

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

ÉTUDE DE L'EXPRESSION GÉNÉTIQUE DIFFÉRENTIELLE AVANT ET APRÈS
CHIMIOTHÉRAPIE DANS LES CANCERS DU SEIN CHEZ LA FEMME NOIRE
AFRICAINNE

THÈSE PRÉSENTÉE À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES
COMME EXIGENCE PARTIELLE
AU DOCTORAT EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR
HURETTE JUNIE CHANSI KENGNI

JUIN 2024

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.

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES
BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE (DOCTORAT)

Direction de recherche

Éric Asselin

Directeur de recherche

Monique Cadrin

Codirectrice de recherche

Jury d'évaluation

Éric Asselin

Directeur de recherche

Monique Cadrin

Codirectrice de recherche

Patrick Narbonne

Président de jury

Erwan Pernet

Évaluateur interne

Jean-Jacques Lebrun

Évaluateur externe

Je dédie cet ouvrage à mes Parents et à Mon Époux

RÉSUMÉ

Le cancer surpasse les maladies cardiovasculaires et est à l'heure actuelle la première cause de mortalité au Canada. Le cancer du sein est le cancer féminin le plus fréquent chez la Canadienne. Malgré les avancées thérapeutiques, il demeure la deuxième cause de mortalité féminine par cancer. Parmi les Cancer du sein, il existe des formes agressives tant sur le plan clinique (Cancer du sein inflammatoire ; Cancer du sein localement avancé) que moléculaire (Cancer du sein triple négatif ; Cancer du sein HER2+). Ces formes ont de mauvais pronostiques et sont majoritairement associées à la femme noire. Aux États-Unis, les afro-américaines présentent un taux de décès par Cancer du` sein de 41% supérieur à celui des caucasiennes. À l'instar des États-Unis, il a été observé que la femme Africaine au Gabon développe un Cancer du sein généralement plus agressif de type moléculaire triple négatif. La chimiothérapie est l'arme thérapeutique principale des cancers du sein agressifs et triples négatifs. Les agents chimio thérapeutiques les plus souvent utilisés sont la doxorubicine et les taxanes mais le faible taux de réponse démontre l'importance de la chimiorésistance. Ainsi, les mécanismes conduisant à la chimiorésistance se doivent d'être élucidés afin d'augmenter le taux de survie des femmes atteintes de cette terrible maladie. Une des solutions pour mieux comprendre la chimiorésistance consiste en la recherche de biomarqueurs prédisant les réponses thérapeutiques. AKT est une kinase essentielle dans la prolifération et la survie cellulaire et notre laboratoire a déjà montré son implication dans la chimiorésistance endométriales et ovariennes.

Notre travail s'est d'abord concentré sur l'étude du rôle de la voie PI3K/AKT, qui dans le cancer est un sentier signalétique associé principalement à la prolifération cellulaire et la chimiorésistance. Notre hypothèse, dérivée des travaux précédents chez la femme caucasienne stipulait d'une part que cette voie de signalisation était impliquée dans la chimiorésistance et la réponse thérapeutique du cancer du sein chez la femme noire. D'autre part notre hypothèse stipulait que l'action d'AKT sur certains mécanismes moléculaires chez la femme noire était isoforme dépendante. L'expression de chacun des isoformes d'AKT exerçait individuellement un contrôle sur certains mécanismes moléculaires. Sur des échantillons de biopsies de patientes africaines ayant un cancer du sein invasif, nous avons regardé via l'immunohistochimie et le séquençage d'ARN les isoformes et les substrats d'AKT. En plus de l'expression protéique d'AKT,

le transcriptome obtenu grâce au séquençage d'ARN a permis d'identifier les agents chimiothérapeutiques qui surexpriment AKT dans le cancer du sein de la femme noire. Ces résultats pourraient ajouter une valeur pronostique supplémentaire dans le cas de cancer du sein agressif. Nous avons pu montrer une corrélation positive entre AKT1, FOXO3 et le grade de la maladie. Une suractivation globale d'AKT post chimiothérapie et une surexpression d'AKT2 et de FOXO3 chez les patientes traitées avec doxorubicine-cyclophosphamide a aussi été observée.

Enfin, afin d'améliorer l'efficacité des traitements chimio thérapeutiques dispensés aux femmes noires ayant le cancer du sein, nous avons voulu identifier de nouveaux marqueurs diagnostiques et thérapeutiques de cancer du sein agressif. La stratégie de séquençage d'ARN combinée à une analyse *in silico* et à des tests *in vitro* a été utilisée pour identifier et comparer les différences d'expression des gènes avant et après le traitement chimio thérapeutique. En comparant les patientes post traitées aux patientes avant le traitement chimio thérapeutiques, nous avons pu identifier avec succès neuf protéines différemment exprimées dans chacun des groupes de traitement. Ces neuf protéines (AGR2, PLIN1, GJB6, CEACAM6, EGR1, CCN2, MYB, AMPK α et GPNMB) pouvant servir de cibles thérapeutiques ont ensuite été validées par immunohistochimie. En comparant les patientes chimiorésistantes aux patientes chimio sensibles, CEACAM6 était la seule protéine surexprimée chez les chimiorésistantes faisant de CEACAM6 une protéine potentielle pouvant contrer la chimiorésistance. De plus les patientes ayant un cancer du sein triple négatif surexpriment MYB, AGR2, EGR1 et PLIN1 proposant ces quatre protéines comme cibles thérapeutiques possibles de cancer triple négatif. Il reste donc maintenant à trouver une drogue qui saura outre-passer ces mécanismes de résistance. Cette étude est la 1^{ère} étude au Canada portant sur la chimiorésistance du cancer du sein chez la femme Africaine et pourrait mener à la découverte des cibles diagnostiques et thérapeutiques.

En conclusion, nos travaux soulignent l'implication de la voie de signalisation PI3K/AKT dans le cancer du sein agressif de la femme noire. Notre travail propose aussi des biomarqueurs de réponse thérapeutique et de chimiorésistance qui serviront à conduire des études précliniques qui permettront de mieux comprendre la chimiorésistance, personnaliser le traitement des patientes ayant un cancer du sein triple négatif et diminuer la disparité actuellement observée dans la mortalité par cancer du sein chez la femme noire.

Mots-clés : AKT, PI3K, cancer du sein, chimiorésistance, réponse thérapeutique, doxorubicine, Séquençage d'ARN, CCN2, EGR1, AGR2, c-Myb, PLIN1, CEACAM6, GJB6, AMPK α 2, GPNMB.

REMERCIEMENTS

J'ai eu l'énorme privilège durant ces années d'étude doctorales d'être entourée de personnes exceptionnelles qui ne réalisent même pas leur influence sur ma vie et sur l'aboutissement de ce long parcours.

À mes parents : je ne serais pas où je suis aujourd'hui si ce n'était de votre soutien inébranlable. Merci pour votre amour inconditionnel, et merci d'avoir cru en moi, souvent beaucoup plus que je ne croyais en moi-même.

À mon époux et mes enfants : Que de sacrifices consentis. Vous avez toujours été à mes côtés dans les moments difficiles, partagé mes angoisses et joies. Ce travail est le fruit de vos efforts, de votre amour, de vos prières et de vos encouragements. Merci pour votre présence, votre patience et pour votre capacité à me ramener à la raison lorsque j'en avais besoin. Vous avez été une bouffée d'oxygène chaque fois que les obstacles m'étouffaient.

À Corinne et Pamela : Merci pour votre expérience partagée avec moi, votre écoute et vos nombreux conseils.

Aux membres du laboratoire : Merci pour les plus beaux moments de ma vie universitaire. Merci pour votre aide et votre soutien durant toutes ces années. Un merci tout spécial à Dadou qui nous a quitté pour son soutien et ses encouragements. Dadou tu te souciais de moi plus que moi-même et tu t'assurais de me voir sourire avant de rentrer, de là où tu es un énorme merci.

Enfin, cette thèse n'aurait jamais eu lieu sans mes directeurs de thèse Éric Asselin et Monique Cadrin. Éric, notre rencontre remonte à ma deuxième année de baccalauréat. Malgré les obstacles et les nombreuses hypothèses qui se sont avérées infructueuses, jamais tu ne m'as laissé douter de ma capacité à pouvoir proposer la bonne. C'est grâce à cette confiance, ta rigueur et ta patience que je termine mes études doctorales aujourd'hui et je serai toujours reconnaissante pour toutes les opportunités que tu m'as offertes au cours des années.

Monique, tu es cette main de fer dans un gant de velours. J'aime ton sens du détail et ta rigueur qui nous emmène constamment à nous améliorer. À toutes et à tous, je vous remercie énormément

TABLE DES MATIERES

<i>RÉSUMÉ</i>	1
<i>REMERCIEMENTS</i>	4
<i>TABLE DES MATIERES</i>	5
<i>LISTE DES FIGURES</i>	9
<i>LISTE DES TABLEAUX</i>	14
<i>LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES</i>	15
<i>INTRODUCTION</i>	23
1.1 CANCER DU SEIN – CONTEXTE GENERAL.....	23
1.1.1 <i>Épidémiologie du cancer du sein</i>	23
1.1.2 <i>Disparités observées dans le cancer du sein</i>	23
1.1.2.1 Cancer du sein chez la femme noire	24
a. Chez la femme Afro-américaine.....	24
b. Chez la femme Africaine.....	27
1.1.3 <i>TYPES DE CANCER DU SEIN</i>	29
1.1.4 <i>Facteurs de risque du cancer du sein</i>	32
1.2 DEVELOPPEMENT ET ANATOMIE DE LA GLANDE MAMMAIRE.....	36
1.2.4 <i>Le développement de la glande mammaire</i>	36
1.2.5 <i>Anatomie de la glande mammaire</i>	37
1.3 CANCEROGENESE ET PATHOGENESE DU CANCER DU SEIN	40
1.3.4 <i>Pathogénèse du cancer du sein</i>	43
1.3.4.1 La cellule d'origine du cancer du sein.....	47
1.3.4.2 Hétérogénéité intra tumorale dans le cancer du sein.....	50
1.3.4.3 Les modèles de progression du cancer du sein.....	51
1.3.4.4 Du cancer invasif à la métastase	52
1.4 VOIE DE SIGNALISATION PI3K/AKT.....	53
1.5 BIOMARQUEURS DU CANCER	60
1.5.4 <i>Définition et types de bio marqueurs</i>	60
1.5.4.1 Biomarqueurs de diagnostic et de dépistage.....	61
1.5.4.2 Biomarqueur pronostique.....	61
1.5.4.3 Biomarqueurs prédictifs	61
1.5.5 <i>Caractéristiques d'un biomarqueur idéal</i>	62
1.5.6 <i>Application actuelle des biomarqueurs et leur utilité clinique</i>	63

1.5.7	<i>Biomarqueurs du cancer du sein actuellement disponibles</i>	64
1.6	STRATEGIES POUR DECOUVRIR DE NOUVEAUX BIOMARQUEURS DU CANCER	67
1.6.1	<i>Profilage de l'expression génique</i>	68
1.6.2	<i>Profilage basé sur la spectrométrie de masse</i>	70
1.6.3	<i>Profilage basé sur l'Immunohistochimie</i>	71
1.7	SEQUENÇAGE D'ARN.....	72
1.8	DIAGNOSTIC CLINIQUE DU CANCER DU SEIN	74
1.8.1	<i>Bilan radiologique</i>	74
1.8.2	<i>Bilan pathologique</i>	76
a.	Type histologique	77
b.	Grade histologique.....	78
c.	Système de classification TNM et stade tumoral	79
d.	Stadification de la tumeur résiduelle après traitement néoadjuvant	80
e.	Type moléculaire.....	80
1.9	TRAITEMENTS DU CANCER DU SEIN	82
1.9.1	<i>Chirurgie</i>	82
1.9.2	<i>Radiothérapie</i>	83
1.9.3	<i>Thérapie Endocrine</i>	85
1.9.4	<i>Thérapie dirigée contre l'HER2</i>	87
1.9.5	<i>Thérapie pour la maladie métastatique</i>	89
1.9.6	<i>Chimiothérapie</i>	90
1.9.6.1	La chimiothérapie néoadjuvante	93
a.	Anthracyclines : mécanisme d'action et toxicité	94
b.	Taxanes : mécanisme d'action et toxicité.....	96
1.10	DEFIS ET CONTROVERSE DANS LE DIAGNOSTIC DU CANCER DU SEIN.....	99
1.10.1	<i>Diagnostic et gestion</i>	99
1.10.1.1	Hétérogénéité tumorale	100
1.10.1.2	Surtraitement et sous- traitement	102
1.10.1.3	Résistance aux traitements, en particulier la chimiorésistance	103
1.10.1.4	La chimiorésistance	104
CHAPITRE 2		110
<i>RNA-SEQUENCING REVEALS POTENTIAL BREAST CANCERS BIOMARKERS IN BLACK WOMEN.</i>		110
2.1	CONTRIBUTION DES AUTEURS.....	111
2.2	RESUME DE L'ARTICLE (FRANÇAIS).....	111
2.3	INTRODUCTION	116
2.4	MATERIALS AND METHODS.....	117

2.4.1	<i>Human tissue samples</i>	117
2.4.2	<i>Cell lines and reagents</i>	118
2.4.3	<i>Cell treatments</i>	118
2.4.4	<i>RNA sequencing and data processing</i>	118
2.4.5	<i>Protein extraction and Western blot analysis</i>	118
2.4.6	<i>Immunohistochemistry</i>	119
2.4.7	<i>Quantification of immunohistochemistry results</i>	119
2.4.8	<i>Statistical analysis</i>	120
2.5	RESULTS	120
2.5.1	<i>AKT1 and FOXO3 correlate with breast cancer grade in African women</i>	123
2.5.2	<i>Activation of AKT in breast cancer in African women</i>	124
2.5.3	<i>AKT2 and FOXO3 increase significantly post chemotherapy in breast cancer in African women</i>	126
2.5.4	<i>Breast cancer and benign tissue gene expression profiles via RNA-seq</i>	128
2.5.4.1	Gene expression profiles of patients treated with 5-fluorouracil (FAC) for breast cancer via RNA-seq.	130
2.5.4.2	Gene expression profiles of patientes treated with Adriblastine-Endoxan (AC) for breast cancer via RNA-seq.	131
2.5.4.3	Gene expression profiles of patientes treated with Adriblastine-Navelbine for breast cancer via RNA-seq.	132
2.5.4.4	Gene expression profiles of chemoresistance patients and triple negative breast cancer patients via RNA-seq.	133
2.5.5	<i>Validation of RNA seq analysis protein by Immunohistochemistry</i>	137
2.5.5.1	PLIN1	137
2.5.5.2	AGR2	139
2.5.5.3	CEACAM6	141
2.5.5.4	EGR1	143
2.6	DISCUSSION	160
2.6.1.1	Activation of AKT and overexpression of AKT1 and FOXO3 post chemotherapy	161
2.6.1.2	Gene expression profile expression in response to chemotherapy	162
2.6.1.3	Expression profile of genes expression on MCF7 and MB231 cell lines	166
2.7	REFERENCES ARTICLE RNA SEQUENCING	167
DISCUSSION		181
3.1	VALIDATION DE L'AGRESSIVITE TUMORALE DANS LE CANCER DU SEIN DE LA FEMME NOIRE DE LA POPULATION AFRICAINE	181
3.2	DETERMINER LA CONTRIBUTION DE AKT DANS LA CHIMIORESISTANCE	183
3.2.1	<i>Activation d'AKT</i>	185
3.2.2	<i>Surexpression d'AKT1 et FOXO3 après la chimiothérapie a la doxorubicine</i>	185
3.3	IDENTIFIER DE NOUVEAUX BIOMARQUEURS THERAPEUTIQUES POUR LE CANCER DU SEIN AGRESSIF DE LA FEMME NOIRE	190

3.3.1	<i>Profil d'expression génique en réponse à la chimiothérapie</i>	190
3.3.2	<i>Biomarqueurs thérapeutiques du cancer du sein proposés dans cette thèse</i>	192
3.3.2.1	GPNMB (Glycoprotéine Non- metastatic B Protein) : Une protéine transmembranaire de surface cellulaire...	192
3.3.2.2	EGR1 (Early Growth Response 1) : un facteur de transcription	197
3.3.2.3	CX30 (Connexin 30) : Une jonction lacunaire B6	200
3.3.2.4	AGR2 (protéine du gradient antérieur 2) : une protéine disulfure isomérase	203
3.3.2.5	CTGF (Connective Tissue Growth Factor) : Une protéine CCN sécrétoire	208
3.3.2.6	CEACAM6 (molécule d'adhésion cellulaire CEA 6).....	212
3.3.2.7	C- Myb (Cellular myeloblastosis viral oncogene cellular homolog) : Un facteur de transcription	216
3.3.3	<i>Méthodes de Validation des résultats obtenus par le séquençage d'ARN</i>	223
3.3.4	<i>Profil d'expression des gènes sur les lignées cellulaires MCF7 et MD-MB231</i>	229
3.4	CONCLUSION ET PERSPECTIVES A VENIR	230
3.4.1	<i>Conclusion</i>	230
3.4.2	<i>Perspectives à venir</i>	231
	<i>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	235
	<i>ANNEXES</i>	294
	<i>LES DONNÉES SUPPLÉMENTAIRES DU CHAPITRE II ET III</i>	294

LISTE DES FIGURES

Figures	Pages
FIGURE 1.1 : TAUX DE MORTALITÉ PAR CANCER DU SEIN CHEZ LES FEMMES ÂGÉES DE 50 À 74 ANS, PAR RACE/ORIGINE ETHNIQUE AUX ÉTATS-UNIS DE 2006-2016, NATIONAL VITAL STATISTICS SYSTEM.....	24
FIGURE 1.2 : CLASSIFICATIONS DES CANCERS DU SEIN. CAMILLE FRANCHET, BULLETIN DU CANCER, 2015.	26
FIGURE 1.3 : TAUX D'INCIDENCE DU CANCER DU SEIN FÉMININ PAR SOUS-TYPE, RACE/ORIGINE ETHNIQUE ET ÂGE AUX ÉTATS-UNIS. DESANTIS, CAROL. CANCER JOURNAL FOR CLINICIANS. 2019.....	29
FIGURE 1.4 : TYPES HISTOLOGIQUES PARTICULIERS DE CANCER DU SEIN. CAMILLE FRANCHET. BULLETIN DU CANCER, 2015.	30
FIGURE 1.5 : ANATOMIE DE LA GLANDE MAMMAIRE, JUSTINE GAGNON, 2024. ADAPTÉE DE LA SÉNOLOGIE AU QUOTIDIEN.....	38
FIGURE 1.6 : ANATOMIE DE L'UNITÉ LOBULAIRE DU CANAL TERMINAL (UCLT), JOCELYNE CHIQUETTE 2020. ADAPTÉE DE LA PHYSIOLOGIE DU SEIN DE L'UNIVERSITÉ MONTPELLIERS.	40
FIGURE 1.7 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES DIX MÉCANISMES FONDAMENTAUX QUI PERMETTENT À LA CELLULE DE DEVENIR CANCÉREUSE. HANAHAN, DOUGLAS. CANCER DISCOVERY (2022).	42
FIGURE 1.8 : TROIS MODÈLES DE LA PATHOGENÈSE DU SEIN, JULIE LEMAIRE, BULLETIN DU CANCER, 2020.	46
FIGURE 1.9 : DEUX MODÈLES DE LA TRANSFORMATION MALIGNÉ, GINESTIER, CHRISTOPHE. THE CANCER STEM CELL MÉDECINE SCIENCES, 2008.....	49
FIGURE 1.10 : LA VOIE DE SIGNALISATION PI3K/AKT. FABI F, ASSELIN E. REPRODUCTION 2014.....	53

FIGURE 1.11 : STRUCTURE DES TROIS ISOFORMES HUMAINES DE LA FAMILLE AKT/PKB, FABI F, ASSELIN E. REPRODUC-TION.2014.....	57
FIGURE 1.12 : LE CANCER DU SEIN COMPORTE CINQ SOUS-TYPES MOLÉCULAIRES EN FONCTION DE L'EXPRESSION DIFFÉRENTIELLE DES GÈNES. CHARAN, MANISH. (2020). INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES.	82
FIGURE 1.13 : LES CHIMIOTHÉRAPIES ET LEUR ACTION SUR LA CELLULE.	92
FIGURE 1.14 : FORMULE CHIMIQUE ET MOLÉCULAIRE DE LA DOXORUBICINE, TIRÉE DE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY 2023.	95
FIGURE 1.15 : MODE D'ACTION DE LA DOXORUBICINE. LAZAR, DIANA & FARCAS, 2021. TIRÉE DE MOLECULAR MECHANISMS OF CARDIOTOXICITY.	96
FIGURE 1.16 : FORMULE CHIMIQUE DU PACLITAXEL ET DU DOCETAXEL, TIRÉE DE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY EN 2023.	97
FIGURE 1.17 : CCR MOLECULAR PATHWAYS, TIRÉE DE MICROTUBULE ACTIVE AGENTS 2008.	98
FIGURE 1.18 : MÉCANISME D'ACTION DES TAXANES, P.MORIS. TIRÉE DE MICROTUBULE ACTIVE.....	99
FIGURE 2.1: STUDY PROCESS. FLOW DIAGRAM DEPICTING SCREENING AND ENROLLMENT OF PATIENTS.....	117
FIGURE 2.2: AKT ACTIVATION (PAKT SUBSTRATES) IN INVASIVE BREAST CANCER. IMMUNOHISTOCHEMICAL STAINING OF P AKT POST CHEMOTHERAPY IN BLACK WOMEN BREAST CANCER. IHC STAINING AFTER CHEMOTHERAPY	125
FIGURE 2.1 : AKT ACTIVATION (PAKT SUBSTRATES) IN INVASIVE BREAST CANCER. IMMUNOHISTOCHEMICAL STAINING OF PAKT PRE CHEMOTHERAPY IN BLACK WOMEN BREAST CANCER. IHC STAINING BEFORE CHEMOTHERAPY.	125
FIGURE 2.4: GLOBAL PAKT IHC SCORE BEFORE AND AFTER CT.....	126

FIGURE 2.3 :	IMMUNOHISTOCHEMISTRY SCORE OF ADRIBLASTIN- ENDOXAN CHEMOTHERAPY FOR A) AKT ISOFORMS AND B) AKT SUBSTRATES IN BREAST CANCER IN AFRICANWOMEN.	127
FIGURE 2.4:	RNA-SEQ DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES IN FAC-TREATED BLACK WOMEN.	129
FIGURE 2.7:	VENN DIAGRAM ILLUSTRATING THE NUMBER OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES IN FAC CHEMOTHERAPY PATIENTS AS A FUNCTION OF THEIR P- VALUES AND LOG2 FACTOR CHANGE IN RNA-SEQ ANALYSIS OF 6 PAIRS OF 5-FLUOROURACIL TREATED SAMPLES. THE POSSIBLE THERAPEUTIC BIOMARKERS THAT EMERGE ARE IN RED. P ADJ < 0, 1.....	130
FIGURE 2.5 :	CHEMO RESISTANT RNA-SEQ IDENTIFIES GENES DIFFERENTIALLY EXPRESSED IN CHEMO RESISTANT BREAST CANCER IN BLACK WOMEN.....	135
FIGURE 2.9:	SUMMARY OF GENES IN CHEMO-RESISTANT	136
FIGURE 2.10:	EXPRESSION OF PLIN 1 IN BREAST CANCER.	138
FIGURE 2.11:	AGR2 EXPRESSION IN BREAST CANCER.	140
FIGURE 2.12:	EXPRESSION OF CEACAM6 IN BREAST CANCER.....	142
FIGURE 2.13:	EGR1 EXPRESSION IN BREAST CANCER.....	144
FIGURE 2.14:	DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION OF AGR2 USING UALCAN ONLINE TOOL IN BRCA A (BASED ON SAMPLE TYPES) AND B (BASED ON PATIENT'S RACE) ..	147
FIGURE 2.15:	DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION OF CTGF USING UALCAN ONLINE TOOL IN BRCA A (BASED ON SAMPLE TYPES) AND B (BASED ON PATIENT'S RACE) ..	148
FIGURE 2.16:	DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION OF CEACM6 USING UALCAN ONLINE TOOL IN BRCA A (BASED ON SAMPLE TYPES) AND B (BASED ON PATIENT'S RACE)....	149

FIGURE 2.17: DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION OF MYB USING UALCAN ONLINE TOOL IN BRCA A (BASED ON SAMPLE TYPES) AND B (BASED ON PATIENT'S RACE) ..	150
FIGURE 2.18: DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION OF PLIN1 USING UALCAN ONLINE TOOL IN BRCA A (BASED ON SAMPLE TYPES) AND B (BASED ON PATIENT'S RACE) ..	151
FIGURE 2.19: DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION OF PRKAA2 USING UALCAN ONLINE TOOL IN BRCA A (BASED ON SAMPLE TYPES) AND B (BASED ON PATIENT'S RACE) ..	152
FIGURE 2.20: DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION OF GSK3B USING UALCAN ONLINE TOOL IN BRCA A (BASED ON SAMPLE TYPES) AND B (BASED ON PATIENT'S RACE) ..	153
FIGURE 2.21: DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION OF GPNMB USING UALCAN ONLINE TOOL IN BRCA A (BASED ON SAMPLE TYPES) AND B (BASED ON PATIENT'S RACE) ..	154
FIGURE 2.22: DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION OF EGR1 USING UALCAN ONLINE TOOL IN BRCA A (BASED ON SAMPLE TYPES) AND B (BASED ON PATIENT'S RACE) ..	155
FIGURE 2.23: DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION OF GPNMB USING UALCAN ONLINE TOOL IN BRCA A (BASED ON SAMPLE TYPES) AND B (BASED ON PATIENT'S RACE) ..	156
FIGURE 2.24: ANALYSE WESTERN BLOT DE LA SENSIBILITÉ DES LIGNES CELLULAIRES AU TRAITEMENT DOX AVEC MESURE DES ISOFORMES AKT ET DES MARQUEURS DE CHIMIORÉSISTANCE ..	159
FIGURE 2.25: ANALYSIS OF PROTEIN EXPRESSION IN MCF-7 AND MB231 CELLS ..	160
FIGURE 3.1 : LA POPULATION NOIRE AU CANADA, TIRÉE DE STATISTIQUES CANADA. EN 2016.	182

FIGURE 3.2: SCHEMA ILLUSTRANT LES MECANISMES D'ACTION DES AGENTS CHIMIO THERAPEUTIQUES UTILISES DANS LE TRAITEMENT DE CANCER DU SEIN EN AMONT DE L'EXPRESSION DE FOXO3A.....	190
FIGURE 3.3 : REPRÉSENTATION STRUCTURELLE DE GPNMB, TIRÉE DE ONCOTARGETS AND THERAPY,2013.....	193
FIGURE 3.4 : LA VOIE DE SIGNALISATION PI3K/AKT ET GPNMB, YANG, CHAOFEI. BONE.INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES. 2021.	197
FIGURE 3.5 : REPRÉSENTATION STRUCTURELLE DE EGR1. CAITLIN M. WOODSON. TIRÉE DE FRONTIERS IN MICROLOGY 2022.....	199
FIGURE 3.6 : REPRÉSENTATION STRUCTURELLE DE CX30. DEL CASTILLO, FRANCISCO & DEL CASTILLO, IGNACIO. (2017) FRONTIERS IN MOLECULAR NEUROSCIENCE.	201
FIGURE 3.7 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE ET STRUCTURELLE D'AGR2. ZHANG KE.2023. FRONTIERS IN ONCOLOGY.....	204
FIGURE 3.8 : MÉCANISMES D'ACTIVATION D'AGR2 DANS LE CANCER DU SEIN. SALMANS, ML,2013. CANCER DU SEIN RES.	208
FIGURE 3.9 : REPRÉSENTATION STRUCTURELLE DE CTGF. YASAMAN RAMAZANI 2018.	209
FIGURE 3.10 : RÔLES MOLÉCULAIRES DE CTGF : ACTIVATION, LIAISON ET EFFETS CELLULAIRES, INGEBORG KLAASSEN, 2015.	210
FIGURE 3.11 : LA SUPERFAMILLE DES GÈNES CEACAM. BEAUCHEMIN, NICOLE. 2013. CANCER METASTASIS REVIEWS.	213
FIGURE 3.12 : CEACAM 6 DANS LE CANCER TIRÉE DE CANCER SCIENCE 2017, ZANG, MINGDE. 2017.SCIENTIFIC REPORTS.	215
FIGURE 3.14 : C-MYB DANS LE CANCER, ANAND, SHASHI (2023). CANCER AND METASTASIS REVIEWS.....	219

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux	Pages
TABLEAU 2-1: INDIVIDUAL CLINICO-PATHOLOGIC CHARACTERISTICS OF INCLUDED PATIENTES: RE, ESTROGEN RECEPTOR; PR, PROGESTERON RECEPTOR; HER2, HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR. MOST OF PATIENTS HAVE HIGH GRADE (2 AND 3)BREAST CANCER.	123
TABLEAU 2-3: SUMMARY TABLE OF OUR GENES OF INTEREST WHEN COMPARED TO THE CONTROL BEFORE AND AFTER FAC CHEMOTHERAPY. RED GENES ARE DIFFERENTIALLY EXPRESSED WITH HIGH FOLD.	131
TABLEAU 2-4: SUMMARY TABLE OF OUR GENES OF INTEREST WHEN COMPARED TO THE CONTROL BEFORE AND AFTER ADRIBLASTINE-ENDOXAN CHEMOTHERAPY. RED GENES ARE DIFFERENTIALLY EXPRESSED WITH HIGH FOLD2	132
TABLEAU 2-5: SUMMARY TABLE OF OUR GENES OF INTEREST WHEN COMPARED TO CONTROL BEFORE AND AFTER ADRIBLASTINE-NAVELBINE CHEMOTHERAPY.....	133
TABLEAU 2-6: SUMMARY TABLE OF OUR GENES OF INTEREST COMPARING OUR IHC SCORE WITH OUR RNA-SEQ RESULTS. REVERSE SHOWS INVERSE CORRELATION BETWEEN IHC EXPRESSION AND RNA-SEQUENCING. FOUR OUT OF THE 24 RNA-SEQ RESULTS SHOW INVERSE CORRELATION AND COULD NOT BE VALIDATED BY IHC.84% OF CORRELATION BETWEEN RNA-SEQ AND IHC SCORE.....	146
TABLEAU 2-7: SUMMARY TABLE OF OUR GENES OF INTEREST IN THE UALCAN TCGA RNA-SEQ DATABASE	157
COMPARISON OF GENE EXPRESSION PROFILES OF PATIENTS FROM RNA-SEQ WITH THOSE OF CELL LINES	157
TABLEAU 3-1: TABLE RÉSUMANT LES SEPT PROTÉINES DISCUTÉES DANS L'ARTICLE AVEC LEUR NIVEAU D'EXPRESSION, LEUR FONCTIONNEMENT EN CONDITION NORMALE ET PATHOLOGIQUE DANS LE CANCER DU SEIN	221

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AGR2	Anterior gradient 2
AIF	Apoptosis-inducing factor
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AKT	Protéine kinase B
AMPK α	AMP-activated protein kinase α
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ASK1	Apoptosis signal-regulating kinase 1
BCL-xL	B-celllymphoma-extra large
BCL-2	B-celllymphoma 2
Bid	BH3 interacting-domain death agonist
BRCA	Gènes/protéines « breast cancer »
Casp	Caspase
CBR	Taux de bénéfice clinique (CR+PR+SD)
CCNB1	Cyclin B1

CCND1	Cyclin D1
CCNE1	Cyclin E1
CDH1	Cadherin 1
Cdks	Cyclin-dependent kinase
CEACAM6	CEA cell adhesion molecule 6
Cl.	Clivé
COX	Cyclooxygénase
CR	Réponse complète
CRISPR	Courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées
CSC	Cellules souches cancéreuses
CTGF	Connective tissue growth factor
Cyt	Cytolytique
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4
DISC	Complexe de signalisation et d'induction de la mort
E2	17~-estradiol
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EGR1	Early growth response 1
EMT	Transition épithéliale-mésenchymateuse
ErbB2	Human epidermal growth factor receptor 2

ERBF-1	Estrogen receptor promoter B factor 1
ERCC1	Excision repair cross-complementation-1
ERE	Élément de réponse aux estrogènes
ERF-1	Estrogen receptor factor 1
ERK1I2	Extracellular signal-regulated kinases Y2
FAC	Cyclophosphamide, épirubicine et 5-fluorouracil
Fbxo45	F-box protein 45
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FNAC	Fine Needle Aspiration Cytology
FOX03a	Forkhead box 03
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GJ	Gap junction
GJB6	Gap junction protein beta 6
GnRH	Hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GPNMB	Glycoprotein nmb
GPR30	G protein-coupled receptor 30
GRP78	Glucose-regulated protein-78
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques

HDM2	E3 ligase human double minute 2
HE	Hématoxyline-éosine
ICC	Immunocytochimie
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IGFR	Insulinlike growth factor1 receptor
INSR	Insulin receptor gene
JNK	JUN N-terminal kinase
KRT 18	Keratin 18
LC3B	Light Chain 3-B
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCL1	Myeloid leukemia 1
MDR1	Multidrug Resistance 1
MEK1I2	Mitogen-activated protein kinase kinases Yz
miARN	MicroARN
MKP3	MAP kinase phosphatase 3
MMAE	Monomethyl auristatin E
MMP2	Matrix metallopeptidase 2
MMP9	Matrix metallopeptidase 9
MS	Mass spectrometry

mTOR	Mammalian target of rapamycin
mTORC	Mammalian target of rapamycin complex
MYB	MYB proto-oncogene, transcription factor
MYBL2	MYB Proto-Oncogene Like 2
NACT	Neo adjuvant chemotherapy
NER	Réparation par excision de nucléotide
NHG	Nottingham histologic grade
NGS	Next-generation sequencing
NF-KB	Nuclear factor-kappa B
NLS	Séquence de localisation nucléaire
NM23	Nucleoside-diphosphate kinase A
NST	No special type
OMS	Organisation mondiale de la Santé
ORR	Taux de réponse objectif (CR+PR)
P	Phosphorylé
Par-4	Protéine prostate apoptosis response-4
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PAWR	Gène prostate apoptosis response-4
PBS	Tampon phosphate salin

pCR	Réponse pathologique clinique
PD-1	Programmed cell death 1
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptors
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase-1
PFS	Survie sans progression
PI-PLC	Phospholipase C Phosphatidylinositol-spécifique
PIP2	Phosphatidylinositol (4, 5) -biphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol (3, 4, 5) -triphosphate
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIK3CA	Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit alpha
PIK3R1	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit 1
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PLIN1	Perilipin 1
PMSF	Phénylméthylsulfonyl fluoride
PgR	Récepteur à la progestérone
PR	Réponse partielle (au moins 30 % de réduction de la tumeur)
PS2Aa1	Parasporine 2Aa1
PTEN	Phosphatase and tensin homolog

p53	Tumor suppressor p53
RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma
RCB	Charge residuelle du cancer
RH	Récepteur hormonal
RISC	RNA-induced silencing complex
RTK	Récepteur à activité tyrosine kinase
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
ER	Récepteur à l'estrogène
SD	Maladie stable (entre 30 % de réduction et 25% d'augmentation de la tumeur)
SELDI-MS	Surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry
SERM	Modulateurs sélectifs des récepteurs à l'estrogène (Selective estrogen receptor modulators)
SGK	Serum/glucocorticoid regulated kinase
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
TCD	Tomosynthèse mammaire
TGFβ1	Transforming growth factor-beta 1
TMA	Micropuces tissulaires
TNF-a	Tumor necrosis factor-a

TNM	Tumour, node and metastasis
cTNM	Tumour, node and metastasis clinic
pTNM	Tumour, node and metastasis pathologic
TGF- α	Transforming growth factor- α
TRAIL	TNF -related apoptosis-inducing ligand
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Kinase insert domain receptor
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Cancer du sein – Contexte général

1.1.1 Épidémiologie du cancer du sein

Le cancer du sein est un problème de santé majeur mondial chez les femmes en raison de son taux de morbidité et de mortalité élevé. En comptabilisant les cas incidents de cancer du sein à l'aide de registres de cancer nationaux ou régionaux, les données récentes GLOBOCAN 2018 de 185 pays ont signalé 2,3 millions de cas incident (11,7 %) de cancer du sein pour 6,9% de taux de mortalité [1].

Au Canada, le cancer du sein représente 26 % des cancers incidents chez les femmes et 13% de taux de mortalité par cancer. En 2023, un diagnostic de cancer du sein a été établi chez 29400 canadiennes entraînant le décès de 15 d'entre elles chaque jour. Si 75 % des cancers du sein sont diagnostiqués chez des femmes de plus de 50 ans [2], ce qui implique que chez les femmes plus jeunes le cancer du sein était moins fréquent. Par contre, ces femmes plus jeunes d'âge ont tendance à développer une forme plus agressive de la maladie que les femmes âgées. Le taux de survie à cinq ans d'un cancer du sein localisé avoisine 98% [3]. Lorsque ce cancer devient métastatique, ce taux chute à moins de 30 %, même avec une chimiothérapie [4]. Donc finalement, les cancers du sein métastatiques diagnostiqués chez une jeune femme auront un mauvais pronostic. Fort heureusement, au moment du diagnostic, 60 % des cas de cancer sont encore localisés au sein et bénéficient d'excellents taux de survie à cinq ans [3,5].

