Sigma Chemical Company (A3854, 1 : 40 000, Oakville, Canada). L'anticorps secondaire (Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody, #6515, 1 : 4 000) a été acheté chez Bio-Rad Laboratories (Mississauga, Ontario, Canada). La solution de chimiluminescence (SuperSignal West Femto) utilisée pour détecter le signal émis par la HRP provient de chez ThermoFisher Scientific. La β -actine a servi de point de référence lors des analyses densitométriques effectuées pour évaluer l'expression relative des protéines à l'étude en calculant le ratio de la protéine d'intérêt sur la β -actine.

2.7.1 Lysats cellulaires pour les études de signalisation

Les cellules ont été mises en culture dans des plaques 24-puits ($2,0 \times 10^5$ cellules/puits). Après 18h, elles ont été sevrées pendant 3 h dans du milieu de culture ne contenant pas de sérum (FBS), afin d'éliminer l'effet du FBS sur l'activation de différentes voies de signalisation dans les cellules. Ensuite, elles ont été prétraitées avec DAB-1 à $30 \mu\text{M}$ ou son véhicule (DMSO 0,1 %) pendant 1 h et stimulées avec les milieux conditionnés des MØs, le *StemXvivo*[®] ou du PBS pendant 5 ou 15 min. Les cellules ont été directement récupérées dans $200 \mu\text{L}$ d'un tampon de lyse chauffé contenant du SDS à 1 % (v/v) et des inhibiteurs de protéases et de phosphatases. Le tampon de lyse chauffé a permis de lyser les cellules plus rapidement, respectant ainsi les temps d'activation choisis pour évaluer la signalisation. De plus, le tampon de lyse contenait du bleu de bromophénol afin de colorer les échantillons pour la migration, puisque les échantillons n'ont pas besoin d'être dosés avant d'être mis sur gel. Pour la préparation de lysats cellulaires homogènes, du β -mercaptoéthanol à une concentration finale de 10 % (v/v) a été ajouté et les échantillons ont été chauffés à $95 \text{ }^\circ\text{C}$ avant l'analyse par immunobuvardage de type western.

2.8 Immunofluorescence

La localisation du marqueur épithélial E-cadhérine ainsi que la conformation des filaments d'actine (phalloïdine) ont été observées par immunofluorescence sur les cellules MCF-7. Les cellules ($40\,000$ cellules/lamelle) ont été déposées sur des lamelles stériles placées au fond des puits d'une plaque 6-puits. Les lamelles ont été incubées avec $1,5 \text{ mL}$ des milieux conditionnés de MØs (1:3), du *StemXvivo*[®] ou du PBS (1:100) dilués dans du milieu de culture contenant 10 % de FBS, pendant 7 jours avec un changement pour des dilutions fraîches au 4^e jour. Après 7 jours, les cellules ont été fixées sur les lamelles avec de la formaline 10 % pendant 20 minutes à température pièce, suivi d'un lavage avec du PBS. Ensuite, les lamelles ont été incubées avec le tampon de blocage (PBS 1X / 5 % goat serum / 0,3 % Triton X-100) pendant 1 h et lavées avec du PBS. Les lamelles ont été incubées pendant 18 h avec l'anticorps primaire (anti-E-cadhérine, CellSignaling #3195, 1:200) dilué dans le tampon de

dilution d'anticorps (PBS 1X / 1 % BSA / 0,3 % Triton) et ensuite, avec l'anticorps secondaire (*Anti-rabbit IgG Alexa Fluor conjugate 488*, CellSignaling #4412, 1 :1000) dilué dans le même tampon pendant 30 minutes. Le marquage des filaments d'actine a été effectué en incubant pendant 20 minutes les cellules fixées sur les lamelles avec l'anticorps anti-phalloïdine couplé à un fluorochrome (*DyLight™ 594 phalloidin*, CellSignaling #12877, 1 :20) dilué dans le PBS. Finalement, les lamelles ont été lavées avec du PBS et montées sur lame avec une solution contenant du DAPI, un agent fluorescent lorsqu'il se lie à l'ADN qui permet ainsi de visualiser le noyau (*ProLong Gold Antifade; Cell Signaling Technology*, Danvers, MA), puis observées pour la capture des images avec un microscope confocal Leica SP8 (Leica Microsystems Inc., Concord, Canada).

2.9 Test d'invasion en chambre de Boyden

L'effet de DAB-1 sur le potentiel invasif des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 stimulées par les facteurs solubles dérivés des MØs a été évalué par un test d'invasion en chambre de Boyden (HTS Transwell System; from Corning, New York, USA). La chambre de Boyden consiste en un insert qui se place à l'intérieur des puits d'une plaque de culture, qui comporte un filtre en polycarbonate avec des pores de 0,4 µm de diamètre. Le filtre a été recouvert par une couche de BME (*Cultrex Basement Membrane Extract*, Trevigen, MD, USA) dilué 1:2 (v/v) dans du milieu de culture sans sérum, ce qui forme une matrice extracellulaire naturelle (99). Les cellules MCF-7 ou MDA-MB-231 (1×10^5 cellules) ayant été préalablement traitées avec DAB-1 (15-30 µM, 60 minutes) ou le véhicule (DMSO 0,1 %) ont été déposées sur la couche de BME recouvrant le filtre, alors que des MØs activés (5×10^4 cellules) ont été placés au fond du puits au-dessous de l'insert. Une incubation de 48 h a été effectuée afin de permettre aux cellules tumorales invasives de passer au travers du BME. Les pores de 0,4 µm ne permettaient pas aux cellules de traverser le filtre et de se rendre au fond du puits, car la taille des pores est trop petite, donc les cellules invasives se retrouvaient sur le dessus du filtre, alors que les cellules non invasives restaient au-dessus de la couche de BME. Ainsi, les cellules non invasives ont été retirées délicatement avec la couche de BME à

l'aide d'un coton-tige, puis les cellules invasives demeurant sur le filtre ont été colorées avec du Hoescht et comptées à l'aide d'un microscope à fluorescence. Pour chaque condition, des photos ont été prises dans 5 champs différents afin de compter le nombre de cellules présentes. Les résultats sont présentés sous forme de graphique, représentant le nombre de cellules invasives par champ, selon la condition de traitement.

2.10 Test de migration (*wound healing assay*)

L'effet de DAB-1 sur le potentiel de migration des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 a été étudié en effectuant des tests de migration par fermeture de plaies (*wound healing assay*). Les cellules MCF-7 ($1,50 \times 10^5$ cellules / puits) et MDA-MB-231 (2×10^5 cellules/puits) ont été mises en culture dans une plaque 24-puits pour adhésion pendant 18 h. Ensuite, le milieu de culture a été remplacé par 500 μ L de CM-MØ ou CM-Ctl (1 :3) pendant 2 jours pour les cellules MCF-7 et par du milieu de culture avec de l'IL-6 (25 ng/mL) pendant 24 h pour les cellules MDA-MB-231. Lorsque les cellules avaient atteint une confluence de 70-80 %, elles ont été traitées avec le véhicule (DMSO 0,1 %) ou DAB-1 (15 ou 30 μ M) pour 60 minutes. Ensuite, deux plaies horizontales ont été formées à l'aide d'embouts de pipettes p200, puis les débris cellulaires ont été enlevés en effectuant deux lavages avec du HBSS. Les cellules ont été incubées pour migration pendant 24 heures dans du milieu de culture frais, contenant 2,5 % de FBS avec du milieu conditionné (CM) pour les MCF-7 ou sans FBS avec de l'IL-6 (25 ng/mL) pour les MDA-MB-231. Du milieu de culture contenant 2,5% de FBS a été utilisé pour les expériences de MCF-7 puisqu'elles ne migraient pas sans sérum. Des photos des plaies ont été prises au $t = 0$ h ainsi qu'au $t = 24$ h et elles ont été analysées avec le logiciel ImageJ. Les mesures de l'aire des plaies ont été prises pour ensuite calculer le pourcentage de fermeture de chacune.

2.11 Zymographie sur gélatine

La zymographie sur gélatine a été réalisée pour étudier le niveau d'activation des protéases MMP-9 sécrétées par les cellules cancéreuses MCF-7 et MDA-MB-231

lorsqu'elles ont été stimulées avec les milieux conditionnés des MØs et traitées avec DAB-1. Tout d'abord, les cellules ont été mises en culture dans des plaques 6-puits ($6,0 \times 10^5$ cellules/ puits) pour adhésion pendant 18 h. Le lendemain, 1,5 mL de chaque CM dilué (1 :3) dans du milieu de culture contenant 10 % de FBS a été ajouté séparément dans les puits et les cellules ont été incubées pendant 48 h. Ensuite, le CM a été enlevé et les cellules traitées avec DAB-1 à 30 μ M ou son véhicule (DMSO 0,1 %) pendant 1 h. Ensuite, les cellules ont été lavées 3 fois avec du HBSS et incubées avec du milieu de culture sans FBS. À cette étape, il est important de bien laver les cellules avec le HBSS afin qu'il ne reste aucune trace de FBS, étant donné que celui-ci contient des MMPs. Après 24 h d'incubation, le surnageant a été récolté et centrifugé afin de précipiter les débris cellulaires. Les protéines dans le surnageant ont été dosées par colorimétrie (*DC protein assay kit*) afin d'analyser la même quantité de protéines par échantillon (3 μ g de protéines). Les protéines des échantillons ont ensuite été séparées sur gel de SDS-polyacrylamide 10 %, contenant 1 % de gélatine de porc. Après séparation, le gel d'acrylamide a été récupéré puis exposé pendant 1 h (2 x 30 min) à un tampon de lavage. Ensuite, le gel a été placé dans un tampon d'incubation pendant 18 h, dans un incubateur à 37 °C, sous agitation, afin de permettre aux gélatinases de dégrader la gélatine présente dans le gel. Le gel a finalement été coloré avec une solution de bleu de Coomassie jusqu'à ce qu'il soit bleu, puis décoloré avec une solution de décoloration jusqu'à ce que des bandes claires apparaissent. Les bandes décolorées correspondent aux endroits où la gélatine a été dégradée par l'activité hydrolytique des protéases de type gélatinases telles que MMP-2 et MMP-9. L'image du gel a ensuite été captée à l'aide d'un transilluminateur de lumière blanche, permettant de mieux voir les bandes de gélatine dégradée, qui apparaissaient comme des bandes blanches sur le fond bleu du gel coloré. Les MMPs ont ensuite été identifiées en se basant sur leur poids moléculaire, par la hauteur des bandes de gélatine dégradée, utilisant le marqueur de poids moléculaire comme point de référence. Il est important de noter que cette étude ne prend pas en compte l'activité des inhibiteurs de MMPs qui sont présents dans des conditions normales et donc n'est pas représentative de ce qui se passe *in vivo*. La zymographie permet surtout d'évaluer la quantité de chaque forme d'enzyme qui est présente (pro- ou active/clivée) (100).

2.12 Analyses statistiques

Les données présentées représentent les moyennes d'au moins trois expériences indépendantes \pm SD (*standard deviation*) ou SEM (*standard error of the mean*) et le nombre de répliques est indiqué dans la légende de chaque figure, où applicable. Les analyses statistiques ont été faites avec le logiciel Prism 9. Le test de normalité Shapiro-Wilk a été utilisé pour confirmer la distribution normale des valeurs. Les valeurs suivant une distribution normale ont été analysées par *two-way ANOVA* avec un test de comparaisons multiples Tukey ou un test de comparaisons multiples Sidak ou par *one sample t-test*. Les tests non-paramétriques qui ont été utilisés sont le test Kruskal-Wallis avec un test de comparaisons multiples de Dunn, et le *one sample Wilcoxon test*.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 L'effet de DAB-1 sur la viabilité des cellules MCF-7 et leur prolifération, lorsque stimulées avec les facteurs dérivés des macrophages

Des travaux antérieurs de l'équipe ont confirmé que les effets négatifs de DAB-1 sur la viabilité des cellules tumorales ne seraient pas causés par une augmentation de la mortalité cellulaire, mais plutôt par l'arrêt de la prolifération cellulaire (82, 83). Ces études ont également démontré que les doses optimales de DAB-1 requises pour affecter l'activation induite par des signaux pro-tumoraux *in vitro* dans les cellules du cancer de la vessie sans affecter leur viabilité se situent entre 10 et 50 μM . Ainsi, avant d'étudier l'impact de DAB-1 sur les différents paramètres liés au processus de TEM induit dans les cellules du cancer du sein MCF-7 par les facteurs dérivés des MØs, nous avons commencé par étudier la viabilité et la prolifération des cellules MCF-7 en réponse à différentes concentrations de DAB-1. Le test de viabilité cellulaire (MTT) effectué montre que la concentration de DAB-1 à laquelle le nombre des cellules MCF-7 viables (ou métaboliquement actives) est diminué de 50 % (IC_{50}) par rapport au contrôle est de 40.2 μM (Figure 3.1). À partir de ces données, pour la suite des expériences, nous avons utilisé deux concentrations de DAB-1 se trouvant sous la valeur de l' IC_{50} , soit 15 et 30 μM , afin de s'assurer que les traitements avec DAB-1 ne soient pas excessivement toxiques pour les cellules en culture.

Ensuite, pour étudier la survie et la prolifération des cellules MCF-7 en réponse à un traitement conjoint des facteurs dérivés des MØs et de DAB-1, un test de formation de colonies a été effectué (Figure 3.1B-C). Pour effectuer le test de formation de colonies avec les cellules MCF-7, une dose de DAB-1 à 30 μM a été utilisée, pour les raisons mentionnées plus haut et considérant que nous avons établi à environ 77 % le pourcentage de viabilité des cellules MCF-7 après un traitement de DAB-1 à cette dose

(Figure 3.1A). Les résultats du test clonogénique montrent une augmentation du nombre de colonies lorsque les cellules sont stimulées avec le CM-MØ par rapport au CM-Ctl. Cependant, avec un pré-traitement de DAB-1 à 30 μM , le nombre de colonies formées par les cellules MCF-7 diminue lorsqu'elles ont été stimulées autant avec le CM-Ctl, avec une baisse évaluée à 40 %, que le CM-MØ dont la diminution est autour de 51 % (Figure 3.1B).