1.1.2 Disparités observées dans le cancer du sein

Bien que la survie au cancer du sein se soit améliorée au cours des 30 dernières années, des disparités inexplicables dans le taux de mortalité par cancer du sein subsistent toujours entre les pays et entre les groupes ethniques [6]. Non seulement les pays ayant un faible statut socio-économique ont toujours les taux de mortalité les plus élevés, en plus, les Afro-Américaines courent un risque plus élevé de mourir d'un cancer du sein que les autres groupes ethniques (Figure 1.1) [6].

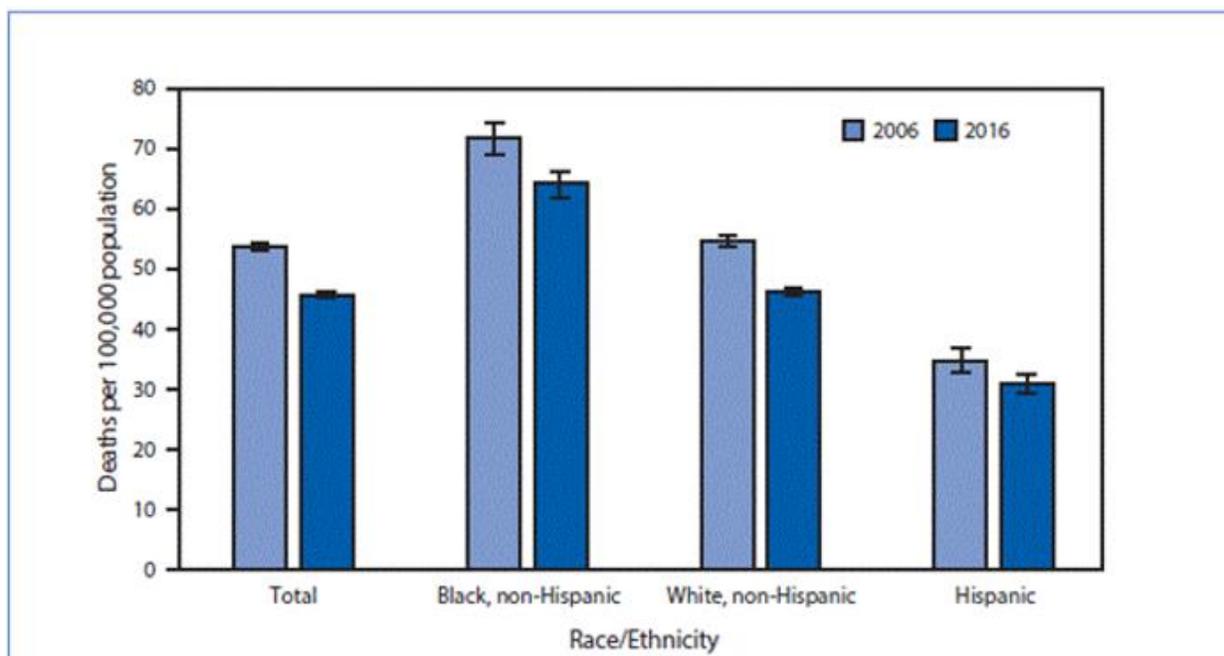


Figure 1.1 : Taux de mortalité par cancer du sein chez les femmes âgées de 50 à 74 ans, par race/origine ethnique aux États-Unis de 2006-2016, National Vital Statistics System.

Morb Mortal Wkly Rep 2018. En 2006 et 2016, le taux de mortalité par cancer du sein était plus élevé chez les femmes noires non hispaniques que chez les femmes blanches hispaniques

Dans les pays industrialisés ou pays à revenu élevé, par exemple, le taux de mortalité par cancer du sein a chuté de 40 % entre les années 1980 et 2020 mais aucune amélioration dans les pays africains n'a été observée [6]. En effet, les disparités existant pour le cancer du sein entre les pays à revenu faible et intermédiaire et ceux à revenu élevé sont considérables. L'incidence du cancer du sein est plus fréquente dans les pays à revenu élevé (571/100 000) que dans les pays à faible revenu (95/100 000) alors que la plupart des décès par cancer du sein sont recensés dans des pays à revenu faible ou intermédiaire [6, 7]. De plus, le taux de survie du cancer du sein à cinq ans passe de 90 % dans les pays à revenu élevé pour n'atteindre que 66 % dans les pays à revenu intermédiaire tel que l'Inde et 40 % dans les pays à faible revenu (Afrique du Sud) [6, 7].

1.1.2.1 Cancer du sein chez la femme noire

a. Chez la femme Afro-américaine

Dans des pays industrialisés comme les États-Unis, la diversité ethnique est très vaste en raison de l'histoire migratoire complexe du pays. Des variations du cancer du sein entre les différentes ethnicités présentes aux États-Unis ont été observées [7-8]. Les statistiques montrent une incidence globale du cancer du sein chez les femmes afro-américaines (114,7 cas pour 100 000) inférieure à celle des femmes caucasiennes (121,7 cas pour 100 000) mais un taux de mortalité de 41 % supérieure que celui de la caucasienne [7-8]. Le cancer du sein chez les femmes afro-américaines se présente à un âge plus jeune et à un stade plus avancé. Si on compare le cancer du sein de la femme afro-américaine avec celui de la caucasienne, on observe dans le cancer du sein de la femme afro-américaine des caractéristiques histologiques plus agressives et que celui-ci est associé à une mauvaise survie quel que soit le stade et le grade du cancer [9]. On a longtemps attribué ces disparités aux facteurs socio-économiques et comportementaux car la femme afro-américaine n'avait pas accès au dépistage précoce mais des études moléculaires approfondies ont montré des différences biologiques significatives [7-8] et la présence d'anomalies moléculaires associées à une plus grande prolifération du cancer du sein chez les femmes afro-américaines que chez les femmes caucasiennes, ce qui pourrait accélérer l'apparition et le développement du cancer du sein [10]. Les différences biologiques et les anomalies moléculaires significatives sont abordées dans les paragraphes ci-dessous.

En effet, une classification moléculaire du cancer du sein a été établie. Elle est représentée dans la Figure 1.2 et est basée sur l'expression des récepteurs hormonaux suivants : l'œstrogène (ER), la progestérone (PR) et le facteur de croissance épidermique humain (HER2) [7]. L'expression des récepteurs hormonaux a permis d'identifier quatre sous-types moléculaires de cancer du sein largement reconnus : luminal A (ce sous-type est caractérisé par l'expression des récepteurs d'œstrogène (ER) et/ou de progestérone (PR), ainsi que par un faible niveau de prolifération cellulaire mesuré par le marqueur Ki-67 [7-8]. Il a généralement un bon pronostic), luminal B (ce sous-type exprime les récepteurs d'œstrogène et/ou de progestérone, mais il présente un niveau de prolifération cellulaire plus élevé mesuré par Ki-67), HER2-positif (ce sous-type est caractérisé par une surexpression du récepteur HER2 sans expression significative des récepteurs d'œstrogène et de progestérone) et triple négatif (ce sous-type ne présente pas d'expression significative des récepteurs d'œstrogène, de progestérone ni de surexpression de HER2. Les sous types Luminal A et B sont ER⁺ tandis que les autres sous-types sont ER⁻ [7-8]. Il est clairement établi que les tumeurs ER⁻, à l'opposé des cancers ER⁺, se présentent sous la forme de tumeurs de haut grade

histologique, associées à une constellation d'altérations moléculaires qui en font un sous-type beaucoup plus agressif [10]. Les tumeurs triples négatives présentent une agressivité élevée et sont difficile à traiter en raison du manque de cibles thérapeutiques spécifiques. Avec les progrès récents dans la recherche sur le cancer du sein de la femme afro-américaine, il a été établi qu'elle présente les sous types moléculaires les plus agressifs qui sont les cancers HER2-positif et triple négatif (TN) [10].

Classification Intrinsèque des cancers du sein 2010

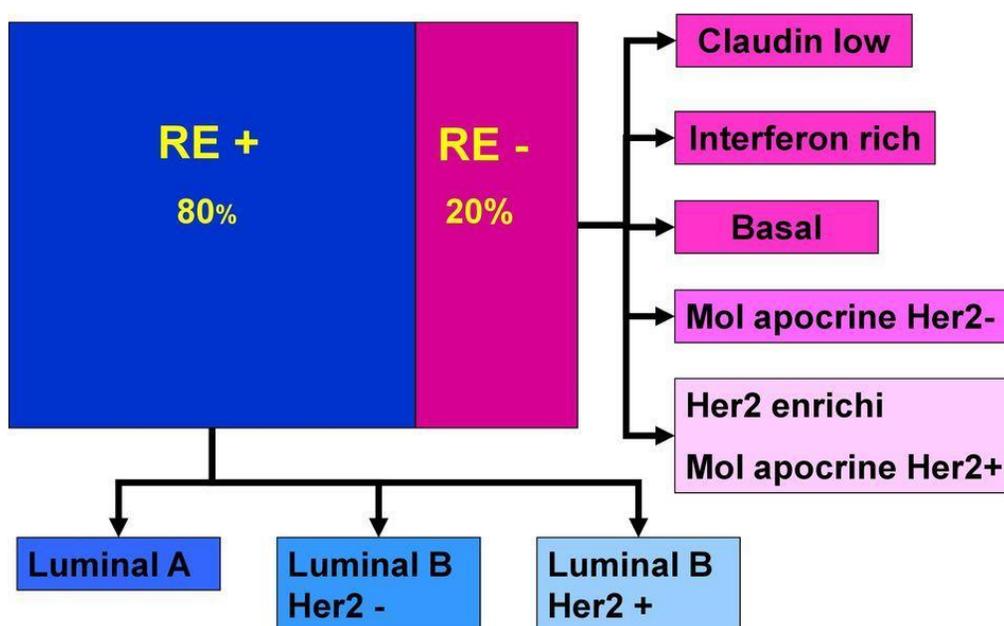


Figure 1.2 : Classifications des cancers du sein. Camille Franchet, Bulletin du Cancer, 2015.

RE (récepteur œstrogène) + pour 80% des cancers du sein = sous-types Luminal A et Luminal B. RE (récepteur œstrogène) - pour 20% des cancers du sein = sous-types Claudin low, Interferon rich, Basal, Mol apocrine Her2-, Her2 enrichi Mol apocrine Her2+

À cette incidence accrue de cancer du sein HER2-positif et triple négatif (TN) (Figure 1.3), s'ajoute une incidence accrue de cancers du sein de haut grade [10-11]. Les femmes caucasiennes et afro-américaines présentent d'autres différences biologiques significatives pouvant influencer, voire expliquer, de multiples aspects des disparités entre ces deux groupes ethniques. Ces différences

biologiques fortement associées à la femme afro-américaine sont présentes dans les taux plasmatiques de facteurs de croissance et d'hormones (les femmes afro-américaines par rapport aux Caucasiennes présentent des taux d'estradiol 18 % plus élevés , des niveaux d'IGF-I libre 25 % plus élevés et des niveaux plus faibles d'IGFBP-3) [11-12], dans les caractéristiques tumorales primaires comme la présence et l'expression de récepteurs de facteurs de croissance [7, 11-16], dans les protéines du cycle cellulaire (par exemple, CDKN2A (p16), cycline A2 , cycline B1 , cycline D1 et cycline E2 ont été exprimés à des niveaux significativement plus élevés dans l'épithélium tumoral des afro-américaines que des caucasiennes) [13], dans les gènes suppresseurs de tumeurs comme P53 et RASSF1A [13, 17], dans les anomalies chromosomiques (Les mutations héréditaires uniques BRCA1 et BRCA2 [12, 13] , les polymorphismes H-ras-1 et CYP1A1 [12, 13]), deux fois plus de fréquence de gain du nombre de copies en 13q31-13q34 pour les tumeurs triples négatives chez les femmes afro-américaines que chez les femmes caucasiennes et deux gènes « conducteurs » cullin4A (CUL4A) et le facteur de transcription Dp-1 (TFDP1) dans 13q34 chez la femme afro-américaine qui facilitent la progression tumorale [17]. Une compréhension de ces différences moléculaires et de la façon dont elles contribuent à ces disparités est essentielle pour développer des stratégies thérapeutiques nouvelles ou meilleures pour la prise en charge de ce cancer du sein agressif chez les femmes noires [11-19].

b. Chez la femme Africaine

L'Afrique est un continent immense, caractérisé par une grande diversité génétique et culturelle [11]. Les personnes qui s'identifient comme Afro-Américains ont souvent des ancêtres provenant principalement des pays d'Afrique occidentale subsaharienne comme le Ghana, en raison de la traite des esclaves. L'Afrique présente à ce jour le taux le plus élevé de mortalité par cancer du sein [6, 7]. En effet, de tous les décès attribuables au cancer chez les femmes dans le monde, 60 % des cancers du sein sont majoritairement enregistrés dans des pays en développement [20]. Des 882 900 femmes habitant dans un pays en développement et ayant reçu un diagnostic de cancer du sein, 324 300 en sont décédées [19-20]. On estime que d'ici 2025, plus de 19,3 millions de femmes, dont la majorité sont originaires d'Afrique subsaharienne, souffriront d'un cancer du sein. Le taux de survie à cinq ans du cancer du sein en Afrique subsaharienne est inférieur à 40 % par rapport à celui des pays comme le Canada qui présentent des taux de survie supérieur à 86 % [21]. Les facteurs contribuant au faible taux de survie à cinq ans en Afrique sont en partie le faible niveau

de sensibilisation et le manque de documentation sur la prévalence du cancer du sein. La plupart des cancers sont habituellement à un stade avancé au moment de la présentation [22].

En Afrique, les tendances sont difficiles à évaluer en raison d'un manque de données. La plupart des pays d'Afrique disposent de peu d'informations sur la prévalence du cancer du sein chez les femmes car ces pays ne disposent pas de registres nationaux du cancer [22-23]. Cependant, les pays disposant de registres locaux signalent un doublement des taux incident de cancer du sein au cours des 40 dernières années. En 2020, Globocan présentaient des taux d'incidence de cancer du sein standardisés sur l'âge pour 100 000 femmes allant de 20,0 en Zambie et 22,2 en Ouganda à 49,0 au Nigéria, 52,6 en Afrique du Sud et 57,6 en Namibie [23]. À titre d'exemple spécifique à un pays africain, les données de GLOBOCAN 2020 pour le Kenya montrent qu'au Kenya, le taux d'incidence du cancer du sein avoisine les 40,3 par 100 000 femmes, avec un taux de mortalité à 17,8 par 100 000 personnes (Organisation mondiale de la santé, 2020) [23]. Au Rwanda par contre, les données de GLOBOCAN 2020 donnent un taux d'incidence du cancer du sein à 41,0 pour 100 000 femmes, avec un taux de mortalité à 19,4 pour 100 000. Une étude réalisée par le Centre d'excellence en soins du cancer de Butaro (Rwanda) révèle que des 86 % des femmes ayant développé des tumeurs aux seins, 55 % ont reçu un diagnostic de cancer du sein, et 36 %, un diagnostic de tumeur bénigne [24]. Chez les femmes atteintes d'un cancer du sein, environ 20 % en étaient au stade précoce (1 ou 2) au moment du diagnostic, 46 % en étaient au stade tardif mais localisé, et 31 % présentaient un cancer du sein métastatique [24].

De plus, à l'instar des femmes noires américaines et de la femme noire du Royaume-Uni qui présente un cancer du sein précoce, de haut grade et négatif aux récepteurs d'œstrogènes (ER) par rapport à celui des femmes caucasiennes [15,16], des séries cliniques en Afrique ont documenté chez la femme africaine un cancer du sein diagnostiqué à un âge précoce et présentant des caractéristiques cliniques agressives. Plusieurs centres de cancérologie en Afrique ont également rapporté que les cancers du sein à récepteurs hormonaux négatifs sont prédominants [17,19]. Par exemple, seulement 25 % des cas de cancer du sein dans une grande série multicentrique de patientes d'Afrique de l'Ouest étaient ER-positifs sachant que ce pourcentage passe à 70% chez la caucasienne américaine [18,20,21]. Une étude prospective plus récente chez les femmes noires sud-africaines a révélé que 35 % des cas de cancer du sein sont négatifs [22], ce qui est comparable à ceux qui ont été signalés chez les femmes noires américaines [20,21].

D'importants efforts de recherche sont en cours pour mieux comprendre la base moléculaire du cancer du sein de la femme noire et permettre la découverte de marqueurs moléculaires qui pourraient prédire un pronostic et éventuellement permettre de développer des thérapies fiables [11-19].

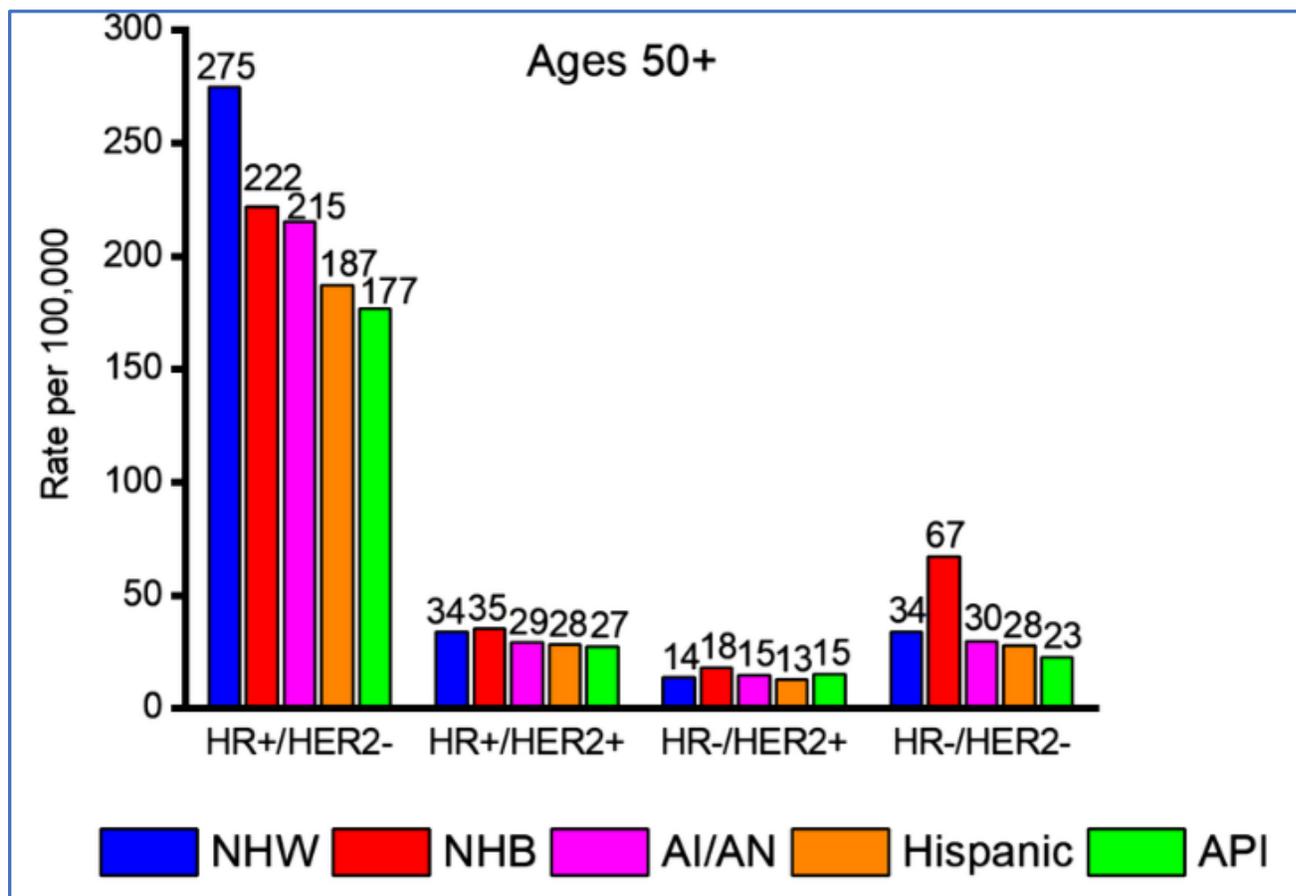


Figure 1.3 : Taux d'incidence du cancer du sein féminin par sous-type, race/origine ethnique et âge aux États-Unis. Desantis, Carol. *Cancer Journal for Clinicians*. 2019.

Les statuts du récepteur hormonal (HR) et/ou du récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2) ont été notés. Les patientes noires (NHB) présentent le taux le plus élevé de cancer HER2 + et triples négatifs (HR-/HER2-). AI/AN indique un Indien d'Amérique/un natif de l'Alaska ; API, Asie/Îles du Pacifique ; NHB, noir non hispanique ; NHW, blanc non hispanique.

1.1.3 TYPES DE CANCER DU SEIN

Les types de cancer du sein dépendent de la localisation des cellules cancéreuses. Le cancer du

sein est une prolifération de cellules anormales qui peuvent se développer dans les canaux, les lobules ou les tissus adipeux du sein (Figure 1.4) [10]. Ces cellules anormales ont la capacité de se propager aux ganglions lymphatiques adjacents, ainsi qu'à la peau du sein et du mamelon, entraînant parfois une rétraction de la peau ou du mamelon [10-11]. Lorsque les cellules anormales sont situées dans un canal galactophore, on l'appelle carcinome canalaire. Si le cancer infiltre un lobule du sein, on l'appelle dans ce cas carcinome lobulaire [10]. Le carcinome canalaire est le type de cancer du sein le plus fréquent [10]. On retrouve des formes de cancer du sein plus rare telles que le cancer inflammatoire [12] (ils sont caractérisés par leur évolution rapide et leur nature agressive. Ils se manifestent souvent par des symptômes similaires à une inflammation du sein, tels que rougeur, gonflement et parfois une texture de peau d'orange, couvrant au moins un tiers de la surface du sein), la maladie de Paget (c'est le cancer du mamelon ou de l'aréole [13] (elle se manifeste comme une lésion eczémateuse sous forme de croûte ou de plaie qui ne guérit pas au niveau du mamelon ou de l'aréole et un écoulement de sang), le cancer médullaire, le cancer tubuleux, ainsi que les cancers papillaires et micro-papillaires. Les cellules cancéreuses peuvent aussi se développer dans la graisse du sein, ce sont des tumeurs phyllodes malignes ou des sarcomes [10,14].

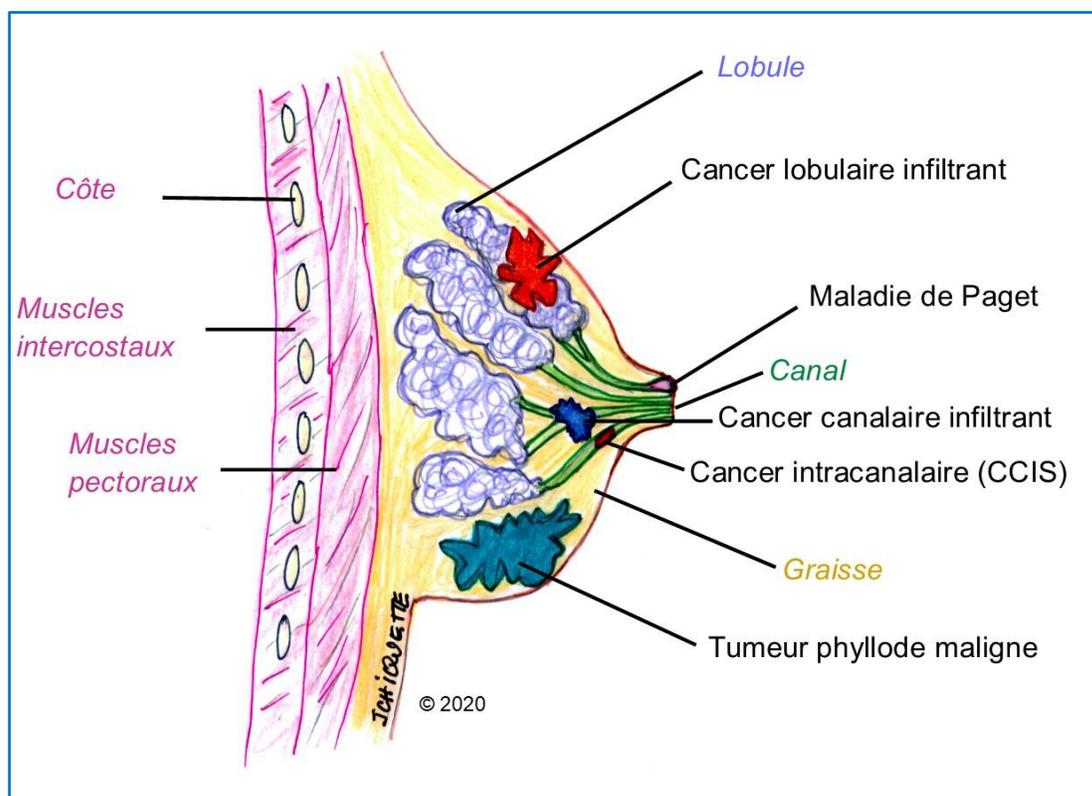


Figure 1.4 : Types histologiques particuliers de cancer du sein. Camille Franchet. Bulletin du Cancer, 2015.

Carcinome intracanalair, Carcinome lobulaire invasif, Carcinome canalaire invasif, Maladie de Paget, Tumeur phyllode maligne.

Les cancers canalaire et lobulaire sont classés en cancer *in situ* ou cancer infiltrant [15]. On parle de cancer *in situ* lorsque la tumeur reste confinée à l'intérieur. Les cellules cancéreuses prolifèrent à l'intérieur d'un canal galactophore (carcinome canalaire *in situ*) ou d'un lobule (carcinome lobulaire *in situ*) sans que les cellules ne dépassent la paroi pour envahir le reste du sein. Le cancer peut aussi dépasser la paroi d'un canal (carcinome canalaire infiltrant) ou la paroi du lobule (carcinome lobulaire infiltrant) et infiltrer les tissus du sein [15].

Au début des années 2000, les recherches menées par Perou et al. ont démontré que les cancers du sein pouvaient être catégorisés en sous-groupes moléculaires définis par leur profil d'expression génique [16]. Les cancers du sein étaient divisés en deux catégories principales : les tumeurs qui expriment le récepteur des œstrogènes (RE), connues sous le nom de tumeurs lumineales ou RE+, et celles qui ne l'expriment pas, désignées sous le terme de tumeurs RE-. Ces deux catégories présentaient des réponses distinctes en termes de biologie tumorale, de progression clinique et de réponse aux traitements [17]. Il est bien établi que les tumeurs RE-, contrairement aux cancers RE+, se présentent généralement sous forme de tumeurs de haut grade histologique et sont souvent associées à des altérations moléculaires qui les rendent plus agressives. En voulant expliquer la complexité des cellules tumorales mammaires, Perou et al. ont compartimentés pour la première fois les deux catégories en 6 sous-types moléculaires de cancer du sein [16].

Le sous-type luminal A est caractérisé par l'expression des récepteurs aux œstrogènes, ainsi que par une faible expression du marqueur Ki-67, qui est un indicateur de la prolifération cellulaire. Ces tumeurs sont généralement moins agressives et ont tendance à avoir un meilleur pronostic que d'autres sous-types de cancer du sein. Elles répondent souvent favorablement aux traitements hormonaux, tels que les inhibiteurs de l'aromatase ou les antagonistes des récepteurs aux œstrogènes [16,17].

Le sous-type luminal B caractérisé par l'expression des récepteurs aux œstrogènes et/ou à la progestérone, mais il présente également une expression plus élevée du marqueur Ki-67, indiquant une plus grande activité cellulaire et une prolifération plus rapide que les tumeurs lumineales A. Les cancers luminaux B ont un pronostic légèrement moins favorable que les tumeurs lumineales A, réponde aux traitements hormonaux et peuvent nécessiter des traitements plus agressifs [16,17].

Le sous-type HER2+ ou Her « enrichies » : représente 15 à 20 % des cancers du sein. Il est caractérisé par la surexpression et l'amplification du récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2) et une négativité des récepteurs hormonaux. Le récepteur Her2 est codé par le gène Her2 qui est un pro-oncogène situé sur le chromosome 17q12. Ce sont des tumeurs hautement proliférantes avec un grade histologique élevé et fréquemment des mutations p53. Ces tumeurs ont une progression tumorale plus agressive bien que souvent traitées avec des thérapies ciblant spécifiquement le récepteur HER2, telles que le trastuzumab [16,17].

Le sous-type basal-like représente 10 à 20 % des cancers du sein. Il se distingue par l'absence d'expression des récepteurs hormonaux (estrogène et progestérone) ainsi que par l'absence de surexpression du récepteur HER2. Il a les caractéristiques moléculaires des cellules basales de l'épithélium mammaire normal et est souvent associé à un phénotype histologique de haut grade. Ces tumeurs sont agressives et leur pronostic moins favorable. Leur prise en charge thérapeutique plus complexe car elles ne répondent ni aux traitements hormonaux classiques, ni aux thérapies ciblées [16,17].

Le sous-type Claudin-low : Ces tumeurs sont caractérisées par une faible expression de certaines protéines de jonction cellulaire appelées claudines et l'absence d'expression des marqueurs luminaux. Elles sont triples négatives. Ce sous-type serait le type tumoral dérivé des cellules souches mammaires [16,17].

1.1.4 Facteurs de risque du cancer du sein

L'étiologie du cancer du sein est multifactorielle et implique des facteurs de risque hormonaux, personnels et familiaux, les mutations des gènes BRCA1 et BRCA2, les facteurs de risques histologiques et les facteurs de risque environnementaux.

Les facteurs de risque hormonaux : Le cancer du sein est qualifié de cancer "hormono-dépendant" en raison de son lien avec les hormones, principalement les œstrogènes. Ce type de cancer peut se développer et prospérer dans un environnement où les niveaux d'œstrogènes sont élevés, soit de façon absolue (une quantité élevée d'œstrogène dans le corps), soit de manière relative (un déséquilibre entre les niveaux d'œstrogènes et de progestérone). Les facteurs de risque hormonaux sont les facteurs qui exposent plus longtemps le tissu mammaire aux hormones [21].

Parmi les facteurs de risque hormonaux, on retrouve : la puberté précoce (<12 ans), la parité tardive (> 30 ans), la nulliparité, l'absence d'allaitement, la ménopause tardive (>52 ans), la contraception œstroprogestative et l'obésité (aromatation des androgènes en œstrogènes dans les adipocytes) [21].

Les facteurs de risque personnels et familiaux : Les femmes ayant déjà été atteinte d'un cancer du sein ont un risque accru de développer un nouveau cancer du sein. Le nouveau cancer peut se former soit dans le même sein que le premier cancer, soit dans l'autre sein [33]. Quant aux facteurs familiaux, ils englobent les formes héréditaires (facteurs génétiques) et les prédispositions génétiques (antécédents familiaux) [34]. Ces prédispositions génétiques au cancer du sein sont principalement dues à des mutations dans certains gènes spécifiques, notamment les gènes BRCA1 et BRCA2. D'autres mutations génétiques moins fréquentes telles que des mutations dans les gènes TP53 (impliqué dans la suppression des tumeurs), PTEN (suppression des tumeurs), PALB2 (réparation de l'ADN) et CHEK2 (réparation de l'ADN) peuvent également être associées à un risque accru de cancer du sein, bien que leur impact soit généralement moins important que les mutations dans les gènes BRCA1 et BRCA2 [24,33]. Ces mutations altèrent le fonctionnement normal de ces gènes, qui sont impliqués dans la régulation de la croissance cellulaire, la réparation de l'ADN et la suppression des tumeurs [24]. Lorsque ces gènes sont mutés, cela peut entraîner une perturbation de ces processus cellulaires, augmentant ainsi le risque de développement du cancer du sein. Par conséquent, le fait d'avoir un parent au premier degré (mère, père, sœur, fille, frère) qui a eu un cancer du sein augmente de 2 à 3 fois le risque de développer soi-même un cancer du sein, en particulier si cette personne était âgée de moins de 45 ans au moment du diagnostic [24]. Ce risque n'est multiplié que par 1,5 en cas de lien de parenté au second degré (tante, cousine, grand-mère). Une prédisposition génétique doit aussi être suspectée lorsque plusieurs membres de la famille ont eu un cancer du sein et/ou de l'ovaire à un jeune âge. De plus, lorsqu'il y'a eu des antécédents de cancer de l'ovaire dans certaines familles, on remarque un nombre plus élevé de cas de cancer du sein que ce à quoi on s'attendrait par simple coïncidence. On parle alors de facteurs génétiques ou des formes héréditaires qui représentent environ 4% des cancers du sein (syndrome « sein-ovaire ») [22,24].

Les mutations des gènes BRCA1 et BRCA2 : Les gènes BRCA1 et BRCA2 sont naturellement présents dans le corps et sont désignés comme des gènes suppresseurs de tumeurs car ils régulent

la croissance des cellules cancéreuses et réparent les dommages à l'ADN [38]. Lorsqu'ils fonctionnent correctement, ces gènes aident à prévenir le développement du cancer. Cependant, des mutations dans les gènes BRCA1 et BRCA2 peuvent altérer leur fonctionnement, les rendant incapables de contrôler efficacement le développement du cancer. Bien que rares, ces mutations surviennent chez environ 1 personne sur 500 [37-39]. Les mutations dans les gènes BRCA1 et BRCA2 sont héritées selon un mode autosomique dominant, ce qui signifie qu'une seule copie mutée du gène, héritée d'un parent, est suffisante pour augmenter considérablement le risque de cancer du sein et d'autres cancers associés, tels que le cancer de l'ovaire [38]. Les personnes porteuses de ces mutations ont un risque nettement plus élevé de développer un cancer du sein au cours de leur vie par rapport à la population générale. La mutation du gène BRCA1 (chromosome17) augmente de 45% le risque de cancer de l'ovaire et de 80% celui du sein. La mutation du gène BRCA2 (chromosome13) entraîne un risque cumulatif de cancer de 25% [33]. Le risque cumulatif de cancer du sein se réfère ici à la probabilité qu'une femme développe un cancer du sein au cours de sa vie, en prenant en compte les facteurs de risque qu'elle présente et leur effet cumulatif au fil du temps. Par conséquent, la probabilité que le cancer du sein soit lié à une mutation héréditaire du gène BRCA1 ou BRCA2 sera plus élevée chez les femmes présentant déjà les autres facteurs de risques de cancer du sein [22,33]. La technique du "séquençage de nouvelle génération" permet non seulement une détection plus précise des mutations, mais aussi une analyse plus approfondie des séquences génétiques, ce qui peut aider à mieux comprendre les mécanismes sous-jacents des cancers associés à ces mutations [34]. Le séquençage complet des gènes BRCA1 et BRCA2 va permettre de détecter non seulement les mutations connues sur ces gènes, mais aussi les variations génétiques rares ou nouvelles qui pourraient également être associées au risque de cancer. Dès lors qu'une mutation a été identifiée dans une famille, la recherche de cette mutation chez les autres membres de la famille devient systématique [22-23].

Les facteurs de risque histologiques : La plupart des tumeurs bénignes du sein ne sont pas associées à un risque accru de cancer du sein, mais certaines peuvent augmenter légèrement le risque. En effet, certains types histologiques de tumeurs mammaires, tels que le carcinome canalaire in situ (CCIS) et le carcinome lobulaire in situ (CLIS), sont considérés comme des lésions précancéreuses et peuvent augmenter le risque de développer un cancer invasif du sein [12]. De plus, la présence d'autres lésions précancéreuses telles que l'hyperplasie canalaire atypique, le

néoplasie lobulaire in situ (NLIS) et le néoplasie canalaire in situ (NCIS) peuvent augmenter le risque de développer un cancer du sein invasif [13].