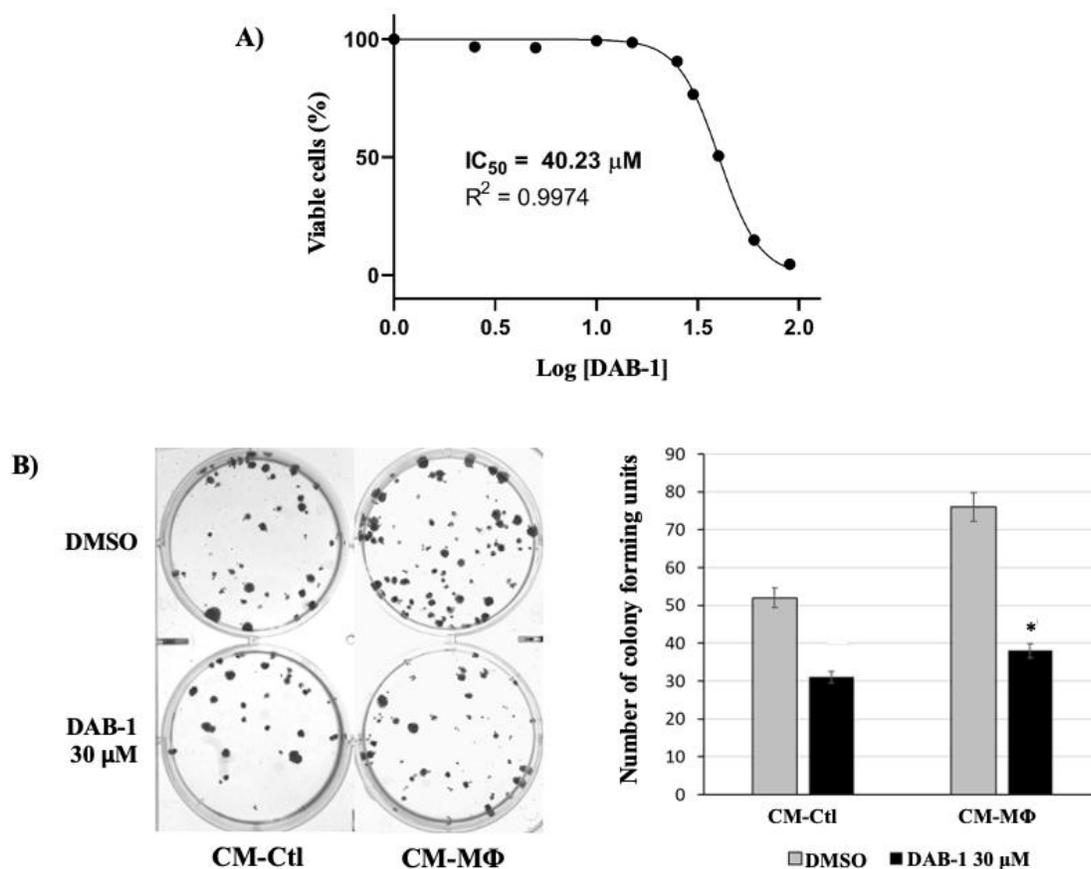


Figure 3.1 Effets de DAB-1 sur la viabilité et la survie des cellules MCF-7. Graphique représentatif de la viabilité cellulaire observée par MTT en fonction du traitement de DAB-1 (2,5 – 90 μM) en échelle logarithmique. Les valeurs représentent les moyennes de trois expériences indépendantes effectuées en quadruplicata. **B)** Images et analyse graphique représentatives du nombre de colonies formées après 21 jours. Les colonies sont colorées au crystal violet et comptées. Les valeurs représentent les moyennes de trois expériences indépendantes effectuées en duplicata \pm SEM. Analyses statistiques : *Kruskal-Wallis test*, *Dunn's multiple comparisons test*. * $p < 0,05$, DAB-1 par rapport au DMSO.

3.2 Effets des facteurs dérivés des macrophages et de DAB-1 sur l'induction du processus de TEM dans les cellules MCF-7

3.2.1 Induction de la TEM par les facteurs dérivés des macrophages

Afin de déterminer si les facteurs dérivés des MØs induisent le processus de TEM dans les cellules MCF-7, nous avons fait une étude comparative des facteurs solubles présents dans le CM-Ctl et le CM-MØ en évaluant leur capacité à induire un changement morphologique vers un phénotype mésenchymateux et à réguler l'expression d'un marqueur épithélial, soit la glycoprotéine de surface cellulaire E-cadhérine, et d'un marqueur mésenchymateux, soit le facteur de transcription Snail1.

Dans une première série d'expériences, les cellules MCF-7 ont été stimulées avec le CM-Ctl ou le CM-MØ pendant 7 jours et la morphologie des cellules a été vérifiée tout au long de l'incubation dans les deux conditions. Des photos ont été prises avec un microscope à contraste de phase aux jours 3 et 7 (Figure 3.2A). Les données obtenues par microscopie à contraste de phase et par immunofluorescence indiquent que les cellules MCF-7 adoptent une morphologie différente lorsqu'elles sont incubées avec le CM-MØ par rapport au CM-Ctl. Les cellules se retrouvent avec une forme plus irrégulière et allongée avec plusieurs prolongements cytoplasmiques, ce qui est caractéristique des cellules mésenchymateuses (101). Par contre, les cellules incubées avec le CM-Ctl conservent une forme plutôt régulière et arrondie, caractéristique des cellules épithéliales (Figure 3.2A). Au jour 7 de l'incubation avec les CM, la conformation des filaments d'actine à l'intérieur des cellules cancéreuses a été vérifiée par immunofluorescence en les marquant avec la phalloïdine (Figure 3.2B; coloration rouge). Les images obtenues par microscopie à fluorescence montrent que la conformation des filaments d'actine est perturbée lorsque les cellules MCF-7 sont incubées avec le CM-MØ en comparaison avec le CM-Ctl. Effectivement, dans des cellules épithéliales, les filaments d'actine sont disposés à l'endroit des jonctions cellulaires, tout autour des membranes plasmiques, ce qui peut être observé dans les cellules incubées avec le CM-Ctl (Figure 3.2B). Dans une cellule mésenchymateuse, les filaments d'actine forment un réseau de fibres de stress qui peut être observé par la

présence d'un amas de fibres dans le cytoplasme, comme observé dans le bas de la figure 3.2B, lorsque les cellules sont incubées avec le CM-MØ (73, 102, 103).

L'expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux a été étudiée par immunobuvardage de type western dans les cellules MCF-7 stimulées avec les milieux CM-Ctl et CM-MØ. Pour valider et confirmer ces résultats, les cellules ont également été stimulées avec deux facteurs dérivés des MØs connus pour induire la TEM, le TNF- α et le TGF- β 1. Tout d'abord, les résultats de l'analyse de l'expression d'un marqueur mésenchymateux montrent une augmentation dans l'expression de Snail1 d'environ 300 % lorsque les cellules MCF-7 sont stimulées avec le CM-MØ comparativement au CM-Ctl (Figure 3.2C). Dans les cellules exposées au PBS (témoin) et aux cytokines à activité pro-TEM, une augmentation variant de 40 à 90 % a été établie lorsqu'elles ont été stimulées avec le TNF- α ou le TGF- β 1, seules ou en combinaison (Figure 3.2C).

Pour ce qui est du marqueur épithélial E-cadhérine, la régulation de son expression a été vérifiée dans les mêmes conditions par immunobuvardage de type western (Figure 3.2D) ainsi que par immunofluorescence (Figure 3.2E). Les résultats de l'analyse par immunobuvardage indiquent que lorsque les cellules MCF-7 sont stimulées avec le CM-MØ, l'expression de E-cadhérine est inhibée d'environ 70 % par rapport à une stimulation avec le CM-Ctl, alors que, par rapport au PBS, l'inhibition de E-cadhérine varie de 30 à 40 % lorsque les cellules sont stimulées par le TNF- α , le TGF- β 1 ou la combinaison TNF- α plus TGF- β 1. Les images obtenues par microscopie à fluorescence montrent une diminution marquée de l'expression de E-cadhérine à la membrane plasmique des cellules MCF-7 stimulées avec le CM-MØ par rapport au CM-Ctl.

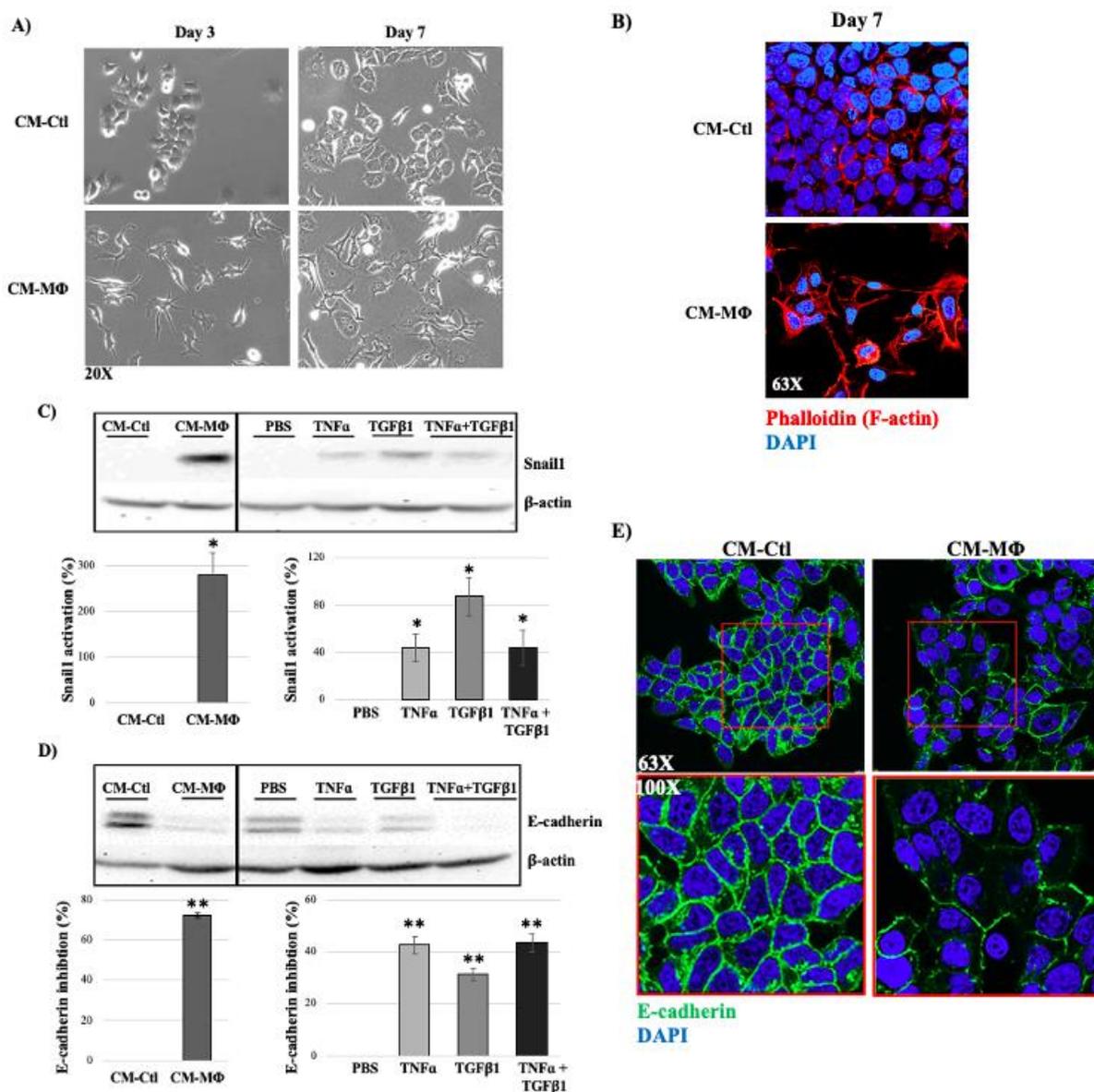


Figure 3.2 Effets des facteurs dérivés des macrophages sur la morphologie des cellules MCF-7 ainsi que sur l'expression de Snail1 et E-cadhérine par les MCF-7.

A, B) Images représentatives du changement de morphologie des cellules MCF-7 sous lumière blanche à contraste de phase et immunofluorescence après incubation avec le CM-M Φ ou CM-Ctl. **C, D)** Immunobuvardage de type western et analyses densitométriques respectives de l'expression de Snail1 et E-cadhérine dans les cellules stimulées avec du CM-M Φ , du TNF- α , TGF- β 1 ou TNF- α + TGF- β 1 pendant 6 h pour Snail1 et 7 jours pour E-cadhérine. Les pourcentages d'activation/inhibition sont calculés en faisant un ratio sur la β -actine pour chaque échantillon. Les valeurs représentent les moyennes de trois expériences indépendantes \pm SD. Analyses statistiques : *one sample t-test*. **E)** Expression de E-cadhérine par immunofluorescence après incubation des cellules avec du CM-M Φ pendant 7 jours. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ par rapport au contrôle (CM-Ctl ou PBS).

3.2.2 Effet de DAB-1 sur les paramètres cellulaires associés au processus de TEM

Afin de déterminer si DAB-1 affecte les caractéristiques cellulaires typiquement associées au processus de TEM induites par les facteurs dérivés des MØs dans les cellules MCF-7, des analyses biochimiques et biologiques ont été effectuées pour étudier a) l'expression de Snail1 et de E-cadhérine, par immunobuvardage de type western; b) l'invasion cellulaire, à l'aide d'un test de micro-invasion en chambre de Boyden; c) la motilité cellulaire, par un test de fermeture de plaie; d) l'activation et l'expression de la métalloprotéinase MMP-9, à l'aide respectivement d'une zymographie sur gélatine et un immunobuvardage de type western; et e) l'induction des voies de signalisation impliquées dans la progression tumorale et la TEM, par immunobuvardage de type western.

Tel qu'observée précédemment, l'étude sur l'expression de Snail1 et de E-cadhérine indique que, par rapport au CM-Ctl, le CM-MØ induit une forte expression de Snail1 (Figure 3.3A) ainsi qu'une nette diminution dans l'expression de E-cadhérine (Figure 3.3B) dans les cellules MCF-7 non prétraitées avec DAB-1. Cependant, l'expression différentielle de Snail1 et de E-cadhérine induite par les facteurs présents dans le CM-MØ n'a pas été affectée dans les cellules ayant été prétraitées avec DAB-1, dans lesquelles une forte expression de Snail1 et une diminution de l'expression de E-cadhérine ont été observées (Figure 3.3).

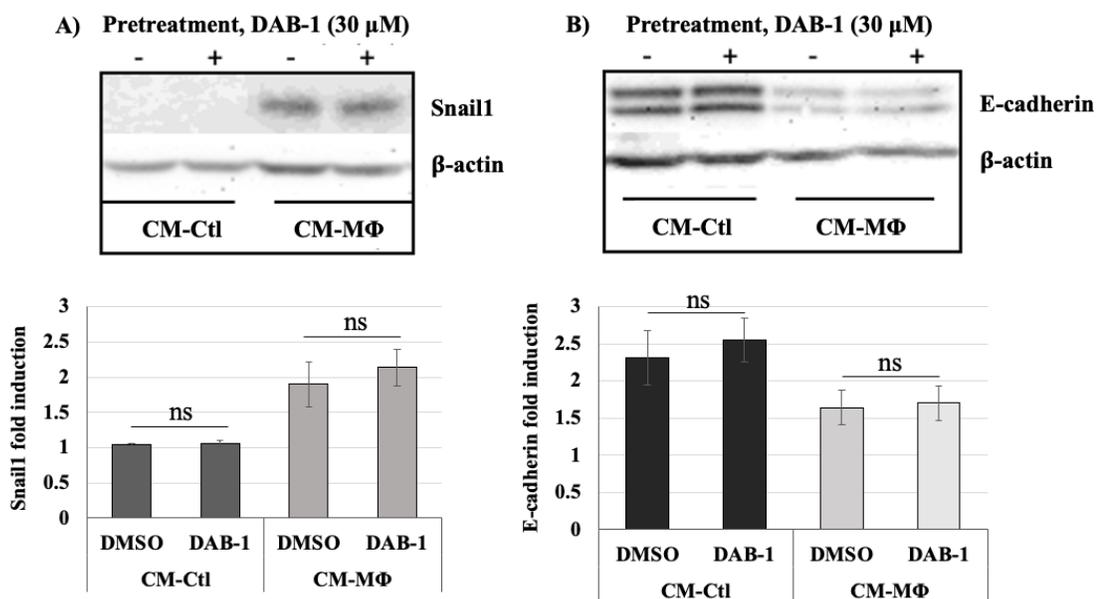


Figure 3.3 Effets de DAB-1 sur l'expression de Snail1 et de la E-cadhérine induite par les facteurs dérivés des macrophages dans les cellules MCF-7. Images et analyses graphiques respectives de l'expression de Snail1 (A) et E-cadhérine (B) observée par immunobuvardage de type western dans les cellules MCF-7 prétraitées avec DAB-1 (30 μ M) pendant 1 h et stimulées par le CM-M Φ pendant 6 h ou 7 jours. Les valeurs représentent les moyennes de trois expériences indépendantes \pm SD. Analyses statistiques : *Kruskal-Wallis test*, *Dunn's multiple comparisons test*. ns : différence non significative de DAB-1 par rapport au DMSO.

Ensuite, une série d'expériences a été réalisée afin d'évaluer l'impact de DAB-1 sur le potentiel invasif qui est acquis lorsque les cellules cancéreuses MCF-7 de phénotype épithélial entreprennent la TEM en réponse aux facteurs dérivés des M Φ s (Figure 3.4). Tout d'abord, les tests d'invasion ont été effectués par une coculture des cellules MCF-7 avec des M Φ s activés (a-M Φ) ou non activés (na-M Φ) afin de permettre une interaction paracrine entre les cellules cancéreuses et les M Φ s. Pour quantifier l'activité invasive des cellules MCF-7, nous avons procédé au dénombrement des cellules invasives par champ, en fonction des conditions de culture et de prétraitement. Tel que rapporté à la figure 3.4A, sans prétraitement avec DAB-1, le nombre des cellules MCF-7 invasives est environ 2,5 fois plus grand lorsqu'elles ont été mises en coculture avec des M Φ s activés (a-M Φ), par rapport au nombre des cellules en coculture avec des M Φ s non activés (na-M Φ). Par contre, lorsque des prétraitements de DAB-1 à 15 μ M ou à 30 μ M ont été effectués, le nombre des cellules MCF-7 invasives diminue

significativement pour les deux doses de DAB-1 lorsque les cellules sont placées en coculture avec des MØs activés et avec une dose de 30 μ M seulement lorsqu'elles sont en coculture avec des MØs non activés (Figure 3.4A),

Ensuite, les tests de migration ont été effectués avec les cellules MCF-7 qui ont été prétraitées avec le véhicule (DMSO) ou avec DAB-1 (15 μ M ou 30 μ M) et ensuite stimulées avec du CM-MØ ou CM-Ctl. Pour quantifier les propriétés de motilité/migration des cellules MCF-7, nous avons évalué le pourcentage de fermeture de la plaie, en fonction des conditions de culture et de prétraitement. Le pourcentage de fermeture de la plaie a été calculé à partir de l'aire des plaies mesurées sur des captures d'images réalisées aux temps initial ($t = 0$ h) et final ($t = 24$ h) de l'expérience. Les résultats rapportés à la figure 3.4B montrent que, sans prétraitement avec DAB-1, les cellules MCF-7 sont plus motiles lorsqu'elles sont stimulées avec le CM-MØ par rapport au CM-Ctl, les fermetures de la plaie à $t = 24$ h étant respectivement évaluées à 83 % et à 35 %. Par contre, les prétraitements de DAB-1 à 15 μ M et 30 μ M diminuent la capacité des cellules MCF-7 stimulées avec le CM-MØ à refermer la plaie, de manière significative à 30 μ M seulement; les pourcentages de fermeture de la plaie à $t = 24$ h étant de 68 % avec DAB-1 à 15 μ M et de 27 % avec DAB-1 à 30 μ M (Figure 3.4B).

Pour documenter davantage l'effet de DAB-1 sur la capacité des cellules MCF-7 à dégrader la matrice extracellulaire en réponse aux facteurs dérivés des MØs, la présence de la protéinase MMP-9 sous forme active a été étudiée à l'aide d'une zymographie sur gélatine (Figure 3.4C) et son expression par un immunobuvardage de type western (Figure 3.4D). Une augmentation de la quantité de MMP-9 clivée (active) a été observée lorsque les cellules ont été stimulées avec le CM-MØ, et cette augmentation est freinée par un traitement de DAB-1 à 30 μ M (Figure 3.4C). De manière analogue, une augmentation de l'expression de la protéine MMP-9 a été induite lorsque les cellules ont été stimulées avec le CM-MØ, et cet effet inducteur a été inhibé lorsqu'elles ont été traitées avec DAB-1 à 30 μ M (Figure 3.4D).

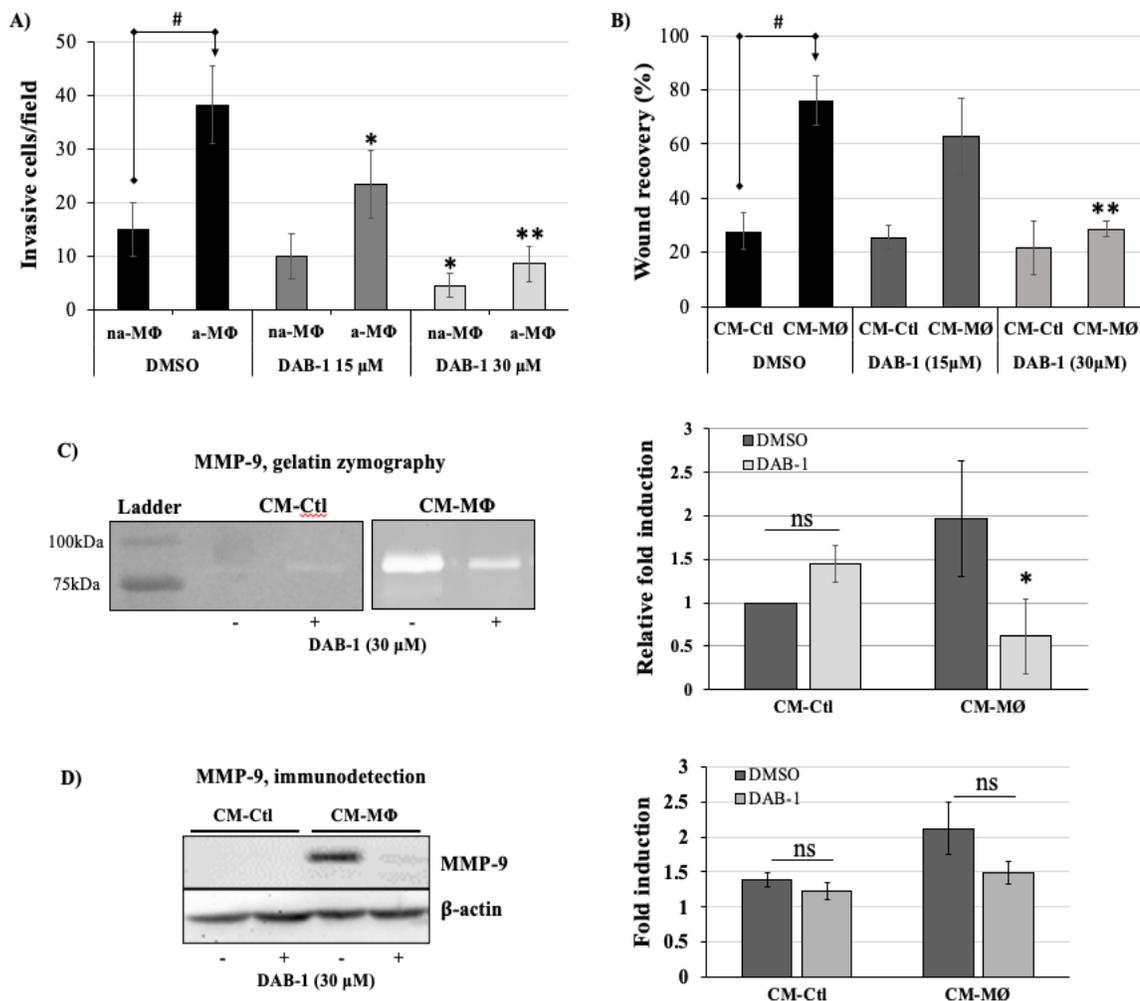


Figure 3.4 Effets de DAB-1 sur le potentiel invasif et la motilité des cellules MCF-7, puis sur l'activation et l'expression de MMP-9 induites par les facteurs dérivés des macrophages.

Analyses graphiques des tests d'invasion (A) et de migration (B) effectués avec les MCF-7 en utilisant une coculture MCF-7/MØ et du CM-MØ, respectivement, avec un prétraitement de DAB-1 (15-30 μM) ou DMSO pendant 1 h. Les valeurs représentent les moyennes de trois expériences indépendantes effectuées en duplicata ± SEM. Analyses statistiques : *two-way ANOVA*, *Tukey's multiple comparisons test*. Images et analyses graphiques représentatives des essais de zymographie sur gélatine (C) et d'immunobuvardage de type western (D) pour évaluer la sécrétion et l'expression, respectivement, de la métalloprotéinase matricielle, MMP-9. Les cellules ont été stimulées avec du CM-MØ/CM-Ctl et traitées avec DAB-1 (30 μM) ou DMSO pendant 1 h. Les valeurs représentent les moyennes de trois expériences indépendantes ± SD. Analyses statistiques : *Kruskal-Wallis test*, *Dunn's multiple comparisons test*. # $p < 0,01$: a-MØ par rapport à na-MØ (A) et CM-MØ par rapport à CM-Ctl (B); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ns : différence non significative : DAB-1 par rapport à DMSO.

Finalement, une étude de signalisation cellulaire a été réalisée, par immunobuvardage de type western, afin de mieux comprendre le mécanisme d'action antitumoral de DAB-1 sur le déclenchement de la TEM induite dans les cellules MCF-7 en réponse aux facteurs dérivés des MØs (Figure 3.5). Dans cette étude, les cellules ont d'abord été prétraitées avec DAB-1 (30 μ M) ou DMSO pendant 1 h et ensuite stimulées avec le CM-Ctl ou le CM-MØ pendant 5 min et 15 min. Les données rapportées à la figure 3.5 montrent que les niveaux de phosphorylation des protéines NF- κ B, STAT3, AKT et SMAD2 sont augmentés lorsque les cellules MCF-7 ont été soumises à une activation de 5 ou 15 minutes par le CM-MØ. À noter, cette augmentation de l'activation des protéines signalétiques pro-TEM est inhibée lorsque les cellules ont été prétraitées avec DAB-1, à l'exception d'AKT. Pour ce qui est de la forme totale de ces mêmes protéines, le niveau d'expression varie faiblement ou demeure stable, peu importe les conditions de traitements ou d'activation. Le même principe s'applique pour la protéine β -actine qui est utilisée aussi dans nos études comme contrôle interne pour déterminer le niveau relatif d'activation des protéines signalétiques pro-TEM à l'étude. Les résultats obtenus montrent aussi des niveaux relativement élevés et semblables de la forme active/phosphorylée de la protéine CREB autant dans les cellules MCF-7 stimulées avec le CM-Ctl qu'avec le CM-MØ. Cependant, les niveaux de la forme active/phosphorylée de la protéine CREB ont été diminués après un prétraitement avec DAB-1 suivi d'une activation de 5 minutes avec le CM-Ctl (Figure 3.5).

Étant donné que dans les cellules MCF-7 stimulées avec les facteurs dérivés de MØs, la molécule DAB-1 n'a pas affecté l'expression de Snail1 ni de E-cadhérine, mais qu'elle a la capacité d'inhiber d'autres paramètres liés au processus de TEM et l'agressivité tumorale, comme l'invasion et les voies de signalisation pro-tumorales, nous avons opté pour une méthode alternative d'induction de la TEM en utilisant le réactif *StemXvivo*® *EMT Inducing Media*. L'objectif des expériences effectuées était double : déterminer quelles voies sont activées par le réactif *StemXvivo*® et lesquelles sont inhibées par un traitement avec DAB-1. Le réactif *StemXvivo*® est un supplément de milieu de culture contenant plusieurs facteurs, incluant des anticorps contre la protéine E-cadhérine humaine et la cytokine TGF- β 1 humaine. Il a été validé pour induire la TEM dans plusieurs lignées cellulaires, notamment les cellules MCF-7 (104, 105). Tout d'abord, nous avons confirmé la capacité de ce réactif à induire la TEM dans les cellules MCF-7 en observant la présence de E-cadhérine puis la conformation des filaments d'actine (marquage à la phalloïdine) par immunofluorescence (Figure 3.6A) et l'expression de Snail1 et E-cadhérine par immunobuvardage de type western (Figure 3.6B-C). L'analyse des images obtenues par microscopie montre une diminution dans l'expression de E-cadhérine par immunofluorescence ainsi qu'un changement dans la conformation des filaments d'actine (phalloïdine) dans les cellules stimulées avec le réactif *StemXvivo*® (Figure 3.6A). De plus, les analyses par immunobuvardage de type western ont révélé une augmentation dans l'expression de Snail1 et une diminution dans l'expression de E-cadhérine (Figure 3.6B-C).