Les facteurs environnementaux : Le niveau socio-économique élevé est un facteur de risque car il génère du stress entraînant une dysovulation et une carence en progestérone. Les femmes ayant un niveau de vie élevé ont deux fois plus de risque de développer un cancer que celle ayant un niveau socio-économique faible. [10,25-26]. Il est possible que ce soit à cause de certains aspects du mode de vie qui sont liés au cancer du sein, comme porter des enfants à un âge plus avancé ou en porter moins, avoir 'une alimentation plus riche en graisses saturées, une consommation plus élevée d'alcool, un niveau plus faible d'activité physique ou une exposition accrue à des facteurs environnementaux [26]. De plus, le manque d'activité physique et l'obésité (un ratio taille/hanches élevé) sont d'autres facteurs de risque important de cancer du sein chez les femmes ménopausées et sont également associée à un mauvais pronostic de la maladie chez les femmes de tous âges [28-30]. Aux États-Unis, Il a été observé que les femmes ménopausées ayant un indice de masse corporel (IMC) élevé et une circonférence abdominale ≥ 90 cm étaient plus susceptibles de développer un cancer du sein [30,31] et que l'accumulation d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans le tissu adipeux mammaire était un facteur aggravant [30,31]. Les HAP sont des composés organiques cancérigènes présents dans l'environnement, souvent issus de sources telles que la combustion de combustibles fossiles, les émissions industrielles, la fumée de cigarette et la cuisson des aliments à haute température [31]. Ils peuvent être absorbés par l'organisme par inhalation, ingestion ou contact cutané, et certains de ces composés peuvent être stockés dans les tissus adipeux. Or, les HAP interagissent avec les récepteurs cellulaires des œstrogènes, ce qui a pour effet d'augmenter le risque de développer un cancer du sein [35]. Dans le même sens, une autre étude a démontré que les femmes obèses atteintes d'un cancer du sein avaient une survie globale moins bonne que les femmes non obèses atteintes d'un cancer du sein [33] car l'obésité favorisait l'inflammation. En résumé, l'obésité peut influencer le cancer du sein par plusieurs mécanismes, notamment en affectant les niveaux hormonaux (l'obésité est souvent associée à des niveaux d'hormones sexuelles, notamment d'œstrogènes, plus élevés [34]. Les tissus adipeux, en particulier chez les femmes ménopausées, peuvent être une source importante d'œstrogènes dans le corps), en favorisant l'inflammation (l'obésité est également associée à une inflammation chronique de faible intensité dans le corps [34]. Cette inflammation peut favoriser

le développement et la progression du cancer en perturbant l'équilibre des cellules normales et en favorisant la croissance des cellules cancéreuses), en augmentant la résistance à l'insuline (les personnes obèses ont souvent une résistance à l'insuline, ce qui signifie que leur corps ne réagit pas aussi bien à cette hormone, qui régule le taux de sucre dans le sang [35]. Une résistance à l'insuline peut entraîner une augmentation des niveaux d'insuline et d'IGF-1 (insulin-like growth factor 1), ce qui peut favoriser la croissance des cellules cancéreuses.) et en modifiant l'équilibre hormonal dans le corps (l'obésité peut également perturber l'équilibre des hormones telles que l'adiponectine, qui a des effets anti-inflammatoires et antiprolifératifs).

De nombreuses données épidémiologiques ont établi un lien entre la consommation d'alcool et le risque de cancer du sein [36]. L'association globale estimée est une augmentation d'environ 30 à 50 % du risque de cancer du sein à partir de 15 à 45 grammes/jour de consommation d'alcool (environ 1 à 2 verres/jour). Une étude a révélé que la consommation d'alcool (>35-44 grammes/jour) augmentait de 46 % le risque de cancer du sein [34-36] car dans le tissu mammaire, une dose élevée d'alcool est métabolisée en acétaldéhyde par l'enzyme alcool déshydrogénase. L'acétaldéhyde accumulé peut se lier aux protéines et à l'ADN et interférer avec le système de défense antioxydant, la synthèse de l'ADN et le système de réparation de l'ADN en régulant négativement le gène BRCA1 (BRest CAncer gene 1) [37-39]. De plus, l'acétaldéhyde peut influencer négativement l'expression et la fonction de BRCA1 à travers divers mécanismes, y compris des altérations épigénétiques, des dommages à l'ADN et des interactions protéiques altérées [38]. Cependant, il est important de noter que la recherche sur cette interaction est encore en cours [37-39].

1.2 Développement et anatomie de la glande mammaire

1.2.4 Le développement de la glande mammaire

Les glandes mammaires sont l'une des caractéristiques distinctives des mammifères. Pendant le développement embryonnaire, plusieurs glandes se forment le long des crêtes mammaires (épaississements ectodermiques bilatéraux, formés le long de l'aisselle en développement jusqu'à la région inguinale). Chez les humains, contrairement à d'autres mammifères, seuls un groupe de cellules se développe davantage et forme le tissu mammaire rudimentaire [40-42]. Les glandes mammaires rudimentaires sont présentes à la naissance aussi bien chez l'homme que chez la

femme et sont dans une certaine mesure sensible aux hormones maternelles. Les canaux du tissu mammaire de leur côté continuent de s'allonger et de se ramifier. Chez les femmes, ce développement est accéléré pendant la puberté sous l'influence de deux hormones : les œstrogènes et la progestérone. Ces hormones ovariennes favorisent la prolifération, la différenciation et le remodelage des canaux et du tissu conjonctif pour former les glandes mammaires adultes [43-44].

Au cours du cycle menstruel, les glandes mammaires adultes sont influencées par les taux hormonaux. La prolifération de l'épithélium des canaux se fait pendant la deuxième moitié du cycle menstruel et sera suivie d'une apoptose séquentielle avec une diminution des niveaux d'œstrogènes et de progestérone au début des règles. Pendant la grossesse, le nombre de canaux terminaux augmente significativement et à ce stade, le tissu mammaire est principalement composé d'épithélium lobulaire. Pendant l'allaitement, les unités des canaux lobulaires terminales (UCLT) sont agrandies, l'épithélium devient vacuolisé, et les lumières des canaux sont dilatés par du matériel sécrétoire. La sécrétion de lait est induite par la prolactine via l'adénohypophyse tandis que l'éjection du lait est stimulée par la libération d'ocytocine via la neurohypophyse [45-47]. Sous l'influence de l'environnement hormonal modifié à la ménopause, les UCLTs s'atrophient, mais les systèmes de canaux intermédiaires et les canaux plus importants subsistent. Une dilatation kystique des canaux résiduels est fréquemment observée, accompagnée d'une diminution du tissu conjonctif fibreux interlobulaire, ce qui entraîne une augmentation de la proportion de tissu adipeux [35].

1.2.5 Anatomie de la glande mammaire

Le sein illustré à la Figure 1.5 est principalement composé de tissu adipeux, de tissu glandulaire et de tissu conjonctif. Il est recouvert de peau, repose sur le muscle pectoral et est séparé en arrière par un fascia. La glande mammaire contient environ 15 à 20 lobes, chacun étant composé de 20 à 40 UCLT [47].

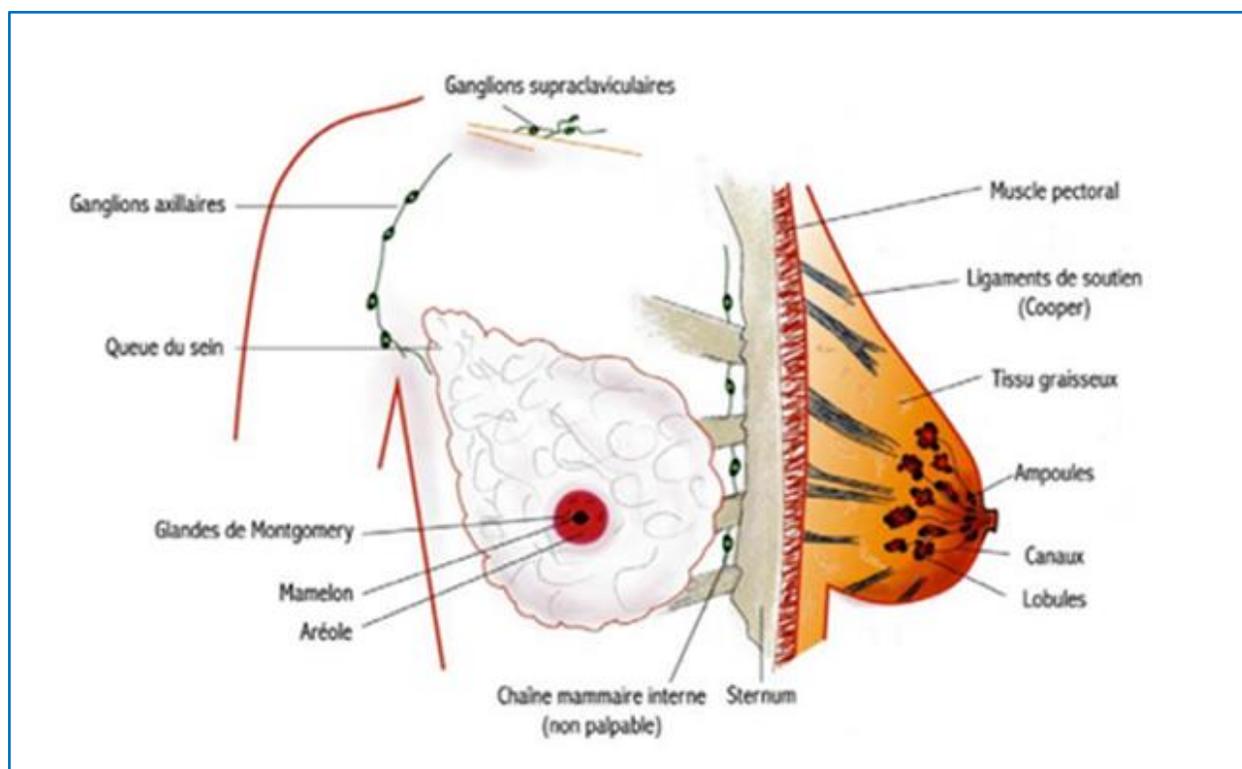


Figure 1.5 : Anatomie de la glande mammaire, Justine Gagnon, 2024. Adaptée de la Sénologie au quotidien.

Le sein est composé d'une glande mammaire, de canaux et de lobules, de fibres de soutien (ligaments de Cooper) et de graisse (tissu adipeux) ; le tout est recouvert par la peau.

L'UCLT illustré à la Figure 1.6 est l'unité fonctionnelle la plus importante du sein et se compose de canaux terminaux extra lobulaires et intra lobulaires, ainsi que des acinis. Les canaux sont composés de deux couches d'épithélium : la couche luminale la plus interne repose sur une membrane basale et est tapissée par une couche de cellules myoépithéliales [48]. Le système canalaire est entouré par un compartiment stromal constitué des cellules endothéliales, des fibroblastes, des macrophages et des cellules inflammatoires (les lymphocytes et les cellules dendritiques). Les UCLTs sont étroitement entourés par un tissu conjonctif spécialisé, de type myxoïde, sensible aux hormones et ne comportant aucune fibre élastique. Il faut préciser que le développement de la glande mammaire dépend de l'interaction entre le tissu épithélial spécialisé et son stroma [49].

Autour des canaux plus larges, on trouve un tissu élastique continu et bien développé ayant moins de stroma spécialisé. Les UCLTs sont connectées aux canaux plus larges par le biais de canaux sous-segmentaires et segmentaires, qui conduisent à leur tour à des canaux collecteurs se vidant dans le mamelon. On pense que les modifications pathologiques au niveau des UCLTs donnent naissance à la majorité des carcinomes du sein et au carcinome canalaire in situ (CCIS) [50]. Les lésions précancéreuses du cancer du sein appelées CCIS représente une prolifération épithéliale précancéreuse à l'intérieur des canaux et diffère du carcinome lobulaire in situ (CLIS) qui est une néoplasie lobulaire confiné aux lobules [51].

La glande mammaire est bien vascularisée et est alimentée par les branches thoraciques de l'artère axillaire, l'artère thoracique interne et les artères intercostales antérieures [52]. Le sein reçoit une innervation sensorielle des nerfs intercostaux de la deuxième à la sixième côte et du nerf supra claviculaire. Le système lymphatique du sein se draine principalement vers les ganglions lymphatiques axillaires pectoraux inférieurs, puis vers les ganglions lymphatiques supra claviculaires (75%) [53]. Les ganglions lymphatiques axillaires sont divisés en six groupes en fonction de leur relation avec le muscle petit pectoral. Le drainage lymphatique se fait également vers les ganglions lymphatiques parasternaux, en particulier à partir de la partie médiale du sein. De plus, un drainage lymphatique superficiel peut se produire vers le sein controlatéral ou la paroi abdominale. Le drainage lymphatique du tissu mammaire est la principale voie par laquelle les cellules cancéreuses du sein métastasent [54].

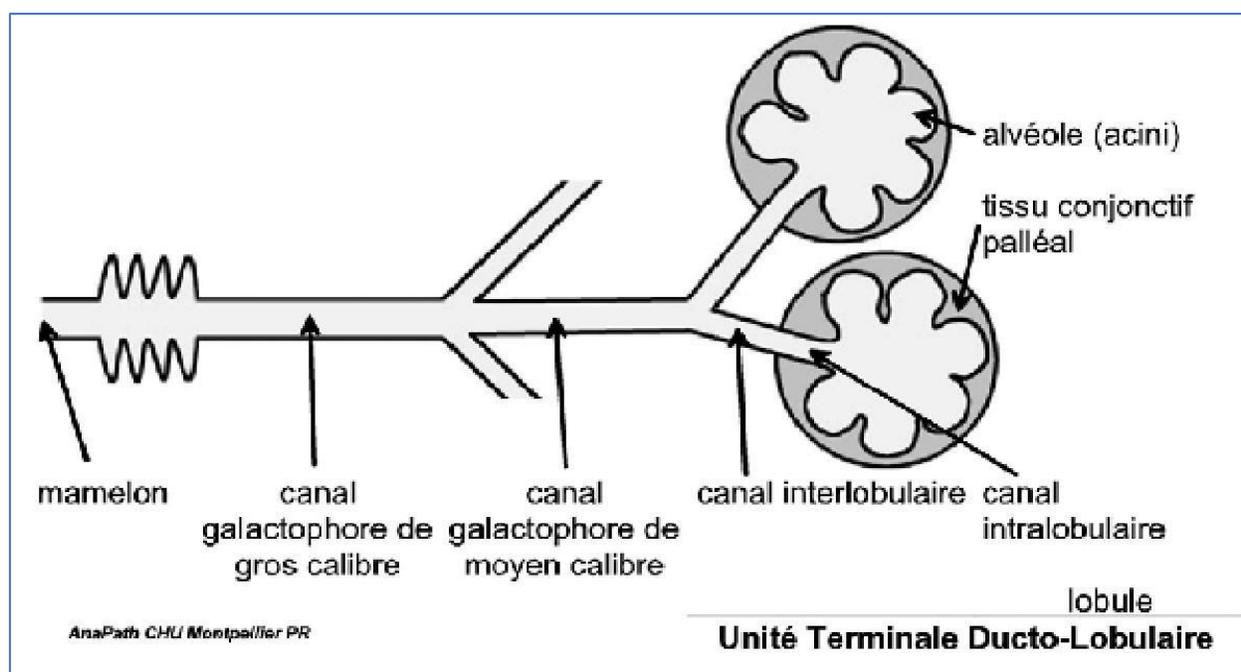


Figure 1.6 : Anatomie de l'unité lobulaire du canal terminal (UCLT), Jocelyne Chiquette 2020. Adaptée de La Physiologie du Sein de l'université Montpellier.

Elle comporte les canaux extra- et intra lobulaires qui se terminent par les acini qui sont fonctionnels surtout pendant la grossesse et la lactation.

1.3 Cancérogenèse et pathogenèse du cancer du sein

Le cancer est une maladie multifactorielle et complexe au cours de laquelle les cellules normales, à travers une succession de modifications génétiques et épigénétiques, acquièrent la capacité de se développer, d'envahir les tissus adjacents, de se disséminer pour en fin de compte coloniser des organes à distance. Bien que les mécanismes spécifiques permettant la transformation néoplasique et métastatique varient selon les différents types de cancer, il existe des points de régulation communs pour expliquer la carcinogenèse. Weinberg et al ont publié en 2000 un article dans lequel ils proposaient six caractéristiques communes à la plupart des tumeurs humaines [57]. Cet article a été révisité en 2011 pour finalement inclure huit caractéristiques essentielles du cancer à savoir la signalisation proliférative soutenue, l'évasion des suppressions de la croissance, la résistance à la mort cellulaire, l'immortalité répllicative, l'induction de l'angiogenèse, l'activation de l'invasion et de la métastase, reprogrammation du métabolisme énergétique et évasion de la destruction immunitaire [55-56]. De plus, ils ont proposé deux caractéristiques habilitantes qui représentent les mécanismes par lesquels les caractéristiques essentielles du cancer sont acquises : l'instabilité génomique et l'état inflammatoire des lésions pré-cancéreuses (Figure 1.7). Bien que ces dernières décennies aient été marquées par de grands progrès en oncologie moléculaire, nous sommes encore loin de comprendre pleinement comment sont acquises et maintenues les caractéristiques essentielles qui soutiennent les tumeurs.

Une des caractéristiques principales des cellules cancéreuses est leur capacité à proliférer de manière incontrôlée. Les cellules cancéreuses contournent le système de régulation de la croissance en devenant, par exemple autonomes en ce qui concerne les facteurs de croissance soit en entraînant une signalisation excessive des facteurs de croissance. Les cellules cancéreuses peuvent aussi interagir avec le stroma associé à la tumeur pour produire des facteurs de croissance [55-57]. Ainsi, elles provoquent une prolifération incontrôlée en activant des voies de prolifération

cellulaire et en inhibant la mort cellulaire. Dans le cancer du sein, l'amplification du récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2) en est un excellent exemple et une cible de la thérapie ciblée par l'anticorps monoclonal trastuzumab [56]. En effet, HER2 est une protéine qui joue un rôle important dans la croissance et la division des cellules. Normalement, elle est présente à la surface des cellules et aide à contrôler leur croissance. Cependant, pour environ 20 % des patientes atteintes d'un cancer du sein, les cellules tumorales produisent trop de protéine HER2 [56,57]. Ce qui conduit à une croissance cellulaire incontrôlée et à la formation de tumeurs. C'est pourquoi HER2 est souvent ciblée dans le traitement du cancer du sein, notamment par des médicaments comme le trastuzumab.

Outre la prolifération soutenue, les cellules cancéreuses ont la capacité de résister à la mort cellulaire en subissant des mutations telles que l'activation d'oncogènes ou la perte de fonction des gènes suppresseurs de tumeurs. Elles acquièrent également la capacité d'immortalité répliquative, en partie en augmentant l'activité de la télomérase [55-57]. Une autre caractéristique des cellules cancéreuses est leur capacité à induire l'angiogenèse en libérant des facteurs de croissance endothéliaux vasculaires (VEGF), qui peuvent également être utilisés en thérapie ciblée par le médicament bevacizumab [58-60]. De plus, la "transition épithélio-mésenchymateuse" ou EMT est un régulateur clé dans le processus complexe d'activation de l'invasion et de la métastase [61]. En effet l'EMT est un processus en plusieurs étapes, dans lequel les cellules épithéliales perdent progressivement l'adhésion cellule-cellule, subissent une réorganisation importante du cytosquelette, modifient leur morphologie cellulaire et deviennent des cellules mésenchymateuses migratrices et invasives.

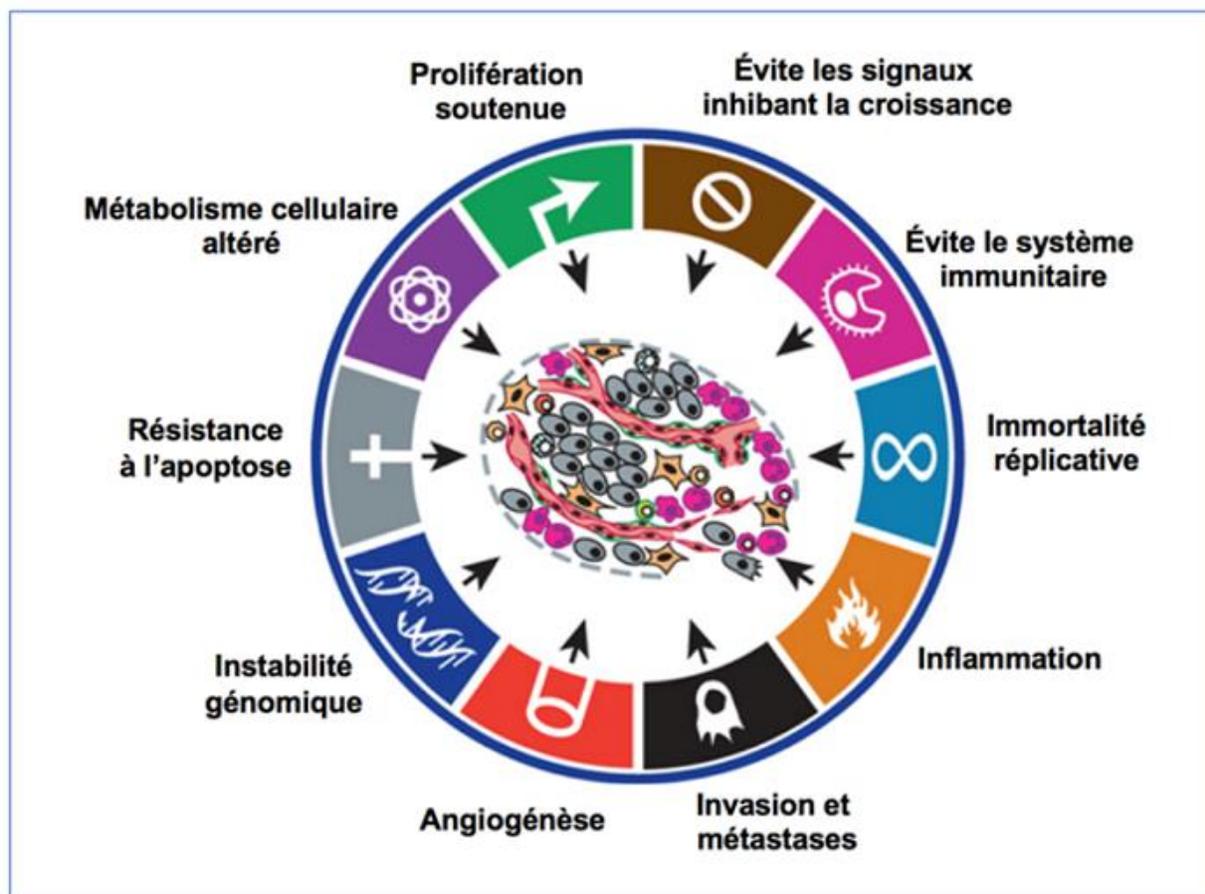


Figure 1.7 : Représentation schématique des dix mécanismes fondamentaux qui permettent à la cellule de devenir cancéreuse. Hanahan, Douglas. *Cancer discovery* (2022).

Dans le sens des aiguilles d'une montre et en commençant par le rectangle sur fond vert, la cellule cancéreuse évolue en : maintenant une croissance autonome indépendante des signaux de prolifération, échappant aux mécanismes de régulation du cycle cellulaire, activant l'invasion et les métastases, permettant un potentiel réplcatif illimité, induisant l'angiogenèse et en résistant à la mort cellulaire

Le système immunitaire est le gardien de nos cellules mais il peut être déjoué par les cellules cancéreuses [61]. Le système immunitaire possède la capacité de reconnaître des antigènes, qui sont des structures protéiques présentes à la surface de chaque cellule et présentées aux lymphocytes T par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) [61]. Ces antigènes sont détectés par le récepteur des lymphocytes T, appelé TCR (récepteur des lymphocytes T) [62]. Dans

le cas des cellules cancéreuses, les antigènes proviennent de l'expression de gènes mutés. Ces antigènes présentent donc des altérations par rapport aux antigènes du soi et sont reconnus par les lymphocytes effecteurs [61,62]. Cependant, la cellule cancéreuse possède des mécanismes pour éviter la réponse du système immunitaire et se déplacer au milieu des cellules effectrices de l'immunité sans déclencher de réaction contre elle [62]. Elle peut adopter différentes stratégies pour cela. Par conséquent la capacité des cellules cancéreuses à éviter la destruction par le système immunitaire en inhibant la réponse immunitaire est l'une des caractéristiques qui a récemment suscité une grande attention. En effet, les cellules cancéreuses ont développé divers mécanismes pour échapper à la réponse immunitaire, et l'expression de protéines de surface telles que la protéine 1 de mort cellulaire programmée (PD-1) est l'un de ces mécanismes. Lorsque les cellules cancéreuses expriment des molécules telles que PD-1, elles peuvent se lier aux protéines de surface des cellules T, ce qui inhibe la réponse immunitaire dirigée contre elles [62]. Ce processus est un exemple de l'évasion immunitaire tumorale, où les cellules cancéreuses utilisent les mécanismes du système immunitaire pour favoriser leur survie et leur croissance.

Fort heureusement plusieurs thérapies comme l'immunothérapie anti-PD-1/PD-L1 ciblant la réponse immunitaire ont été mise en place [63]. En effet, l'immunothérapie aide à renforcer les lymphocytes T présents dans le système immunitaire ou à rétablir la capacité du système immunitaire de combattre le cancer. Elle fait partie des thérapies ciblées car elle agit sur des cellules cibles de la tumeur ou sur les cellules immunitaires [61]. L'immunothérapie via les inhibiteurs de checkpoints, tels que le pembrolizumab (un anticorps monoclonal, inhibiteur de la PD-1) et l'atezolizumab (un anticorps monoclonal humanisé contre le PD-L1), sont utilisés dans le traitement des cancers du sein métastatiques triple négatifs [61,63]. Ces médicaments bloquent les protéines PD-1 ou PD-L1, activent la migration, la prolifération et la production de cytokines par les lymphocytes T permettant ainsi aux lymphocytes T de reconnaître et d'attaquer les cellules cancéreuses [63].

1.3.4 Pathogenèse du cancer du sein

Des études réalisées il y a plus de 50 ans ont déjà décrit l'augmentation exponentielle des taux de cancer avec l'âge [63,64] émettant ainsi l'idée qu'un modèle de cancer à plusieurs étapes pouvait expliquer l'initiation, la promotion et la progression de la tumeur [65]. Cependant, l'incidence du

cancer du sein ne suit pas une courbe exponentielle, et tous les modèles précoces de cancer à plusieurs étapes ne présentaient pas la même courbe de taux d'incidence spécifique à l'âge [66]. Un modèle de cancer hormonal à deux composantes a ensuite été introduit, montrant deux courbes distinctes de taux d'incidence spécifiques à l'âge. Ce modèle de cancer hormonal à deux composantes semble décrire deux types distincts de cancers du sein en fonction de l'expression des récepteurs d'œstrogènes (ER) et de l'âge au moment du diagnostic ; on retrouve les tumeurs précoces à récepteurs d'œstrogènes (ER) négatifs pré-ménopausiques et les tumeurs tardives à récepteurs d'œstrogènes (ER) positifs post-ménopausiques [67-68]. Ce modèle hormonal explique que les tumeurs précoces à récepteurs d'œstrogènes négatifs (ER-) qui se développent avant la ménopause et caractérisées par une absence d'expression des récepteurs d'œstrogènes ne dépendent pas de ces hormones pour leur croissance [67-68]. Elles peuvent avoir des mécanismes de développement différents et être plus agressives dans leur progression. Il y a ensuite les tumeurs tardives à récepteurs d'œstrogènes positifs (ER+) qui surviennent après la ménopause et expriment des récepteurs d'œstrogènes. Elles sont généralement plus sensibles aux traitements hormonaux qui ciblent ces récepteurs et ont un pronostic différent des tumeurs précoces à ER négatifs [67-68].

La complexité de ce modèle incorporant la caractérisation de l'expression des gènes, les modèles biostatistiques et l'épidémiologie analytique montre plutôt une distribution bimodale selon l'âge [69]. Sur la base de la caractérisation de l'expression des gènes, il a également été démontré que les tumeurs ER-positives et ER-négatives sont fondamentalement des maladies distinctes au niveau transcriptomique [70]. Plus tard, des modèles intégrant les variations épigénétiques et l'hypoxie cellulaire se sont développés. D'un côté, les variations épigénétiques sont des changements dans l'expression des gènes qui ne sont pas causés par des altérations dans la séquence d'ADN [71]. Dans le cancer du sein, les variations épigénétiques contribuent à la désactivation des gènes suppresseurs de tumeurs, à l'activation de gènes oncogènes et à d'autres changements dans l'expression génique qui favorisent la croissance tumorale, la métastase et la résistance aux traitements [70]. Par exemple, la méthylation d'une région de l'ADN peut conduire à la répression de l'expression génique dans cette région [71]. De l'autre côté, l'hypoxie cellulaire contribue de manière significative à la pathogenèse du cancer du sein en favorisant la croissance tumorale, la néo angiogenèse, l'invasion et la métastase, ainsi qu'en modulant la réponse au traitement et l'expression génique des cellules tumorales [70]. Les tumeurs solides comme les

cancers du sein, ont souvent des régions hypoxiques, où l'apport en oxygène est limité en raison de la croissance rapide des cellules tumorales et de l'inefficacité de la vascularisation [72]. Cette hypoxie va induire l'activation de plusieurs voies de signalisation, dont la voie de l'HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1), qui est une réponse adaptative cellulaire importante à l'hypoxie. HIF-1 est un facteur de transcription qui régule l'expression de gènes impliqués dans des processus tels que la glycolyse anaérobie, l'angiogenèse, la survie cellulaire et la migration, ce qui favorise la progression tumorale [72].

Ainsi, la pathogenèse du cancer du sein est décrite selon de multiples voies et plusieurs modèles (Figure 1.8). On ne parle plus d'un cancer du sein mais de plusieurs cancers du sein. Le premier modèle de tumorigenèse proposé dit stochastique de la croissance des cancers était basé sur une vision Darwinienne du développement tumoral. Cette théorie soutient que toutes les cellules cancéreuses ne sont pas dans un système organisé. Elles ont le même potentiel de division, elles ont la capacité de former un clone tumorigène, mais l'auto-renouvellement et la différenciation de chaque cellule est aléatoire [13]. Ainsi l'initiation et la progression tumorale résulteraient, d'une part, d'une acquisition séquentielle et aléatoire de mutations à l'origine de la formation de clones tumoraux et, d'autre part, de la sélection des clones se multipliant le plus rapidement dans un environnement donné [13] (Figure 1.8).

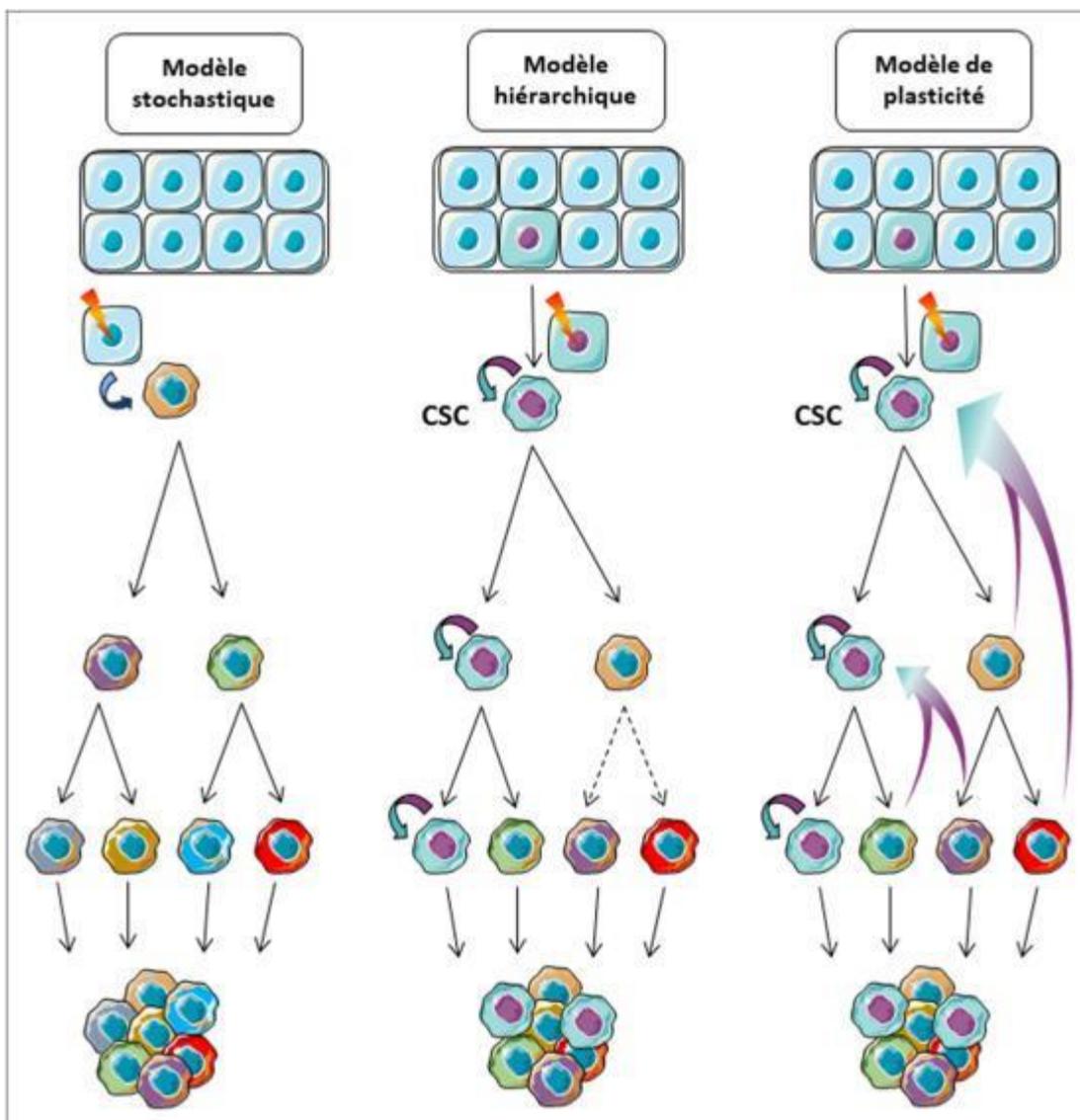


Figure 1.8 : Trois modèles de la pathogenèse du sein, Julie Lemaire, Bulletin du Cancer, 2020.

(A) Dans le modèle stochastique, chaque cellule cancéreuse est supposée avoir un potentiel tumorigène. L'initiation et la progression tumorale résultent de l'acquisition de mutations. (B) Dans le modèle hiérarchique, les cellules souches cancéreuses (CSC) sont considérées comme les moteurs de la croissance tumorale. Bien que les cellules non-CSC constituent la majorité de la masse tumorale, elles ont peu ou pas de capacités tumorigéniques. (C) Le modèle de plasticité des CSC suggère que les cellules à l'origine de la croissance tumorale peuvent être à la fois des cellules souches et des cellules différenciées.

Dans les années 90, un nouveau modèle de cellules souches cancéreuses dit hiérarchique a été proposé [13]. Ce dernier diffère du modèle précédent et suggère que les tumeurs se développent comme les tissus normaux de l'organisme. Ce modèle suppose que seule la cellule souche cancéreuse (CSC), de par sa capacité à s'auto-renouveler et à se différencier en cellules néoplasiques aurait la possibilité d'initier et propager la tumeur [13] (Figure 1.8). Ce modèle suggère une hiérarchie des cellules dans la tumeur. Ainsi, la CSC se situerait au sommet de la pyramide du processus tumoral, d'où le terme hiérarchique [13].

Enfin, le modèle de plasticité cellulaire est une combinaison des deux autres modèles. Les deux premiers modèles ont été revisités pour aboutir à un troisième modèle intégrant la notion de plasticité des CSC [13] (Figure 1.8). Ici, l'idée principale selon laquelle la différenciation des cellules souches vers les cellules matures serait irréversible est remise en question et les cellules néoplasiques non tumorigènes auraient de ce fait la capacité à se dédifférencier en CSC [13]. De plus, au cours de la progression tumorale, les CSC pourraient acquérir de nouvelles altérations génétiques conférant à certaines sous-populations un avantage prolifératif [13]. Ainsi, les CSC constitueraient une population cellulaire hétérogène dont la diversité génétique serait responsable de l'organisation oligoclonale de la tumeur [13].

1.3.4.1 La cellule d'origine du cancer du sein

Actuellement, il existe les deux modèles principaux illustrés en Figure 1.9 pour la carcinogenèse du sein : le modèle de l'évolution clonale sporadique et l'hypothèse des cellules souches cancéreuses (CSC) [371]. Les études suggèrent que ces deux modèles peuvent se compléter mutuellement mais aucun d'entre eux ne fournit une explication complète [372-73]. Les cellules souches cancéreuses représentent une sous-population de cellules présentes dans les tumeurs cancéreuses qui partagent des caractéristiques de résistance, de plasticité et d'auto-renouvellement avec les cellules souches normales [71,370]. L'hypothèse des cellules souches cancéreuses propose que les cellules souches cancéreuses qui ont la capacité de s'auto-renouveler indéfiniment et de se différencier, stimulent l'initiation et la progression du cancer. La présence de cellules souches cancéreuses (CSC) a été fortement associée à la résistance aux traitements du cancer du sein. En effet, les cellules souches cancéreuses sont généralement une fraction minoritaire au sein de la population de cellules tumorales [366]. Cependant, leur importance réside dans leur capacité à

engendrer la dissémination de la maladie et la résurgence tumorale, notamment en se propageant vers d'autres sites (métastases) et en survivant malgré les traitements thérapeutiques [368]. Les cellules souches cancéreuses ont la capacité de migrer à partir de la tumeur initiale vers d'autres parties du corps, souvent via la circulation sanguine ou lymphatique. Elles peuvent envahir les tissus environnants et former des métastases dans des sites distants [369]. Grâce à leur capacité à se régénérer et à former de nouvelles tumeurs, les cellules souches cancéreuses sont souvent résistantes aux traitements conventionnels tels que la chimiothérapie et la radiothérapie. De plus, les cellules souches cancéreuses peuvent entrer dans un état de dormance, où elles restent inactives pendant une période prolongée [370]. Cela peut se produire en réponse à des traitements ou à des conditions environnementales défavorables. Par la suite, ces cellules peuvent se réactiver, entraînant une résurgence tumorale après une période de rémission [371]. Cette hypothèse fait du sens car les cellules souches sont les seules cellules pouvant proliférer à long terme. Par conséquent, les cellules souches possèdent un caractère évolutif leur permettant de se dérégler [372]. Les cellules souches cancéreuses jouent un rôle dans la disparité de survie au cancer du sein. En effet, Plusieurs études indiquent que les populations avec une ascendance africaine ont une incidence plus élevée de cellules souches cancéreuses (CSC) dans leur cancer de sein par rapport à celles d'origine européenne [370]. Les populations ayant une ascendance africaine présentent aussi des niveaux élevés de CD44 particulièrement dans le cancer du sein triple négatif [371]. Cette augmentation de CD44 a été constatée dans les tissus mammaires, qu'ils soient tumorigènes ou non, chez les afro-américaines par rapport aux caucasiennes [372]. Les cellules souches cancéreuses sont généralement caractérisées par une expression positive de CD44 et une expression faible ou négative de CD24 [369,372]. En tant que biomarqueurs, les cellules mammaires CD44+/CD24- ont démontrées des propriétés initiatrices de tumeurs, des capacités invasives accrues et une probabilité plus élevée de développer une résistance à la radiothérapie [375]. Sur le plan clinique, les tumeurs présentant une proportion plus élevée de cellules CD44+/CD24- sont plus fréquemment associées à des métastases à distance et à de mauvais résultats cliniques. Des recherches récentes ont également montré que les tumeurs du sein triple négatif peuvent présenter une proportion plus élevée de ces cellules CD44+/CD24-. De plus, les études ont révélé que d'autres biomarqueurs des cellules souches cancéreuses, tels que l'expression de l'ALDH dans les tumeurs, sont élevés dans plus de 30 % des tumeurs des patientes afro-

américaines et des patientes africaines en Afrique de l'Ouest, par rapport aux tumeurs des femmes caucasiennes américaines [366-370].