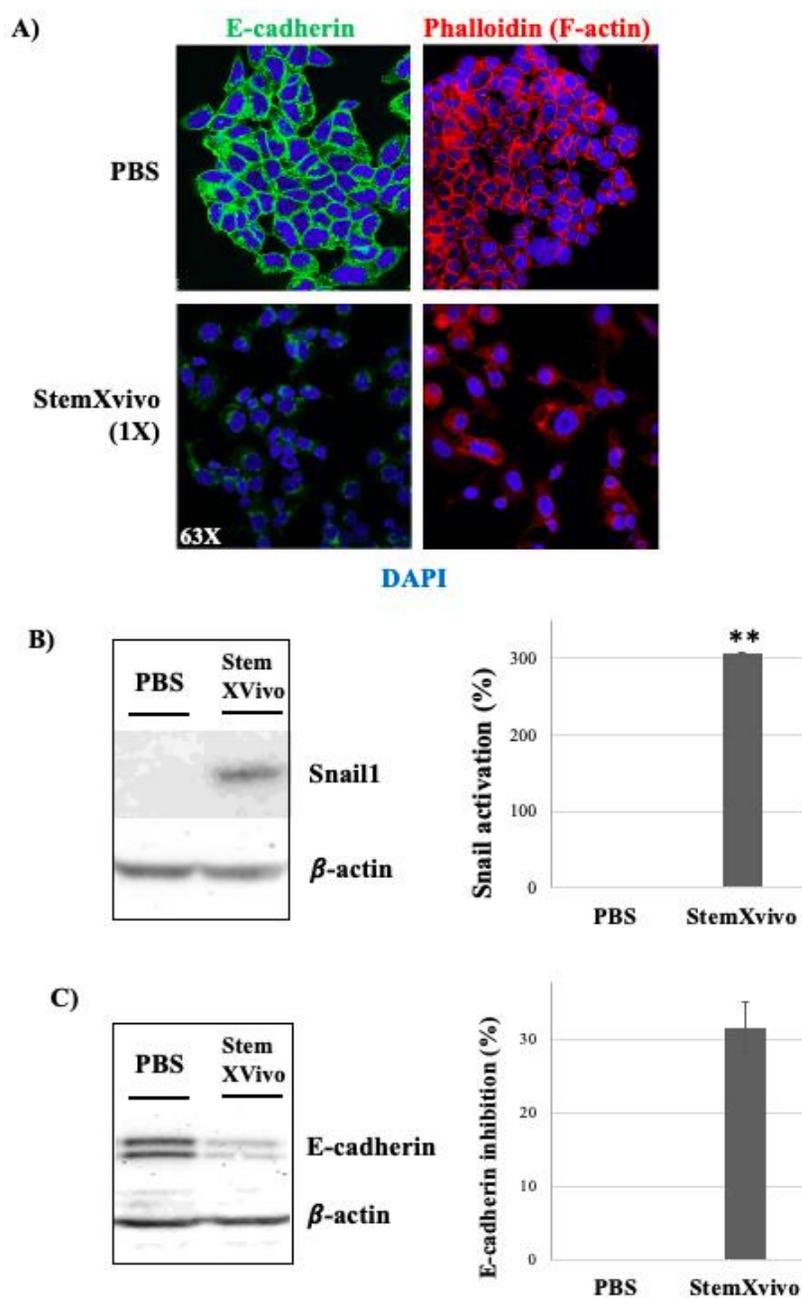


Figure 3.6 Expression des marqueurs de la TEM dans les cellules MCF-7 stimulées par le réactif *StemXvivo*®.

A) Images d'immunofluorescence des cellules MCF-7 marquées avec la E-cadhérine (vert), la phalloïdine (rouge) et le DAPI (bleu). **B, C)** Images représentatives d'immunobuvardage de type western avec analyse graphique respective, pour l'expression de Snail1 et E-cadhérine dans les cellules MCF-7 stimulées par le *StemXvivo*®. Les cellules ont été incubées 6 h pour Snail1 et 7 jours pour E-cadhérine. Les valeurs représentent la moyenne de trois expériences indépendantes \pm SD. Analyses statistiques : Shapiro-Wilk normality test, one sample t-test (B), one sample Wilcoxon test (C) ** $p < 0,01$; *StemXvivo*® par rapport au PBS.

Pour les études de signalisation, les cellules MCF-7 ont été prétraitées pendant 1 h avec DAB-1 à 30 μ M, puis stimulées avec le *StemXvivo*[®] pendant 5 min et 15 min. L'étude est limitée à l'immunodétection de protéines sous les formes phosphorylée et totale des protéines signalétiques pro-TEM les plus pertinentes, notamment NF- κ B, STAT3, SMAD2 et CREB. Les résultats rapportés à la figure 3.7 montrent un niveau de détection faible ou nul des protéines NF- κ B, STAT3 et AKT sous la forme active dans les deux conditions, une détection des protéines SMAD2 et CREB en présence de PBS et une augmentation de la forme active de la protéine SMAD2 induite par le réactif *StemXvivo*[®]. À noter, l'analyse par densitométrie montre que DAB-1 inhibe l'activation de la protéine SMAD2 lorsqu'elle a été induite par le réactif *StemXvivo*[®] et l'activation de la protéine CREB en présence de PBS seulement (Figure 3.7).

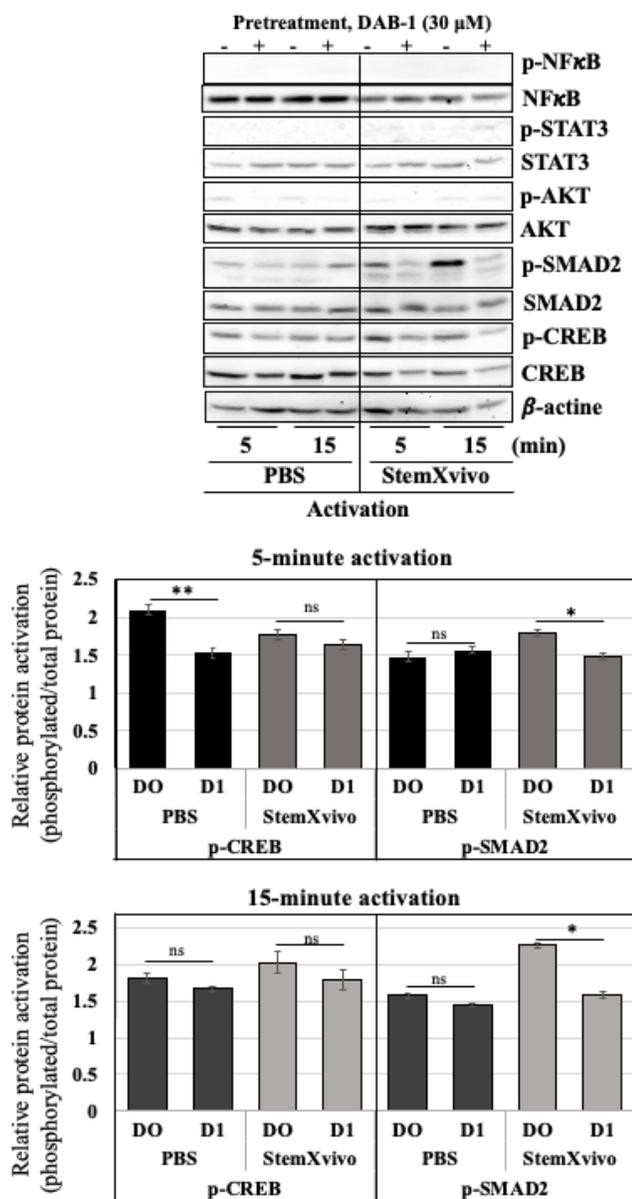


Figure 3.7 Effet de DAB-1 sur l'activation des voies de signalisation pro-tumorales induites par le réactif *StemXvivo*® dans les cellules MCF-7.

Images et analyses graphiques représentatives d'une étude de signalisation par immunobuvardage de type western de certaines voies pro-tumorales. Les cellules ont été prétraitées avec DAB-1 ou DMSO pendant 1 h et activées avec du *StemXvivo*® ou PBS pendant 5 ou 15 minutes. Les graphiques représentent le taux d'expression relatif de chaque protéine phosphorylée par rapport à sa forme totale. Les protéines phosphorylées pour lesquelles il n'y a pas d'induction ne sont pas représentées graphiquement. Les valeurs représentent les moyennes de trois expériences indépendantes \pm SD. Analyses statistiques : *Kruskal-Wallis test*, *Dunn's multiple comparisons test*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ns : non significatif ; DAB-1 (D1) par rapport à DMSO (DO)

3.3 L'effet antitumoral de DAB-1 sur les cellules triple négatives MDA-MB-231

Pour vérifier l'effet de DAB-1 sur les cellules ayant un phénotype mésenchymateux, plusieurs expériences ont été effectuées avec la lignée cellulaire triple négative du cancer du sein MDA-MB-231.

Tout d'abord, nous avons déterminé l'effet de DAB-1 sur l'invasion (Figure 3.8A), par un test d'invasion en chambre de Boyden, et la motilité (Figure 3.8B), par un test de migration par fermeture de plaies. Les résultats rapportés à la figure 3.8A montrent qu'une coculture avec des MØs activés (a-MØ) augmente le nombre de cellules invasives par champ, par rapport à une coculture avec des MØs non activés (na-MØ). De plus, un prétraitement de DAB-1 à 30 μ M diminue le nombre de cellules invasives lorsque les cellules MDA-MB-231 ont été mises en coculture avec les MØs activés, par contre DAB-1 n'a pas d'effet sur le nombre de cellules invasives lorsque les cellules ont été mises en coculture avec les MØs non activés (Figure 3.8A).

Nos études publiées (82) et préliminaires (non présentés) ont démontré que l'activation de la voie IL-6/STAT3 jouait un rôle majeur dans l'induction de la motilité cellulaire, surtout dans les MØs et les cellules du cancer de la vessie et du sein. Les résultats rapportés à la figure 3.8B confirment qu'une stimulation avec l'IL-6 induit la migration des cellules MDA-MB-231, la plaie ayant été refermée à environ 90 % après 24 h d'incubation avec l'IL-6, comparativement à 50 % pour la condition contrôle (PBS). De plus, les résultats de cet essai de migration indiquent qu'après un prétraitement avec DAB-1 à 30 μ M, les cellules MDA-MB-231 sont moins motiles et réussissent moins efficacement à refermer la plaie; la fermeture de la plaie étant mesurée à environ 30 % lorsqu'incubées avec le PBS et 10 % avec l'IL-6, suivant un traitement de DAB-1 (Figure 3.8B).

Ensuite, pour mieux comprendre le mécanisme d'action inhibiteur de DAB-1 sur la capacité invasive des cellules MDA-MB-231, nous avons déterminé la quantité sous forme active (Figure 3.8C) et l'expression (Figure 3.8D) de la MMP-9. Les résultats de

zymographie sur gélatine montrent qu'une stimulation des MDA-MB-231 avec le CM-MØ augmente la quantité de MMP-9 clivée se retrouvant dans le surnageant, par rapport à une stimulation avec le CM-Ctl. De plus, un prétraitement de DAB-1 à 30 μ M diminue la quantité de MMP-9 active sécrétée par les cellules MDA-MB-231 stimulées avec le CM-MØ (Figure 3.8C). Les résultats d'immunobuvardage de type western démontrent que l'expression de la MMP-9 est grandement induite par la stimulation avec le CM-MØ et que cette augmentation de l'expression de la MMP-9 a été inhibée lorsque les cellules ont été prétraitées avec DAB-1 à 30 μ M (Figure 3.8D).

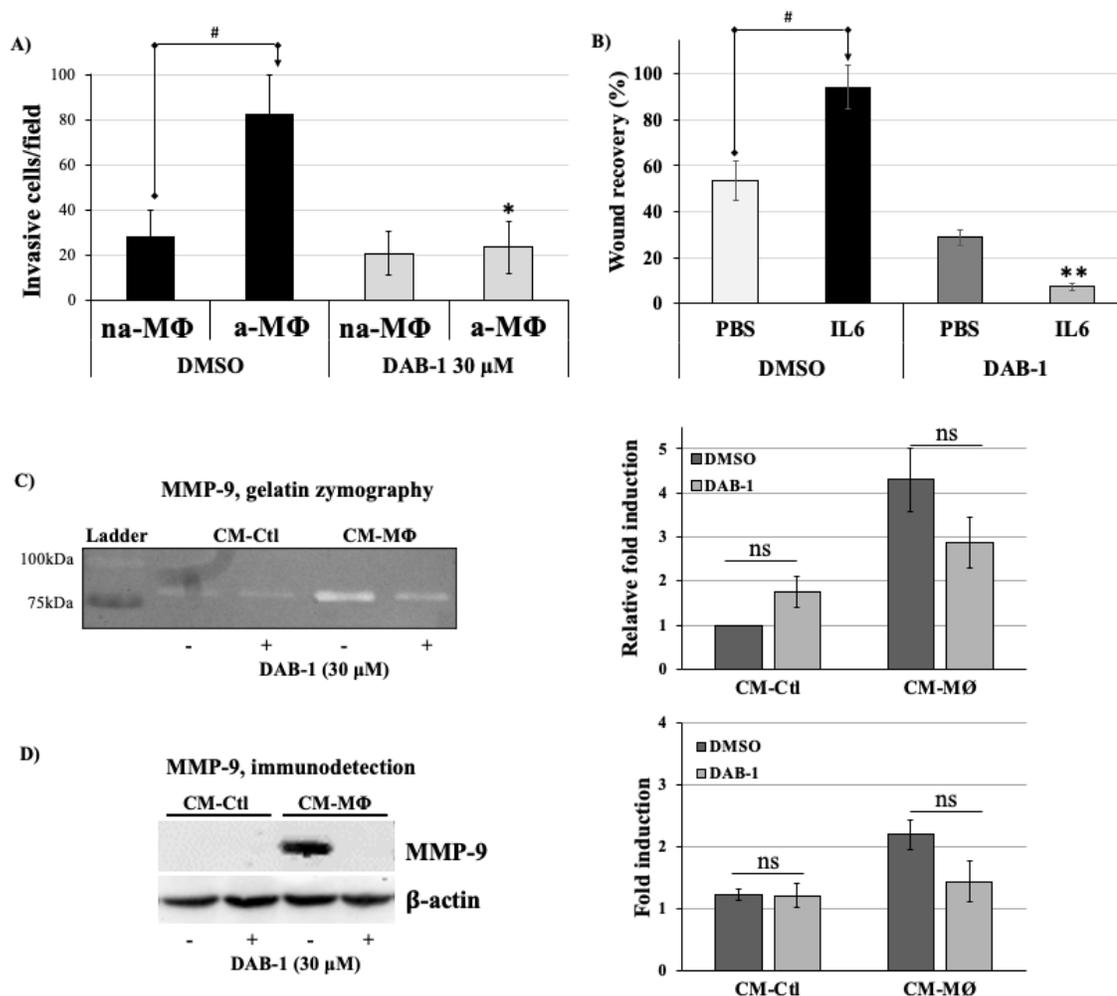


Figure 3.8 Effets de DAB-1 sur l'invasion et la motilité, induites respectivement par les facteurs dérivés des macrophages et l'IL-6, puis sur l'activation et l'expression de MMP-9 induites par les facteurs dérivés des macrophages dans les cellules MDA-MB-231.

A) Analyse graphique représentant le nombre de cellules invasives par champ, lorsque les cellules sont prétraitées avec DMSO/DAB-1 (30 μM) et stimulées par une coculture de macrophages activés (a-MΦ) ou non activés (na-MΦ). **B)** Analyse graphique d'un test de migration, où les cellules sont prétraitées avec DMSO ou DAB-1 (30 μM) et stimulées avec de l'IL-6 (25 ng/mL) ou du PBS. Les valeurs représentent la moyenne de trois expériences indépendantes effectuées en duplicata ± SEM. Analyses statistiques : *two-way ANOVA*, *Sidak's multiple comparisons test*. **C, D)** Images et analyses graphiques représentatives de la zymographie sur gélatine et l'immunodétection permettant d'évaluer, respectivement, la quantité de MMP-9 sécrétée, ainsi que le niveau d'expression de MMP-9 à l'intérieur des cellules MDA-MB-231, lorsqu'elles sont prétraitées avec DMSO ou DAB-1 (30 μM) et stimulées avec le CM-MΦ ou le CM-Ctl. Les valeurs représentent la moyenne de trois expériences indépendantes ± SD. Analyses statistiques : *Kruskal-Wallis*, *Dunn's multiple comparisons test*. # $p < 0,05$: a-MΦ par rapport à na-MΦ (A) et IL-6 par rapport à PBS (B). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ns : non significatif : DAB-1 par rapport à DMSO.