En revanche, le modèle de l'évolution clonale sporadique suggère qu'une cellule normale quelconque peut être à l'origine de la tumeur une fois que de multiples mutations lui confèrent des avantages de croissance sélectifs naturels. Cette approche darwinienne suggère que les cellules les plus adaptées et les plus agressives stimulent la progression du cancer [75]. Au fil du temps, des sous-populations de différentes cellules se développent, entraînant une hétérogénéité tumorale. Ce modèle montre que la résistance à la thérapie est acquise par la sélection de clones de cellules cancéreuses survivant à la pression micro environnementale induite par la thérapie [76-77].

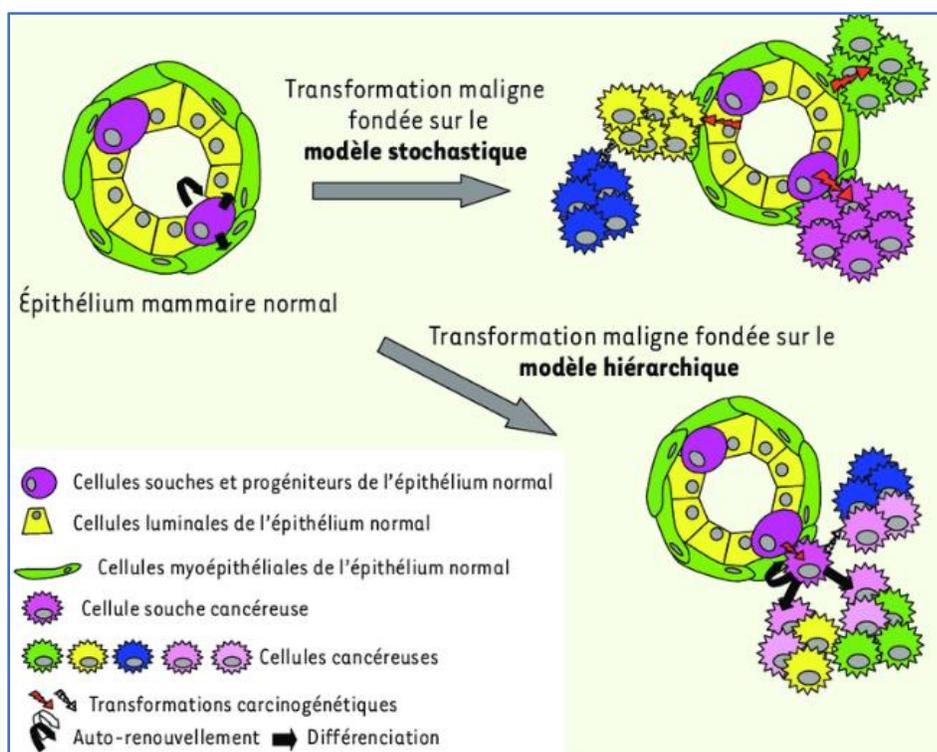


Figure 1.9 : Deux modèles de la transformation maligne, Ginestier, Christophe. *The cancer stem cell Médecine sciences*, 2008.

Le modèle stochastique postule que chaque cellule de l'épithélium mammaire peut être transformée et donner un clone tumoral. Ce clone tumoral est composé de cellules qui ont toutes la capacité de proliférer de façon indéfinie en réponse à l'accumulation de nouvelles altérations oncogéniques. Le modèle hiérarchique suggère qu'une seule cellule souche ou progénitrice est sujette à l'oncogenèse.

1.3.4.2 Hétérogénéité intra tumorale dans le cancer du sein

Une caractéristique commune à tous les types de cancer est la grande variété des cellules tumorales au sein d'une tumeur individuelle [72]. En effet, la plupart des tumeurs émergent et progressent sous une forte pression imposée par des facteurs trophiques, immunologiques, métaboliques et thérapeutiques comme les traitements chimiothérapeutiques. Plus simplement, l'hétérogénéité intra tumorale est le résultat de l'évolution génétique et phénotypique qui se produit pendant la progression de la tumeur. Bien que l'hypothèse des cellules souches cancéreuses et le modèle d'évolution clonale fournit des explications à l'hétérogénéité tumorale, l'hétérogénéité intra tumorale reste un défi majeur dans le traitement du cancer car elle peut contribuer à la résistance au traitement, à la rechute de la maladie et à la progression tumorale. [73]. Le concept d'hétérogénéité spatiale est l'hétérogénéité entre les sous-populations de cellules dans différentes régions de la tumeur. En revanche, l'hétérogénéité temporelle évolue entre la tumeur primitive et la récurrence [74]. L'hétérogénéité tumorale n'est pas seulement observée sur le plan génétique et moléculaire, mais elle est également évidente en ce qui concerne les caractéristiques histologiques telles que le grade histologique, les composants du sous-type histologique et les altérations phénotypiques [75]. Cependant, il est possible que les nouvelles caractéristiques histologiques observées résultent simplement des modifications génétiques et moléculaires présentes dans la cellule. Dans tous les cas, le cancer du sein est un groupe hétérogène de maladies, et l'hétérogénéité tumorale est un facteur limitant pour la pratique clinique et le traitement du cancer, car les échantillons de tumeur peuvent ne pas représenter la tumeur dans son ensemble [76].

Ainsi, la coexistence de plusieurs sous-clones porteurs de différentes anomalies moléculaires et différentes sensibilités aux médicaments peut conduire à ce que la thérapie ne soit pas efficace contre l'ensemble de la tumeur [77]. Par conséquent, cette hétérogénéité tumorale est l'une des causes sous-jacentes de la résistance à la thérapie émergente. Les avancées dans le séquençage des acides nucléiques essaient de contrecarrer l'hétérogénéité intra tumorale. Si la plupart des méthodes de séquençage de nouvelle génération (NGS) analysent la tumeur en tant qu'ensemble, les avancées dans le séquençage de cellules individuelles ont permis de fournir de nouvelles informations sur l'hétérogénéité intra tumorale. Par exemple, Rye et al. ont récemment démontré, au niveau de la cellule unique, que l'hétérogénéité intra tumorale du nombre de copies du gène HER2 était associée à un pronostic défavorable [78].

1.3.4.3 Les modèles de progression du cancer du sein

Avec les avancées dans les analyses génomiques et transcriptomiques qui ont été réalisées sur les différents stades du cancer du sein, la complexité des processus biologiques qui se produisent lors de la progression du cancer du sein est encore plus évidente. Les sous-types moléculaires du carcinome invasif semblent aussi être présents dans le carcinome canalaire in situ (CCIS) non invasif [79]. De nombreux modèles linéaires ont été proposés pour l'initiation, la transformation et la progression du cancer du sein. Un modèle historique supposait que certaines lésions pré-invasives se développaient soit à partir des canaux soit à partir des lobules, et par conséquent, la terminologie de carcinome canalaire in situ et de carcinome lobulaire in situ (LCIS) est apparue [80]. Plus tard, Wellings et al. ont démontré que la plupart des lésions pré-invasives se développaient dans les unités des canaux lobulaires terminaux UCLT [78]. Ce modèle en plusieurs étapes décrivait comment les cellules épithéliales normales des UCLTs se transformaient en hyperplasie de type habituel, puis en hyperplasie canalaire atypique. Dans l'hyperplasie de type habituel, on observe une augmentation du nombre de cellules épithéliales dans les UCLTs, mais ces cellules conservent généralement une apparence normale, ne présentent pas de caractéristiques morphologiques ou nucléaires atypiques et les cellules continuent de remplir leur fonction normale [78]. Dans l'hyperplasie canalaire atypique, les cellules épithéliales des UCLTs commencent à présenter des anomalies morphologiques et nucléaires qui suggèrent une transformation précancéreuse [78]. Ces anomalies incluent souvent une prolifération cellulaire désordonnée, des noyaux agrandis, une chromatine augmentée et une perte de polarité cellulaire [78]. L'hyperplasie canalaire atypique par la suite progressait en carcinome canalaire in situ de faible grade, et à partir de là, les cellules acquéraient soit des caractéristiques permettant l'invasion, soit la progression en carcinome canalaire in situ de haut grade [78,79]. Un modèle similaire pour les lobules proposait que les cellules normales des UCLTs se transforment en hyperplasie lobulaire atypique, en LCIS, et enfin en carcinome lobulaire invasif [79]. Sur la base des analyses génomiques et transcriptomiques, la validité de ce modèle a été remise en question, et il a plutôt été démontré que les lésions pré-invasives, in situ et invasives de bas grade et de haut grade se regroupent en fonction du grade histologique et non du stade de la progression tumorale [83,84]. Outre le grade histologique en tant que principal facteur influençant l'évolution du cancer du sein, des études moléculaires ont montré que l'expression des récepteurs aux œstrogènes (ER) et l'activation des

gènes régulés par les ER forment des clusters et séparent les tumeurs du sein en sous-types [85]. Ainsi, la signalisation des récepteurs aux œstrogènes (ER) joue un rôle crucial dans la progression du cancer du sein. Les modèles susmentionnés de l'évolution du cancer du sein offrent une simplification de ce que nous comprenons actuellement, car la progression vers le cancer du sein invasif implique des voies complexes et multiples [85]. Les lésions précancéreuses du cancer du sein présentent donc des caractéristiques histologiques, immunohistochimiques et moléculaires similaires à celles des tumeurs invasives correspondantes [85]. Elles sont également connues sous le nom de précurseurs non obligatoires, car elles ne se transforment pas nécessairement en tumeurs invasives. [83]. Les lésions précoces de bas grade ou les lésions pré invasives débutantes comprennent les lésions des cellules épithéliales, l'atypie épithéliale, la néoplasie lobulaire atypique/classique LCIS, l'hyperplasie canalaire atypique et le CCIS de bas grade. Elles se caractérisent toutes par un faible grade histologique, une expression des ER, l'absence de surexpression ou d'amplification génique de HER2, et présentent des altérations génétiques telles que des délétions de 16q et des gains de 1q [84-85]. Les lésions précoces de haut grade comprennent l'adénose micro glandulaire, le LCIS pléomorphe et le CCIS de haut grade, et englobent un motif beaucoup plus complexe d'altérations génétiques [85].

1.3.4.4 Du cancer invasif à la métastase

Dans le cancer du sein, le taux de mortalité élevé est la plupart du temps une conséquence de la métastase vers d'autres organes [86,379]. La mortalité est rarement due à la tumeur primitive du sein elle-même. Certaines tumeurs primitives agressives peuvent produire des facteurs de croissance vasculaire qui favorisent le développement de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse) pour alimenter la croissance tumorale [380]. Cela peut entraîner des complications systémiques telles que l'augmentation de la pression artérielle, des troubles métaboliques ou des déséquilibres hormonaux [381]. Le processus métastatique se produit lorsque les cellules néoplasiques acquièrent la capacité non seulement d'envahir le microenvironnement environnant, mais aussi de passer à travers les parois endothéliales des vaisseaux sanguins et lymphatiques [375]. Une fois dans la circulation lymphatique et sanguine, les cellules tumorales circulantes doivent être programmées pour extravaser sur des sites d'organes distants et se développer davantage en une tumeur secondaire [376]. La formation de métastases tumorales n'est pas encore complètement comprise. Les ganglions lymphatiques axillaires sont les sites les plus fréquents où

l'on trouve des métastases locorégionales du cancer du sein [87]. Les sites préférentiels des métastases à distance sont les poumons, les os, le foie et les ganglions lymphatiques non axillaires [88]. Dans certains sous-types de cancer du sein, tels que les tumeurs mammaires triples négatives, des métastases à distance peuvent survenir sans l'implication des ganglions lymphatiques axillaires [89]. Plusieurs études indiquent que les cellules métastatiques peuvent contourner les ganglions lymphatiques axillaires et se diriger directement vers les organes distants [85-88].

1.4 Voie de Signalisation PI3K/AKT

La PI3K est une famille de kinases lipidiques. La voie de signalisation PI3K/AKT représentée à la Figure 1.10 intègre des signaux provenant de facteurs de croissance, de cytokines et d'hormones pour réguler un ensemble des processus cellulaires, tels que le métabolisme, la prolifération, la migration et la sécrétion [258,370].

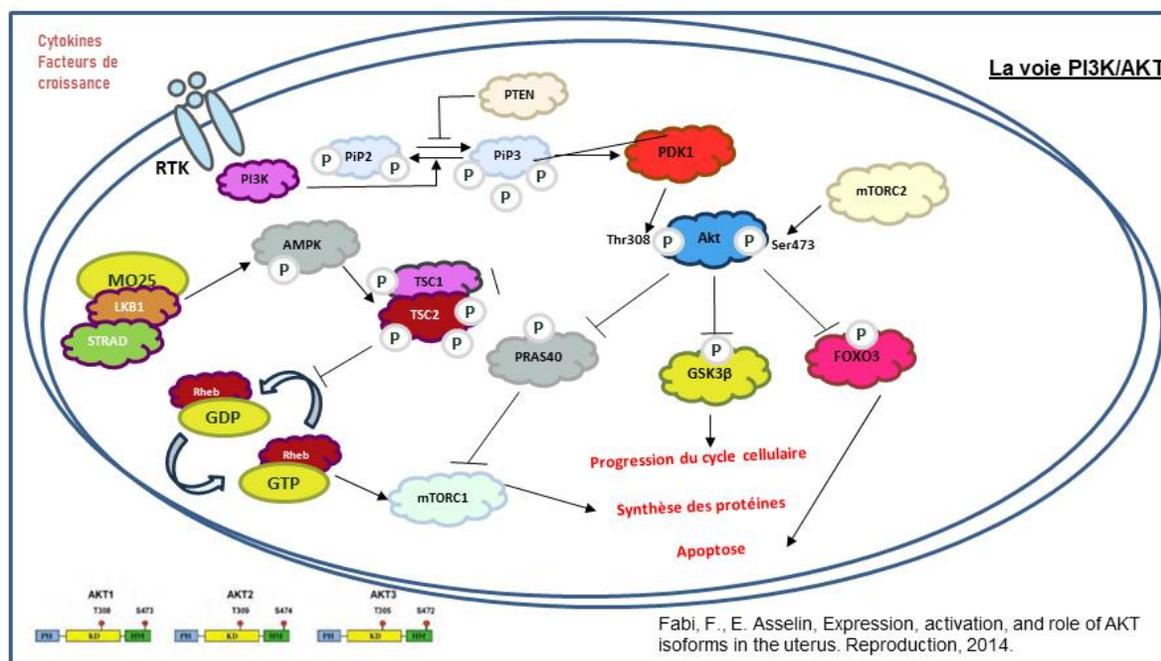


Figure 1.10 : La voie de signalisation PI3K/AKT. Fabi F, Asselin E. *Reproduction* 2014.

Cette voie se situe en aval des récepteurs aux facteurs de croissance. Le récepteur actif de la PI3-Kinase phosphoryle le phosphatidylinositol biphosphate (PIP2) et le phosphatidylinositol triphosphate (PIP3). Cela permet le recrutement d'AKT qui va être phosphorylé (par PDK1 et mTORC2) et ainsi activé. AKT va à son tour activer de nombreux substrats dont PRAS40, GSK3 β et FOXO3. PTEN est une phosphatase jouant un rôle d'inhibiteur d'AKT, en contrant l'action de la PI3K par la transformation du PIP3 en PIP2.

Étant donné que des études antérieures [258-261,370] ont établi un lien entre une expression accrue de PI3K/AKT et le développement des cancers de l'ovaire, du col utérin et du sein chez les caucasiennes, nous avons dirigé nos recherches vers le rôle potentiel de la voie de signalisation activée par PI3K/AKT dans le cancer du sein de la femme noire. En effet, PI3K/AKT est l'une des voies les plus fréquemment dérégulées dans le cancer : une signalisation aberrante de la voie PI3K peut favoriser la survie cellulaire, l'expansion et la dissémination des cellules cancéreuses [259,260]. L'activation aberrante de la voie PI3K peut se produire par plusieurs mécanismes distincts, notamment l'amplification des récepteurs de tyrosine kinase (RTK), la mutation génétique ou l'amplification de protéines de signalisation (PIK3CA, AKT), et la délétion ou mutation de suppresseurs de tumeurs (PTEN, INPP4B) [260]. PIK3CA et PTEN font partie des gènes les plus fréquemment mutés dans le cancer humain [259]. Les altérations de la voie PI3K sont présentes dans divers types de cancers et des expériences précliniques soutiennent le potentiel du ciblage thérapeutique de la voie PI3K [260].

La famille PI3K est regroupée en trois grandes classes (I-III) en fonction de leur homologie de séquence et de la spécificité du substrat [261]. Les PI3K de classe I sont les plus étudiées en raison de leur contribution à l'oncogenèse [258-260]. L'activation de la voie PI3K de classe I (désormais "voie PI3K") peut se produire par plusieurs mécanismes, le plus courant étant son activation via les récepteurs tyrosine kinases (RTKs), les petites protéines G et les protéines G hétérotrimériques. Chez les mammifères, La liaison du facteur de croissance induit des changements conformationnels et souvent une dimérisation des RTK qui entraîne leur autophosphorylation et activation, activant ainsi la cascade de signalisation en aval [259]. La voie PI3K activée par les RTK va produire des réponses phénotypiques spécifiques : l'activation de cette voie par le récepteur du PDGF (PDGFR) et le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) par exemple vont favoriser la prolifération et la migration cellulaire, le récepteur du facteur de

croissance analogue à l'insuline (IGFR) va stimuler la survie et la croissance cellulaire, et le récepteur de l'insuline (INSR) va favoriser l'homéostasie métabolique [259-261].

La classe I de PI 3-K est un hétérodimère comprenant une sous-unité catalytique (p110) et une sous-unité régulatrice (p85). Il existe quatre isoformes de sous-unités catalytiques de PI3K de classe I : p110D, p110E, p110G et p110J, codées respectivement par les gènes PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD et PIK3CG2,5. Les isoformes p110D et p110E sont exprimées de manière ubiquitaire, tandis que p110G et p110J sont propre aux cellules immunitaires [261]. L'analyse de la séquence de la sous-unité p110 a révélé la présence de régions fonctionnelles, y compris un site de liaison avec la sous-unité régulatrice p85, un domaine de liaison et un domaine catalytique. D'autre part, la sous-unité p85 est dotée d'un domaine SH3 (C-terminal Src-homology 3) en N-terminal et de deux domaines SH2 (C-terminal Src-homology 2) séparés par un domaine inter-SH2 [263]. Ces domaines SH2 et SH3 jouent un rôle crucial dans les interactions protéine-protéine, ce qui est essentiel pour l'induction des voies de signalisation cellulaires [263].

La sous-unité p85 peut être activée par des récepteurs présentant une activité tyrosine kinase (RTK) ou couplés à la protéine G (GPCR), par des facteurs de croissance, des intégrines, des oncogènes tels que Ras. Cette stimulation de p85 entraîne l'autophosphorylation de résidus tyrosines spécifiques au niveau du domaine SH2 de la sous-unité p85 [261,263]. Ce processus recrute et lie la sous-unité p85 au récepteur via ses motifs phosphotyrosines. Par la suite, la sous-unité p110 va se lier à p85 pour être activée [261]. Cependant, la sous-unité p110 peut également être activée, indépendamment de p85 par la protéine Ras. C'est suite à l'activation de ses deux sous-unités que la classe I de la PI3K va catalyser la phosphorylation du groupe hydroxyle 3' sur le groupe tête du lipide inositol PIP₂ afin de générer le PIP₃ [261]. Le PIP₃ est un messenger lipidique qui va favoriser la signalisation à travers la voie PI3K en recrutant spécifiquement des protéines de signalisation cytosoliques à la membrane plasmique. Le PIP₃ agit comme les seconds messagers en se liant au domaine PH (domaine d'homologie à la pleckstrine), présent notamment sur des protéines telles que AKT et PDK1 (3-phosphoinositides-dependent kinase-1), afin de favoriser leur recrutement vers la membrane plasmique où ils seront activés [261].

Cependant, plusieurs voies de signalisation en aval peuvent être activées lors de l'activation de la PI3K, y compris les kinases tyrosine de la famille TEC, les facteurs d'échange de nucléotides

guanines (GEF) et les protéines activatrices de GTPases (GAP) [261]. Le gène homologue de la tensine (PTEN), inhibe la signalisation de la PI3K en catalysant l'élimination du phosphate en position 3' du PIP3 pour générer le PIP2. Le PIP3 peut également subir une déphosphorylation séquentielle par les phosphatases à domaine SH2 contenant de l'inositol (SHIP1/2) pour générer le PIP2[262]. Même des changements subtils dans l'abondance du PIP3 ont des effets majeurs sur la signalisation en aval en raison de l'amplification du signal à travers la cascade de kinases PI3K/AKT/mTOR qui se produit fréquemment dans le cancer [261].

1.4.1 AKT en tant qu'effecteur de la signalisation de la PI3K

Le gène AKT/PKB (Protéine B Kinase/Protéine Kinase B) est un homologue humain de la forme virale v-AKT, un oncogène dérivé du gène AKT8 qui est associé à des lymphomes chez la souris [259]. La famille de kinases sérine/thréonine AGC AKT (AKT1, AKT2 et AKT3) est un effecteur canonique de l'activation de la PI3K médiée par les récepteurs, dont l'activation peut favoriser la prolifération cellulaire, la survie, la croissance et des changements métaboliques [260]. La structure de domaine des isoformes d'AKT est hautement conservée, comprenant un domaine d'homologie à la pleckstrine (PH) à l'extrémité N-terminale, un domaine de liaison, un domaine catalytique conservé de la kinase AGC et un domaine régulateur C-terminal, également connu sous le nom de motif hydrophobe (Figure 1.11) [260]. Les isoformes d'AKT sont codées par des gènes présentant un degré élevé de similarité de séquence. Bien que les isoformes d'AKT partagent la plupart des cibles en aval, ils présentent des fonctions isoformes spécifiques dans différents tissus et cellules [259,260].

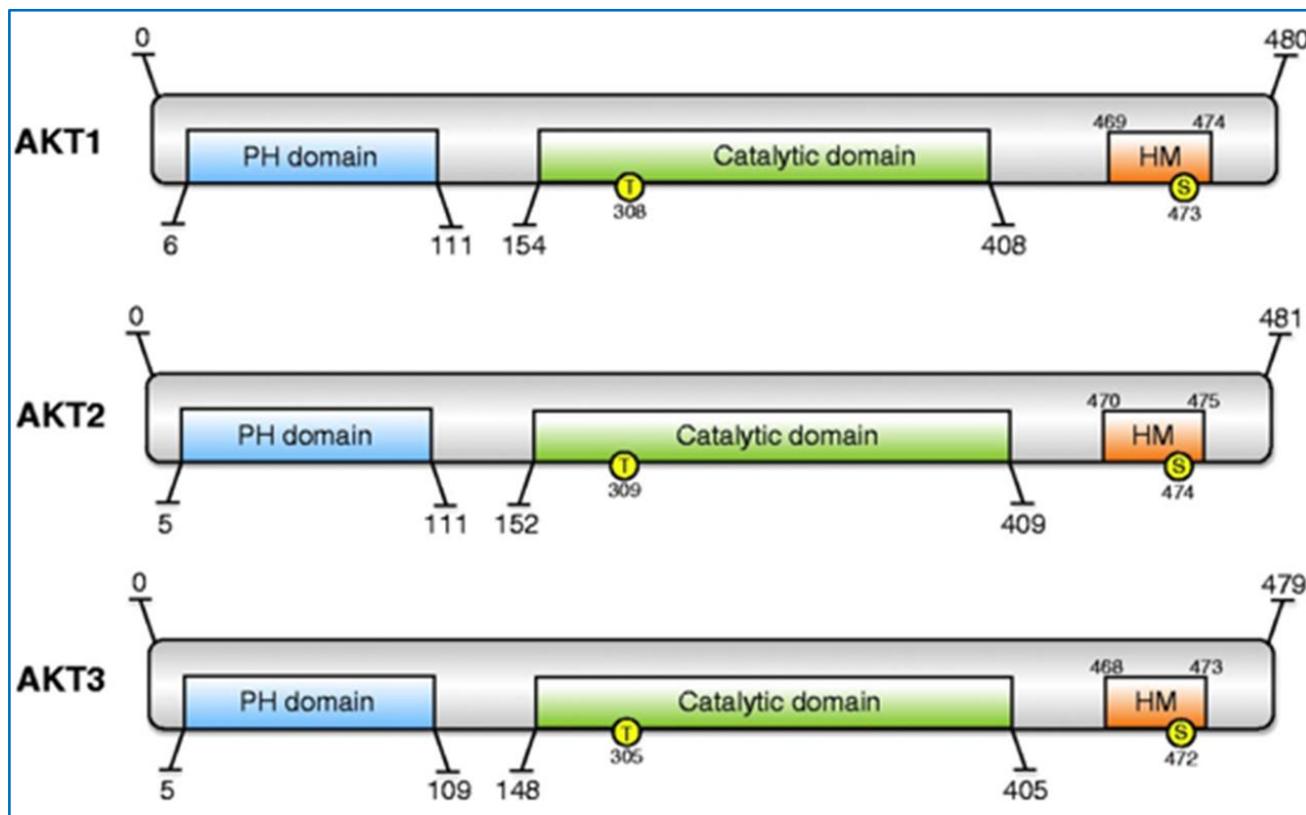


Figure 1.11 : Structure des trois isoformes humaines de la famille AKT/PKB, Fabi F, Asselin E. Reproduction.2014.

Trois isoformes d'AKT existent chez l'homme qui partagent environ 80% d'homologie de séquence d'acides aminés. Chaque isoforme contient un domaine d'homologie de pleckstrine (PH) dans la région N-terminale (bleu), suivi d'un domaine catalytique central (vert) et d'une région C-terminale régulatrice (orange). Les positions des sites activateurs de phosphorylation (thréonine et sérine en jaune) sont représentées pour chaque isoforme.

AKT est recruté au niveau de la membrane plasmique par l'interaction de son domaine PH avec PIP3 et PI34P2 [260]. À la membrane plasmique, AKT est doublement activée via la phosphorylation de ses deux motifs régulateurs : la boucle d'activation dans le domaine catalytique et le motif hydrophobe près de l'extrémité C-terminale. La liaison du domaine PH d'AKT aux phosphoinositides de la membrane plasmique induit un changement de conformation qui permet une activation partielle d'AKT par PDK1. PDK1 va pouvoir accéder et phosphoryler la Thr308/Thr309/Thr305 de la boucle d'activation dans le domaine catalytique d'AKT1/2/3 respectivement [259,260]. L'activation complète d'AKT nécessite la phosphorylation par

mTORC2 sur un résidu régulateur supplémentaire sur le motif hydrophobe : Ser473/Ser474/Ser472 sur AKT1/2/3. Outre la phosphorylation d'AKT, mTORC2 peut phosphoryler d'autres kinases avec des sites analogues au motif hydrophobe d'AKT, comme la protéine kinase C (PKC) δ [259]. Outre ces deux sites de phosphorylation régulateurs cruciaux, La régulation de l'activité et de la localisation d'AKT par d'autres modifications post-traductionnelles a également été signalée, notamment l'acétylation, la glycosylation et l'hydroxylation [274]. Après activation, AKT phosphoryle de nombreux substrats protéiques dans diverses localisations subcellulaires. Ces substrats sont phosphorylés sur leurs résidus de sérine (Ser) et thréonine (Thr) et contiennent le motif de reconnaissance consensus minimal d'AKT R-X-R-X-X-S/T-B (où X est n'importe quel acide aminé et B représente une préférence pour des résidus hydrophobes volumineux) [275].

Le rôle d'AKT dans les processus cellulaires souligne son importance en biologie du cancer, car la dysrégulation de ces processus contribue à la tumorigenèse et à la progression [274-276]. Le ciblage de la voie d'AKT est au centre de la thérapie contre le cancer, et de nombreux inhibiteurs sont en cours de développement et testés dans des essais cliniques.

1.4.2 Isoformes d'AKT

L'emplacement chromosomique de chaque gène AKT humain a été déterminé par hybridation in situ en fluorescence : 14q32 pour AKT1, 19q13.1-13.2 pour AKT2 et 1q44 pour AKT3. Les isoformes d'AKT représentés à la Figure 1.10 régulent des fonctions cellulaires distinctes et parfois opposées [260,288,290]. Des facteurs spécifiques au contexte tels que l'expression tissulaire et la localisation cellulaire peuvent expliquer en partie la spécificité fonctionnelle des isoformes d'AKT. AKT1 est ubiquitairement exprimé, AKT2 est exprimé dans les tissus sensibles à l'insuline tels que le foie, le muscle squelettique et la graisse, et AKT3 est exprimé principalement dans le cerveau [288]. Des études sur des souris knockouts des isoformes d'AKT suggèrent des fonctions non redondantes et des rôles spécifiques aux tissus [260,288,290]. AKT1 a été impliqué dans la survie cellulaire, car les souris knockout pour AKT1 sont plus petites que leurs homologues sauvages et présentent une mortalité périnatale [276]. Les souris knockout pour AKT2 développent une résistance à l'insuline, et les souris knockout pour AKT3 présentent des défauts neurologiques et une petite taille du cerveau [277]. Les différences observées dans la localisation subcellulaire

des isoformes d'AKT peuvent expliquer l'accès sélectif aux substrats. Par exemple, des études utilisant la microscopie à fluorescence à réflexion interne totale (TIRF) ont montré une accumulation préférentielle d'AKT2 mais pas AKT1 à la membrane plasmique des adipocytes [280]. Cette différence de localisation subcellulaire peut également expliquer la régulation spécifique d'AKT2 sur GLUT4 et la contribution d'AKT2 au métabolisme du glucose [280]. La phosphorylation spécifique d'AKT1 de la protéine PALLADIN dépend de la présence de son domaine de liaison. Des différences moléculaires intrinsèques sont également proposées pour contribuer aux fonctions distinctes des isoformes d'AKT [288]. Bien que les isoformes d'AKT partagent entre eux la majorité des substrats, il existe des substrats spécifiques pour chaque isoforme. AKT1 par exemple aura comme substrats spécifiques AS160, HDM2, Myosin5a, AKT2 aura comme substrats Ankr2/ARRP et TBX3 a été proposé comme substrat spécifique d'AKT3 [288].

1.4.3 AKT dans le cancer

Des études ont également mis en évidence des fonctions non redondantes, voire opposées, des isoformes d'AKT dans la physiologie normale, la migration et la métastase des cellules cancéreuses [260,288,290-294]. L'amplification d'AKT1 est fréquemment observée dans les cancers gastriques, du colon et du sein, l'amplification d'AKT2 a été rapportée dans les cancers ovariens, du pancréas et du sein ; et l'amplification d'AKT3 a été observée principalement dans les cancers de la prostate et du sein [258]. En effet, Sun et al. ont observé une augmentation de l'activité kinase de l'AKT dans plus de 50% des cancers de la prostate et dans près de 40% des cancers de l'ovaire et du sein. De plus, environ 80% des tumeurs présentant une activité élevée d'AKT sont des cancers classés en stade III/IV [288-290]. AKT1 supprime la migration et l'invasion des cellules cancéreuses du sein tandis que AKT2 les favorise. AKT1 a été identifié comme un moteur de la prolifération et de la survie des cellules cancéreuses du sein, bien qu'il ne favorise pas la métastase [289]. L'augmentation d'AKT3 a été identifiée comme un mécanisme de résistance des cellules cancéreuses du sein traitées par l'inhibiteur d'AKT MK-2206118. Le knockout d'AKT3 a également été démontré pour sensibiliser les cellules du cancer du sein triple négatif à l'inhibition pan-AKT [288-290].

Dans le cancer du sein de la femme noire, les isoformes AKT n'ont pas été évalués. Cependant une étude portant sur PTEN dans une population de 202 femmes afro-américaines (AA) a corrélé l'expression immunohistochimique du PTEN avec d'autres facteurs clinicopathologiques. PTEN est un gène suppresseur de tumeur qui inhibe la prolifération cellulaire en inhibant la voie de signalisation de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) [382]. La perte de PTEN entraîne la prolifération cellulaire par activation de mTOR. L'inactivation de PTEN, lève l'inhibition des processus dépendants d'AKT, et est associée à la tumorigenèse dans plusieurs cancers humains, y compris le cancer du sein [375,376]. Elle a conclu que chez la femme afro-américaine, la perte d'expression de PTEN était associée aux cancers canaux à récepteur hormonaux négatifs (ER négatif ($p = 0,021$), PR négatif ($p = 0,024$)) et triple négatif ($p = 0,0024$). La perte de PTEN était marginalement associée à des métastases à distance ($p = 0,074$). Cependant, il n'y avait dans cette étude aucune association entre la perte de PTEN et la survie sans récurrence ou la survie globale [375,376]. Ce résultat était contraire avec certaines des études publiées précédemment qui montraient une association significative entre la perte de PTEN et la survie sans maladie, en particulier chez les femmes afro-américaines, suggérant que la perte de PTEN pourrait prédire un comportement agressif et de mauvais résultats cliniques chez les patientes atteintes d'un cancer du sein [375,376].

Malgré une compréhension approfondie de la signalisation d'AKT et de sa contribution à plusieurs phénotypes cellulaires, notre compréhension du rôle spécifique des isoformes d'AKT dans la physiologie normale et le cancer reste sous-développée.

1.5 Biomarqueurs du cancer

1.5.4 Définition et types de bio marqueurs

Les rapports pathologiques précis et complets constituent la base de tout diagnostic de cancer [182]. Ils sont la condition préalable pour poser un diagnostic correct, établir un traitement optimal personnalisé et obtenir le meilleur pronostic et résultat pour chaque patiente. Les biomarqueurs sont au cœur de cette recherche car ils fournissent des informations biologiques sur la tumeur d'une patiente spécifique et permettent d'établir un diagnostic et un traitement corrects [182]. Il y a plusieurs définitions du terme « biomarqueur », et selon le National Institutes of Health, un biomarqueur est une caractéristique objectivement mesurée et évaluée comme un indicateur de

processus biologiques normaux, des processus pathogènes ou des réponses à une intervention thérapeutique [183].

Les biomarqueurs peuvent être trouvés dans les tissus, le sang ou d'autres fluides corporels et peuvent fournir des informations sur une variété de fonctions corporelles et sur l'état de la maladie. Il existe différentes catégories de biomarqueurs, chacune ayant des applications spécifiques. Les biomarqueurs pronostiques, les biomarqueurs prédictifs, les biomarqueurs de sensibilité et de risque, les biomarqueurs diagnostiques, les biomarqueurs de surveillance, les biomarqueurs pharmacodynamiques/réponse etc.. [183]. Parmi ces catégories, les biomarqueurs pronostiques et prédictifs sont particulièrement pertinents dans le contexte du cancer du sein. [184].

1.5.4.1 Biomarqueurs de diagnostic et de dépistage

Les marqueurs de dépistage et les marqueurs de diagnostic du cancer sont tous deux des indicateurs biologiques utilisés pour détecter la présence de cancer, mais ils sont utilisés à différentes étapes du processus de détection et ont des objectifs différents [186]. Les marqueurs de dépistage sont utilisés pour détecter le cancer à un stade précoce chez des individus asymptomatiques, tandis que les marqueurs de diagnostic sont utilisés pour confirmer la présence du cancer et caractériser ses aspects cliniques chez des patients présentant des symptômes ou des résultats de dépistage positifs. Ces types de marqueurs doivent avoir une spécificité et une sensibilité élevées [184].

1.5.4.2 Biomarqueur pronostique

Ce marqueur est utilisé une fois que le statut de la maladie a été établi. Ces biomarqueurs permettent de prédire l'évolution probable de la maladie, sa récurrence, son agressivité et ils ont donc une influence importante sur la thérapie [188]. Par exemple, les facteurs pronostiques traditionnels du cancer du sein comprennent la taille de la tumeur, le grade de la tumeur et l'état des ganglions lymphatiques proche de la tumeur [183].