Finalement, une étude de signalisation a été effectuée afin de déterminer quelles sont les voies de signalisation qui sont affectées par DAB-1 dans les cellules MDA-MB-231 stimulées avec les milieux CM-Ctl et CM-MØ. Les résultats d'immunodétection rapportés à la figure 3.9 indiquent que les niveaux d'expression de NF- κ B, STAT3, AKT et SMAD2 sous la forme phosphorylée sont augmentés lors d'une activation de 5 ou 15 minutes avec le CM-MØ par rapport au CM-Ctl. De plus, un prétraitement de DAB-1 inhibe l'expression de ces protéines phosphorylées (de manière non significative pour NF- κ B). L'analyse de la protéine CREB indique qu'elle est exprimée sous la forme active et phosphorylée autant dans les cellules stimulées avec le CM-Ctl que le CM-MØ. Cependant, le niveau d'activation de la protéine CREB est grandement inhibé par un prétraitement de DAB-1 à 30 μ M suivi d'une stimulation de 15 minutes avec les facteurs dérivés de MØs, activés et non activés (Figure 3.9).

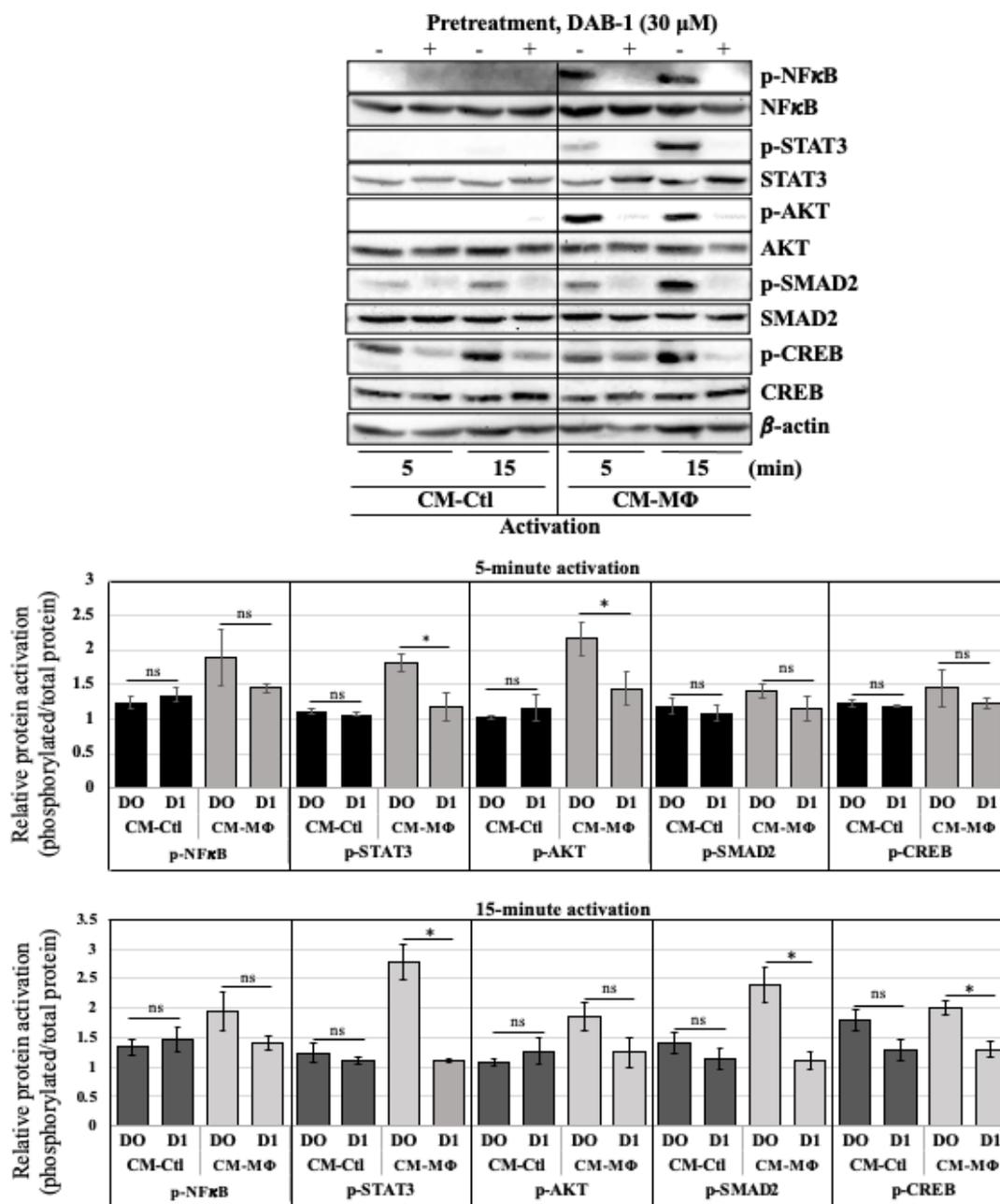


Figure 3.9 Effet de DAB-1 sur l'activation des voies de signalisation pro-tumorales induites par les facteurs dérivés des macrophages dans les cellules MDA-MB-231. Images et analyses graphiques représentatives d'une étude de signalisation par immunobuvardage de type western de certaines voies pro-tumorales. Les cellules ont été prétraitées avec DAB-1 ou DMSO pendant 1 h et activées avec du CM-M Φ ou CM-Ctl pendant 5 ou 15 minutes. Les graphiques représentent le taux d'expression relatif de chaque protéine phosphorylée par rapport à sa forme totale. Les valeurs représentent les moyennes de trois expériences indépendantes \pm SD. Analyses statistiques : *Kruskal-Wallis* test avec *Dunn's multiple comparisons test*. * $p < 0,05$, ns : non significatif; DAB-1 (D1) par rapport à DMSO (DO)

CHAPITRE IV

DISCUSSION ET CONCLUSION

4.1 Interprétation des résultats

4.1.1 Analyse de la viabilité des cellules MCF-7 et leur prolifération, lorsque stimulées avec les facteurs dérivés des macrophages

Le premier objectif était d'analyser l'effet antiprolifératif de DAB-1 sur les cellules cancéreuses MCF-7 afin de déterminer la concentration la moins toxique possible à utiliser lors de l'évaluation de l'impact de DAB-1 sur les propriétés tumorales des cellules MCF-7, telles que l'invasion, la migration, la production de MMPs et la réponse aux signaux inducteurs du processus TEM. Pour ce faire, nous avons utilisé l'essai MTT, un test colorimétrique basé sur l'activité d'enzymes métaboliques dans les cellules viables (106). En utilisant de doses croissantes de DAB-1 (de 2,5 à 90 μM), cette expérience nous a permis de quantifier la concentration inhibitrice médiane de DAB-1 (CI à 50 %, ou CI_{50}) sur la prolifération, ou la capacité enzymatique à réduire le MTT, des cellules MCF-7 à une valeur autour de 40 μM . Cependant, bien que ce ne soit pas l'objectif de l'étude, il est pertinent d'indiquer qu'une des limitations de cette technique est qu'elle ne permet pas de savoir quelle est la cause exacte de la diminution de la prolifération ou de l'activité métabolique. La diminution peut être due à plusieurs facteurs, notamment la mortalité cellulaire (par apoptose ou via un autre programme de mort cellulaire), une inhibition de la prolifération cellulaire, ou encore une diminution de l'activité des enzymes responsables pour la réduction du MTT en cristaux de formazan. Ainsi, cet essai à lui seul ne nous permet pas de savoir si une molécule est cytotoxique ou si elle agit sur la prolifération. Dans le cas de DAB-1, des études antérieures avaient démontré que cette molécule agit sur la viabilité cellulaire en inhibant la prolifération, plutôt qu'en induisant l'apoptose. Pour ce faire, les essais de MTT avaient été complétés avec des analyses de coloration au PI (propidium iodine), pour mesurer la

mort cellulaire, et des analyses d'activité de la caspase-3 et caspase-7 (Caspase-Glo® 3/7 Assay, Promega) pour mesurer l'apoptose. Les résultats ont montré que DAB-1 induit très peu d'apoptose et de mort cellulaire en général dans les cellules du cancer de la vessie (83). Cependant, ce serait à confirmer avec les lignées cellulaires du cancer du sein utilisées dans cette étude. D'autres études (non publiées) nous ont permis de confirmer que DAB-1, à de doses inférieures à 30 μM , n'agit pas sur l'apoptose selon les résultats d'une analyse par cytométrie en flux avec marquage de l'annexin V dans les cellules du cancer de la vessie et du sein (Article en préparation, Y. Oufqir et al. 2022).

Ainsi, nous avons choisi de poursuivre les expériences sur les cellules MCF-7 en utilisant une dose maximale de DAB-1 à 30 μM afin de ne pas trop affecter la viabilité/prolifération de ces cellules. Une trop grande inhibition de la prolifération pourrait affecter le déroulement et l'achèvement de plusieurs essais biologiques, notamment ceux qui s'étendaient sur plusieurs jours, tels que les tests d'invasion, de migration et de zymographie.

Ensuite, un test de formation de colonies a permis d'étudier l'effet de DAB-1 sur la survie et la capacité d'expansion clonale des cellules MCF-7 stimulées avec des facteurs dérivés des MØs (milieux conditionnés). La pertinence de cet essai clonogénique est qu'il permet d'exposer la capacité des cellules tumorales à s'attacher et à proliférer afin de former des colonies après avoir subi un stress cellulaire, en l'occurrence à l'effet antiprolifératif de DAB-1. Cette technique présente toutefois quelques limitations. Premièrement, il est possible que le nombre de cellules capable de former une colonie soit affecté par le nombre restreint de cellules qui est ajouté à chaque puits (200 cellules/puits). C'est-à-dire que dans certaines lignées cellulaires, il y a une interaction paracrine entre les cellules qui est favorisée par le rapprochement, ce qui contribue à induire la prolifération cellulaire. Cette interaction paracrine est affectée lorsqu'il y a peu de cellules en culture ensemble. Par contre, le même nombre de cellules est ajouté à chaque puits, pour toutes les conditions et donc chaque condition devrait être affectée de la même manière; il est néanmoins possible que le nombre de cellules capables de former des colonies soit sous-évalué dans l'ensemble de l'expérience. Dans

le même ordre d'idée, un nouveau protocole a été publié (107) afin d'éliminer le plus possible la contrainte « d'isolement » des cellules, où les cellules sont mises en plaque 96-puits au lieu de 6-puits afin qu'elles soient plus concentrées et plus proches. Cette technique permet aussi d'étudier plusieurs conditions à la fois avec plusieurs réplicats plus facilement, en diminuant aussi le temps de manipulation. De plus, elle utilise un lecteur de plaques capable de mesurer la confluence des cellules, afin d'évaluer la formation de colonies en temps réel plutôt qu'à la fin de l'expérimentation, donc après 21 jours dans notre cas. Ce serait une technique plus performante pour évaluer de manière plus précise l'effet de DAB-1 sur la capacité clonogénique des cellules cancéreuses. Un autre détail, selon le protocole proposé, les cellules ont été traitées à la trypsine avant leur mise en culture immédiatement après le traitement de DAB-1. Donc, comme les cellules viennent tout juste de subir un stress, il est possible qu'elles aient eu plus de difficulté à adhérer à la plaque pour ensuite proliférer et créer les colonies (108). Donc, il se peut que le nombre de colonies formées soit sous-évalué pour cette raison aussi.

Cependant, puisque la même procédure a été appliquée à chaque condition, cette possible sous-évaluation ne serait pas à l'origine des variations observées, soit une augmentation du nombre des colonies lorsque les cellules MCF-7 ont été exposées au milieu CM-MØ vs CM-Ctl et une diminution induite par DAB-1. Nous avons ainsi pu montrer qu'un traitement de DAB-1 à une concentration de 30 μ M permet à plus de 75 % des cellules de rester viables (activité métabolique fonctionnelle), mais diminue de façon significative la capacité clonogénique des cellules cancéreuses individuelles induites par le CM-MØ, un effet qui pourrait expliquer son impact sur le développement tumoral *in vivo* (109). D'ailleurs, l'utilisation de cette dose de DAB-1 est supportée par les résultats obtenus précédemment dans des lignées cellulaires de cancer de la vessie et de monocytes (82, 83).

En conclusion, les tests MTT et de clonogénicité effectués ont permis d'établir qu'une concentration de DAB-1 à 30 μ M était adéquat pour la suite des

expérimentations, car elle affecte le moins possible le métabolisme et la survie cellulaire.

4.1.2 Études de l'effet de DAB-1 sur les différents paramètres cellulaires associés au processus de TEM dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231

Pour les études d'induction de TEM, les cellules MCF-7 ont été utilisées. La lignée cellulaire MCF-7 est largement utilisée pour la recherche sur le cancer du sein, incluant la recherche pour le développement de nouveaux traitements anticancéreux. C'est une lignée cellulaire non-invasive avec un très bas niveau d'agressivité et elles présentent des caractéristiques de l'épithélium mammaire différencié (110). Elles sont souvent utilisées pour les études du processus TEM puisqu'elles présentent des marqueurs épithéliaux et elles ne présentent pas de marqueurs mésenchymateux (90, 110). Par contre, elles peuvent être dédifférenciées vers un phénotype mésenchymateux (70, 111). De plus, pour compléter l'étude de l'impact de DAB-1 sur le processus TEM, nous avons utilisé un autre modèle de cancer du sein, soit la lignée cellulaire MDA-MB-231. Les cellules MDA-MB-231 sont dites mésenchymateuses; elles présentent donc des marqueurs mésenchymateux (90) et ont des capacités invasives et migratrices augmentées par rapport aux cellules MCF-7, par exemple (89). L'utilisation de cette lignée cellulaire permet d'étudier l'effet de DAB-1 non seulement sur l'accentuation du processus de TEM déjà en cours dans les cellules, mais aussi sur les propriétés tumorales des cellules du cancer du sein triple négatif en cours de TEM.

Comme mentionné plus tôt, le processus de TEM se produit sur un long laps de temps et il varie énormément, donc différents marqueurs épithéliaux et mésenchymateux sont exprimés/supprimés à différents moments ou encore dans différentes lignées cellulaires; ainsi, il y a plusieurs manières de caractériser la TEM (73). En se basant sur un article de Yang et al. (101), nous avons choisi plusieurs marqueurs et paramètres fonctionnels importants associés à la TEM, que nous avons observés par différentes techniques, afin de déterminer s'il y avait ou non induction d'une TEM par le CM-MØ dans les cellules MCF-7. Ces mêmes marqueurs et paramètres ont ensuite été utilisés

pour comprendre l'action de DAB-1 sur la TEM induite par le CM-MØ. Les études d'immunobuvardage de type western et d'immunofluorescence montrant les changements dans l'expression de E-cadhérine et de Snail1, en plus des images représentant la morphologie cellulaire à la figure 3.2 (Chapitre III) suggèrent qu'il y a une TEM induite par le CM-MØ dans les cellules MCF-7. S'ajoutent aussi à ces résultats l'augmentation de l'invasion et de la motilité cellulaire en plus de l'augmentation de la sécrétion de MMP-9 active et l'expression de la MMP-9; des caractéristiques importantes pour les cellules ayant entrepris la TEM (63, 101). Tous ces résultats réunis confirment l'induction de la TEM par le CM-MØ dans les cellules MCF-7. Nous avons aussi comparé les niveaux d'expression de E-cadhérine et Snail1 lorsque les cellules MCF-7 sont incubées avec le TNF- α et le TGF- β 1, seuls ou en combinaison, puisque ce sont deux cytokines connues pour induire la TEM dans les cellules cancéreuses, incluant les cellules du cancer du sein (96-98).