1.5.4.3 Biomarqueurs prédictifs

Ces marqueurs permettent de prédire la réponse à un médicament avant de commencer le traitement. Il classe les individus en tant que répondeurs probables ou non-répondeurs à un

traitement particulier. Ces biomarqueurs proviennent principalement de grandes études de type réseau qui permettent de prédire un résultat clinique à partir des caractéristiques moléculaires de la tumeur de la patiente.

Un biomarqueur peut être pronostique, prédictif ou les deux et il est important de ne pas confondre les deux types. Par exemple, la présence de ER dans une tumeur indique qu'elle est de type luminal et a donc un pronostic favorable on dit dans ce cas que ER est un marqueur pronostique. L'expression d'ER peut également signifier quel cancer répondra probablement au traitement endocrinien ; c'est donc également un marqueur prédictif.

Les biomarqueurs sont généralement simples d'utilisation [189]. Ils se doivent d'être des tests relativement non invasifs et indépendants de l'opérateur. À cet égard, les biomarqueurs du cancer peuvent être de l'ADN, de l'ARNm, des protéines, des métabolites impliqués dans des processus tels que l'apoptose, l'angiogenèse ou la prolifération [183-185]. Les marqueurs sont produits soit par la tumeur elle-même ou par d'autres tissus, en réponse à la présence d'un cancer ou de facteur associé telles que l'inflammation. De tels biomarqueurs peuvent être trouvés dans une variété de fluides et de tissus. Les marqueurs tumoraux peuvent être utilisés pour dépister une population générale, pour établir un diagnostic différentiel chez les patientes symptomatiques et pour la stadification du cancer [183]. De plus, ils peuvent être utilisés pour évaluer la tumeur résiduelle, évaluer la réponse au traitement, pour évaluer la récurrence par le biais d'une surveillance ou comme indicateurs pronostiques de progression de la maladie [7]. De nos jours, aucun marqueur connu ne répond à tous ces critères donc il est primordial de miser sur la découverte de nouveaux biomarqueurs.

1.5.5 Caractéristiques d'un biomarqueur idéal

Un marqueur tumoral idéal doit pouvoir être mesuré de manière simple, fiable et économique à l'aide d'un test présentant une sensibilité et une spécificité analytiques élevées [183]. Un marqueur tumoral idéal doit être produit par les cellules tumorales et entrer dans la circulation. Il doit aussi pouvoir être détecté à de faibles niveaux dans le sérum d'organismes sains ou bénins. Dans le sérum d'organismes sain ou bénin, il est idéal de détecter des biomarqueurs qui sont présents à des niveaux très bas ou absents chez les individus en bonne santé, mais qui peuvent être significativement élevés en cas de présence de maladie. La recherche de biomarqueurs dans le

sérum sain ou bénin offre des possibilités importantes pour la prévention, le diagnostic précoce, la surveillance et le traitement des maladies [185,189]. Un marqueur tumoral doit augmenter de manière significative dans le cancer (de préférence dans un type de cancer particulier). De plus, un marqueur tumoral idéal doit être présent dans une proportion détectable (ou supérieure à normales) aux stades précoces ou précliniques et les niveaux quantitatifs du marqueur tumoral doit refléter la charge tumorale [185]. Enfin, il devrait démontrer un niveau élevé de sensibilité diagnostique (peu de faux négatifs) et de spécificité (peu de faux positifs) [183-185].

Une mise en garde concernant les marqueurs tumoraux actuellement utilisés est qu'ils sont généralement de faibles spécificité et sensibilité diagnostiques. Seuls quelques marqueurs sont entrés dans la routine clinique, et seulement pour un nombre limité de types de cancer. Dans la majorité des cas, les marqueurs actuels sont utilisés en conjonction avec l'imagerie, la biopsie et les informations cliniques et pathologiques associées avant qu'une décision clinique ne soit prise [184].

1.5.6 Application actuelle des biomarqueurs et leur utilité clinique

L'une des applications d'un marqueur tumoral est le dépistage de population. Malheureusement, les marqueurs tumoraux actuels sont plus souvent élevés aux stades avancés de la maladie. Par conséquent, leur utilité clinique actuelle comme outil de dépistage est limitée. Les patientes en clinique ont aussi besoin de marqueur tumoral diagnostic. Semblables aux marqueurs de dépistage, les biomarqueurs diagnostics actuels souffrent d'une faible sensibilité et spécificité diagnostique pour servir de marqueurs diagnostiques [183-185]. Une autre application d'un marqueur tumoral est celle d'un marqueur pronostique. Dans la plupart des cancers, les marqueurs ont une certaine valeur pronostique mais des interventions thérapeutiques sur leur base spécifique ne peuvent pas être réalisées car leur précision de prévision est plutôt médiocre. Certains marqueurs peuvent servir d'indicateur prédictif de la réponse thérapeutique. À cet égard, très peu de marqueurs ont un pouvoir prédictif (les exceptions incluent les récepteurs hormonaux et HER-2 dans le cancer du sein), mais les informations qu'ils fournissent aident à la sélection thérapeutique [183].

Il existe deux autres applications actuelles des marqueurs tumoraux, notamment la détection précoce des récurrences des tumeurs ainsi que la surveillance de l'efficacité du traitement anticancéreux [184]. L'utilité des marqueurs actuels dans la détection précoce des récurrences des

tumeurs est controversée et n'affecte pas de manière significative le résultat car les rechutes cliniques peuvent survenir sans élévation des biomarqueurs ou l'élévation des biomarqueurs n'est pas spécifique. En ce qui concerne l'utilité des marqueurs actuels pour la surveillance de l'efficacité du traitement du cancer, les biomarqueurs fournissent des informations sur la réponse thérapeutique (efficace ou non) qui sont facilement interprétable et plus économique que l'imagerie. Ainsi les marqueurs actuels utilisés pour la surveillance de l'efficacité du traitement jouent un rôle clinique essentiel [185-189].

1.5.7 Biomarqueurs du cancer du sein actuellement disponibles

À l'heure actuelle, les marqueurs utilisés pour le cancer du sein sont principalement les marqueurs cliniques traditionnels tels que l'état des ganglions lymphatiques, l'âge, la taille de la tumeur, le grade histologique, le nombre de mitoses et les marqueurs immunohistochimiques détectables (statut hormonal ER/PR, HER2 ou Ki-67). En effet, les caractéristiques clinicopathologiques classiques comme l'âge, la taille de la tumeur, le grade histologiques, les métastases ganglionnaires et l'invasion lymphovasculaire, indiquent le pronostic de la patiente. Une tumeur de petite taille est souvent associée à un stade précoce de la maladie, ce qui signifie qu'elle est plus susceptible d'être traitée avec succès et a un risque de propagation (métastases) moindre [186]. En revanche, une tumeur de grande taille est généralement associée à un stade plus avancé du cancer, ce qui peut nécessiter des traitements plus agressifs et être associée à un pronostic moins favorable [187]. Le grade histologique est un facteur important pris en compte dans l'évaluation du risque de rechute et dans la prise de décision concernant le traitement adjuvant [188]. Les tumeurs de grade élevé sont souvent plus agressives et peuvent nécessiter un traitement plus intensif, comme une chimiothérapie adjuvante, en plus de la chirurgie et de la radiothérapie. En revanche, les tumeurs de grade faible peuvent avoir un meilleur pronostic et nécessiter des traitements moins agressifs. De plus, les informations sur les métastases ganglionnaires sont essentielles pour déterminer le stade du cancer du sein, ce qui guide souvent les décisions thérapeutiques. L'évaluation de la présence de métastases ganglionnaires est souvent réalisée par une biopsie des ganglions lymphatiques sentinelles, qui sont les premiers ganglions lymphatiques vers lesquels les cellules cancéreuses du sein sont susceptibles de se propager. Si des métastases sont détectées dans les ganglions sentinelles, cela indique généralement une propagation potentielle du cancer à d'autres

parties du corps, ce qui peut influencer le pronostic. La présence de métastases ganglionnaires est associée à un risque accru de rechute et à un pronostic moins favorable dans le cancer du sein.

Le statut hormonal déterminé par la présence ou l'absence de récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone, est sans aucun doute le biomarqueur le plus important du cancer du sein, car il fournit l'indice de sensibilité au traitement endocrinien. Les tumeurs ER-positives (environ 80 % des cancers du sein) utilisent l'hormone stéroïde estradiol comme principal stimulus de croissance ; Le récepteur d'estrogène est donc la cible directe des thérapies endocriniennes. Par conséquent, la présence de ces récepteurs est un facteur pronostic favorable et un facteur prédictif de la réponse au traitement endocrinien [137].

L'oncogène HER2 est un indicateur du pronostic du patient. En cas de surexpression de HER2 (HER2 positif), les patientes atteintes d'un cancer du sein sont plus susceptibles de souffrir de rechute et ont tendance à avoir une survie globale plus courte et par conséquent auront un mauvais pronostic (125). Grâce au développement de l'anticorps monoclonal trastuzumab, qui cible HER2, le statut d'amplification de HER2 est également devenu un biomarqueur hautement prédictif (40,126). La surexpression et l'amplification de HER2 peuvent être détectées dans environ 15 % de tous les cancers primitifs du sein, et ce groupe de patientes bénéficie de manière significative des thérapies anti-HER2.

Au cours de la dernière décennie, l'utilisation des analyses d'expression des gènes dans le cancer du sein a considérablement augmenté et pourrait aider à découvrir de nouveaux biomarqueurs et permettre de déterminer avec précision le risque de récurrence et la réponse au traitement. Cependant il existe déjà dans le commerce des tests basés sur les gènes diagnostique ou pronostique du cancer du sein [186]. Ces tests de profil d'expression effectués à partir des biopsies des patientes ont été introduits en clinique, comme le test de récurrence du cancer du sein à 70 gènes MammaPrint® approuvé par la FDA, le test Oncotype DX® Breast Recurrence Score (21 gènes), et le test de signature génétique pronostique du cancer du sein Prosigna® (PAM50).

Un autre outil prometteur est l'utilisation de biomarqueurs liquides. Les biomarqueurs liquides proviennent de l'urine ou du sang périphérique des patientes. Ces liquides contiennent des facteurs tels que l'ADN tumoral circulant (ADNct) [187-188], les cellules tumorales circulantes, les exosomes, ou les miARN provenant de la tumeur primitive et/ou des dépôts métastatiques qui

peuvent être identifiés et analysés [188-189]. Les biopsies liquides beaucoup plus faciles à prélever et moins invasive permettraient ainsi d'évaluer l'état de la maladie et d'aider au suivi et à la surveillance thérapeutique [190].

Compte tenu du fait que les biopsies tissulaires sont difficiles à acquérir et impliquent souvent un certain degré d'inconfort pour la patiente, la découverte de nouveaux biomarqueurs par l'étude des échantillons déjà disponibles ou de biopsie fixée en paraffine seraient idéals et moins contraignants. C'est cette alternative que nous avons exploitée dans notre étude en utilisant des biopsies fixées dans la paraffine.

Pour avoir une valeur clinique, un biomarqueur doit fournir des informations utiles et être suffisamment robuste pour être mesuré avec précision. Les mesures doivent être reproductibles sur différentes plateformes, différents observateurs et différentes patientes. De surcroît, des analyses de validité clinique du biomarqueur doivent confirmer son utilité clinique [184,190].

Le pouvoir discriminatoire d'un marqueur détermine sa capacité à distinguer entre un résultat de test « positif » ou « négatif ». Un marqueur diagnostique idéal aurait une sensibilité de 100 % et serait en même temps 100 % spécifique [183-185]. Ce scénario utopique signifierait que chaque personne atteinte de la maladie serait identifiée avec précision, sans jamais qu'il y ait de faux négatifs ou faux positifs. À ce jour, aucun test ni biomarqueur ne répond à cet idéal utopique. En réalité, il y aura toujours un certain degré de chevauchement dans lequel les individus sans la maladie auront un test positif, et vice versa. L'objectif doit être de trouver un compromis qui maximise à la fois la sensibilité et la spécificité [190]. Pour les tests pronostiques et/ou prédictifs du cancer du sein, le bémol actuel reste qu'une partie des patientes affectés au groupe à haut risque ne développeront jamais de récurrence et inversement, certaines patientes définies comme présentant un faible risque pourraient encore développer une récurrence. Quant à ceux présentant un risque intermédiaire, il n'existe pas des lignes directrices claires. De toute évidence, il existe toujours dans le cancer du sein un besoin de nouveaux biomarqueurs pour une amélioration thérapeutique et une médecine de précision surtout dans le cas du cancer du sein agressif.

Les femmes noires ont tendance à être diagnostiquées avec des cancers du sein plus agressifs. La recherche continue des biomarqueurs associés aux cancers du sein agressifs chez les femmes noires

est essentielle pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à l'agressivité du cancer du sein chez cette population et pour développer des approches de traitement plus efficaces et ciblées [18-20]. Par exemple, malgré le fait que les porteurs de mutation de BRCA soient bien décrits et élevée chez la femme noire, les évaluations des risques ne sont pas tout à fait claires et concises car la pénétrance observée des mutations n'est pas à 100% [191]. Un autre exemple est que toutes les lésions de cancer in situ détectées lors du dépistage ne vont pas évoluer vers un cancer invasif. Au moment du diagnostic, la plupart des patientes sont désireux de connaître leur pronostic et espèrent recevoir le traitement le plus optimal possible [183]. Cependant, la réalité actuelle est que nous ne pouvons pas prédire avec précision l'issue exacte d'une quelconque patiente. Nous ne pouvons pas non plus prédire dans quelle mesure une patiente répondra au traitement, et il n'est pas garanti que la chimiothérapie administrée comme traitement en première intention sera efficace.

C'est dans le but d'améliorer la réalité actuelle et d'aider dans la médecine de précision que nous avons procédé à l'analyse par séquençage d'ARN de tissus sains et cancéreux. Nous proposons dans cette thèse neuf gènes comme biomarqueurs thérapeutiques possibles dans le cancer du sein de la femme africaine.

1.6 Stratégies pour découvrir de nouveaux biomarqueurs du cancer

L'introduction de technologies permettant un examen simultané de milliers de protéines et de gènes dans des expériences uniques (telles que le séquençage d'ARN, la spectrométrie de masse et les puces à ADN et ARN) ont donné un regain d'intérêt pour la découverte nouveaux biomarqueurs du cancer. Les nouvelles avancées incluent l'achèvement du projet du génome humain, le progrès en bio-informatique, l'analyse de matrices (par exemple ADN, ARN, protéines), le profilage de masse et l'identification par spectrométrie, la microdissection par capture laser, le simple polymorphisme nucléotidiques, hybridation génomique comparative et le séquençage à haut débit [237-238]. Ces technologies modernes sont capables d'effectuer des analyses parallèles plutôt que séquentielles, offrant ainsi des opportunités pour identifier des motifs distinctifs (signatures, portraits) pour le diagnostic du cancer, la classification et la prédiction de la réponse thérapeutique (traitements personnalisés). De plus, elles fournissent les moyens par lesquels de nouveaux marqueurs tumoraux individuels pourraient être découverts en utilisant des hypothèses

raisonnables et des stratégies analytiques novatrices [237]. Étant donné que l'interface hôte-tumeur peut générer un clivage et une libération enzymatique, ainsi que le partage de facteurs de croissance, il est concevable que la tumeur elle-même ou son microenvironnement puisse être une source de biomarqueurs qui seraient éventuellement libérés dans le protéome sérique, permettant une détection précoce de la maladie et le suivi de l'efficacité thérapeutique [239]. Certes, les technologies génomiques et protéomiques ont considérablement augmenté le nombre de biomarqueurs potentiels d'ADN, d'ARN et de protéines en cours d'investigation. Un changement de paradigme a récemment été réalisé, remplaçant l'analyse de biomarqueurs individuels par une analyse multiparamétrique de gènes ou de protéines. Un essai multiparamétrique fait référence à l'idée qu'un panel de marqueurs peut fournir une meilleure information clinique que la performance des marqueurs individuels qui composent le panel [237-239]. Cela a suscité la question de savoir si le cancer possède une empreinte unique (c'est-à-dire génomique, protéomique, métabolomique). Plusieurs stratégies de découverte de biomarqueurs du cancer utilisant des technologies émergentes sont exposées ci-dessous, incluant des discussions sur leurs mérites et limitations.

1.6.1 Profilage de l'expression génique

Le profilage via les micropuces génomiques représentent une technologie extrêmement puissante pour les études d'expression génique. Les expériences de micropuces sont généralement réalisées avec de l'ADN ou de l'ARN isolé à partir de tissus, qui sont ensuite marqués avec un marqueur détectable et autorisés à s'hybrider avec les puces composés de sondes spécifiques représentant des milliers de gènes individuels [240]. Plus le degré d'hybridation est élevé, plus le signal est intense, impliquant ainsi un niveau d'expression relatif plus élevé. En raison du volume massif de données générées par l'expérience, les marqueurs moléculaires et leurs motifs d'expression nécessitent une analyse approfondie à l'aide d'outils informatiques sophistiqués, ajoutant ainsi une couche supplémentaire de complexité statistique. Deux analyses de base sont les algorithmes de regroupement hiérarchique non supervisés et supervisés ; ces derniers identifient des motifs d'expression génique qui discriminent les tumeurs en fonction d'informations cliniques prédéfinies [241]. De plus, la PCR en temps réel quantitative est généralement considérée comme la « référence » utilisée pour la validation des méthodes [241]. L'hypothèse de la sous-classification du cancer affirme que les motifs d'expression génique identifiés à l'aide de micropuce d'ADN peuvent prédire le comportement clinique des tumeurs. La preuve de cette hypothèse a été fournie pour

diverses malignités, telles que les leucémies et les cancers du sein. Par exemple, les résultats des technologies de micropuces ont permis de classer les cancers du sein en catégories pronostiques en fonction de l'expression de certains gènes [240]. L'étude par micropuce d'un panel de 70 gènes pouvant prédire de la survie cellulaire a conduit au développement de MammaPrint, qui était en 2007 le premier test de panel de gènes approuvé par la FDA américaine pour prédire la rechute du cancer du sein [242]. Un autre profil d'expression génique, Oncotype DX, basé sur la RT-PCR quantitative, est disponible commercialement pour le même usage depuis 2004 [242]. Oncotype DX et MammaPrint utilisent des plates-formes analytiques différentes et, malgré leur indication clinique similaire, présentent un faible chevauchement de gènes dans leurs panels respectifs [242]. Néanmoins, au cours de la dernière décennie, on a observé une croissance considérable de l'application du profilage d'expression génique. Il a contribué à la théorie de la sous-classification du cancer, aux perspectives sur la pathogenèse du cancer et à la découverte d'un grand nombre de marqueurs diagnostiques [240-243].

Michiels et al. ont récemment réalisé une méta-analyse de sept des études les plus importantes sur le pronostic du cancer utilisant le profilage d'expression basé sur les micropuces [243]. Étonnamment, dans cinq des sept études sur le pronostic du cancer, les données originales n'ont pas pu être reproduites suite aux variations dans les techniques. En effet, on observe des variations dans la préparation des échantillons, la taille de l'échantillon, les méthodes d'hybridation, les micropuces utilisées, les plateformes de micropuces et les outils d'analyse des données générées. Les deux autres études ont montré des informations pronostiques beaucoup plus faibles que les données originales. La méta-analyse a également indiqué que la liste des gènes identifiés comme des prédicteurs du pronostic était très peu fiable et que les signatures moléculaires dépendaient fortement de la sélection des patientes dans les ensembles d'entraînement [242-243]. Sachant que dans le contexte de l'analyse des données, un ensemble d'entraînement est un ensemble de données utilisé pour ajuster les paramètres du modèle afin qu'il puisse produire des prédictions précises, cette méta-analyse suggère que les résultats des études susmentionnées sont trop optimistes et qu'ils nécessitent une validation minutieuse et des échantillons plus importants avant de tirer des conclusions sur leur utilité clinique [74-76]. Malgré des données prometteuses de principe, la découverte de nouveaux sous-types de carcinomes en utilisant des micro réseaux géniques et l'utilisation de ces technologies pour la découverte de marqueurs diagnostiques, n'est pas encore

recommandée pour une utilisation clinique généralisée par les organisations émettant des directives cliniques ou par des comités d'experts [243]. Cependant, il a été recommandé que chez les patientes nouvellement diagnostiquées avec un cancer du sein négatif pour les ganglions, récepteur d'œstrogènes positif, le test Oncotype DX peut être utilisé pour prédire le risque de récurrence chez les patientes traitées par tamoxifène [242]. L'utilité clinique précise et l'application appropriée pour d'autres tests multiparamétriques, tels que le test MammaPrint (un panel de 70 gènes pour prédire la probabilité de récurrence du cancer), la "Signature de Rotterdam" (un panel de 76 gènes pour prédire un faible ou un fort risque de développement de maladie métastatique) et le rapport d'expression génique du cancer du sein (basé sur le ratio d'expression de deux gènes : le gène homéoboîte-B13 (HOXB13) et le gène récepteur de l'interleukine-17B (IL17BR) sont en cours d'investigation[89,245].

1.6.2 Profilage basé sur la spectrométrie de masse

Le profilage des motifs protéomiques est une approche récente pour mettre en évidence la découverte de nouveaux biomarqueurs. Étant donné que l'information de l'ARNm ne reflète pas au mieux la fonction des protéines, qui sont les composants fonctionnels à l'intérieur des organismes, l'utilisation du diagnostic ou de la sous-classification des tumeurs via des motifs protéomiques semble prometteuse.

La logique sous-jacente est que les protéines produites par les cellules cancéreuses ou leur microenvironnement peuvent éventuellement pénétrer dans la circulation et que les motifs d'expression de ces protéines pourraient être évalués par spectrométrie de masse et utilisés à des fins diagnostiques, en combinaison avec un algorithme mathématique. Les méthodes basées sur la spectrométrie de masse pour l'analyse protéomique se sont améliorées et incluent des technologies plus avancées permettant une plus grande précision de la masse, une meilleure capacité de détection et des temps de cycle plus courts, permettant ainsi une augmentation du rendement et des données plus fiables [245]. Des technologies telles que l'électrophorèse bidimensionnelle, l'électrophorèse en gel de polyacrylamide bidimensionnelle et la technologie d'identification protéique multidimensionnelle peuvent être utilisées pour le profilage protéique à haut débit. La technologie qui a suscité une attention considérable ces dernières années implique l'utilisation d'une petite quantité d'échantillon de sérum non fractionné ajoutée à une "puce à protéines", qui

est ensuite analysée par spectrométrie de masse par ionisation par désorption laser améliorée en surface avec temps de vol (SELDI-TOF-MS) pour générer une signature protéomique du sérum [246]. Ces puces à protéines utilisées pour analyser simultanément la présence et l'abondance relative de multiples protéines dans un échantillon biologique sont souvent basées sur le même principe que les puces à ADN, mais au lieu de détecter les acides nucléiques, elles détectent les protéines [138]. Ces motifs reflètent une partie du protéome sanguin, mais sans connaissance de l'identité réelle des protéines. Le potentiel de l'analyse des motifs protéomiques a été démontré pour la première fois dans le diagnostic du cancer de l'ovaire [247]. Dans cette étude, des résultats exceptionnels ont été obtenus avec une sensibilité de 100% (même pour les stades précoces) et une spécificité de 95%. Ces chiffres sont nettement supérieurs aux sensibilités et spécificités obtenues avec les biomarqueurs sérologiques actuels du cancer. Depuis lors, cette approche a été étendue à plusieurs autres types de cancers, tels que le sein, la prostate, le côlon, le foie, le rein, le pancréas, la tête et le cou.

Malgré l'optimisme entourant cette approche, plusieurs limitations importantes ont été identifiées [246-247]. Les limitations comprennent des biais liés aux artefacts, liés à la collecte et au stockage des échantillons cliniques, la nature qualitative des spectromètres de masse, l'incapacité à identifier des biomarqueurs du cancer bien établis, des biais dans l'identification des molécules à haute abondance dans le sérum et des divergences entre les pics générés par différents laboratoires de recherche [248]. Une autre limitation inclut d'éventuels artefacts bio-informatiques [248]. Malgré le premier rapport datant de cinq ans, aucun produit n'a atteint la clinique et aucune étude de validation indépendante n'a été publiée. Les organisations développant des lignes directrices et les panels d'experts ne recommandent actuellement pas le profilage protéomique du sérum (identification des pics discriminants) à des fins cliniques [250].

1.6.3 Profilage basé sur l'Immunohistochimie

Avec la réduction des coûts, le profilage de l'expression génique est de plus en plus intégré dans le diagnostic de routine du cancer du sein. Cependant, de tels tests ne sont pas universellement accessibles, en particulier dans les pays à faible revenu. Les sous-types moléculaires intrinsèques peuvent être reproduits en utilisant les mesures immunohistochimiques (IHC) d'ER, PR, HER2 et

Ki67 [251]. Les sous-types de substitution sont définis comme luminal A-like, luminal B-like (HER2 négatif), luminal B-like (HER2 positif) et triple négatif.

Les recommandations du consensus international de St Gallen ont permis d'utiliser en uniformisant le profil hormonal fait par immunohistochimie comme biomarqueurs clinique. Le seuil initial de Ki67 fixé à 14% pour dichotomiser les tumeurs lumineales B des tumeurs lumineales A a été établi [250,252]. Il a aussi suggéré qu'un Ki67 élevé ou un PR faible pouvait permettre de distinguer les tumeurs lumineales A-like des tumeurs lumineales B-like (HER2 négatif). En outre, les recommandations de St Gallen ont suggéré le type de traitement systémique pour chaque sous-type de substitution défini en 2013. Les définitions des sous-types de substitution du St Gallen de 2013 étaient les suivantes : Luminal A-like : ER positif, PR positif, HER2 négatif et Ki67 bas ; Luminal B-like (HER2 négatif) : ER positif, HER2 négatif et Ki67 élevé ou PR négatif ; Luminal B-like (HER2 positif) : ER positif, HER2 positif et tout Ki67 ou PR ; HER2 positif (non luminal) : HER2 positif et ER et PR absents ; Triple négatif : ER et PR absents et HER2 négatif [251].

1.7 Séquençage d'ARN

Les diagnostics du cancer du sein basés sur le séquençage ont le potentiel de remplacer les biomarqueurs de routine et de fournir une caractérisation moléculaire permettant une médecine de précision personnalisée [253].

Pour identifier la base moléculaire sous-jacente de la résistance thérapeutique, une approche globale est nécessaire afin d'identifier les altérations à l'échelle du génome responsables de la résistance thérapeutique. Le profilage moléculaire des tumeurs basé sur le séquençage de la nouvelle génération ou NGS offre le potentiel de fournir aux patientes et aux cliniciens des informations sur la caractérisation tumorale et les thérapies adaptées du point de vue génomique [254]. En effet, Le séquençage NGS offre comme avantages la capacité de séquençage massif et en parallèle, le criblage simultané de plusieurs gènes dans plusieurs échantillons, une meilleure appréciation de l'hétérogénéité des tumeurs ainsi que la détection quantitative et sensible des aberrations génomiques [253-254]. Ses principaux inconvénients sont la complexité du flux de travail avec une grande quantité de données générées par l'analyse bio-informatique et des difficultés lors de l'interprétation des résultats, la nécessité d'une validation approfondie des

performances de l'essai, la nécessité de sélection des gènes pour le panel NGS, le choix et la sélection de l'approche de capture de cible selon la plateforme disponible [254].

Le NGS déchiffre la séquence d'ADN en identifiant les signaux de fluorescence émis par les nucléotides incorporés dans la chaîne d'ADN lors de la synthèse en double brin. Ce processus est étendu à des milliards de brins d'ADN courts en parallèle. Le séquençage d'ARN peut révéler des motifs d'expression génique à l'échelle du génome. Dans le cas du séquençage d'ARN, l'ARN est d'abord extrait des tissus ou des cellules, puis converti en ADN complémentaire (ADNc) par une transcription inverse. Une fois que le ADNc est synthétisé, il peut être encore fragmenté en tailles idéales pour la NGS. Des millions de lectures courtes sont obtenues et assemblées en transcriptome soit en alignant les lectures sur un génome de référence, soit en assemblant de novo sans références génomiques [255]. La technologie de séquençage à haut débit a radicalement révolutionné la manière dont les scientifiques acquièrent des informations génétiques [256]. De toute évidence, il existe une demande croissante pour des diagnostics et des traitements du cancer personnalisés.

Le profilage moléculaire basé sur le séquençage de l'ARN pour le cancer du sein pourrait être utilisé pour prédire les biomarqueurs de routine actuels, ER, PR et HER2. L'un des grands avantages fournis par les diagnostics basés sur le séquençage est l'amélioration des modèles de stratification des patientes, tels qu'un modèle de grade transcriptomique, et des informations supplémentaires sur les altérations somatiques ciblables [257]. Le séquençage de gènes individuels tels que EGFR et KRAS dans le cancer du poumon non à petites cellules fait désormais partie de la pathologie de routine. Cependant, une approche plus large est nécessaire pour identifier les mutations prédictives de la thérapie et les variants structuraux. Des études actuelles sont en train de concevoir des panels de gènes internes pour des tests pan-cancéreux de médicaments ciblés [255]. L'initiative nationale Genomic Medicine Sweden est en train de développer un panel de gènes suédois national pour le profilage génomique. Avec les progrès dans les inhibiteurs de PI3K, la pratique clinique nécessitera une analyse des mutations de PIK3CA, et des panels de séquençage doivent être disponibles. Certains auteurs ont récemment démontré l'application du séquençage clinique prospectif des tumeurs solides en utilisant MSK-IMPACT, un panel de séquençage basé sur la capture par hybridation, afin de guider l'utilisation de thérapies adaptées au génome. À ce jour, l'utilité clinique réelle du profilage moléculaire est encore incertaine et des essais cliniques supplémentaires sont nécessaires pour prouver l'efficacité des thérapies ciblées moléculaires.

1.8 Diagnostic clinique du cancer du sein

Le diagnostic clinique face à une masse mammaire suspecte repose sur la palpation de masse suivi des bilans radiologiques et un bilan pathologique.

1.8.1 Bilan radiologique

La mammographie numérique aux rayons X est la procédure la plus importante dans le diagnostic d'imagerie du cancer du sein. Elle est utilisée dans la détection précoce du cancer du sein, la clarification des résultats ainsi que le suivi des soins pour le cancer du sein. La détection précoce peut être effectuée soit dans le cadre d'une mammographie de dépistage, soit sous la forme d'une stratégie d'examen individualisée et adaptée au risque. L'importance principale de la mammographie réside ici dans la détection des carcinomes mammaires aux stades tumoraux précoces, de préférence pré-invasifs. La mammographie est actuellement la seule méthode généralement reconnue comme efficace pour la détection précoce du cancer du sein [90].

La mammographie de dépistage a pour objectif de détecter un carcinome du sein existant à un stade précoce et donc encore potentiellement curatif afin de réduire la mortalité par cancer du sein. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) recommande que les programmes de dépistage du cancer du sein débutent entre 50 et 69 ans et que les femmes subissent une mammographie tous les deux ans [1]. Ils notent également que le dépistage peut être proposé aux femmes dès l'âge de 40 ans dans les régions où le cancer du sein est fréquent [1,92-93]. En détectant les cancers du sein à un stade précoce, la mammographie de dépistage peut contribuer à réduire le taux de mortalité lié au cancer du sein. Les traitements initiaux sont souvent moins invasifs et plus susceptibles de réussir lorsqu'ils sont administrés à un stade précoce de la maladie [92-93]. Il existe un certain nombre de grands essais randomisés prospectifs qui diffèrent dans leur conception d'étude, mais conviennent que l'introduction de la mammographie de dépistage peut entraîner une réduction relative de 20 à 40 % de la mortalité liée à l'âge par cancer du sein [92-93]. Sur la base des résultats de ces études, l'efficacité de la mammographie de dépistage pour les femmes âgées de 50 à 70 ans a été clairement démontrée. Un effet positif similaire est également observé chez les femmes âgées de 40 à 50 ans [91-94].

La mammographie curative fait référence à l'examen radiologique du sein chez les patientes dont le résultat nécessite une clarification ou dans le suivi d'un cancer du sein. La découverte suspecte n'est pas nécessairement l'expression d'une tumeur maligne. Les indications pour une mammographie curative sont : tumeur palpable, douleur, lésions cutanées suspectes, sécrétion pathologique, mammographie ou échographie anormaux lors d'un examen préliminaire. La sensibilité de la mammographie curative est rapportée à 85-95% dans diverses études [92-94].

Dans le suivi du cancer du sein, la mammographie occupe une place significative. Bien que la majorité des femmes traitées pour un cancer du sein se rétablissent grâce à un traitement initial, certaines patientes peuvent développer une récurrence maligne, dépendant du type et du stade de la tumeur ainsi que du statut des récepteurs hormonaux. Des récurrences locales ou locorégionales surviennent chez environ 5 % des cas dans les 10 ans suivant une chirurgie mammaire conservatrice et une radiothérapie [95].

L'introduction de la mammographie dans les années 80 a été suivie d'une augmentation des taux de détection d'incidence en particulier chez les patientes in situ (stade 0) et les patientes au stade précoce (stade 1) [99]. La sensibilité et la spécificité de la mammographie pour les femmes de plus de 50 ans est respectivement de 77 à 84 % et de 90 à 94 % [98-99]. Il est par contre plus faible chez les femmes de 40 à 49 ans (sensibilité de 70 % avec spécificité de 90 %).

La tomosynthèse mammaire numérique (TMN) est l'avancée la plus importante de la mammographie numérique. Elle fournit des images de coupes en 3D presque sans chevauchement basées sur un nombre défini d'images individuelles avec différents angles de projection. Elle permet d'obtenir une image plus claire et plus nette du sein, en diminuant l'effet de superposition des tissus mammaire environnants. En conséquence, les structures difficiles à détecter en mammographie conventionnelle en raison du chevauchement des tissus peuvent être visualisées beaucoup plus clairement. Selon les études actuelles, la tomosynthèse numérique est associée à une sensibilité et une spécificité plus élevée que la mammographie numérique. En combinaison avec la mammographie numérique conventionnelle, elle permet d'améliorer la précision diagnostique du dépistage [96-98]. En outre, la tomosynthèse peut également être utilisée pour le contrôle précis des biopsies mammaires peu invasives.

L'échographie mammaire est une partie importante de l'imagerie mammaire. Il est indiqué dans la détection précoce comme méthode principale 1) chez les jeunes femmes 2) les femmes à haut risque de moins de 40 ans et 3) comme procédure complémentaire, en plus de la mammographie, dans les cas de parenchyme mammaire dense observé par la mammographie [100]. Dans le cas d'une détection précoce intensifiée chez les patientes à risque élevé, l'échographie mammaire est recommandée tous les 6 à 12 mois [101]. L'échographie est l'imagerie de choix pour les lésions liquides. L'échographie est incontestablement d'une grande importance dans la différenciation des kystes et des résultats focaux solides. En établissant des critères clairs de malignité des foyers solides, il est également possible de faire la distinction entre les lésions bénignes et malignes avec une certitude diagnostique relativement élevée [102].

1.8.2 Bilan pathologique

Pour donner suite à la radiologie, une cytologie par aspiration, une biopsie liquide ou tissulaire peuvent être réalisées.

La cytologie par aspiration à l'aiguille fine (FNAC) est une méthode de diagnostic mini-invasive par laquelle une aiguille fine est utilisée pour aspirer des cellules de la lésion suspectée. Le matériel aspiré est immédiatement étalé sur une lame de verre ou utilisé pour faire une immunocytochimie (ICC). La cytologie par aspiration peut être réalisée par palpation ou échographie pour cibler avec précision la lésion. La FNAC est une méthode rapide qui nécessite peu de matériel pour le diagnostic du cancer. Lorsque la palpation et les résultats radiologiques indiquent clairement la nécessité d'une ablation chirurgicale primaire de la tumeur, la FNAC peut être une option suffisante pour établir le diagnostic [106]. L'inconvénient des échantillons FNAC est que le matériel tumoral est constitué d'un mélange désorganisé de cellules aspirées et, par conséquent, les tumeurs non invasives ne peuvent pas être distinguées du carcinome invasif [107]. Dans le contexte métastatique, la FNAC peut parfois être le seul choix de diagnostic.

Avec **la technique de biopsie à l'aiguille**, une biopsie tissulaire est prélevée et fixée au formol. Après son inclusion en paraffine, des coupes sont réalisées, montées sur des lames de verre puis sont systématiquement colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (HE) pour évaluation pathologique. L'avantage des biopsies est que le tissu et son architecture sont préservés, ce qui permet une

évaluation morphologique du type de tumeur et du grade histologique. Une architecture préservée permet également de différencier le carcinome in situ du carcinome invasif [108].

L'autre avantage est que sur ces biopsies, peut être réalisée une coloration immunohistochimique supplémentaire. Ainsi, pour tous les cancers du sein, un panel de biomarqueurs (récepteur d'œstrogène (ER), récepteur de progestérone (PR), HER2, et parfois KI67 également selon le pays) est systématiquement évalué. Selon les directives internationales, l'évaluation du biomarqueur doit être effectuée soit sur une biopsie soit sur un échantillon de résection, et pas uniquement sur du matériel de cytologie [111-113].

Les biopsies liquides permettent la détection de cellules tumorales circulantes dans le sang dans certains cancers précoces et dans la majorité des cancers avancés [109]. Bien que plusieurs investigations prospectives aient été réalisées, il n'existe pas encore de preuves d'une mise en œuvre dans la pratique clinique [110].