Une analyse par immunobuvardage de type western a montré qu'un prétraitement de DAB-1 n'affecte pas l'expression de E-cadhérine et de Snail1 dans les cellules MCF-7 stimulées par les facteurs dérivés des MØ activés. En ce qui concerne l'expression de E-cadhérine, comme celle-ci est induite par plusieurs signaux et sujette à une régulation multifactorielle (112), il est possible qu'un seul prétraitement de DAB-1 n'ait pas été suffisant pour observer l'effet après 7 jours. Au fait, nous avons mis au point un protocole avec des traitements répétés de DAB-1 tout au long des 7 jours d'incubation avec le CM-MØ pour éliminer cette contrainte. Cependant, la combinaison du CM-MØ avec des traitements à tous les deux jours de DAB-1 causaient un détachement des cellules dans les puits, rendant impossible la complétion des expériences. Pour ce qui est de Snail1, il est possible que DAB-1 agisse en aval de celui-ci et donc que sa transcription et son expression ne soient pas affectées, mais que son activation/activité soit affectée à court terme (quelques heures suivant le traitement de DAB-1). Afin de vérifier directement si l'activation de Snail1 est affectée, une étude de localisation du facteur de transcription pourrait être effectuée; ceci permettrait d'observer s'il y a une diminution de la translocation de Snail1 dans le noyau à la suite d'un traitement de DAB-1. Cette étude de localisation pourrait être effectuée par

immunobuvardage de type western suivant une extraction des protéines cytoplasmiques et nucléaires, ou encore par microscopie à fluorescence. Il se peut aussi que DAB-1 n'affecte tout simplement pas ces marqueurs protéiques reliés à la TEM. Pour valider que DAB-1 n'a pas d'effet sur l'expression de ces marqueurs de la TEM, nous avons recouru à une approche complémentaire. Ainsi, nous avons utilisé le réactif « *StemXvivo® EMT Inducing Media* », un supplément de milieu de culture conçu pour induire la TEM. Puisque son efficacité a été démontrée au fil de nos travaux et par des études indépendantes (104), il faudrait éventuellement déterminer si des traitements répétés de DAB-1 auraient le même effet sur les cellules MCF-7 incubées avec le réactif *StemXvivo®* qu'avec le CM-MØ. Si les cellules MCF-7 résistent mieux à la combinaison de DAB-1 et *StemXvivo®* pendant les 7 jours d'incubation, nous pourrions utiliser la microscopie (lumière blanche et immunofluorescence) et l'immunobuvardage de type western encore une fois pour observer la morphologie cellulaire et l'expression de marqueurs protéiques pour évaluer l'effet de DAB-1 sur la TEM. Pour déterminer les similarités au niveau du mécanisme d'action entre le CM-MØ et le réactif *StemXvivo®*, nous avons vérifié les voies de signalisation qui sont activées avec le réactif *StemXvivo®* afin de les comparer avec celles qui sont activées par le CM-MØ. Parmi les voies investiguées, seulement une voie de signalisation est activée en commun par les deux stimulations, soit celle de TGF- β 1/SMAD2. Il est possible que le *StemXvivo®* active la TEM d'une manière différente du CM-MØ, impliquant des voies de signalisation autres que celles que nous avons étudiées (qui sont classiquement associées à la TEM). Toutefois, dans les deux cas, l'induction de p-SMAD2 a été inhibée par DAB-1, ce qui suggère un mécanisme d'action inhibitrice similaire au niveau de la régulation de cette voie de signalisation. Des expériences complémentaires pourraient également être réalisées pour vérifier un probable effet inhibiteur de DAB-1 sur l'induction de la motilité et l'invasion induites dans les cellules cancéreuses que nous utilisons pour modèle, par le réactif *StemXvivo®* (92).

Étant donné la diminution dans l'expression de E-cadhérine lorsque les cellules MCF-7 sont stimulées avec le CM-MØ, nous pouvons nous attendre à ce que les cellules soient plus motiles, puisqu'elles ne seront plus retenues les unes contre les autres avec

des jonctions adhérentes. Pour ce qui est de Snail1, en plus d'inhiber E-cadhérine, son activation permet d'augmenter le potentiel invasif des cellules cancéreuses en induisant, par exemple, l'expression de MMPs ou de vimentine (76). Ainsi, nous nous attendions à ce que les cellules MCF-7 stimulées par les facteurs solubles des MØ soient plus motiles et invasives. Cette hypothèse a été confirmée par les tests d'invasion et de migration qui ont été effectués. Effectivement, les facteurs solubles de MØs ont augmenté le potentiel invasif des cellules MCF-7 et MDA-MB-231; ceci a été étudié à l'aide d'un test d'invasion en chambre de Boyden où les cellules cancéreuses ont été placées en coculture avec des MØ. Cet essai permet de reconstituer le microenvironnement tumoral, où le BME utilisé remplace la matrice extracellulaire (99), puis la coculture permet l'interaction paracrine entre les cellules cancéreuses et les MØ pour induire l'invasion. En effet, il a été démontré qu'une boucle d'activation est impliquée dans l'invasion des cellules cancéreuses induite par les MØ. Cette boucle implique la production de CSF-1 (*colony stimulating factor 1*) par les cellules cancéreuses, qui va agir de manière paracrine pour induire la production d'EGF (*epidermal growth factor*) par les MØs activés. L'EGF agit ensuite sur les cellules cancéreuses à son tour, en induisant leur invasion et leur production de CSF-1 (113, 114). Il est possible que DAB-1 agisse sur cette boucle d'interaction, puisqu'il réussit à inhiber l'invasion induite par les MØs autant dans les cellules MCF-7 que dans les cellules MDA-MB-231.

D'autre part, puisque l'invasion des cellules cancéreuses est fortement liée à l'expression de MMPs, telles que MMP-2 et MMP-9, nous avons effectué une zymographie sur gélatine. Puisque la gélatine est le substrat de choix de la MMP-2 et la MMP-9, elle a été utilisée dans l'essai de zymographie pour déterminer l'activité de ces deux enzymes (100). Finalement, seule la MMP-9 a pu être détectée dans le surnageant de culture des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 stimulées avec les facteurs solubles des MØs. La hauteur des bandes de gélatine dégradées sur le gel, comparée aux bandes du marqueur de poids moléculaire, suggère que c'est la forme clivée, et donc active, de la MMP-9 qui est détectée. Toutefois, l'identification des bandes par cette méthode laisse place à l'erreur, puisqu'il y a une bande à 75kDa et une à 100kDa, ce qui laisse un grand

écart, qui inclut la forme clivée (82kDa) et non clivée (pro-, 92kDa), de la MMP-9. Afin de confirmer, hors de tout doute, la forme de la MMP-9 qui est détectée, il faudrait inclure au gel de zymography un contrôle positif pour les deux formes de la MMP-9. L'activité observée de la MMP-9 sécrétée était augmentée par une stimulation avec le CM-MØ, mais inhibée avec un prétraitement de DAB-1. Une analyse par immunobuvardage de type western a donc été effectuée en utilisant des lysats cellulaires des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 dans les mêmes conditions que la zymographie. Les résultats montrent que le niveau d'expression de la MMP-9 dans les deux lignées cellulaires est affecté de la même manière que l'activité de celle-ci. Ainsi, cela suggère que la diminution dans la quantité de MMP-9 active qui était observée après un prétraitement de DAB-1 était probablement due à une diminution de son expression et conséquemment de sa sécrétion dans le milieu de culture. Cela suggère ainsi que DAB-1 agit en amont de l'expression de MMP-9, supportant d'autant plus la théorie que DAB-1 agit sur l'activation du facteur de transcription Snail1, qui peut être responsable d'induire la transcription de la MMP-9 (76). D'un autre côté, on sait aussi que la MMP-2 peut cliver la MMP-9 pour l'activer (115). S'il s'agit bien d'une variation dans la quantité de MMP-9 clivée, il est possible que DAB-1 agisse sur la MMP-2, cependant nous n'avons pas détecté de MMP-2 par zymographie dans le surnageant des cellules MCF-7 et MDA-MB-231. Il est possible que l'enzyme soit présente en trop petite quantité pour être détectée parce que les conditions utilisées n'étaient pas optimales pour sa sécrétion, par exemple, ou encore que les lignées cellulaires étudiées expriment très peu la MMP-2. Toutefois, la méthodologie utilisée pour la zymographie sur gélatine m'a déjà permis de détecter la MMP-2 dans le surnageant d'une lignée cellulaire du cancer de la vessie humain (RT4) (résultats non publiés), ce qui confirme que la technique utilisée est adéquate.

Pour ce qui est des études de signalisation, le but était de vérifier l'effet de DAB-1 sur l'activation de plusieurs voies induites par les facteurs dérivés des MØ et connues pour jouer un rôle important dans plusieurs étapes du développement tumoral (35, 43, 45). Les voies ont été choisies en se basant sur les cytokines qui sont connues pour être sécrétées dans le microenvironnement inflammatoire par les MØs (35, 43, 45). Comme

le protocole de différenciation et de polarisation des MØs était basé sur la littérature, il est possible d'avoir une idée assez claire des cytokines produites par ceux-ci. Nos études antérieures (116) ont montré que les MØs polarisés vers un phénotype pro-inflammatoire produisent des cytokines, telles que l'IL-12, le TNF- α et le GM-CSF. Nous avons aussi montré que les MØs pro-inflammatoires peuvent induire la production de cytokines inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-8 dans une lignée cellulaire du cancer de la vessie, les cellules T24 (116). Ainsi, nous avons étudié les voies de signalisation TNF- α /NF- κ B et IL-6/STAT3 car ces voies sont connues pour favoriser la progression tumorale et la TEM dans les cellules cancéreuses de plusieurs types, incluant celles du cancer du sein (96, 117). Notre intérêt pour étudier la voie de signalisation TGF- β /SMAD2 est basé sur deux évidences expérimentales. D'une part, plusieurs études ont montré que le TGF- β 1 peut induire la TEM dans différents types de cancer, incluant le cancer du sein (111), et d'autre part, il a été montré que le TNF- α peut induire la production du TGF- β dans les MØs activés (97). Ensuite, la voie de signalisation PI3K/AKT était également d'intérêt puisqu'elle est impliquée dans la croissance et la survie cellulaires et souvent associée à une résistance des cancers du sein et autres, aux différentes thérapies ciblées (118, 119). Pour ce qui est du facteur de transcription CREB, il est souvent surexprimé dans les cellules cancéreuses et sa suractivation est souvent associée à une résistance des tumeurs à certains traitements, incluant les inhibiteurs de la voie PI3K/AKT (120). Le facteur de transcription CREB peut d'ailleurs être phosphorylé par AKT, et les gènes qu'il induit sont impliqués dans le cycle cellulaire, la survie et la prolifération cellulaire, ainsi que la réparation de l'ADN (121).

La capacité de DAB-1 à inhiber ces différentes voies de signalisation pro-tumorales semble très prometteuse. D'ailleurs, plusieurs études ont déjà été effectuées dans différents types de cancers pour évaluer l'effet de l'inhibition spécifique des voies de signalisation présentées sur la progression tumorale et la TEM. Par exemple, dans les cellules du cancer du sein MDA-MB-231, il a été montré que le resvératrol est capable

d'inhiber la TEM induite par le TGF- β 1 en régulant les voies de PI3K/AKT et des SMADs (122).

4.2 Perspectives

En inhibant l'invasion, la migration et différentes voies de signalisation pro-tumorales, DAB-1 pourrait empêcher la progression tumorale et le développement de métastases. Comme la présence de métastases est la première cause de mortalité dans des cas de cancer du sein (88), DAB-1 pourrait améliorer le pronostic des patientes.

À court terme, l'étude pourrait être complétée en ajoutant diverses expériences avec la lignée cellulaire MDA-MB-231. Par exemple, l'analyse de la concentration inhibitrice médiane de DAB-1 sur la prolifération, ou la capacité enzymatique à réduire le MTT, pourrait être étudiée. De plus, l'effet de DAB-1 sur l'expression ou la localisation de marqueurs mésenchymateux à la suite d'une induction de la TEM pourrait être étudié par immunobuvardage de type western ou immunofluorescence, respectivement. Aussi, certaines expériences effectuées dans cette étude devraient être complétées afin d'augmenter la valeur des résultats obtenus, par exemple, dans le cas de la zymographie sur gélatine il faudrait inclure des puits contenant des protéines pro-MMP-9 et MMP-9 clivées aux gels, afin de confirmer avec certitude la forme de la MMP-9 qui est détectée.

Il serait intéressant d'étudier le potentiel de DAB-1 à titre de traitement en combinaison avec des traitements déjà existants. Par exemple, il a déjà été démontré que la surproduction de TGF- β au niveau des tumeurs est associée à une résistance aux molécules chimiothérapeutiques, telle que la cisplatine, aussi l'inhibition de TGF- β peut augmenter l'efficacité de ces mêmes traitements en rendant les cellules plus sensibles (123). Plusieurs études ont par ailleurs démontré que l'utilisation de molécules avec un potentiel anti-inflammatoire en combinaison avec un agent chimiothérapeutique pourrait augmenter l'efficacité de celui-ci, en diminuant aussi la résistance des cellules

cancéreuses et la probabilité de récurrence (17, 124-126). Ainsi, un traitement de DAB-1 en combinaison avec un agent chimiothérapeutique pourrait non seulement augmenter l'efficacité de ce dernier, mais il pourrait aussi contrer la résistance des cancers aux traitements existants. Dans cet ordre d'idée, nos collaborateurs ont déjà entamé des études de traitement combiné de DAB-1 avec l'agent chimiothérapeutique cisplatine. Les résultats (non publiés) montrent qu'un prétraitement avec une dose de DAB-1 inférieure à 10 μM sensibilise les cellules MDA-MB-231 aux effets cytotoxiques de plus faibles doses de cisplatine. En effet, la cytotoxicité est augmentée lors d'un traitement combiné, par rapport à un traitement de cisplatine seul, avec un IC_{50} diminué d'un facteur 2, soit de 46 μM à 19 μM après un prétraitement de DAB-1 à 10 μM (Article en préparation, Y. Oufqir et al. 2022).