Il faut noter que seul le compte rendu anatomopathologique permettra de donner le type histologique, le grade et le stade du cancer.

a. Type histologique

La tumeur du sein peut être non invasive ou invasive. Des tumeurs du sein non invasives, le carcinome canalaire in situ (CCIS) est le plus courant et représente environ 85 % des carcinomes in situ. Le CCIS se présente généralement comme des microcalcifications détectables à la mammographie. Le CCIS est caractérisé par une prolifération intra canalaire de l'épithélium malin. Les lésions CCIS de haut grade ne posent généralement aucun problème de diagnostic. Cependant, une petite lésion de bas grade peut être difficile à distinguer d'une hyperplasie canalaire atypique et par conséquent conduire à une grande variabilité inter-observateur avec à la fois des sous- et sur interprétations [111]. Ces lésions sont fréquemment détectées par dépistage mammographique et posent un défi diagnostique [112].

Le carcinome lobulaire in situ (LCIS) est la prolifération de cellules néoplasiques provenant des UCLT et qui vont s'étendre jusqu'aux acini. La E-cadhérine, une glycoprotéine transmembranaire joue un rôle dans l'adhésion cellulaire et dans la régulation des voies de signalisation cellulaires

telle que les voies de signalisation des caténines. La perte d'expression de la E-cadhérine est associée à la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) [60]. De plus, la perte de E-cadhérine ou une altération de sa fonction, provoquée par l'inactivation du gène CDH1 qui code pour la protéine E-cadhérine., est un trait caractéristique des lésions lobulaires [58]. Le LCIS est une lésion précurseur d'un cancer invasif avec un faible risque d'évolution vers un cancer lobulaire invasif [114]. Elle n'est pas classée comme pré-cancéreux et ne nécessite pas d'excision chirurgicale [115-116].

Le carcinome invasif le plus fréquent est un adénocarcinome et 80 % sont de type canalaire infiltrant. Les carcinomes invasifs du sein comprennent un large éventail de phénotypes morphologiques et sont classés en différents sous-types histologiques selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS) [117]. Le plus grand groupe de cancers du sein invasifs est classé comme carcinome invasif non spécifique (NST), précédemment appelé carcinome canalaire infiltrant ou carcinome canalaire invasif. Le carcinome lobulaire invasif constitue le deuxième groupe le plus courant et, avec le carcinome invasif NST, ces groupes constituent environ 95 % de toutes les tumeurs du sein. Les tumeurs du sein moins fréquentes et présentant d'autres caractéristiques sont en outre classées en carcinome cribriforme, adénocarcinome apocrine, carcinome micropapillaire invasif et carcinome métaplasique. L'OMS a classé plusieurs autres catégories de tumeurs du sein ayant une morphologie caractéristique [118]. Les néoplasmes papillaires, notamment le carcinome papillaire encapsulé, le carcinome papillaire solide et le carcinome papillaire intra canalaire, sont classés séparément et ont un aspect histopathologique complexe [119].

b. Grade histologique

L'évaluation morphologique et le stade tumoral font partie du diagnostic histopathologique des carcinomes mammaires invasifs. La première méthode décrite pour le classement des tumeurs par Bloom et Richardson a ensuite été modifiée par Elston et Ellis [119-120]. Le grade de la tumeur est un facteur pronostique majeur dans le cancer du sein invasif [121-122] et est régulièrement évalué pour toutes les tumeurs invasives du sein par un comptage manuel des mitoses qui, avec la formation de tubules et le pléomorphisme nucléaire donnent à la tumeur le grade histologique de Nottingham (NHG). L'activité mitotique est évaluée en comptant les mitoses jusqu'à récemment

dans 10 champs de forte puissance, mais depuis les dernières recommandations de l'OMS de 2019, les mitoses sont comptées dans une zone définie en mm² [119,122]. Des décomptes mitotiques précis reposent sur une fixation et une préparation optimale des tissus. Chacune des trois caractéristiques se voit attribuer un score numérique de 1 à 3. Ces trois scores sont ajoutés à un score total (3 à 9) et à un classement final de la tumeur de 1 à 3. Un grade plus élevé reflète une tumeur plus agressive où les cellules sont peu différenciées. La reproductibilité des qualités faibles (grade 1) par rapport aux qualités élevées (grade 3) est relativement simple. Cependant, les défis de classification se situent au sein du grade intermédiaire (grade 2). Les tumeurs de grade 2 comprennent probablement un mélange de tumeurs de bas et de haut grade et n'ont qu'une signification clinique limitée [122]. En outre, des études sur l'expression génique ont montré que le grade reflète mieux « la composition moléculaire du cancer du sein » que l'état ganglionnaire ou la taille de la tumeur [119,122].

c. Système de classification TNM et stade tumoral

Outre l'âge de la patiente, le grade de la tumeur, le sous-type histologique, l'état des marges et l'invasion lymphovasculaire, le facteur pronostique le plus important reste le stade de la maladie, qui est intégré dans le système de classification TNM des tumeurs du sein. La classification TNM est une classification internationale qui permet d'apprécier le stade évolutif d'un cancer. Cette dernière est basée sur trois indicateurs : le T qui côtoie pour la tumeur, le N qui désigne les « nodes » ou ganglions en anglais, et le M désigne la présence ou non des métastases. Chaque lettre est associée à un chiffre et plus le chiffre est grand, plus la gravité est grande [122-123]. On a deux types de TNM : Le TNM clinique (cTNM) est basé sur l'examen physique et les études radiologiques tandis que le TNM pathologique (pTNM) est basé sur l'examen histopathologique d'une pièce tumorale chirurgicale (T) et des ganglions lymphatiques (N). La taille de la tumeur est classée en T1 (≤ 2 cm), T2 (> 2 cm mais ≤ 5 cm), T3 (> 5 cm) et T4 (tumeur s'étendant à la paroi thoracique et/ou à la peau). L'atteinte ganglionnaire est divisée en N0 (pas de métastases ganglionnaires régionales ou cellules tumorales isolées), N1 (micrométastases ou métastases dans 1 à 3 ganglions lymphatiques homolatéraux), N2 (métastases dans 4 à 9 ganglions lymphatiques ipsilatéraux) et N3 (métastases dans plus de 10 ganglions lymphatiques homolatéraux) [124]. La présence de métastases à distance est classée M1 et leur absence de métastases M0 ; la plupart des cancers du sein peuvent être définis comme Mx (état des métastases à distance inconnu) puisque

l'imagerie des organes pour les métastases à distance n'est pas incluse dans le bilan de la plupart des cas de cancer du sein aujourd'hui.

Dans le récent système de classification TNM de l'American Joint Committee on Cancer (AJCC), les informations anatomiques TNM sont combinées avec la biologie intrinsèque de la tumeur dans un « stade pronostique du cancer du sein » [122-123]. Outre T, N et M, les biomarqueurs prédictifs (ER, PR et HER2) et le grade sont inclus pour la stratification de la prédiction des résultats.

d. Stadification de la tumeur résiduelle après traitement néoadjuvant

La stadification pathologique de la charge tumorale résiduelle est cruciale pour l'évaluation de l'effet du traitement néoadjuvant. La réponse pathologique complète (pCR) a été largement utilisée comme critère d'évaluation dans les essais néoadjuvants et est associée à un meilleur pronostic [125], en particulier pour HER2- (> 5 cm) et T4 (tumeur s'étendant à la paroi thoracique et/ou à la peau). L'évaluation de l'atteinte ganglionnaire et de la présence de métastases à distance reste identique à celle décrite ci-dessus. La pCR est définie comme l'absence de tumeur invasive résiduelle dans le sein et les ganglions lymphatiques axillaires [124]. Cependant, en cas d'absence de réponse complète au traitement, on observe la quantité de tissu tumoral restant suite au traitement ou charge tumorale résiduelle. La charge tumorale résiduelle peut ne montrer aucun changement apparent dans la zone tumorale ou montrer une réduction significative avec seulement quelques amas de cellules tumorales résiduelles ou des cellules dispersées : cette situation est classée comme une réponse partielle sur le plan pathologique [125].

La classification actuelle de l'OMS des tumeurs du sein recommande l'évaluation standardisée de la charge résiduelle de cancer (RCB), qui prend en compte la taille de la tumeur primaire, le pourcentage de tissu tumoral invasif résiduel, le nombre de ganglions lymphatiques résiduels positifs ainsi que les métastases [126-128]. Ces paramètres sont utilisés pour calculer un indice RCB et l'un des quatre scores de risque (RCB-0 à RCB III) est déterminé, ce qui fournit des informations pronostiques sur différents sous-types biologiques de cancer du sein [132].

e. Type moléculaire

La classification moléculaire des cancers du sein a beaucoup affiné la classification morphologique. Le profilage de l'expression génique a classé le cancer du sein en différents sous-types moléculaires, à savoir les cancers du sein à récepteurs positifs (Luminal A, Luminal B, Normal like et HER-2 (récepteur du facteur de croissance épidermique humain) 2 positifs) et ceux à récepteurs négatifs (le Cancer du sein triple négatif ou Basal like) (Figure 1.12) [131]. Lehmann et coll. ont par la suite identifié différents sous-groupes dans le cancer du sein triple négatif et ont nommé ces sous-types de cancer du sein triple négatif : Basal like-1, Basal like-2, Immunomodulatoire, Mésoenchymateux, Mésoenchymateux Stem Cell like et Luminal Androgen en fonction de l'expression de gènes distincts [131]. Les données collectives globales ont identifié que ces sous-types de cancer du sein ont des comportements histopathologiques et cliniques différents et sont associés à différents groupes d'âge (jeune âge, femmes pré ménopausées) et différentes ethnies (asiatiques et afro-américaines) [132-134]. En effet, les sous-types HER2 positifs et le cancer du sein triple négatif qui présentent un potentiel métastatique plus élevé avec un taux de rechute élevé sont fréquents chez les jeunes femmes, les femmes pré ménopausées, les femmes afro-américaines et asiatiques [132-134].

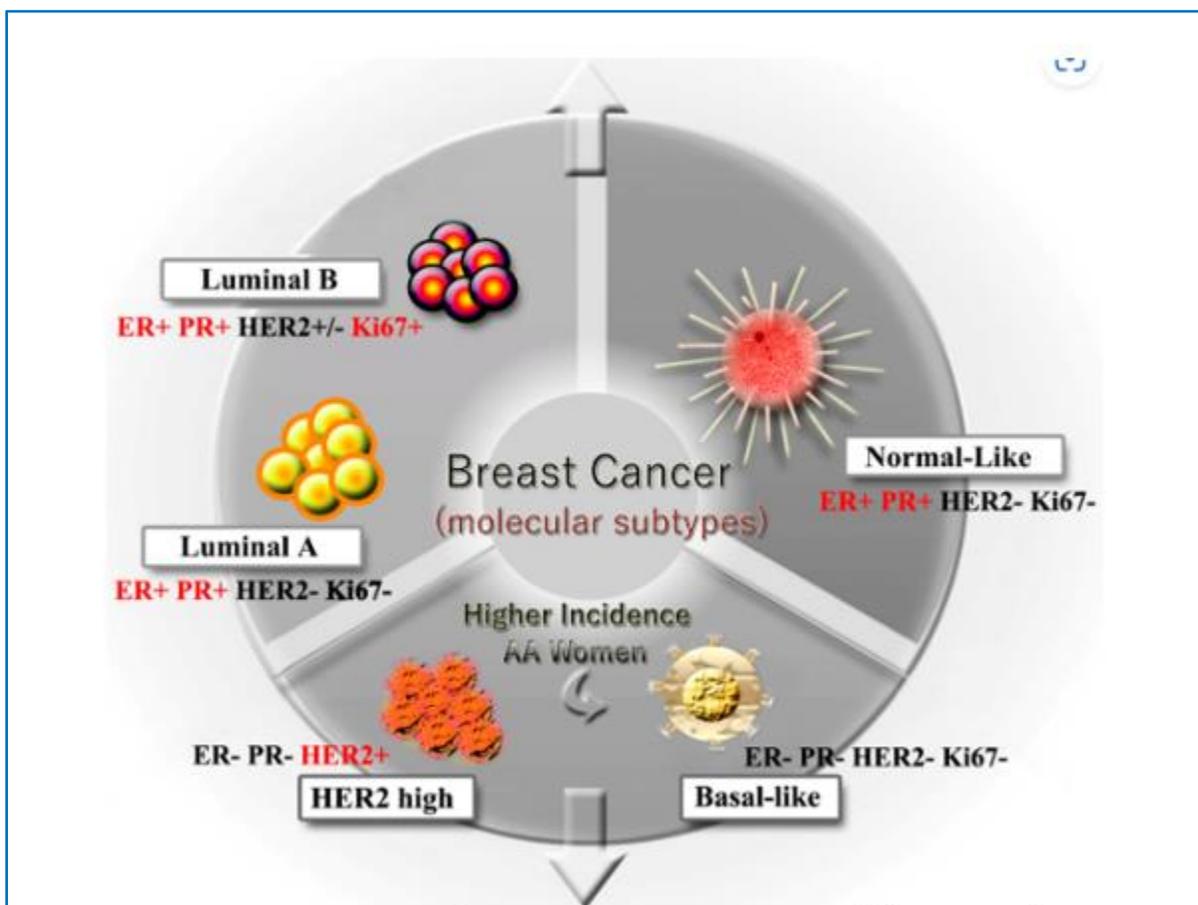


Figure 1.12 : Le cancer du sein comporte cinq sous-types moléculaires en fonction de l'expression différentielle des gènes. Charan, Manish. (2020). *International Journal of Molecular Sciences*.

Luminal A (récepteur hormonal + et HER2 -), luminal B (récepteur hormonal + et HER2 - / +), cancer du sein de type basal ou triple négatif (CSTN) (récepteur hormonal - et HER2 -), enrichi en HER2 (récepteur hormonal - et HER2 - / +), de type normal (récepteur hormonal + et HER2 -)

1.9 Traitements du cancer du sein

Il existe plusieurs thérapies disponibles pour le traitement du cancer du sein, notamment la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'endothérapie et l'immunothérapie [134-135]. Malgré la disponibilité de ces thérapies, l'incidence et la mortalité du cancer du sein restent élevées [135]. Cependant, les faibles taux de récurrence locale à l'ère moderne sont dus aux progrès dans la prise en charge multidisciplinaire du cancer du sein. Ces progrès sont : le traitement de la maladie à un stade précoce grâce au dépistage, l'amélioration de l'imagerie permettant une sélection appropriée des patientes pour la conservation du sein, les techniques chirurgicales améliorées, l'évaluation pathologique des marges, et les techniques de radiothérapie améliorées [134]. De plus, la chimiothérapie ou les thérapies systémiques endocriniennes, lorsqu'elles sont indiquées, sont largement utilisées.

1.9.1 Chirurgie

La chirurgie demeure le principal moyen de traitement local et régional du cancer du sein. Au cours de la première moitié du XXe siècle, les femmes diagnostiquées avec un cancer du sein étaient couramment traitées par une mastectomie radicale. Bien que l'ablation chirurgicale de la tumeur soit le principal traitement établi pour le cancer du sein précoce, les approches chirurgicales se sont considérablement améliorées au cours des dernières décennies. Il existe des preuves solides d'essais randomisés avec un suivi à long terme que la chirurgie mammaire conservatrice suivie d'une radiothérapie donne des résultats de survie équivalents à ceux d'une mastectomie pour les cancers du sein précoce [136-138]. Des études récentes ont toutefois signalé une augmentation des effets spécifiques au cancer du sein et de la survie globale après une chirurgie conservatrice du sein avec radiothérapie par rapport à mastectomie sans radiothérapie [139-141]. La chirurgie mammaire conservatrice est recommandée à condition que des marges saines puissent être

obtenues avec un résultat esthétique acceptable [141]. Pour les tumeurs de grande taille, lorsque la chirurgie primaire ne peut pas répondre à ces critères, le patiente peut être traité par thérapie préopératoire (néoadjuvante) afin d'obtenir un rétrécissement de la tumeur et par la suite autoriser une chirurgie mammaire conservatrice (voir section pour la chimiothérapie néoadjuvante).

Pour les patientes présentant des métastases à distance au moment du diagnostic (stade IV), le traitement est palliatif et présente des stratégies chirurgicales propre à la patiente.

L'état des ganglions lymphatiques axillaires est l'un des facteurs pronostiques les plus importants. Il fournit des informations utiles pour les décisions thérapeutiques [92, 100,11]. L'une des avancées techniques majeures en chirurgie mammaire a été l'introduction de la biopsie du ganglion sentinelle pour remplacer la dissection conventionnelle des ganglions axillaires. Le ganglion sentinelle est le premier ganglion lymphatique recevant le drainage lymphatique de la tumeur et est identifié avec un produit isotope radioactif injecté. Il s'agit d'une méthode bien établie et reproductible [139,142]. Pour les patientes sans ganglions palpables, le bilan axillaire est réalisé grâce à biopsie du ganglion sentinelle. Cette technique est associée à un risque significativement plus faible de lymphœdème (<2%–3%) que la dissection complète des ganglions axillaires (15%–20%) [143]. La procédure est précise à plus de 98% lorsque les résultats sont négatifs, et aucune dissection supplémentaire n'est nécessaire. De plus, la biopsie du ganglion sentinelle peut être utilisée chez les patientes après une bonne réponse à la chimiothérapie néoadjuvante. L'essai ACOSOG Z1071 a démontré qu'elle est réalisable après la chimiothérapie néoadjuvante et ne présente que 12,6% de faux négatifs [142,143].

1.9.2 Radiothérapie

La radiothérapie est l'utilisation de rayonnements ionisants pour la prise en charge d'une maladie maligne dans le but d'éradiquer la tumeur résiduelle tout en épargnant les tissus normaux environnants. Les tissus normaux peuvent être épargnés d'une part en focussant le faisceau sur la tumeur et d'autres part en administrant la dose d'irradiation en plusieurs fractions. En effet, la dose totale de radiothérapie peut être répartie sur plusieurs séances (fractionnement) pour permettre aux tissus sains de récupérer entre les séances et réduire ainsi les effets secondaires. Cette approche permet de maximiser l'efficacité du traitement sur les cellules cancéreuses tout en minimisant les

dommages aux tissus normaux. L'exposition aux rayonnements ionisants provoque l'arrêt du cycle cellulaire, l'induction de mutations, la transformation et la mort cellulaire [144].

La radiothérapie cible l'ADN et les radiations entraînent des cassures double brin de l'ADN [145]. La sensibilité aux rayonnements cellulaires varie en fonction de la phase du cycle cellulaire dans laquelle se trouve la cellule : la phase de mitose étant la plus sensible aux radiations.

Les données provenant de méta-analyses soutiennent que la radiothérapie adjuvante réduit le risque de lésions locales, de récurrence et de mortalité par cancer du sein [146]. La radiothérapie du sein après une chirurgie mammaire conservatrice réduit le risque de récurrence de 50 % après 10 ans et le risque de mortalité par cancer du sein de 15% après 15 ans [144-146]. La radiothérapie après une chirurgie mammaire conservatrice pour le cancer du sein précoce, à faible risque et ER-positif est déconseillée chez les patientes plus âgées [145]. En effet, les patientes plus âgées présentant un cancer du sein précoce à faible risque peuvent avoir un risque global de récurrence locale plus faible, ce qui signifie que les bénéfices absolus de la radiothérapie peuvent être moins importants que chez les patientes plus jeunes. De plus, les patientes plus âgées sont plus susceptibles d'avoir des comorbidités telles que des problèmes cardiovasculaires, des troubles pulmonaires ou d'autres problèmes de santé. La radiothérapie peut augmenter le risque de complications cardiovasculaires à long terme, ce qui peut être une considération importante chez ces patientes.

La radiothérapie a également un rôle avéré dans le traitement du cancer du sein de stade 0 (carcinome canalaire in situ) car malgré son stade précoce, le CCIS peut présenter un risque de récurrence locale s'il n'est pas traité adéquatement. La radiothérapie sur le CCIS vise à détruire les éventuelles cellules cancéreuses restantes dans la zone chirurgicalement traitée et à réduire ainsi le risque de récurrence locale. Les progrès dans les techniques chirurgicales et de radiothérapie ont permis d'améliorer le contrôle local du CCIS, avec un taux de contrôle à long terme estimé entre 90% et 95%.

Pour les patientes présentant des ganglions positifs, la radiothérapie locorégionale post-mastectomie réduit de trois quart le risque de récurrence. Pour les patientes sans ganglions, la radiothérapie locorégionale n'est généralement pas recommandée après une mastectomie car l'absence d'envahissement ganglionnaire est souvent associée à un risque réduit de récurrence locale

du cancer du sein et en évitant la radiothérapie chez les patientes présentant un faible risque de récurrence locale, on minimise également le risque de complications associées à ce traitement [145-146].

1.9.3 Thérapie Endocrine

La thérapie endocrine est importante dans le traitement du cancer du sein, en particulier des cancers du sein hormono-sensibles qui expriment les récepteurs hormonaux, tels que les récepteurs aux œstrogènes (ER) et/ou aux progestérones (PR) [147]. La thérapie endocrine est généralement bien tolérée et peut être utilisée seule ou en combinaison avec d'autres modalités thérapeutiques, telles que la chirurgie, la radiothérapie ou la chimiothérapie. Son efficacité a été démontré dans le traitement du cancer du sein hormono-sensible et joue un rôle crucial dans la gestion de la maladie [149]. La thérapie endocrine est dite adjuvante lorsqu'elle est administrée après la chirurgie pour réduire le risque de récurrence du cancer du sein. Elle peut être utilisée pendant plusieurs années chez les patientes atteints de cancers du sein à récepteurs hormonaux positifs à un stade précoce pour réduire le risque de rechute [147,151]. Voici un aperçu des différentes thérapies endocrines utilisées dans le cancer du sein :

Les inhibiteurs de l'aromatase (IA) : L'aromatase est une enzyme clé dans la biosynthèse des œstrogènes. Les IA vont bloquer la production d'œstrogènes chez les femmes ménopausées en inhibant l'enzyme aromatase, qui convertit les androgènes en œstrogènes dans les tissus adipeux [151]. Cette réduction des niveaux d'œstrogènes supprime la croissance des cellules cancéreuses du sein qui dépendent des œstrogènes pour leur croissance, ce qui en fait une stratégie efficace dans le traitement du cancer du sein hormono-dépendant. Les inhibiteurs de l'aromatase comprennent le létrozole, l'anastrozole et l'exémestane, et sont principalement utilisés dans le traitement du cancer du sein hormono-sensible chez les femmes ménopausées [150,151].

Les modulateurs sélectifs des récepteurs d'œstrogènes (SERM) : Les SERM sont des médicaments qui agissent en se liant aux récepteurs aux œstrogènes présents sur les cellules cibles. Contrairement aux œstrogènes naturels qui agissent comme agonistes (activateurs) dans de nombreux tissus, les SERM ont la capacité d'agir comme agonistes ou antagonistes en fonction du type de tissu dans lequel ils se trouvent. Par exemple, dans les tissus mammaires, les SERM sont des antagonistes et peuvent bloquer la prolifération cellulaire induite par les œstrogènes. Ce qui en

fait des agents thérapeutiques efficaces dans le traitement du cancer du sein hormono-dépendant [147]. Le tamoxifène est le SERM le plus couramment utilisé dans le traitement du cancer du sein hormono-sensible, en particulier chez les femmes pré-ménopausées [148].

Les modulateurs sélectifs des récepteurs de la progestérone (SPRM) : Les SPRM agissent de manière similaire aux SERM mais en se liant spécifiquement aux récepteurs de la progestérone. Le fulvestrant est un exemple de SPRM utilisé dans le traitement du cancer du sein avancé chez les femmes ménopausées, en particulier en cas de résistance au tamoxifène ou aux inhibiteurs de l'aromatase [149].

Les inhibiteurs de la kinase de signalisation : Ces médicaments ciblent les voies de signalisation cellulaires impliquées dans la croissance tumorale, y compris les voies activées par les récepteurs aux œstrogènes. Par exemple, le palbociclib, l'abémaciclib et le ribociclib sont des inhibiteurs de la kinase cycline-dépendante 4/6 (CDK4/6) qui sont souvent utilisés en combinaison avec la thérapie endocrine dans le traitement du cancer du sein métastatique hormono-sensible [150,146]. Les kinases CDK4 et CDK6 sont des enzymes impliquées dans la régulation du cycle cellulaire. Ces kinases sont responsables de la phosphorylation de la protéine Rb (protéine de rétinoblastome), ce qui régule le passage de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire [151]. Par conséquent, le palbociclib en inhibant spécifiquement les kinases CDK4/6, bloque la progression du cycle cellulaire en phase G1 et entraîne une suppression de la prolifération des cellules cancéreuses du sein

Les agonistes de la gonadolibérine, également appelés agonistes de la GnRH (gonadotrophin-releasing hormone), sont des médicaments qui agissent en stimulant les récepteurs de la GnRH dans l'hypophyse antérieure du cerveau. Dans le cancer du sein hormono-sensible, les agonistes de la GnRH agissent en stimulant initialement la production de LH et de FSH, mais avec une utilisation prolongée, ils provoquent une suppression de la production d'œstrogènes chez les femmes pré-ménopausées. Cette suppression peut aider à ralentir la croissance tumorale ou à empêcher la récurrence de la maladie.

La majorité des tumeurs du sein expriment ER et/ou PR et sont donc traitées par thérapie endocrinienne pendant 5 à 10 ans [147]. Pour le cancer du sein ER-positif, plusieurs essais

randomisés ont démontré une réduction substantielle des taux de récurrence et de mortalité jusqu'à 15 ans après un traitement adjuvant au tamoxifène [148]. La sensibilité au traitement endocrinien corrèle avec la positivité aux récepteurs des œstrogènes par IHC [149].

Chez les patientes pré ménopausées présentant une activité œstrogénique ovarienne significative, la durée du traitement standard au tamoxifène est de 5 ans [148-151]. Chez les patientes ménopausées, le tamoxifène et les IA sont des options de traitement en monothérapie ou en séquentiel [151]. Dans une méta-analyse réalisée en 2015, des études comparant 5 ans d'IA à 5 ans de tamoxifène ont montré une réduction significative des récurrences avec les IA [147-149].

La thérapie endocrinienne est recommandée pendant au moins 5 ans ; cependant, les résultats de l'étude ATLAS randomisée ont indiqué une amélioration supplémentaire de 3% de la mortalité par cancer du sein avec 10 ans de tamoxifène plutôt que 5 [148].

Les signatures génomiques sont désormais incluses dans les recommandations internationales sur les options de traitement du cancer du sein précoce ER-positif avec atteinte limitée des ganglions lymphatiques [145].

1.9.4 Thérapie dirigée contre l'HER2

La thérapie ciblée HER2 dans le cancer du sein est spécifiquement destinée aux tumeurs qui surexpriment ou ont une amplification du récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2/neu) [151]. Elle a considérablement amélioré les résultats cliniques pour les patientes atteints de cancer du sein HER2-positif et est souvent utilisée en combinaison avec d'autres traitements, tels que la chimiothérapie, la radiothérapie ou la chirurgie. Voici un aperçu des principaux types de thérapie ciblée HER2 dans le cancer du sein [153]

Trastuzumab (Herceptin) : Trastuzumab est un anticorps monoclonal humanisé qui se lie spécifiquement au domaine extracellulaire du récepteur HER2, empêchant ainsi l'activation du récepteur par son ligand, le facteur de croissance épidermique humain (EGF) [152]. Cela entraîne une inhibition de la signalisation cellulaire et réduit la prolifération des cellules cancéreuses qui surexpriment HER2. Il est utilisé dans le traitement adjuvant et métastatique du cancer du sein HER2-positif, souvent en combinaison avec une chimiothérapie [153].

Pertuzumab (Perjeta) : Pertuzumab est un autre anticorps monoclonal qui se lie à HER2, et agit de manière synergique avec Trastuzumab. Ensemble, ces deux anticorps ciblent HER2 à différents sites, ce qui entraîne un blocage plus complet de la signalisation HER2 et une augmentation de l'efficacité thérapeutique. HER2 forme souvent des homodimères (associations de deux récepteurs HER2), ainsi que des hétérodimères avec d'autres membres de la famille des récepteurs HER (comme HER3) [151]. Ces dimères sont essentiels pour l'activation de la voie de signalisation HER2. Pertuzumab se lie spécifiquement au domaine extracellulaire de HER2, empêchant ainsi la formation de ces dimères et inhibant la signalisation cellulaire. Il est approuvé pour une utilisation en combinaison avec trastuzumab et une chimiothérapie dans le traitement adjuvant et métastatique du cancer du sein HER2-positif.

Inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI) : Ces médicaments, tels que le lapatinib et le neratinib, ont pour mode d'action l'inhibition sélective de l'activité de la tyrosine kinase du récepteur HER2 et également du récepteur épidermique du facteur de croissance (EGFR) [151]. Le lapatinib inhibe par exemple la voie de signalisation HER2 en bloquant spécifiquement la phosphorylation de la tyrosine kinase de HER2.

Ils sont utilisés dans le traitement du cancer du sein HER2-positif, en particulier en cas de résistance à d'autres thérapies ciblées.

Ado-trastuzumab emtansine (Kadcyla) : Il s'agit d'un anticorps conjugué à un médicament. Il combine un anticorps monoclonal anti-HER2, similaire à trastuzumab (Herceptin), avec une molécule de chimiothérapie, DM1 (médiateur de la maytansine 1). Cet anticorps cible spécifiquement les cellules tumorales HER2-positives. Kadcyla agit en ciblant spécifiquement les cellules tumorales HER2-positives avec son anticorps anti-HER2, puis en libérant la chimiothérapie à l'intérieur de ces cellules, ce qui entraîne la mort des cellules tumorales [151]. Il est utilisé dans le traitement du cancer du sein métastatique HER2-positif après échec d'au moins un traitement à base de trastuzumab et de chimiothérapie.

Dans le cas de cancer du sein HER2-positif, le trastuzumab améliore la survie des patientes atteints de cancer du sein à un stade précoce et doit être administré en plus de la chimiothérapie [151]. Bien que le trastuzumab soit efficace dans le traitement de ce type de cancer, il peut également

entraîner des effets secondaires, dont l'insuffisance cardiaque. L'insuffisance cardiaque associée au trastuzumab est généralement réversible mais peut être grave dans certains cas. Le mécanisme exact de cette cardiotoxicité n'est pas entièrement compris mais il faut noter que le récepteur HER2 est également exprimé dans les cellules cardiaques, et l'activation prolongée de ce récepteur par le trastuzumab peut entraîner une dysfonction cardiaque [152]. En raison du risque accru d'insuffisance cardiaque avec des schémas thérapeutiques contenant de l'anthracycline et du trastuzumab, des schémas thérapeutiques contenant du taxane sans anthracycline peuvent être utilisés [152]. Aucun essai n'a comparé les différents schémas thérapeutiques contre l'HER2 ; par conséquent, pour les patientes présentant le plus grand risque, un schéma standard contient une anthracycline suivie d'un taxane avec du trastuzumab. Peu importe la chimiothérapie utilisée, le trastuzumab doit être poursuivi pendant 1 an [151], avec une surveillance cardiaque tous les 3 mois. Les cliniciens peuvent également envisager d'ajouter le pertuzumab, un anticorps monoclonal dirigé contre une zone différente du récepteur HER2 par rapport au trastuzumab.

1.9.5 Thérapie pour la maladie métastatique

La maladie métastatique n'est généralement pas considérée comme curable, des lors, l'objectif de la thérapie dans le contexte de la maladie métastatique est de prolonger la vie tout en minimisant les symptômes ou les effets secondaires. Les patientes atteintes d'un cancer du sein ER-positif ou PR-positif et HER2-négatif reçoivent généralement une thérapie endocrinienne avant d'être placées sous une chimiothérapie. Des données récentes soutiennent également l'ajout de palbociclib, un inhibiteur oral des kinases dépendantes des cyclines 4 et 6, en association avec le létrozole en première ligne [152] et le fulvestrant en deuxième ligne [153] chez les patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique ER-positif. Les patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique HER2-positif devraient recevoir un taxane avec du trastuzumab et du pertuzumab en traitement de première ligne [49]. Les thérapies ultérieures peuvent inclure le trastuzumab-émantine [152], le lapatinib, ou le trastuzumab associé à d'autres agents chimio thérapeutiques. La seule classe d'agents disponible pour les patientes atteintes d'un cancer du sein ER-négatif, PR-négatif et HER2-négatif est la chimiothérapie.

Indépendamment de la décision thérapeutique, la réponse à la thérapie chez les patientes atteintes de maladie métastatique devrait être régulièrement évaluée par des évaluations cliniques et par imagerie.

1.9.6 Chimiothérapie

La chimiothérapie permet de supprimer d'éventuelles cellules tumorales résiduelles non détectables et de prévenir le risque de récurrence (Figure 1.13). La diminution du risque de rechute suite à la chimiothérapie varie de 5 % à plus de 50% selon les cas [158]. Elle doit débiter après la chirurgie et serait moins efficace au-delà de 8 semaines de traitement [159]. Il existe deux types de chimiothérapies : la chimiothérapie adjuvante et la chimiothérapie néoadjuvante. La chimiothérapie adjuvante est administrée après la chirurgie ou d'autres traitements locaux, tels que la radiothérapie. Elle a pour objectif principal de cibler les cellules cancéreuses qui pourraient avoir échappé au traitement local (comme la chirurgie) et qui pourraient être présentes dans d'autres parties du corps. Elle vise à réduire le risque de récurrence du cancer et à améliorer les chances de survie à long terme. La chimiothérapie néoadjuvante est administrée avant la chirurgie ou d'autres traitements locaux. Son objectif principal est de réduire la taille de la tumeur initiale avant la chirurgie. Elle permet de rendre les tumeurs initialement inopérables en tumeurs opérables, ou de permettre une chirurgie moins invasive. Elle donne aussi la possibilité de tester la sensibilité tumorale aux médicaments. Elle offre alors une opportunité unique d'évaluer la réponse de la tumeur aux traitements systémiques, tels que la chimiothérapie ou la thérapie ciblée, avant la chirurgie. Cela permet aux cliniciens de déterminer l'efficacité du traitement et d'adapter les options thérapeutiques en fonction de la réponse de la tumeur. Notre étude est axée sur la chimiothérapie néoadjuvante.

La Chimiothérapie adjuvante a essentiellement pour but de réduire le risque d'extension métastatique. Elle est généralement recommandée pour les patientes présentant un risque élevé de récurrence. Les caractéristiques clinicopathologiques suivantes peuvent être des indications de chimiothérapie : récepteurs hormonaux négatifs ; HER2 positif ; taille de la tumeur plus importante et ganglions lymphatiques positifs. Dans une méta-analyse sur le cancer du sein, les résultats ont montré que la chimiothérapie augmentait les taux de survie à 5 ans et que la poly chimiothérapie était plus efficace que la chimiothérapie en monothérapie [161]. Une autre étude a conclu que les

taux de mortalité pourraient être réduits de moitié après 6 mois de chimiothérapie à base d'anthracycline associé au tamoxifène [160]. Dans une méta-analyse des données individuelles des patientes, il a été en outre démontré que les schémas thérapeutiques combinés de taxane et d'anthracycline ou les régimes thérapeutiques d'anthracycline à forte dose ont réduit de 30% la mortalité par cancer du sein [162]. Aujourd'hui, la chimiothérapie est recommandée pour les tumeurs HER2-positives, triple-négatives et de type luminal de type B [152]. Les tumeurs lumineuses A nécessitent rarement une chimiothérapie adjuvante, sauf si la charge tumorale est élevée (T3 ou N2). En général, les tumeurs ER-négatives répondent mieux à la chimiothérapie [152-154]. Quand les indications pour la chimiothérapie adjuvante sont incertaines, des tests d'expression génique regardant l'expression des récepteurs hormonaux ainsi que celle des gènes liés à la voie des récepteurs aux œstrogènes et à la prolifération peuvent être utilisés. Dans le cas du cancer du sein, par exemple, des tests comme Oncotype DX, MammaPrint et Prosigna sont couramment utilisés pour évaluer le risque de récurrence et aider à prendre des décisions éclairées concernant la chimiothérapie adjuvante. Ces tests facilitent une approche plus personnalisée du traitement, en identifiant les patientes qui sont les plus susceptibles de bénéficier de la chimiothérapie adjuvante tout en évitant une exposition inutile à la toxicité de ce traitement chez ceux qui ne sont pas susceptibles d'en tirer un avantage significatif.

Pour le cancer du sein précoce, les schémas thérapeutiques à base d'anthracycline (par exemple épirubicine, doxorubicine) et à base de taxane (par exemple, docétaxel ou paclitaxel) sont les schémas thérapeutiques standards de chimiothérapie, et une thérapie séquentielle unique est généralement recommandée [162] (Figure 1.13). Un traitement séquentiel réduit le risque de développer les résistances. Les anthracyclines associées aux cyclophosphamides sont plus efficaces que le cyclophosphamide seul et font aujourd'hui partie des traitements standard (par exemple FAC ou fluorouracile-épirubicine cyclophosphamide). Les anthracyclines peuvent entraîner des effets secondaires graves tels qu'une mortalité cardiaque, aplasie médullaire sévère, syndrome myélodysplasique et leucémie induite [152]. L'association de taxanes et de schémas thérapeutiques à base d'anthracyclines (par exemple docétaxel-doxorubicin cyclophosphamide) présente un risque plus élevé de toxicité médullaire. Plusieurs essais suggèrent que les schémas thérapeutiques sans anthracycline (docétaxel/cyclophosphamide) pourraient être une alternative dans le cancer du sein ER-positif, HER2-négatif et triple négatif [152].

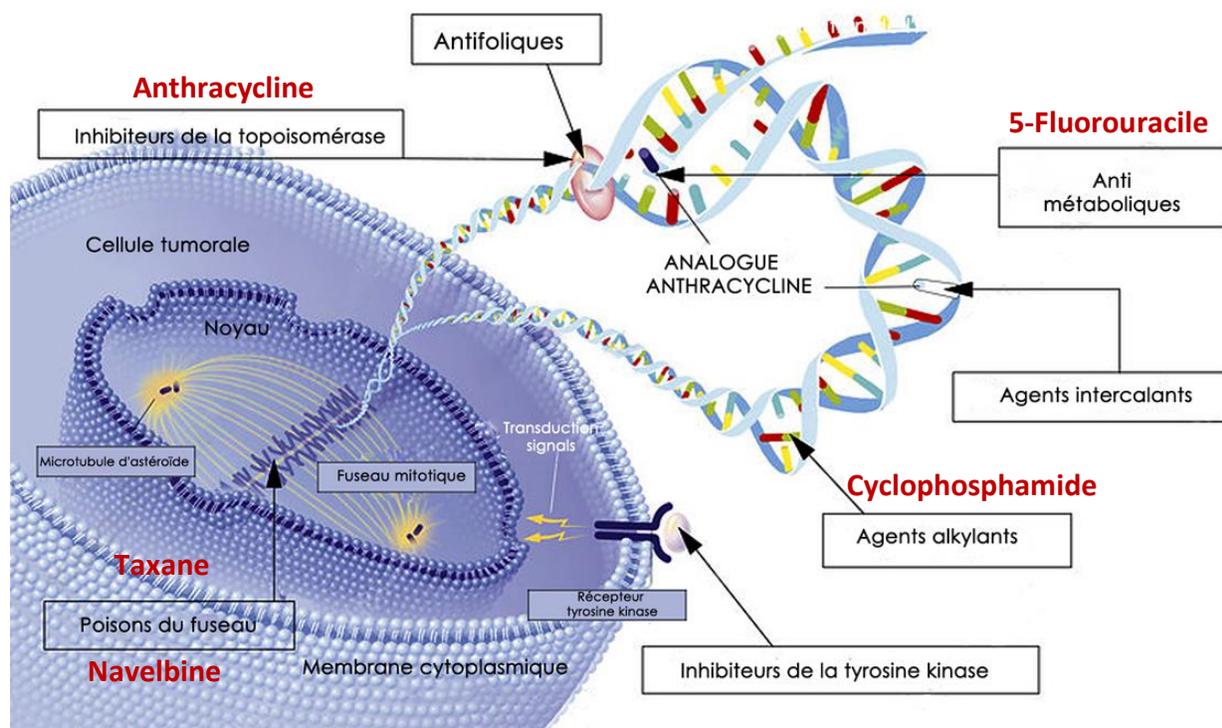


Figure 1.13 : Les Chimiothérapies et leur action sur la cellule.

Une cellule tumorale est vue en coupe. Membrane cytoplasmique avec un récepteur de tyrosine kinase à sa droite. Le noyau de la cellule tumorale est coupé pour montrer le fuseau mitotique. Une double hélice d'ADN part d'un chromosome. Sur l'ADN on voit de gauche à droite une phase de réplication bloquée par un analogue de la purine, agent intercalant. Les médicaments anticancéreux agissent à différents niveaux de la machinerie cellulaire pour empêcher la prolifération des cellules

De plus, dans le cancer du sein triple négatif précoce, l'ajout de capécitabine améliore la survie sans récurrence et la survie globale [152-154]. Par contre, au stade métastatique, la chimiothérapie ne sera pas efficace.

1.9.6.1 La chimiothérapie néoadjuvante

On parle de chimiothérapie néoadjuvante (NACT) pour décrire la chimiothérapie administrée avant la chirurgie avec pour but de réduire la taille de la tumeur et augmenter le taux de thérapie conservatrice du sein [154]. Elle permet aussi une évaluation en temps réel de la réponse tumorale à une thérapie donnée. Elle est indiquée pour traiter le cancer à un stade précoce, le cancer localement avancé, les cancers du sein inopérables, le cancer du sein triple négatif, les cancers du sein HER2-positif et les cancers inflammatoires. Actuellement, les schémas thérapeutiques standards pour le cancer du sein comprennent une anthracycline et un taxane administrés en séquence pour réduire la toxicité. D'autres agents comme le cyclophosphamide, le carboplatine, le méthotrexate et/ou le fluorouracile sont parfois inclus dans le régime [155]. Le traitement chimiothérapeutique comportera au minimum 6 cycles et devra associer anthracyclines et taxanes. En cas de surexpression de HER2, la thérapie ciblée au trastuzumab doit être administrée en néoadjuvante en même temps que les taxanes. La chimiothérapie néoadjuvante par rapport à la chimiothérapie adjuvante n'améliore cependant pas la survie sans récidive à distance ni la survie globale, mais est associée à un risque accru de récidive locale [156]. Le bénéfice le plus élevé de la chimiothérapie néoadjuvante est observé pour les tumeurs HER2 positives et triples négatives. La réponse histologique complète (pCR) dans le traitement chirurgical post chimiothérapie néoadjuvante a une valeur pronostique et est associé à une survie améliorée [157].

Les avantages d'une NACT dans le traitement du cancer du sein localement avancé sont la réduction de la progression tumorale avant la chirurgie, la diminution du taux de résistance croisée à d'autres chimiothérapies et la diminution de la morbidité liée à l'opération. Des études antérieures ont montré qu'il existe une corrélation directe entre un nombre accru de métastases ganglionnaires axillaires et une aggravation du pronostic globale sans NACT lorsque les patientes présentant des statuts ganglionnaires similaires ont été comparés [155-157]. De plus, il a été démontré que le NACT ralentit le développement mammaire de stade II/IIIA du cancer avec un taux de réponse globale d'environ 60 à 90 %, permettant une approche chirurgicale acceptable. [157]. D'autres études ont montré un taux de réponse pathologique complète compris entre 12 et 50 % selon caractéristiques de la tumeur [156]. L'efficacité du NACT dépend du type de régime utilisé. Le régime individuel est déterminé en fonction du sous-type moléculaire, du degré de tumeur, du fardeau et du risque de récidive du cancer.

Avec les preuves croissantes des bénéfices du traitement néoadjuvant, une biopsie préopératoire et un échantillon chirurgical post traitement sont nécessaires pour l'évaluation des biomarqueurs, prédire le bénéfice potentiel du traitement néoadjuvant et guider le choix du traitement. Pour les patientes dont les tumeurs répondent bien au traitement néoadjuvant, on peut obtenir une réponse complète si aucune cellule tumorale résiduelle n'est trouvée dans l'échantillon chirurgical. Si les évaluations des biomarqueurs ne sont pas précises, le patiente risque soit de recevoir un traitement potentiellement nocif sans bénéfice supplémentaire, soit de passer à côté d'un traitement ciblé comme le traitement ciblé sur HER2.

a. Anthracyclines : mécanisme d'action et toxicité

Les anthracyclines sont une classe de médicaments extraits de la bactérie *Streptomyces*. Ils restent l'un des agents chimio thérapeutiques les plus efficaces utilisés pour traiter plusieurs cancers en général et le cancer du sein en particulier [163]. Les anthracyclines les plus importantes sont la doxorubicine, la daunorubicine, l'épirubicine et l'idarubicine. La doxorubicine étant l'agent le plus couramment utilisé (Figure 1.14) [164].

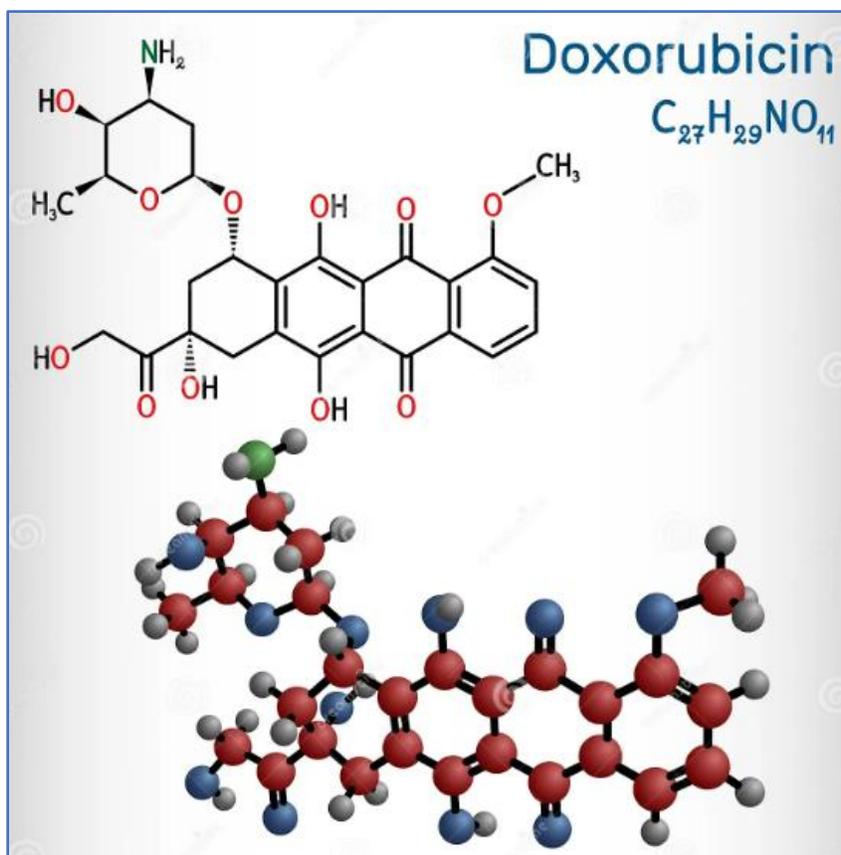


Figure 1.14 : Formule chimique et moléculaire de la doxorubicine, Tirée de American Chemical Society 2023.

La molécule de doxorubicine est un antibiotique anthracycline cytotoxique. La chaîne latérale de la doxorubicine se termine par un groupe alcool primaire

Les anthracyclines induisent une cytotoxicité et la destruction des tumeurs en s'intercalant entre les paires de bases d'ADN et inhibant l'activité de l'ADN topoisomérase II (Figure 1.15) [166]. En agissant ainsi, le médicament inhibe la synthèse de l'ADN, de l'ARN et bloque la division cellulaire, en particulier dans les zones à prolifération active comme les cellules du cancer du sein. La structure volumineuse à 4 anneaux des anthracyclines (une molécule de tétracycline avec un squelette anthraquinone) relié par une liaison glycosidique rend efficace l'intercalation entre les paires de bases d'ADN. Il a également été suggéré que la fraction quinone des anthracyclines génère des espèces oxydantes réactives qui entraînent un stress oxydatif qui va endommager l'ADN et déclencher l'apoptose cellulaire [164-166]. Bien que le mécanisme d'action de l'anthracycline en fasse un agent cytotoxique très efficace, le manque de spécificité limite son utilisation. Les deux effets cytotoxiques majeurs, tous deux dose-dépendants comprennent la myélosuppression et la cardiotoxicité [166].

Puisque la myélosuppression est réversible et peut être combattue par des mesures thérapeutiques, la cardiotoxicité reste la principale limitation à l'utilisation de fortes doses d'anthracyclines en particulier la doxorubicine. La cardiotoxicité induite par les anthracyclines dépend de la dose cumulative et peut survenir à la fois de manière aiguë et chronique. Une toxicité aiguë survient pendant ou immédiatement après l'administration du médicament et entraîne une activité électrique aberrante du cœur, l'hypotension et la vasodilatation [167]. La toxicité chronique se manifeste par une dilatation cardiomyopathie, dysfonctionnement ventriculaire gauche et éventuellement insuffisance cardiaque congestive. Le stress oxydatif et la peroxydation lipidique induits par les anthracyclines ont été impliqués comme une cause des lésions cardiaques [165-167]. Les anthracyclines ont une grande affinité pour la cardiolipine, un phospholipide présent dans les mitochondries. Cette interaction provoque des lésions cellulaires et une apoptose induite par la peroxydation lipidique ainsi qu'un stress oxydatif réactif [164]. Le tissu cardiaque qui est riche en mitochondries soit particulièrement sensible. De plus, le tissu cardiaque contient de faibles niveaux d'enzymes antioxydantes comme la catalase qui limite leur mécanisme de défense contre les

espèces réactives oxydantes [165]. Plusieurs stratégies ont été mise en place pour minimiser la cardiotoxicité et en pratique, il existe une dose maximale à vie définie de 400 à 450 mg/m² recommandé pour prévenir le développement de l'insuffisance cardiaque [166]. Par ailleurs, le dexrazoxane est un chélateur du fer qui peut également être utilisé pour augmenter la protection des tissus cardiaques.

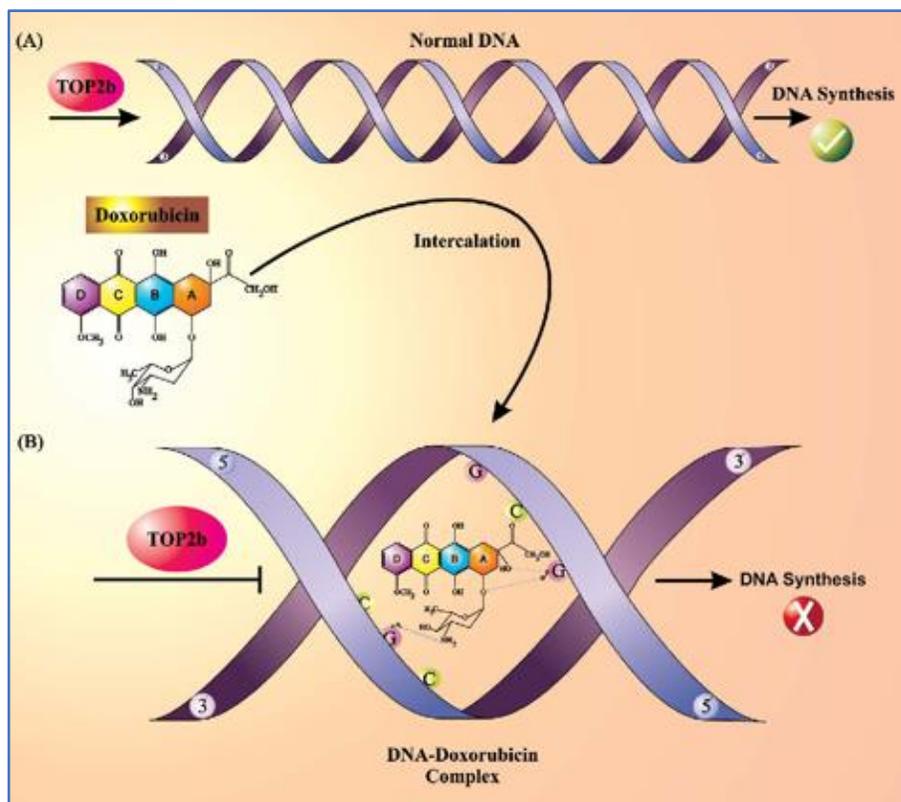


Figure 1.15 : Mode d'action de la doxorubicine. Lazar, Diana & Farcas, 2021. Tirée de *Molecular Mechanisms of Cardiotoxicity*.

Les anthracyclines ont de multiples mécanismes d'action antinéoplasiques, notamment l'intercalation de l'ADN (se coinçant entre les paires de bases de l'ADN pour perturber la structure de l'ADN) ; inhibition de la topoisomérase II; et la formation de radicaux libres.

b. Taxanes : mécanisme d'action et toxicité

Les taxanes illustré à la Figure 1.16 appartiennent à la classe des plantes diterpènes. Les taxanes induisent la destruction des cellules en perturbant la fonction des microtubules essentielles à la division cellulaire [168].

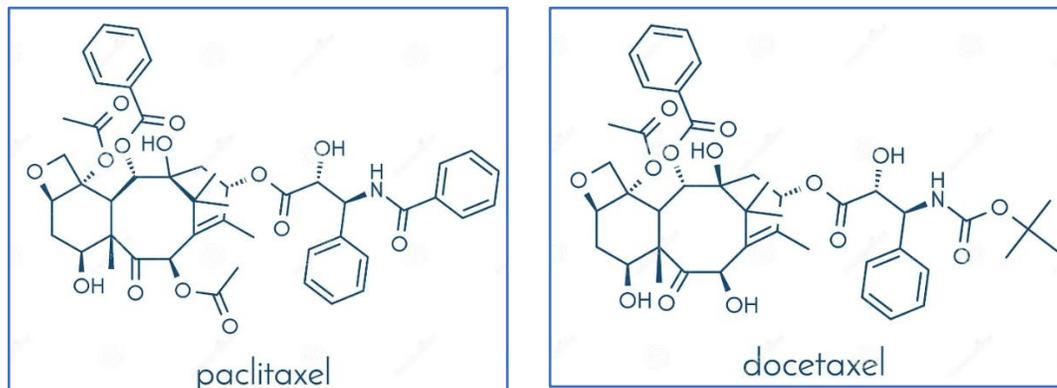


Figure 1.16 : Formule chimique du paclitaxel et du docetaxel, Tirée de American Chemical Society en 2023.

Les deux molécules sont composées d'un système de cycles taxanes à 15 membres liés à un cycle oxétanique à 4 membres aux positions C-4 et C-5 de la molécule. Les structures du paclitaxel et du docétaxel diffèrent par les substitutions à la position du cycle C-10 et par la configuration d'une chaîne latérale ester attachée à C-13

En se liant à la tubuline liée au PIB dans le microtubule, les taxanes empêchent la dépolymérisation du fuseau mitotique de la cellule empêchant ainsi la division cellulaire (Figure 1.17). Cette action des taxanes piège le cycle cellulaire en phase G2 ou M, ce qui va induire éventuellement une nécrose cellulaire. Les taxanes induisent aussi la phosphorylation de bcl-2 favorisant une cascade d'événements conduisant à l'apoptose des cellules (Figure 1.18) [169].

Le docétaxel et le paclitaxel sont les principaux agents chimiothérapeutiques utilisés dans le traitement du cancer du sein et la neurotoxicité dose-dépendante est le principal effet toxique lié à leur utilisation [168,169].

Dans le traitement du cancer du sein à un stade précoce et localement avancé, plusieurs études ont montré que la chimiothérapie néoadjuvante comprenant des anthracyclines et des taxanes améliore le taux de réponse des cellules cancéreuses du sein par rapport à la chimiothérapie néoadjuvante sans anthracycline [152,168]. La séquence d'administration des drogues thérapeutiques est variable

car l'anthracycline spécifiquement la doxorubicine peut être administrée avant le taxane, le plus souvent le docétaxel chez certaines patientes ou administrer après le docétaxel.

Cependant, l'administration de taxane avant l'anthracycline a été associée avec une réponse pathologique améliorée de 15 % à 20 %, par rapport à la première séquence d'anthracycline [152,167]. Les patientes HER2+, verront leur régime thérapeutique renforcée par une thérapie ciblée.

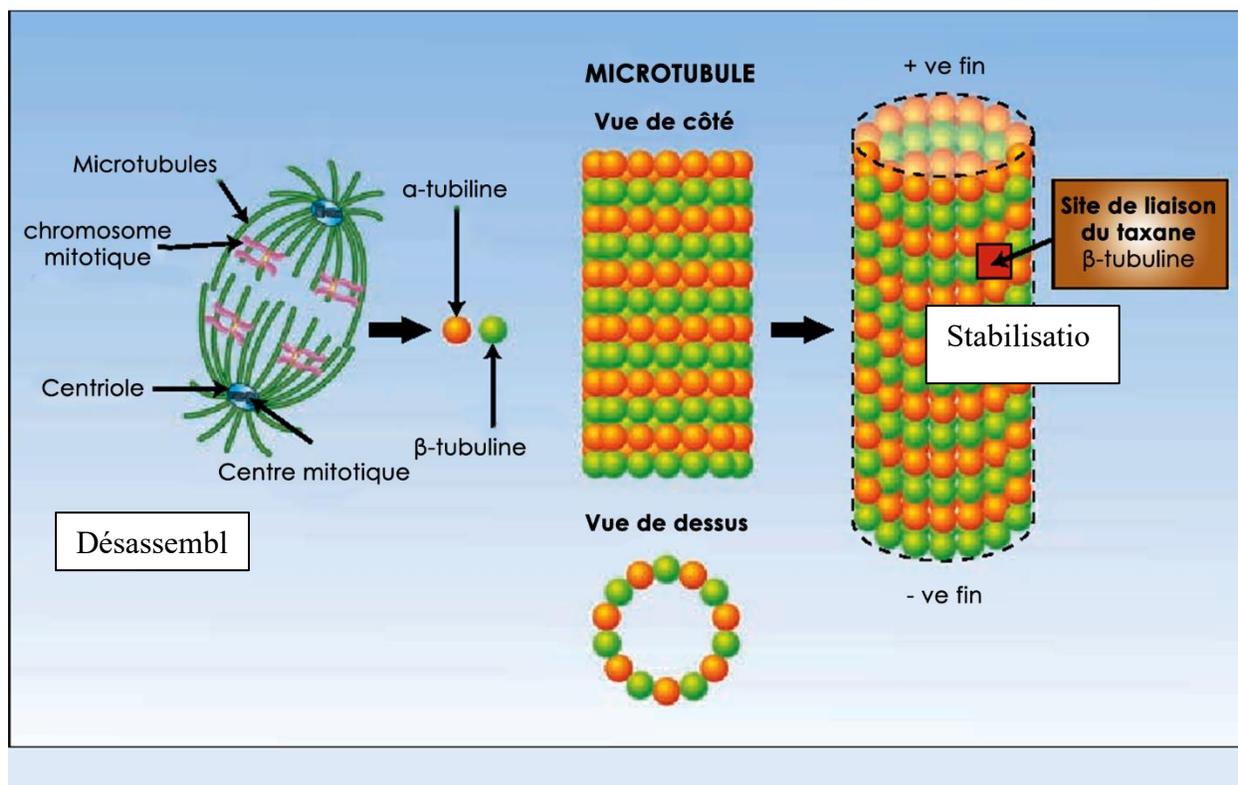


Figure 1.17 : CCR Molecular Pathways, Tirée de Microtubule active agents 2008.

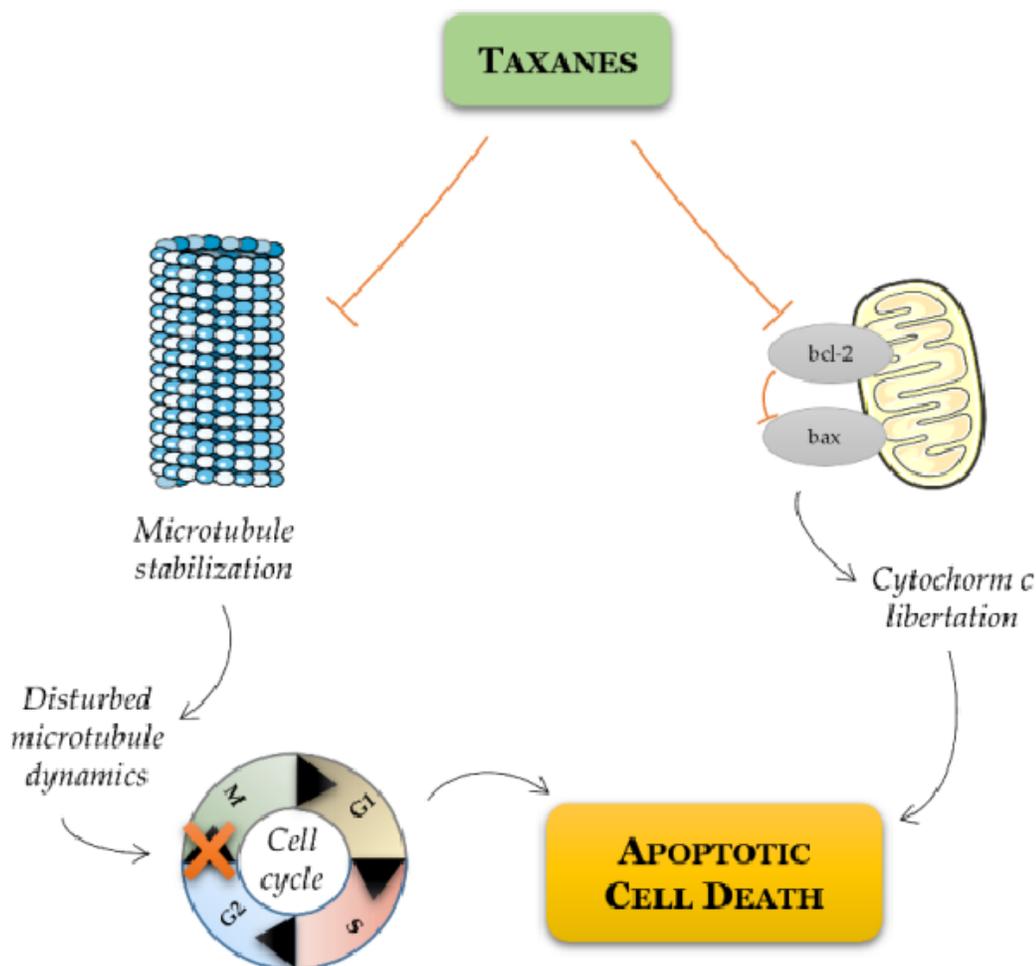


Figure 1.18 : Mécanisme d'action des Taxanes, P.Moris. Tirée de Microtubule active.

Le paclitaxel et le docétaxel, agissent en se liant et en stabilisant les microtubules afin d'inhiber la croissance tumorale des cellules cancéreuses. Les taxanes exercent leur efficacité antitumorale via des modes d'action distincts : action mitotique et apoptotique. Les taxanes se lient aux microtubules et empêchent ainsi leur désassemblage, entraînant l'arrêt du cycle cellulaire G2/M et l'apoptose. Alternativement, les taxanes peuvent inhiber l'expression de Bcl-2 anti-apoptotique, favorisant la mort cellulaire apoptotique grâce au soulagement de la libération du cytochrome c médiée par BAX.

1.10 Défis et controverse dans le diagnostic du cancer du sein

1.10.1 Diagnostic et gestion

L'évolution constante des schémas thérapeutiques du cancer du sein a amélioré le pronostic au cours des dernières décennies, avec un taux de survie relative de cinq ans de plus de 90% [171].

Pour les stades précoces et bien différenciés comme les cancers HR+ (récepteurs hormonaux positifs) à faible prolifération, les pronostics sont meilleurs et avoisinent les 100 % de survie à 5 ans [172]. Cependant, malgré ces résultats encourageants, le risque de récurrence persiste jusqu'à 20 ans après le diagnostic car même si la tumeur initiale est traitée avec succès, il est possible que de petites métastases microscopiques aient déjà été disséminées dans d'autres parties du corps au moment du diagnostic initial. Ces micro-métastases peuvent rester dormantes pendant des années avant de se développer en métastases actives [173]. Plus tôt le cancer est détecté et le traitement instauré, plus il est probable pour la patiente de guérir de la maladie. Ainsi, l'un des principaux défis dans le cancer du sein consiste à identifier précisément quelles patientes présentent un risque plus élevé de développer des récurrences et des métastases. En effet, si le cancer réapparaît dans le même sein, le sein controlatéral ou dans les ganglions lymphatiques, la patiente peut encore être guéri, alors qu'une récurrence à distance équivaut généralement au décès de la patiente.

Plusieurs défis et controverses persistent concernant le diagnostic du cancer du sein et la meilleure gestion de la patiente [172,173]. Les principaux domaines de discussion sont : 1) l'équilibre entre les coûts et les avantages de la mammographie, 2) les tests génétiques, 3) les différents types de chirurgie, 4) la séquence ou les combinaisons de chimiothérapie les plus optimales, 5) l'hétérogénéité des tumeurs (surtraitement et sous traitement), 6) les quantités de thérapie et de traitements supplémentaires. De ces aspects nous allons nous concentrer sur les défis découlant de l'hétérogénéité des tumeurs tels que le surtraitement et le sous-traitement des patientes.

1.10.1.1 Hétérogénéité tumorale

L'hétérogénéité tumorale est peut-être l'un des problèmes les plus importants qui caractérise le cancer du sein. Elle est au centre de nombreux défis permettant de parvenir à un traitement entièrement individualisé pour chaque patiente. Traditionnellement, le cancer du sein a été considéré comme une maladie alors qu'aujourd'hui, il est largement reconnu que le cancer du sein doit être considéré comme plusieurs types distincts de cancer. Bien que toutes ces maladies surviennent au niveau du sein, elles peuvent se comporter différemment selon leur biologie cellulaire, leur grade, leur morphologie, leur classification, leur stade et leur sous-type moléculaire. Le cancer du sein présente une grande hétérogénéité autant entre différentes patientes qu'au sein

de chaque tumeur individuelle [171]. Ce qui en fin de compte joue un rôle important dans la réponse thérapeutique et l'évolution de la maladie.

L'hétérogénéité **inter tumorale** concerne les différences observées entre différentes patientes ayant le même type de cancer, comme le reflète les différences observées dans de nombreuses classifications du cancer du sein (c.-à-d. type histologique et sous-type moléculaire, le grade, le statut du récepteur, la prolifération, etc.). L'hétérogénéité **intra tumorale** fait référence aux différentes caractéristiques au sein d'une tumeur : une zone de la tumeur peut présenter un modèle morphologique, alors que dans une autre zone distincte, des caractéristiques opposées ou très différentes pourraient coexister. Par exemple, l'expression de certains récepteurs ou le degré de prolifération n'est pas nécessairement uniformément réparti sur toute la région tumorale [172], une situation dite d'hétérogénéité spatiale. Son hétérogénéité temporelle qui détermine l'évolution de la tumeur dans le temps s'ajoute à cette complexité [173]. Par conséquent, ces variations compliquent l'évaluation clinique de la tumeur et sont importantes à prendre en compte dans le diagnostic du cancer du sein. Un tissu tumorale prélevé et analysé à un moment donné représente donc la tumeur à un moment instantané, à un endroit et à une heure fixe.

L'hétérogénéité génétique, tant au sein du cancer qu'entre les cancers, résulte de l'instabilité et des mutations du génome, deux des caractéristiques du cancer. Pratiquement toutes les tumeurs présentent un certain degré génétique de base et une certaine hétérogénéité. Elles sont donc constituées de plusieurs sous-clones avec des caractéristiques précises. Ces différences surviennent parce que lors de la division cellulaire, des mutations peuvent survenir ou disparaître, et avec le temps, deux cellules ayant un ancêtre commun deviendront de plus en plus différentes les unes des autres [173]. Cette divergence est à l'origine du concept de résistance aux traitements et de la progression du cancer et c'est pourquoi une lésion métastatique pourrait être très différente de la masse tumorale dont elle est issue. En effet, l'influence du traitement ou des facteurs endogènes va induire une pression de sélection sur les cellules environnantes. Cette pression de sélection créera des sous-clones de tumeurs ayant acquis une résistance au traitement pour s'adapter au nouvel environnement, ce qui favorise la survie cellulaire et la prolifération des clones les mieux adaptés. Par conséquent, le cancer va progresser avec la formation de tumeurs métastatiques du sous-clone ayant acquis des mutations [162]. Au cours de l'évolution du cancer, deux cellules

exposées au même stimulus environnemental peuvent acquérir des mutations motrices ayant des caractéristiques différentes.

1.10.1.2 Surtraitement et sous- traitement

Le traitement du cancer du sein a parcouru un long chemin depuis la première mastectomie radicale et les premières chimiothérapies où toutes les femmes diagnostiquées avec un cancer du sein recevaient le même traitement. Un effort considérable dans la recherche sur le cancer du sein a conduit aujourd'hui à un traitement plus personnalisé. Pour chaque patiente, l'échantillon de tumeur est soigneusement inspecté afin de répondre au plus grand nombre de questions possibles et proposer la thérapie la plus adaptée [174]. Cette situation se reflète aujourd'hui dans le niveau élevé du taux de survie de la plupart des patientes atteintes d'un cancer du sein. Malgré cet effort commun et ces progrès récents, de nombreuses femmes continuent de mourir de leur maladie, soit en raison d'une charge tumorale plus élevée au moment du diagnostic, soit d'une résistance au traitement ou en raison d'une récurrence tardive. Le traitement adjuvant peut consister en des médicaments toxiques ayant des effets secondaires potentiellement graves à long terme avec parfois un impact profond sur la qualité de vie de la patiente. Pourtant, le risque toujours présent de récurrence, aussi minime soit-il, n'empêche pas les médecins et les patientes d'opter pour un traitement supplémentaire. D'un côté, certaines patientes reçoivent des chimiothérapies en soins intensifs non justifiées ou encore passent des années sous thérapie antihormonale [175]. Ces patientes sont en effet surtraitées. Pour d'autres, le traitement est inadéquat et parfois inutile, sans aucun bénéfice supplémentaire en termes de survie, parce qu'ils sont sous-traités. Évidemment, c'est le sous-traitement qui a le plus d'effets et de conséquences néfastes pour la patiente car il va favoriser la résistance thérapeutique. En effet, un traitement insuffisant ne va pas éliminer toutes les cellules cancéreuses, ce qui va permettre à celles qui survivent d'acquérir des mutations génétiques qui les rendent moins sensibles aux traitements ultérieurs ou de développer des mécanismes de résistance aux traitements. Le sous-traitement peut aussi favoriser la croissance de sous-populations de cellules cancéreuses déjà résistantes aux traitements, conduisant à une rechute de la maladie avec une tumeur plus agressive et moins sensible aux traitements conventionnels.

Le surtraitement est un problème beaucoup plus fréquent. Les patientes surtraitées reçoivent en plus du traitement les effets indésirables et les effets secondaires associés au traitement. Les effets

indésirables persistants ou les effets secondaires à long terme du surtraitement peuvent diminuer considérablement la qualité de vie de la patiente en affectant leur capacité à travailler, à s'occuper d'eux-mêmes, à participer à des activités quotidiennes. Les effets indésirables persistants ou les effets secondaires à long terme du surtraitement entraînent parfois une invalidité chronique. L'un des effets secondaires les plus fréquents est une fatigue intense et donc une sensation d'épuisement [174-175]. Certaines études indiquent qu'une telle fatigue liée au cancer peut persister pendant plusieurs années chez environ 30 % des patientes atteintes d'un cancer du sein [176-177]. Par conséquent, une approche plus ciblée et un traitement personnalisé dans la prise en charge thérapeutique qui réduira cette fatigue seront rentables et relativement importants non seulement pour les patientes mais également pour la société dans son ensemble.

1.10.1.3 Résistance aux traitements, en particulier la chimiorésistance

La résistance au traitement dans le cancer du sein est un défi majeur qui peut survenir à différents stades de la maladie et en réponse à diverses thérapies. Malgré les récentes améliorations et les options thérapeutiques multimodales pour les cancers du sein, tous les patientes ne répondront pas au schéma thérapeutique [176]. En raison de l'agressivité du cancer, de la génétique ou de l'hétérogénéité tumorale, certaines patientes répondent mal ou deviennent résistants au traitement. Cette hétérogénéité explique également le fait que deux patientes présentant des caractéristiques tumorales similaires recevant le même traitement peuvent connaître une réponse et des résultats au traitement très différents. Les cellules cancéreuses peuvent 1) développer des mécanismes pour éviter l'effet cytotoxique des agents chimiothérapeutiques, notamment en augmentant l'expression de transporteurs de médicaments. Les transporteurs de médicaments sont des protéines membranaires spécialisées qui jouent un rôle crucial dans le transport des médicaments à travers les membranes cellulaires. Dans le contexte de la résistance au traitement dans le cancer du sein, les transporteurs ABC (ATP-binding cassette) et les transporteurs SLC (solute carrier) peuvent jouer un rôle dans l'élimination des agents chimiothérapeutiques hors des cellules cancéreuses, réduisant ainsi leur efficacité. Les transporteurs ABC tels que la P-glycoprotéine (P-gp), la protéine de résistance au cancer du sein (BCRP) et la protéine liée à la résistance multiple aux médicaments (MRP), sont connus pour leur capacité à éliminer une large gamme de médicaments anticancéreux des cellules tumorales. Les transporteurs SLC tels que le transporteur de cations organiques 1 (OCT1), le transporteur de cations organiques 2 (OCT2) et le transporteur de cations organiques 3

(OCT3), peuvent influencer l'efficacité des médicaments anticancéreux en modulant leur absorption, leur distribution et leur élimination.

Les cellules cancéreuses peuvent 2) activer des mécanismes de réparation de l'ADN endommagé tels que le mécanisme de réparation par excision de bases (BER) et le mécanisme de réparation par recombinaison homologue (HR) [176]. Le mécanisme BER répare les lésions ponctuelles de l'ADN, telles que les bases modifiées ou endommagées. Les enzymes BER identifient et éliminent la base endommagée, puis ajoutent une nouvelle base pour restaurer la séquence d'ADN. Le mécanisme HR utilise une copie intacte du chromosome homologue comme modèle pour restaurer l'intégrité de l'ADN endommagé. Il est principalement actif pendant la phase S du cycle cellulaire et peut réparer efficacement les cassures double brin de l'ADN. L'activation de ces mécanismes de réparation de l'ADN peut conférer une résistance aux agents chimiothérapeutiques en permettant aux cellules cancéreuses de réparer efficacement les lésions de l'ADN et de survivre aux traitements.