Les principaux problèmes des traitements par chimiothérapie sont le développement de résistance par les tumeurs, ainsi que les nombreux effets secondaires dus au manque de spécificité de l'action de ces molécules (127). Ainsi, nos collaborateurs ont synthétisé des molécules hybrides d'œstrogène et de l'agent chimiothérapeutique cisplatine, afin d'augmenter le ciblage spécifique de la cisplatine aux cellules cancéreuses, espérant ainsi augmenter son efficacité tout en réduisant la toxicité aux tissus sains. Un collègue a ensuite essayé de combiner un traitement de DAB-1 avec ces molécules hybrides. Les résultats (non publiés) montrent qu'un traitement avec les hybrides œstrogène-platine est plus toxique pour les cellules cancéreuses MDA-MB-231 que la cisplatine seule, et aussi que DAB-1 sensibilise les cellules cancéreuses aux effets cytotoxiques des molécules hybrides.

La prochaine étape pour étudier le potentiel de DAB-1, à titre de traitement pour le cancer du sein, serait d'effectuer des études *in vivo* utilisant un modèle murin de cancer du sein ectopique (flanc), orthotopique (tissu adipeux de la glande mammaire) ou métastatique (veine de la queue). Pour ce faire, il serait possible d'implanter des tumeurs (xénogreffe) dérivées de lignées cellulaires humaines ou dérivées des tumeurs primaires de patientes atteintes de cancer du sein, dans des souris immunodéficientes. De façon complémentaire, les tumeurs pourraient provenir de lignées cellulaires murines (modèle

syngénique) et être implantées dans des souris immunocompétentes (128). Les souris seraient ensuite traitées avec des injections répétées de DAB-1 ou encore DAB-1 en combinaison avec un agent chimiothérapeutique. Des études antérieures ont montré que des injections répétées de DAB-1 allant jusqu'à 300 μM n'avaient aucun effet de toxicité sur les souris, alors que des doses à 90 et 150 μM suffisaient pour inhiber la croissance tumorale et le développement des métastases dans un modèle de cancer de la vessie (83), donc les doses de 90 et 150 μM pourraient être conservées.

Finalement, nous tentons toujours d'améliorer l'efficacité de diverses molécules anti-inflammatoires à l'étude. Dans ce sens, plusieurs nouvelles générations de molécules DABs ont été synthétisées en modifiant des groupements fonctionnels de la molécule et celles-ci sont comparées à la molécule DAB-1, la molécule « leader » à ce moment-ci. D'ailleurs, une nouvelle molécule de deuxième génération, DAB-2-28, a montré un potentiel anti-inflammatoire supérieur à DAB-1, capable d'inhiber efficacement les voies pro-tumorales $\text{TNF-}\alpha/\text{NF-}\kappa\text{B}$ et IL-6/STAT3 dans les cellules du cancer de la vessie tout en étant moins toxique pour celles-ci (84). De plus, il a été montré que le DAB-2-28 inhibe plus efficacement que DAB-1 la production de NO et l'expression de l'enzyme COX-2 (84), ce qui est très encourageant pour le développement des molécules de troisième génération (129). En effet, prenant compte de l'effet du Celecoxib, un inhibiteur connu de COX-2, sur la TEM des lignées cellulaires du cancer du sein MDA-MB-231 et MCF-7 (80), il est possible de croire que la molécule DAB-2-28 aussi pourrait avoir un potentiel thérapeutique pour les cancers du sein. En effet, dans l'étude de Bocca C. et al. ils démontrent que le Celecoxib, en inhibant la production intracellulaire de ROS dépendante de COX-2, inhibe l'invasion des cellules MDA-MB-231 et MCF-7, en plus d'empêcher la perte d'E-cadhérine et l'augmentation de N-cadhérine induite par COX-2 dans les MCF-7 (80). Comme la molécule DAB-2-28 a elle aussi un effet inhibiteur sur COX-2, son effet pourrait être comparé à celui du Celecoxib. Dans cette optique, il serait intéressant de répéter les expériences présentées dans cette étude en utilisant le DAB-2-28. Des expériences démontrant l'implication de COX-2 dans la progression du cancer du sein pourraient aussi compléter l'étude et ainsi élucider un des mécanismes d'action du DAB-2-28.

4.3 Conclusion

L'ensemble des résultats de notre étude nous a permis de mieux comprendre le mécanisme d'action antitumoral de DAB-1 et suggère fortement que son effet thérapeutique est attribué à une inhibition des principales voies inflammatoires impliquées dans la progression tumorale et le développement de métastases des cellules du cancer du sein. Cette activité de DAB-1 se traduit par l'inhibition des propriétés d'agressivité tumorale reliées à la TEM, telles que l'invasion, la migration et l'expression de la MMP-9, induites par les facteurs dérivés des MØs dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231. Cependant, bien que le mécanisme reste à être déterminé, nous pouvons avancer que l'effet de DAB-1 serait indépendant de certains paramètres associés à la TEM, tels que le changement de morphologie cellulaire et la régulation différentielle de l'expression d'E-cadhérine et de Snail induits par les facteurs dérivés des MØs, du moins dans les cellules MCF-7. Donc, bien que DAB-1 ne semble pas pouvoir inhiber la transformation physique des cellules cancéreuses qui est associée à la TEM, DAB-1 est capable d'inhiber les paramètres les plus cruciaux de la TEM, qui se traduisent par une augmentation de l'agressivité tumorale et qui favorisent l'évolution d'un cancer à une forme métastatique. Ainsi, il est possible de conclure que les objectifs spécifiques posés pour cette étude ont été atteints.

Le DAB-1 est une molécule prometteuse pour le traitement du cancer du sein dans le futur, en limitant le développement et l'avancement du cancer vers une forme métastatique, pouvant ainsi améliorer le pronostic des patientes. Cependant, il reste encore des études à effectuer, entre autres afin de mieux comprendre le mécanisme d'action précis de DAB-1 et de connaître les limitations de ce type de traitement.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Society CC. Breast cancer statistics 2022 [Available from: <https://cancer.ca/en/cancer-information/cancer-types/breast/statistics>].
2. Burguin A, Diorio C, Durocher F. Breast Cancer Treatments: Updates and New Challenges. *J Pers Med*. 2021;11(8).
3. Bergholtz H, Lien TG, Swanson DM, Frigessi A, Bathen TF, Borgen E, et al. Contrasting DCIS and invasive breast cancer by subtype suggests basal-like DCIS as distinct lesions. *npj Breast Cancer*. 2020;6(1):26.
4. Wong EC, S.; Rossi, M. Breast cancer McMaster Pathophysiology Review 2012 [Available from: <http://www.pathophys.org/breast-cancer/>].
5. Tong CWS, Wu M, Cho WCS, To KKW. Recent Advances in the Treatment of Breast Cancer. *Front Oncol*. 2018;8:227.
6. Tian JM, Ran B, Zhang CL, Yan DM, Li XH. Estrogen and progesterone promote breast cancer cell proliferation by inducing cyclin G1 expression. *Braz J Med Biol Res*. 2018;51(3):1-7.
7. Venkatesh P, Kasi A. Anthracyclines. *StatPearls*. Treasure Island (FL) 2022.
8. Manish S, Shrutika S, Prabhu Prasad D, Sonika C. Molecular-Level Understanding of the Anticancer Action Mechanism of Anthracyclines. In: Hilal A, Bassam Abdul Rasool H, editors. *Advances in Precision Medicine Oncology*. Rijeka: IntechOpen; 2020. p. Ch. 9.
9. Boyages J. Radiation therapy and early breast cancer: current controversies. *Med J Aust*. 2017;207(5):216-22.
10. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative G, Darby S, McGale P, Correa C, Taylor C, Arriagada R, et al. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet*. 2011;378(9804):1707-16.
11. Cheng YJ, Nie XY, Ji CC, Lin XX, Liu LJ, Chen XM, et al. Long-Term Cardiovascular Risk After Radiotherapy in Women With Breast Cancer. *J Am Heart Assoc*. 2017;6(5).
12. Colombel M, Soloway M, Akaza H, Böhle A, Palou J, Buckley R, et al. Epidemiology, Staging, Grading, and Risk Stratification of Bladder Cancer. *European Urology Supplements*. 2008;7(10):618-26.

13. Catalanotti V BV, Tariq N, Califano R. Treatment of Advanced Breast Cancer (ABC): The Expanding Landscape of Targeted Therapies. . J Cancer Biol Res. 2014;2(1).
14. Jazieh K, Bell R, Agarwal N, Abraham J. Novel targeted therapies for metastatic breast cancer. Ann Transl Med. 2020;8(14):907.
15. Abbas AKL, Andrew H.; Pillai, Shiv. Cellular and Molecular Immunology. 10th ed. Inc. E, editor: Jeremy Bowes; 2022.
16. Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. Am J Cancer Res. 2020;10(3):727-42.
17. Chung AW, Anand K, Anselme AC, Chan AA, Gupta N, Venta LA, et al. A phase 1/2 clinical trial of the nitric oxide synthase inhibitor L-NMMA and taxane for treating chemoresistant triple-negative breast cancer. Sci Transl Med. 2021;13(624):eabj5070.
18. Imbert T. La réaction inflammatoire. In: Canopé-CNDP, editor. corpus. Réseau Canopé2011.
19. Hannoodee S, Nasuruddin DN. Acute Inflammatory Response. StatPearls. Treasure Island (FL)2022.
20. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. Oncotarget. 2018;9(6):7204-18.
21. Netea MG, Balkwill F, Chonchol M, Cominelli F, Donath MY, Giamarellos-Bourboulis EJ, et al. A guiding map for inflammation. Nat Immunol. 2017;18(8):826-31.
22. Agier J, Pastwinska J, Brzezinska-Blaszczyk E. An overview of mast cell pattern recognition receptors. Inflamm Res. 2018;67(9):737-46.
23. Sarma JV, Ward PA. The complement system. Cell Tissue Res. 2011;343(1):227-35.
24. Lodish B, Kaiser, Krieger, Bretscher, Ploegh, Amon, Scott. Molecular Cell Biology 7th ed. New York, USA: W.H. Freeman and company; 2012.
25. Lan M, Lu W, Zou T, Li L, Liu F, Cai T, et al. Role of inflammatory microenvironment: potential implications for improved breast cancer nano-targeted therapy. Cell Mol Life Sci. 2021;78(5):2105-29.
26. Moro-Garcia MA, Mayo JC, Sainz RM, Alonso-Arias R. Influence of Inflammation in the Process of T Lymphocyte Differentiation: Proliferative, Metabolic, and Oxidative Changes. Front Immunol. 2018;9:339.

27. Furman D, Campisi J, Verdin E, Carrera-Bastos P, Targ S, Franceschi C, et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat Med.* 2019;25(12):1822-32.
28. Zhao H, Wu L, Yan G, Chen Y, Zhou M, Wu Y, et al. Inflammation and tumor progression: Signaling pathways and targeted intervention. *Signal transduction and targeted therapy.* 2021;6(1):1-46.
29. Takahashi Y, Demachi-Okamura A, Oya Y, Nakada T, Sakakura N, Kuroda H, et al. Research advance in tumor specific antigens: a narrative review. *AME Medical Journal.* 2020;6.
30. Dong C, Flavell RA. Cell fate decision: T-helper 1 and 2 subsets in immune responses. *Arthritis Res.* 2000;2(3):179-88.
31. Lee HG, Cho MZ, Choi JM. Bystander CD4(+) T cells: crossroads between innate and adaptive immunity. *Exp Mol Med.* 2020;52(8):1255-63.
32. Pennock ND, White JT, Cross EW, Cheney EE, Tamburini BA, Kedl RM. T cell responses: naive to memory and everything in between. *Adv Physiol Educ.* 2013;37(4):273-83.
33. Suman S, Sharma PK, Rai G, Mishra S, Arora D, Gupta P, et al. Current perspectives of molecular pathways involved in chronic inflammation-mediated breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;472(3):401-9.
34. Berg JW. Inflammation and prognosis in breast cancer; a search for host resistance. *Cancer.* 1959;12(4):714-20.
35. Hibino S, Kawazoe T, Kasahara H, Itoh S, Ishimoto T, Sakata-Yanagimoto M, et al. Inflammation-Induced Tumorigenesis and Metastasis. *Int J Mol Sci.* 2021;22(11).
36. Hugo HJ, Saunders C, Ramsay RG, Thompson EW. New Insights on COX-2 in Chronic Inflammation Driving Breast Cancer Growth and Metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2015;20(3-4):109-19.
37. Singh N, Baby D, Rajguru JP, Patil PB, Thakkannavar SS, Pujari VB. Inflammation and cancer. *Ann Afr Med.* 2019;18(3):121-6.
38. Kartikasari AER, Huertas CS, Mitchell A, Plebanski M. Tumor-Induced Inflammatory Cytokines and the Emerging Diagnostic Devices for Cancer Detection and Prognosis. *Front Oncol.* 2021;11:692142.
39. Afshar-Kharghan V. The role of the complement system in cancer. *J Clin Invest.* 2017;127(3):780-9.

40. Kolev M, Das M, Gerber M, Baver S, Deschatelets P, Markiewski MM. Inside-Out of Complement in Cancer. *Front Immunol.* 2022;13:931273.
41. Kany S, Vollrath JT, Relja B. Cytokines in Inflammatory Disease. *Int J Mol Sci.* 2019;20(23).
42. Manore SG, Doheny DL, Wong GL, Lo HW. IL-6/JAK/STAT3 Signaling in Breast Cancer Metastasis: Biology and Treatment. *Front Oncol.* 2022;12:866014.
43. Masjedi A, Hashemi V, Hojjat-Farsangi M, Ghalamfarsa G, Azizi G, Yousefi M, et al. The significant role of interleukin-6 and its signaling pathway in the immunopathogenesis and treatment of breast cancer. *Biomed Pharmacother.* 2018;108:1415-24.
44. Labovsky V, Martinez LM, Calcagno ML, Davies KM, Garcia-Rivello H, Wernicke A, et al. Interleukin-6 receptor in spindle-shaped stromal cells, a prognostic determinant of early breast cancer. *Tumour Biol.* 2016;37(10):13377-84.
45. Khongthong P, Roseweir AK, Edwards J. The NF-KB pathway and endocrine therapy resistance in breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2019;26(6):R369-R80.
46. Wu Y, Zhou BP. TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer.* 2010;102(4):639-44.
47. Rajput S, Wilber A. Roles of inflammation in cancer initiation, progression, and metastasis. *Front Biosci (Schol Ed).* 2010;2:176-83.
48. Bhatelia K, Singh K, Singh R. TLRs: linking inflammation and breast cancer. *Cell Signal.* 2014;26(11):2350-7.
49. Jorgovanovic D, Song M, Wang L, Zhang Y. Roles of IFN-gamma in tumor progression and regression: a review. *Biomark Res.* 2020;8:49.
50. Heimes AS, Hartner F, Almstedt K, Krajnak S, Lebrecht A, Battista MJ, et al. Prognostic Significance of Interferon-gamma and Its Signaling Pathway in Early Breast Cancer Depends on the Molecular Subtypes. *Int J Mol Sci.* 2020;21(19).
51. Park SY, Seol JW, Lee YJ, Cho JH, Kang HS, Kim IS, et al. IFN-gamma enhances TRAIL-induced apoptosis through IRF-1. *Eur J Biochem.* 2004;271(21):4222-8.
52. Kim PKM, Armstrong M, Liu Y, Yan P, Bucher B, Zuckerbraun BS, et al. IRF-1 expression induces apoptosis and inhibits tumor growth in mouse mammary cancer cells in vitro and in vivo. *Oncogene.* 2004;23(5):1125-35.
53. Kak G, Raza M, Tiwari BK. Interferon-gamma (IFN-gamma): Exploring its implications in infectious diseases. *Biomol Concepts.* 2018;9(1):64-79.

54. Martin-Hijano L, Sainz B, Jr. The Interactions Between Cancer Stem Cells and the Innate Interferon Signaling Pathway. *Front Immunol.* 2020;11:526.
55. Tecalco-Cruz AC, Macias-Silva M, Ramirez-Jarquín JO, Mendez-Ambrosio B. Identification of genes modulated by interferon gamma in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res.* 2021;27:101053.
56. Ni L, Lu J. Interferon gamma in cancer immunotherapy. *Cancer Med.* 2018;7(9):4509-16.
57. Zaidi MR. The Interferon-Gamma Paradox in Cancer. *J Interferon Cytokine Res.* 2019;39(1):30-8.
58. Fu X, De Angelis C, Schiff R. Interferon Signaling in Estrogen Receptor-positive Breast Cancer: A Revitalized Topic. *Endocrinology.* 2022;163(1).
59. Zhang M, Zhang YY, Chen Y, Wang J, Wang Q, Lu H. TGF-beta Signaling and Resistance to Cancer Therapy. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:786728.
60. Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res.* 2014;2014:149185.
61. Singha PK, Pandeswara S, Geng H, Lan R, Venkatachalam MA, Dobi A, et al. Increased Smad3 and reduced Smad2 levels mediate the functional switch of TGF-beta from growth suppressor to growth and metastasis promoter through TMEPAI/PMEPA1 in triple negative breast cancer. *Genes Cancer.* 2019;10(5-6):134-49.
62. Peng D, Fu L, Sun G. Expression analysis of the TGF-beta/SMAD target genes in adenocarcinoma of esophagogastric junction. *Open Med (Wars).* 2016;11(1):83-6.
63. Wang Y, Zhou BP. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer progression and metastasis. *Chin J Cancer.* 2011;30(9):603-11.
64. Kubiczikova L, Sedlarikova L, Hajek R, Sevcikova S. TGF-beta - an excellent servant but a bad master. *J Transl Med.* 2012;10:183.
65. Kretzschmar M. Transforming growth factor-beta and breast cancer: Transforming growth factor-beta/SMAD signaling defects and cancer. *Breast Cancer Res.* 2000;2(2):107-15.
66. Lan Y, Zhang D, Xu C, Hance KW, Marelli B, Qi J, et al. Enhanced preclinical antitumor activity of M7824, a bifunctional fusion protein simultaneously targeting PD-L1 and TGF-beta. *Sci Transl Med.* 2018;10(424).

67. Tauriello DVF, Palomo-Ponce S, Stork D, Berenguer-Llgero A, Badia-Ramentol J, Iglesias M, et al. TGFbeta drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. *Nature*. 2018;554(7693):538-43.
68. Suarez-Carmona M, Lesage J, Cataldo D, Gilles C. EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression. *Mol Oncol*. 2017;11(7):805-23.
69. Bonde AK, Tischler V, Kumar S, Soltermann A, Schwendener RA. Intratumoral macrophages contribute to epithelial-mesenchymal transition in solid tumors. *BMC Cancer*. 2012;12:35.
70. Bednarczyk RB, Tuli NY, Hanly EK, Rahoma GB, Maniyar R, Mittelman A, et al. Macrophage inflammatory factors promote epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *Oncotarget*. 2018;9(36):24272-82.
71. Munn LL. Cancer and inflammation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2017;9(2).
72. Health USNIo. Cancer Registration & Surveillance Modules [Available from: <https://training.seer.cancer.gov/disease/categories/classification.html>].
73. Huang Y, Hong W, Wei X. The molecular mechanisms and therapeutic strategies of EMT in tumor progression and metastasis. *Journal of Hematology & Oncology*. 2022;15(1):129.
74. Redig AJ, McAllister SS. Breast cancer as a systemic disease: a view of metastasis. *J Intern Med*. 2013;274(2):113-26.
75. Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(2):69-84.
76. Kaufhold S, Bonavida B. Central role of Snail1 in the regulation of EMT and resistance in cancer: a target for therapeutic intervention. *J Exp Clin Cancer Res*. 2014;33:62.
77. Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(18):3033-46.
78. Sullivan NJ, Sasser AK, Axel AE, Vesuna F, Raman V, Ramirez N, et al. Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene*. 2009;28(33):2940-7.
79. Wu Y, Zhou BP. Inflammation: a driving force speeds cancer metastasis. *Cell Cycle*. 2009;8(20):3267-73.
80. Bocca C, Ievolella M, Autelli R, Motta M, Mosso L, Torchio B, et al. Expression of Cox-2 in human breast cancer cells as a critical determinant of epithelial-to-

- mesenchymal transition and invasiveness. *Expert Opin Ther Targets*. 2014;18(2):121-35.
81. Majumder M, Xin X, Liu L, Tutunea-Fatan E, Rodriguez-Torres M, Vincent K, et al. COX-2 Induces Breast Cancer Stem Cells via EP4/PI3K/AKT/NOTCH/WNT Axis. *Stem Cells*. 2016;34(9):2290-305.
 82. Hamelin-Morrisette J, Cloutier S, Girouard J, Belgorosky D, Eijan AM, Legault J, et al. Identification of an anti-inflammatory derivative with anti-cancer potential: The impact of each of its structural components on inflammatory responses in macrophages and bladder cancer cells. *Eur J Med Chem*. 2015;96:259-68.
 83. Girouard J, Belgorosky D, Hamelin-Morrisette J, Boulanger V, D'Orio E, Ramla D, et al. Molecular therapy with derivatives of amino benzoic acid inhibits tumor growth and metastasis in murine models of bladder cancer through inhibition of TNFalpha/NFKappaB and iNOS/NO pathways. *Biochem Pharmacol*. 2020;176:113778.
 84. Oufqir Y, Fortin L, Girouard J, Cloutier F, Cloutier M, Leclerc M-F, et al. Synthesis of new para-aminobenzoic acid derivatives, in vitro biological evaluation and preclinical validation of DAB-2-28 as a therapeutic option for the treatment of bladder cancer. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*. 2022;6:100069.
 85. Oliver TG. Bosom Buddies: Close Connections Between Breast and Bladder Cancer. *Science Translational Medicine*. 2014;6(225):225ec36-ec36.
 86. Nesi G, Nobili S, Cai T, Caini S, Santi R. Chronic inflammation in urothelial bladder cancer. *Virchows Arch*. 2015;467(6):623-33.
 87. Anderson B. Breast cancer: World Health Organization 2021 [Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>].
 88. Jin X, Mu P. Targeting Breast Cancer Metastasis. *Breast Cancer (Auckl)*. 2015;9(Suppl 1):23-34.
 89. Boon Yin K. The Mesenchymal-Like Phenotype of the MDA-MB-231 Cell Line. 2011.
 90. Eiden C, Ungefroren H. The Ratio of RAC1B to RAC1 Expression in Breast Cancer Cell Lines as a Determinant of Epithelial/Mesenchymal Differentiation and Migratory Potential. *Cells*. 2021;10(2).
 91. Wei Z, Shan Z, Shaikh ZA. Epithelial-mesenchymal transition in breast epithelial cells treated with cadmium and the role of Snail. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2018;344:46-55.

92. Tang Y, Herr G, Johnson W, Resnik E, Aho J. Induction and analysis of epithelial to mesenchymal transition. *J Vis Exp*. 2013(78).
93. Li CW, Xia W, Huo L, Lim SO, Wu Y, Hsu JL, et al. Epithelial-mesenchymal transition induced by TNF-alpha requires NF-kappaB-mediated transcriptional upregulation of Twist1. *Cancer Res*. 2012;72(5):1290-300.
94. Cohen EN, Gao H, Anfossi S, Mego M, Reddy NG, Debeb B, et al. Inflammation Mediated Metastasis: Immune Induced Epithelial-To-Mesenchymal Transition in Inflammatory Breast Cancer Cells. *PLoS One*. 2015;10(7):e0132710.
95. Li L, Qi L, Liang Z, Song W, Liu Y, Wang Y, et al. Transforming growth factor-beta1 induces EMT by the transactivation of epidermal growth factor signaling through HA/CD44 in lung and breast cancer cells. *Int J Mol Med*. 2015;36(1):113-22.
96. Liao SJ, Luo J, Li D, Zhou YH, Yan B, Wei JJ, et al. TGF-beta1 and TNF-alpha synergistically induce epithelial to mesenchymal transition of breast cancer cells by enhancing TAK1 activation. *J Cell Commun Signal*. 2019;13(3):369-80.
97. Liu ZW, Zhang YM, Zhang LY, Zhou T, Li YY, Zhou GC, et al. Duality of Interactions Between TGF-beta and TNF-alpha During Tumor Formation. *Front Immunol*. 2021;12:810286.
98. Ricciardi M, Zanotto M, Malpeli G, Bassi G, Perbellini O, Chilosi M, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) induced by inflammatory priming elicits mesenchymal stromal cell-like immune-modulatory properties in cancer cells. *Br J Cancer*. 2015;112(6):1067-75.
99. Systems RD. Cultrex Basement Membrane Extract (BME) and Extracellular Matrices (ECM) [Available from: https://www.rndsystems.com/products/cultrex-basement-membrane-extract-bme-and-extracellular-matrices-ecm?gclid=Cj0KCQjwvZCZBhCiARIsAPXbajsrFZjXeSnuQ7vW32uciM22wyoKn5IZ5XEefl4XM0AMLptaQQbpAkkaAmU3EALw_wcB&gclsrc=aw.ds].
100. Toth M, Fridman R. Assessment of Gelatinases (MMP-2 and MMP-9 by Gelatin Zymography. *Methods Mol Med*. 2001;57:163-74.
101. Yang J, Antin P, Berx G, Blanpain C, Brabletz T, Bronner M, et al. Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(6):341-52.
102. Miettinen PJ, Ebner R, Lopez AR, Derynck R. TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J Cell Biol*. 1994;127(6 Pt 2):2021-36.

103. Haynes J, Srivastava J, Madson N, Wittmann T, Barber DL. Dynamic actin remodeling during epithelial-mesenchymal transition depends on increased moesin expression. *Mol Biol Cell*. 2011;22(24):4750-64.
104. Liu YL, Chou CK, Kim M, Vasisht R, Kuo YA, Ang P, et al. Assessing metastatic potential of breast cancer cells based on EGFR dynamics. *Sci Rep*. 2019;9(1):3395.
105. Bio-technie. StemXVivo EMT Inducing Media Supplement In: Systems RD, editor.
106. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. Cell Viability Assays. In: Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, Arkin M, Auld D, Austin C, et al., editors. *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD)2004.
107. Mayr C, Beyreis M, Dobias H, Gaisberger M, Pichler M, Ritter M, et al. Miniaturization of the Clonogenic Assay Using Confluence Measurement. *Int J Mol Sci*. 2018;19(3).
108. Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*. 2006;1(5):2315-9.
109. Geldof AA, Rao BR, de Voogt HJ. Development of an in vivo clonogenic cell assay for rat prostate metastatic tumor--R3327-MatLyLu. *Urol Res*. 1987;15(3):139-44.
110. Comsa S, Cimpean AM, Raica M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Res*. 2015;35(6):3147-54.
111. Wang L, Xu C, Liu X, Yang Y, Cao L, Xiang G, et al. TGF-beta1 stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer-associated myoepithelial cell during the progression from in situ to invasive breast cancer. *Cancer Cell Int*. 2019;19:343.
112. Liu YN, Lee WW, Wang CY, Chao TH, Chen Y, Chen JH. Regulatory mechanisms controlling human E-cadherin gene expression. *Oncogene*. 2005;24(56):8277-90.
113. Goswami S, Sahai E, Wyckoff JB, Cammer M, Cox D, Pixley FJ, et al. Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. *Cancer Res*. 2005;65(12):5278-83.
114. Sampaio NG, Yu W, Cox D, Wyckoff J, Condeelis J, Stanley ER, et al. Phosphorylation of CSF-1R Y721 mediates its association with PI3K to regulate macrophage motility and enhancement of tumor cell invasion. *J Cell Sci*. 2011;124(Pt 12):2021-31.

115. Fridman R, Toth M, Pena D, Mobashery S. Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2). *Cancer Res.* 1995;55(12):2548-55.
116. Dufresne M, Dumas G, Asselin E, Carrier C, Pouliot M, Reyes-Moreno C. Pro-inflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages differentially modulate cell survival and invasion of human bladder carcinoma T24 cells. *Mol Immunol.* 2011;48(12-13):1556-67.
117. Chattopadhyay I, Ambati R, Gundamaraju R. Exploring the Crosstalk between Inflammation and Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer. *Mediators of inflammation.* 2021;2021:9918379.
118. Paplomata E, O'Regan R. The PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer: targets, trials and biomarkers. *Ther Adv Med Oncol.* 2014;6(4):154-66.
119. Yang J, Nie J, Ma X, Wei Y, Peng Y, Wei X. Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials. *Mol Cancer.* 2019;18(1):26.
120. Steven A, Friedrich M, Jank P, Heimer N, Budczies J, Denkert C, et al. What turns CREB on? And off? And why does it matter? *Cell Mol Life Sci.* 2020;77(20):4049-67.
121. Sakamoto KM, Frank DA. CREB in the pathophysiology of cancer: implications for targeting transcription factors for cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2009;15(8):2583-7.
122. Sun Y, Zhou QM, Lu YY, Zhang H, Chen QL, Zhao M, et al. Resveratrol Inhibits the Migration and Metastasis of MDA-MB-231 Human Breast Cancer by Reversing TGF-beta1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. *Molecules.* 2019;24(6).
123. Barcellos-Hoff MH, Akhurst RJ. Transforming growth factor-beta in breast cancer: too much, too late. *Breast Cancer Res.* 2009;11(1):202.
124. Hilovska L, Jendzelovsky R, Fedorocko P. Potency of non-steroidal anti-inflammatory drugs in chemotherapy. *Mol Clin Oncol.* 2015;3(1):3-12.
125. Rayburn ER, Ezell SJ, Zhang R. Anti-Inflammatory Agents for Cancer Therapy. *Mol Cell Pharmacol.* 2009;1(1):29-43.
126. Khoo BL, Greci G, Lim JSY, Lim YP, Fong J, Yeap WH, et al. Low-dose anti-inflammatory combinatorial therapy reduced cancer stem cell formation in patient-derived preclinical models for tumour relapse prevention. *Br J Cancer.* 2019;120(4):407-23.
127. Schirrmacher V. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *Int J Oncol.* 2019;54(2):407-19.

128. Park MK, Lee CH, Lee H. Mouse models of breast cancer in preclinical research. *Lab Anim Res.* 2018;34(4):160-5.
129. Cloutier F, Oufqir Y, Fortin L, Leclerc M-F, Girouard J, Tajmir-Riahi H-A, et al. Design of novel 4-maleimidylphenyl-hydrazide molecules displaying anti-inflammatory properties: Refining the chemical structure. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports.* 2022:100064.