1.10.1.4 La chimiorésistance

Dans les cellules cancéreuses du sein, les agents chimio thérapeutiques exercent leurs effets cytotoxiques en empêchant la prolifération et la croissance cellulaire [178]. Les réponses des patientes aux médicaments chimio thérapeutiques sont extrêmement variables dans le contexte clinique. Bien que certaines patientes atteintes de cancer répondent positivement à la chimiothérapie et sont efficacement guéries de la maladie, d'autres patientes montrent une "chimiorésistance", ce qui entraîne une diminution de l'efficacité du traitement et une rechute de la maladie. Les mécanismes de résistance dans le cancer du sein comprennent : l'influence de la membrane cellulaire sur l'absorption du médicament, les glycoprotéines membranaires qui agissent comme des pompes d'efflux et facilitent le transport et l'efflux des médicaments, le système enzymatique qui inactive les médicaments anti tumoraux en affectant leur métabolisme , la quantité et l'affinité des récepteurs hormonaux , les gènes liés au cancer , les gènes liés à la réparation de l'ADN , les altérations génétiques et épigénétiques secondaires acquises, les boucles de rétroaction des voies de signalisation , les modifications tumorales du microenvironnement et la présence de cellules souches cancéreuses (CSC) [178-181]. Les CSC par exemple vont favoriser la chimiorésistance 1) via une expression accrue de protéines de transport de médicaments : Les

CSC vont exprimer des niveaux plus élevés de protéines de transport de médicaments, telles que la P-glycoprotéine, qui permettent l'élimination des agents chimiothérapeutiques hors des cellules. Cela réduit l'accumulation intracellulaire des médicaments et diminue leur efficacité. 2) Les CSC peuvent avoir une capacité accrue à réparer les lésions de l'ADN induites par les agents chimiothérapeutiques, ce qui leur permet de maintenir leur intégrité génomique et de survivre aux traitements.

Cette résistance contribue à plus de 90% de la mortalité chez les patientes atteintes de tumeurs malignes [179]. Dans certains cas, les cellules cancéreuses possèdent une capacité inhérente (résistance intrinsèque) à survivre à des doses cliniquement pertinentes des agents chimiothérapeutiques, entraînant une réponse initiale inadéquate du patiente au traitement administré [180]. Des cas de résistance "acquise" dans lesquels le patiente montre une réponse initialement positive à l'intervention thérapeutique (chimiothérapie, médicaments anticancéreux ciblant des molécules spécifiques, et immunothérapie anticancéreuse) pour ensuite devenir progressivement insensible au traitement en raison d'altérations épigénétiques, génétiques et protéiques acquises, conduisant à une rechute du cancer, représentent un défi majeur en milieu clinique [181]. Malgré de nombreuses recherches menées au cours des années, les mécanismes exacts sous-jacents à la chimiorésistance ne sont pas entièrement compris, mais des mécanismes différents distinguent probablement les deux types de chimiorésistance.

Les Hypothèses et objectifs de recherche

Le cancer du sein est un cancer multifactoriel, multigénique et hétérogène. Il se différencie selon la présence de certaines molécules au sein des tumeurs, selon leur présentation clinique et selon leur réponse au traitement. C'est cette hétérogénéité qui rend ce cancer difficile à traiter. Bien qu'il soit au 2^{ème} rang en termes de mortalité chez la canadienne, cette mortalité fait face à des disparités raciales. En effet, le taux de mortalité de la femme noire est plus élevé que celui de la caucasienne et son cancer est plus agressif [9].

De plus, la chimiothérapie prédomine dans le traitement du cancer du sein et bien que des progrès substantiels aient été réalisés, on observe toujours une résistance graduelle des cellules cancéreuses à presque tous les médicaments chimiothérapeutiques via une variété de mécanismes et de voies

distinctes [23,24]. On se pose alors la question de savoir si ces agents chimio thérapeutiques agissent de manière optimale et modulent efficacement leurs cibles biologiques. Pour contrecarrer la chimiorésistance, les chercheurs se sont tournés vers la découverte de nouveaux biomarqueurs. En effet, en identifiant des marqueurs (gènes, protéines) robustes de réponse chimio thérapeutique, cela devrait permettre la mise en place d'une médecine personnalisée et donc d'améliorer le pronostic et le traitement du patiente. C'est dans ce sens que les recherches précédentes ont établi que l'emploi d'une signature pronostique ou profil de biomarqueurs pronostique de façon routinière éviterait une chimiothérapie adjuvante dans 70 % des cas de cancer du sein. Malheureusement ces recherches ont été effectuées sur une population majoritairement caucasienne ou sur des lignées cellulaires d'ascendance Européenne. Par conséquent, aucun biomarqueur thérapeutique spécifique au cancer du sein agressif de la femme noire n'est disponible. À la lumière de ces connaissances, notre hypothèse générale est que la découverte de nouveaux bio marqueurs prédictifs et pronostiques qui seront spécifiques au cancer du sein de la femme noire permettront d'une part de réduire la disparité observée dans le taux de mortalité élevé du cancer du sein et d'autre part de préciser le type de patientes pouvant tirer un bénéfice maximal de la chimiothérapie.

La voie de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) / AKT est l'une des principales voies de signalisation induites par divers récepteurs tyrosine kinases. Il a déjà été démontré que cette voie est un important promoteur de la croissance cellulaire, du métabolisme, de la survie, des métastases et de la résistance à la chimiothérapie [14-16]. Elle constitue de ce fait un élément crucial dans un réseau de signalisation compliqué. Le rôle central dans cette voie est joué par l'hétérodimère PI3K, qui répond à l'absence ou à la présence de stimulation en amont par les récepteurs à facteur de croissance tyrosine kinases (RTK) [12,13]. De plus, les données de recherche actuelles sur le cancer ont montré que la voie PI3K/AKT est hyperactive dans plus de 70% des tumeurs du sein et pourrait favoriser la chimiorésistance du cancer chez la caucasienne. En effet, l'activation excessive d'AKT dans les cellules du cancer du sein conduit à une résistance à la doxorubicine et au taxol. L'inhibition de la voie PI3-KI/AKT avec LY294002 ou un plasmide augmente l'apoptose induite par la doxorubicine et le taxol. En outre, l'inhibition spécifique de l'isoforme AKT1 à l'aide de la technique de l'ARN interférent (siARN) augmente la sensibilité des cellules du cancer du sein au taxol, mais n'a aucun effet sur l'apoptose induite par la doxorubicine. PTEN (homologue de la phosphatase et de la tensine) est un gène suppresseur de tumeur et est un inhibiteur majeur

de la voie PI3K/AKT. Chez la femme Afro-Américaine, une étude qui analysait l'expression du PTEN dans les quatre principaux sous-types de carcinome du sein (Luminal A, Luminal B, HER2 positif et Triple Négatif) a montré une association significative entre la perte de PTEN et le cancer du sein triple négatif. Cette étude confirmait le rôle important de l'activation non régulée de la voie PI3K/AKT dans la pathogenèse des cancers du sein de la femme noire américaine.

Nous avons donc émis l'hypothèse que l'activation de la protéine AKT dans le cancer du sein de la femme noire peut induire une mauvaise réponse thérapeutique en régulant certaines protéines inhibitrices d'apoptose et causer une chimiorésistance.

Finalement les questions qui se posent sont les suivantes :

1. Quel est le profil des gènes exprimés dans le cancer du sein chez la femme noire chimiorésistante ?
2. Dans quelle mesure la voie de survie PI3K/AKT contribue-elle à la réponse thérapeutique et la résistance au traitement du cancer du sein de la femme noire ?
3. Existe-t-il des biomarqueurs génétiques capable de prédire la réponse à la chimiothérapie dans le cancer du sein de la femme noire ?

Afin de répondre à ces questions, notre équipe a eu pour **objectifs**

1) De déterminer l'implication de la protéine AKT et de ses isoformes dans la réponse thérapeutique

- AKT est-il activé chez nos patientes
- Les drogues thérapeutiques qui induisent la phosphorylation d'AKT dans les cellules cancéreuses de nos patientes
- Les isoformes d'AKT les plus impliqués dans la réponse thérapeutique
- les substrats d'AKT impliqués dans la réponse thérapeutique

2) De déterminer l'implication possible de la protéine AKT dans la résistance aux agents chimio thérapeutiques.

3) De rechercher de nouveaux candidats en tant que cibles thérapeutiques potentielles.

- Un séquençage génomique des tumeurs fera l'inventaire des gènes et conduira à identifier des cibles thérapeutiques.
- Une analyse des gènes dans les groupes de traitement et chez les chimiorésistantes sera effectuée.
- Une sélection des gènes significatifs et redondants dans les groupes de traitement sera retenue.

Dans les sections suivantes, vous pourrez prendre connaissance de l'article scientifique qui se rapportent à cette étude dans les chapitre II ainsi que la discussion, les perspectives futures et les conclusions générales de l'étude dans le chapitre III.

CHAPITRE 2

RNA-sequencing reveals potential breast cancers biomarkers in black women.

Hurette Junie Chansi Kengni ^{1,2}, Weihua Huang ³, Corinne Engohan-Aloghe ², Ernest Belembaogo ², Monique Cadrin¹, Eric Asselin^{1*}

- ¹. University of Quebec at Trois-Rivières (UQTR), Trois-Rivières, Canada
 - ². Institut de Cancérologie de Libreville (ICL), Libreville, Gabon.
- ³. Department of Pathology and Laboratory Medicine, Brody School of Medicine, East Carolina University, Greenville, NC 27834, USA

- *Author to whom correspondence should be addressed

- Correspondence : eric.asselin@uqtr.ca

2.1 Contribution des auteurs

Hurette Junie Chansi Kengni a effectué, en majorité, la conception de l'étude, la réalisation et l'analyse des expérimentations ainsi que la totalité de l'écriture du manuscrit. Huang Weihua, a mis au point et réalisé le protocole de séquençage. Corinne Engohan Aloghe, pathologiste, a effectué les lectures histopathologiques et déterminé le pourcentage tumoral des patientes. Ernest Belembaogo directeur de l'Institut de Cancérologie au Gabon a assuré la mise en place du protocole au Gabon. Monique Cadrin est la Co directrice de recherche de l'équipe de laboratoire et superviseur de ce manuscrit. Éric Asselin est le directeur de recherche de l'équipe de laboratoire et superviseur. Éric Asselin et Monique Cadrin ont assuré la Conception et l'analyse de toutes les expérimentations ainsi que la révision de l'article et de la thèse.

2.2 Résumé de l'article (Français)

Contexte : Le cancer du sein est la deuxième cause de décès par cancer chez les femmes dans le monde, et cette mortalité fait face à des disparités raciales. En effet, la femme noire présente un taux de mortalité plus élevé que celui de la femme caucasienne. Les anthracyclines et les taxanes sont efficaces dans le traitement de nombreux cancers du sein, mais la chimiorésistance reste le principal obstacle. La voie de signalisation PI3K/AKT est activée dans la plupart des cancers du sein et impliquée dans la chimiorésistance. Dans le cadre de notre étude sur le cancer du sein agressif chez les femmes africaines, nous avons d'abord regardé l'activation de la voie de signalisation PI3K/AKT en réponse à la chimiothérapie. Nous avons ensuite utilisé une approche de séquençage d'ARN (ARN-seq) pour mieux comprendre le mode d'action des agents chimiothérapeutiques. Nous avons analysé l'effet de ces agents avant et après le traitement sur plus de 30 000 gènes tissulaires. Ces échantillons ont été prélevés à partir de tissus fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE), une méthode couramment utilisée pour la préservation des échantillons biologiques à des fins de recherche. Afin de mieux comprendre le mode d'action des agents chimiothérapeutiques dans le cancer du sein agressif chez les femmes africaines, nous avons par séquençage d'ARN (ARN-seq) étudié leur effet avant et après le traitement chimiothérapeutique sur plus de 30 000 gènes tissulaires provenant d'échantillons fixés au formol et inclus en paraffine

(FFPE). Nous avons ensuite sélectionné les 9 gènes cliniquement pertinents pour lesquels les expressions différentielles avant et après la chimiothérapie étaient significatives.

Méthode : Nous avons réalisé une technique de séquençage d'ARN sur une plateforme Illumina sur dix-sept patientes atteintes d'un carcinome mammaire invasif ayant reçu une chimiothérapie néoadjuvante et pour lesquelles des tissus tumoraux avant et après la chimiothérapie étaient disponibles. Une analyse de l'expression différentielle des gènes a été effectuée, et une valeur de P value conventionnelle $< 0,05$, une valeur de P ajustée $< 0,1$ et un \log_2 (fold change) ≥ 2 ou ≤ -2 ont été définis comme valeurs seuils pour identifier les gènes exprimés de manière différentielle (DEGs). Neuf des patientes ont été réparties en trois groupes principaux de traitement (AC = doxorubicine et cyclophosphamide ; AN = doxorubicine et navelbine ; FAC = 5-fluorouracile, doxorubicine et cyclophosphamide), quatre des patientes étaient atteintes d'un cancer du sein triple négatif (TNBC) et quatre des patientes présentaient une tumeur bénigne et leurs tissus ont servi de contrôle.

Résultat : En comparant les échantillons avant et après le traitement chimio thérapeutique, le groupe AC post-traité a révélé 1 035 gènes exprimés de manière significativement différente parmi les 46 461 transcrits analysés (valeur de P $< 0,05$). Le groupe FAC post-traité a montré 2 739 gènes significatifs parmi les 43 821 transcrits et le groupe AN post-traité a montré 1 026 gènes significatifs parmi les 44 689 transcrits. À travers une analyse de diagramme de Venn, neuf gènes pertinents (GPNMB, EGR1, GJB6, AGR2, CTGF, CEACAM6, C-MYB, AMPK α 2 et PLIN1) ont été sélectionnés pour une validation ultérieure par immunohistochimie (IHC). Un enrichissement dans les voies de signalisation sur la base de données KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), en particulier la voie de signalisation PI3K/AKT, a été observée. En utilisant une valeur de P ajustée plutôt qu'une valeur de P conventionnelle pour une meilleure sélection, un total de 393 gènes ont présenté une expression différentielle, atteignant une signification statistique à la valeur de P ajustée $< 0,1$. Le niveau d'expression des gènes GPNMB, EGR1, GJB6, AGR2, CTGF, CEACAM6, C-MYB, AMPK α 2 et PLIN1 dans les cellules cancéreuses était significativement plus élevé après la chimiothérapie qu'avant la chimiothérapie dans des échantillons de tissus appariés provenant des mêmes patientes (P ajustée = padj $\leq 0,1$) ou dans la comparaison globale entre les tissus cancéreux et les tissus de contrôle. Cependant, lors de la comparaison entre les patientes résistantes à la chimiothérapie et les patientes sensibles à la chimiothérapie, et entre les

patientes triple négatif et les témoins, seuls deux gènes, MYB et AGR2, ont montré une signification dans les deux groupes de patientes ($p_{adj} \leq 0,01$).

Une validation *In silico* a ensuite été effectuée comme deuxième validation. La réanalyse du jeu de données d'ARN-seq dans The Cancer Genome Atlas (TCGA) effectuée dans la base de données simplifiée UALCAM montre une expression plus élevée d'AGR2, de CEACAM6, de GJB6 et de MYB dans le cancer du sein par rapport aux tissus normaux, et l'expression de ces gènes était associée à un mauvais pronostic.

Nos résultats suggèrent que les neuf gènes GPNMB, EGR1, GJB6, AGR2, CTGF, CEACAM6, c-Myb, AMPK α 2 et PLIN1 pourraient servir de nouveaux biomarqueurs dans le cancer du sein chez les femmes noires. Cette étude conduira à des études supplémentaires sur les fonctions de chacune de ces protéines, sur leurs mécanismes d'action et leur utilité clinique.

Abstract

Background: Breast cancer is the second leading cause of death in women worldwide and this mortality is higher in black women. Anthracyclines and Taxanes are effective in the treatment of many breast cancers but chemoresistance is still the main obstacle. The PI3K/AKT signaling pathway is activated in most breast cancers and involved in chemoresistance. In the context of our study on aggressive breast cancer in African women, we first examined the activation of the PI3K/AKT signaling pathway in response to chemotherapy. We then utilized an RNA sequencing (RNA-seq) approach to better understand the mode of action of chemotherapeutic agents. To better understand the mode of action of chemotherapeutic agents in aggressive breast cancer among African women, we investigated by RNA sequencing (RNA-seq) their effect before and after chemotherapy treatment on over 30,000 tissue genes derived from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples. We identified and selected 9 relevant genes with significant differential expressions.

Method: We performed RNA-seq on an Illumina platform for seventeen patients with invasive breast carcinoma who received neoadjuvant chemotherapy and for whom tumor tissue before and after chemotherapy was available. Differential expression analysis of genes was performed, and

a P-value < 0.05, an adjusted P-value < 0.1 and \log_2 (fold change) ≥ 2 or ≤ -2 were set as the cutoff values to identify differentially expressed genes (DEGs). Nine of the seventeen patients were divided into 3 main treatment groups (AC = doxorubicin and cyclophosphamide; AN = doxorubicin and navelbin; FAC = 5-fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide), four triple negative breast cancer patients (TNBC) and four non-cancerous tissue served as a control.

Result: Compared to the pretreated group, the post-treated AC group revealed 1,035 significantly differentially expressed genes among the 46,461 transcripts analyzed (p-value < 0.05). The post-treated FAC group showed 2739 significant genes out of 43821 transcripts and the post-treated AN group showed 1026 significant genes out of 44689 transcripts. By considering statistical significance, clinical relevance, convergence, and redundancy of all results, we identified and selected 9 genes from the list of differentially expressed genes. Through Venn diagram analysis, 9 pertinent genes (GPNMB, EGR1, GJB6, AGR2, CTGF, CEACAM6, C-MYB, AMPK α 2 and PLIN1) were selected for subsequent validation via immunohistochemistry (IHC) staining. An enrichment in the KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) trails particularly the PI3K/AKT signaling pathway was observed. Using an adjusted p-value rather than a conventional p-value for better selection, a sum of 393 genes exhibited differential expression, reaching statistical significance at the adjusted p-value < 0.1. The expression level of GPNMB, EGR1, GJB6, AGR2, CTGF, CEACAM6, C-MYB, AMPK α 2 and PLIN1 genes in cancer cells was significantly higher after chemotherapy than before chemotherapy in matched tissue samples from the same patients (p adjusted = padj \leq 0.1) or in the overall comparison between cancer and control tissues. However, when comparing chemo resistant patients to chemo sensitive ones and comparing triple-negative patients to controls, only two genes, MYB and AGR2, showed significance in both patients groups (padj \leq 0.01).

Analysis of RNA-seq dataset in The Cancer Genome Atlas (TCGA) shows that there is higher expression of AGR2, CEACAM6, GJB6 and MYB in breast cancer compared to normal tissue and the expression of these genes was associated to a poor prognosis. These genes were all included in our analysis. We also found that AGR2, CEACAM6, GJB6 and MYB were also increased. Our results suggest that the 9 genes GPNMB, EGR1, GJB6, AGR2, CTGF, CEACAM6, C-MYB, AMPK α 2 and PLIN1 could serve as new biomarkers in breast cancer in black women and justify

further studies on their function, their mechanism of action and their potential clinical utility. (Re-analysis done in the simplified UALCAM database).

2.3 Introduction

Precision medicine enables better characterization of diseases at the molecular level. RNA sequencing is one of the approaches used in precision medicine. RNA sequencing on New Generation Sequencing (RNA-seq) is an efficient and established screening method used to identify new biomarkers and to better understand cancer biology [1]. National consortia like the Cancer Genome Atlas (TCGA) and the international consortia like the International Cancer Genomics Consortium (ICGC) have generated enormous amounts of novel data and insights into the molecular characteristics of numerous significant cancer types. This has been achieved through the application of diverse high-throughput profiling technologies, including RNA-seq. [2-4].

Breast cancer is responsible for approximately 685,000 female deaths each year worldwide [5,6]. It is the most common female cancer in America and other Western countries. Of the histologic subtypes, non-specific-infiltrating carcinoma is the most common, accounting for 75% to 85% of all patients [6]. Other types such as lobular, medullary, mucinous, papillary carcinomas are much less frequent. According to data from the National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) program [6], although the current survival rate for women with breast cancer is high at 90%, annual breast cancer deaths still numbered over including 43,000 patients in the United States alone. Moreover, for more than three decades, the race disparity of mortality from breast cancer in the African-American population has not decreased and remains 41% higher than that of the Caucasian [7-9]. Chemoresistance refers to the insensitivity of cancer cells to treatment, which is a key factor leading to reduced effectiveness of chemotherapy. Although various attempts have been made to restore sensitivity to existing chemotherapeutic drugs and to overcome drug resistance in breast cancers, the effects are still unsatisfactory. Thus, there is an imperative to better characterize the molecular mechanism of breast cancer in black women. In order to detect new genes involved in the cancer, we used the high-throughput profiling technology to identify novel biomarkers that may improve our understanding of disease progression and have an impact on the clinical management of this cancer.

That lead to the development of the PI3K/AKT signaling pathway is known to promote growth factor-mediated cell migration, growth, proliferation, and survival [10-14]. Activation of the PI3K/AKT signaling pathway by growth factors has been suggested to contribute to multidrug resistance in breast cancer [15]. Additionally, the role of the PI3K/AKT pathway has been studied in many tumor types, such as squamous cell, oral, head and neck tumors, etc... All these tumors are associated with a poor prognosis [16-18]. Activation of AKT at serine 473 has been reported to induce chemotherapy resistance in Caucasian and Asian women with breast cancer [19-21]. Recently, AKT activation has been shown in Japanese and Caucasian women with HER2/neu-positive breast cancer [22,23]. Therefore, AKT activation in black female breast cancer could play a key role in the development of resistance to chemotherapy and take part in the tumor aggressiveness of breast cancer. Upon activation, AKT phosphorylates its substrates to either inhibit apoptosis or activate cell proliferation. FOXO3, PRAS40, and GSK3 are among the substrates of AKT known to be involved in chemoresistance in Caucasian women. It is crucial to note here that the role of AKT in the progression and invasion of breast cancer, as well as the fact that its activation within mammary cancer cells has never been examined in an African population, made this step crucial.

To determine the involvement of the PI3K/AKT pathway in the therapeutic response and chemoresistance of breast cancer in black women, we proceeded in two major steps. We first looked at AKT activation in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues from black female breast cancer. More over by using the high-throughput profiling technology, we compared the gene expression profile of matched tissues before and after chemotherapy from thirteen patients as well as non-tumor tissues from four patients. The limited amount of RNA did not allow further validation by quantitative PCR but it was performed by immunohistochemistry. Focusing on genes overexpressed during sequencing, we then explored their expression in two known breast cell lines MCF7 (Luminal A or Estrogen positive) and MB231 (Estrogen negative or Triple negative).

2.4 Materials and methods

2.4.1 Human tissue samples

The paraffin blocks biopsy was retrospectively collected from patients who have had breast cancer in Gabon (Central Africa) and the molecular analyzes were carried out in Canada according to the study process below. An epidemiological study on 700 patients was first carried out to confirm the tumor aggressiveness of breast cancer within this population. Then a selection of 28 patients with invasive breast cancer receiving neoadjuvant chemotherapy allowed us to look at the activation of the PI3K/AKT pathway. From this selection, the pre and post chemotherapy FFPE tissues of 9 patients (18 samples) which divided into three main treatment groups, 4 triple negative patients, 4 chemo resistant patients and 4 untreated controls of the tumor were sequenced. (Figure 2.1). The pathological diagnoses and the classification were established by the Institute pathologist. The protocols were approved by the ethics committee of the University of Quebec at Trois-Rivières, the Ministry of Health of Gabon and the ethics committee of Gabon. The requirement for informed consent was waived due to the retrospective nature of the study. 700 patients included for epidemiology, 30 patients selected for RNA-Seq and AKT isoforms and subtracts IHC.

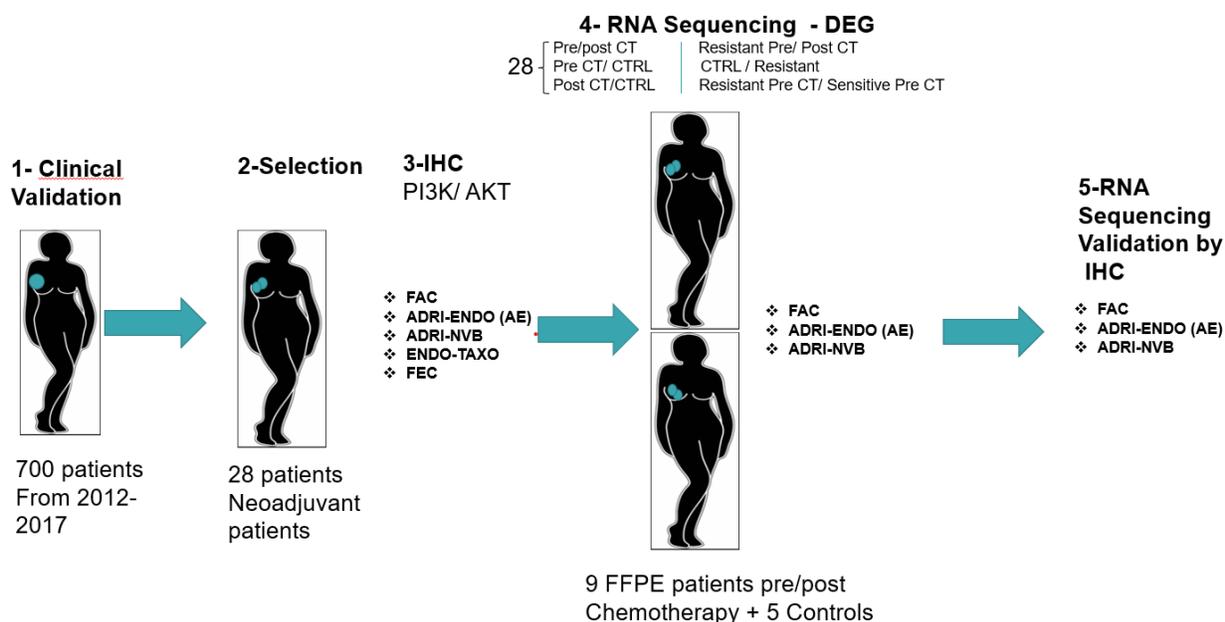


Figure 2.1: Study process. Flow diagram depicting screening and enrollment of patients

2.4.2 Cell lines and reagents

Human breast carcinoma cell lines MDA-MB-231 (ER α -negative) and MCF-7 (ER α -positive) were obtained from ATCC. MDA-MB-231 cells were maintained in L-15 supplemented with FBS (10%) and gentamicin (50 μ g/ml). MCF7 cells were maintained in EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) medium supplemented with FBS (10%) and gentamicin (50 μ g/ml). All western blot antibodies were provided from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) except for HRP-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (Bio-Rad Laboratories) and CX30 (Ab-200866 from Neomarkers, Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA, USA).

2.4.3 Cell treatments

MCF-7 and MDA-MB-468 cells were seeded in 75 cm² flasks at 37° C. in an atmosphere of 5% CO₂ (2.5 \times 10⁶ MCF-7 cells and 2.0 \times 10⁶ MDA-MB-231 cells per flask). The next day, cells were treated with 200nM Doxorubicin for 24 h. Adherent and floating cells were collected for western blot protein analysis. Doxorubicin was purchased from Sigma and processed.

2.4.4 RNA sequencing and data processing

Total RNA was extracted from the FFPE tissue block using the PureLink FFPE kit (Thermo Fisher, Waltham, MA) or the RNeasy FFPE kit (Qiagen, Germantown, MD). RNA quality was examined by the TapeStation 4200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) and RNA concentration was determined by Qubit fluorometric quantitation (Thermo Fisher). cDNA libraries were prepared using the TruSeq Stranded Total RNA prep Kit, Ligation with Ribo-Zero Plus (Illumina, San Diego, CA) according to the manufacturer's protocol. Sequencing of paired-end reads (90 bp \times 2) was performed on the NextSeq 2000 system. Raw sequence reads were clipped for adapters and cleaned to remove short reads using trimmomatic (v0.39). Sequence reads from each sample were pseudo-aligned to the human hg38 reference transcriptome (GENCODE, version 38) and gene transcript abundance was quantified using Kallisto (v0.46.1). Differential gene and transcript expression was achieved using the tximport (v1.20.0) and DESeq2 (v1.26.0) packages in R Studio (Build 351 with R v4.1.1). Gene ontology and KEGG pathway analyzes were performed by gage (v2.42.0) and KEGGREST (v1.32.0) packages. RNA-seq data has been deposited at GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). All samples were extracted in Quebec and sequenced in East Carolina University.

2.4.5 Protein extraction and Western blot analysis

MCF-7 and MDA-MB231 Cells were trypsinized, lysed in RIPA lysis buffer (pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP-40 in PBS, complete protease inhibitor; Roche CA), frozen and thawed three times, then centrifuged (13000 \times g, 20 min at 4°C) to remove insoluble matter. The supernatant was collected and stored at -20°C pending analysis. Protein content was determined with the Bio-Rad DC Protein Assay. Protein extracts (20 μ g) were heated

(95°C, 3 min), resolved by 10% SDS-polyacrylamide (PAGE) gel electrophoresis, and electroblotted onto nitrocellulose membranes (15 V, 30 min) using a semi-dry transfer apparatus (Bio-Rad, Mississauga, Ontario). The membranes were then blocked (1h, TP) with PBS containing 5% milk powder and 0.05% Tween, then incubated with the AKT antibodies (Catalog No. 4691; Cell Signaling Technology, Incubation.;1:000), AKT1 (Catalog No. 75692; Cell Signaling Technology, Inc.;1:000), AKT2 (Catalog No. 5239; Cell Signaling Technology, Incubation.;1:1000), AKT3 (Catalog No. 8018; Cell Signaling Technology, Incubation.; 1:1000), P-AKT (Ser473) (Catalog No. 4060; Cell Signaling Technology, Incubation.;1:1000), cleaved caspase-3 (Catalog No. 9661; Cell Signaling Technology, Incubation.;1:1000), PARP4 (Catalog No. 9532; Cell Signaling Technology, Inc.;1:1000), AMPK α (Catalog No. 2757; Cell Signaling Technology, Incubation.; 1:1000) P-AMPK α (Thr172) (Catalog No. 2535; Cell Signaling Technology, Inc.;1:1000), CTGF (Catalog No. 86641; Cell Signaling Technology, Inc.;1:1000), EGR1 (Catalog No. 4154; Cell Signaling Technology, Inc.;1:1000), CX30 (Catalog No. ab 200866; Abcam Technology, Inc.;1:1000), CEACAM6 (Catalog No. 85102; Cell Signaling Technology, Inc.;1:1000), GPNMB (Catalog No. 38313; Cell Signaling Technology, Inc.;1:1000) and C-MYB (Catalog No. 59995; Cell Signaling Technology, Incubation.;1:1000) (overnight, 4°C) followed by horseradish peroxidase (HRP)-rabbit secondary antibody (1:4000) (RT, 45 min). Peroxidase activity was visualized with West Femto Maximum Sensitivity Substrate Super Signal (Pierce, Arlington Heights, IL), according to the manufacturer's instructions. Protein expression levels were normalized to β -actin expression levels.

2.4.6 Immunohistochemistry

The immunohistochemistry procedure has been previously described [24]. It was used in our study to assess the localization of GPNMB, EGR1, CX30, AGR2, CTGF, CEACAM6, c-Myb, PLIN1, AMPK in our patients before and after treatment. In brief, FFPE tissue sections (5 μ m thick) were deparaffinized with xylene and then rehydrated. Heat-induced epitope retrieval was performed with citrate buffer (pH 6.0). Primary antibodies AKT (Catalog No. 4691; Cell Signaling Technology, Incubation.;1:000), AKT1 (Catalog No. 75692; Cell Signaling Technology, Incubation.;1:000), AKT2 (Catalog No. 5239 Cell Signaling Technology, Incubation.;1:1000), AKT3 (Catalog No. 8018; Cell Signaling Technology, Incubation.;1:1000), P-AKT Substrates (Catalog No. 9641; Cell Signaling Technology, Incubation.; 1:1000), AMPK α (Catalog No. 2757; Cell Signaling Technology, Incubation.;1:1000), CTGF (Catalog No. 86641; Cell Signaling Technology, Inc.;1:1000), EGR1 (Catalog No. 4154; Cell Signaling Technology, Inc.;1:1000), CEACAM6 (Catalog No. 85102; Cell Signaling Technology, Incubation.;1:1000), GPNMB (Catalog No. 38313; Cell Signaling Technology, Inc. ;1:1000), C-MYB (Catalog No. 59995; Cell Signaling Technology, Incubation.;1:1000) and CX30 (Catalog No. ab 200866; Abcam Technology, Inc.;1:1000), (overnight, 4°C) were purchased from Cell Signaling (Littleton, CO) and Abcam (Cambridge, MA), respectively. The polymer-based chromogen visualization system used the HRP anti-rabbit IgG product from Cell Signaling (Burlingame, CA).

2.4.7 Quantification of immunohistochemistry results

Protein expression was first assessed by microscopy by one pathologist and one investigator independently without any prior knowledge of clinical information and pathological parameters.

The color and global cell intensity of the stain varied from light brown to dark brown. Positive staining intensity in tissue samples was scored using three (+++) for high intensity staining, two (++) for moderate staining, one (+) for low intensity staining and negative (no staining). Then, protein expression was firstly quantified as a function of the percentage of tumor cells with positive staining. There were few cases in which the pathologist disagreed with the initial scores. For these cases, we discussed them with the pathologist and re-evaluated and reconfirmed them with another pathologist. Percent staining was categorized as follows: 0=negative, 1=<10% positive tumor cells, 2=11%-50% positive cells, 3=51%-80% positive cells; and 4 = 80% to 100% positive cells [25]. In the final analysis, we developed the protein expression index by combining the global intensity of tumor cell staining and the percentage of tumor cells stained (global cell intensity \times percentage positive area). The threshold was determined after reviewing different studies [26-33] and validated by examining the uninvolved tumor tissue of the same patients in a total of 30 cases. Protein levels were either lower or undetectable in uninvolved tumor tissue, but not in tumor tissue sections.

2.4.8 Statistical analysis

The DESeq2 (v1.26.0) and tximport (v1.20.0) in R packages were used to perform the statistical analyzes of the RNA-seq data. In our study, we also worked in each treatment group with both a conventional p-value and an adjusted p-value. Conventional p-value helps us to assess the evidence against a null hypothesis. The adjusted p-value is often used in situations where multiple comparisons help us to control the overall false positive rate. The level of significance was set at p -value < 0.05, while when screening the long gene lists from RNA-seq, it was adjusted to p -values < 0.1 as described in the results. Principal component analysis was used to analyze the variance of the total RNA-seq count. Wald's test was used when comparing differential gene expression as implemented in the DESeq2 package.

For the western blot, all experiments were repeated at least three times. The densitometric analyzes were carried out using the Quantity One software (Bio-Rad). All data were subjected to one-way ANOVA (PRISM software version 5.0; GraphPad, San Diego, CA) followed by Tukey's test or Student's t-test to determine differences between experimental groups. Differences were considered significant at the $p < 0.05$ level.

In the case of microscopical analysis, all analyzes were performed using GraphPad prism software, version 8 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Statistical significance was accepted when $P < 0.05$.

2.5 Results

After the tumor aggressiveness of our population was assessed by a pathologist, we aimed to investigate whether the PI3K/AKT signaling pathway was activated in 80 patients with available samples.

Of these 80 patients presented an active AKT, for the next phase we selected 28 patients who received neoadjuvant chemotherapy and for whom samples before and after chemotherapy were available.

28 female patients were included in our study during the period of 2019-2021. For these patients, we summarized the individual characteristics of each patient as well as the general characteristics in three tables (Table 2.1; Table 2.2; Table 2.3). The patient's age varied from 25 to 71 years with an average of 46 years (Table 2.1). Table 2.2 show individual characteristics of patient number 1 to patient number 29, patient number 20 was removed because he had a TX breast cancer stage (TX means the pathologist was unable to assess the size of the primary tumor). All specimens were from the same major histological type, invasive ductal carcinoma; Most of our patients had histological grade II or III breast cancer (FIGO, 2009).

PATIENTS	STADE	TYPE	GRADE	AGE	THERAPEUTIC DRUG	ER	PR	HER2
					AC			
P1	T4N2M0	CCI	2	27		Negative	Positive	Negative
P2	T4N0M0	CCI	3	49		Negative	Negative	Negative
P3	T4N0M0	CCI	3	61		Negative	Positive	Negative
P4	T4N1M0	CCI+CIS	1	45		Positive	Positive	Positive
P5	T2N0M0	CCI	2	64		Positive	Positive	Negative
P6	T4N2M0	CCI	2	68		Negative	Negative	Negative
P7	T2N0M0	CCI	3	44		Positive	Positive	Negative
					AN	ER	PR	HER2
P9	T3N1M1	CCI+CIS	3	52		Positive	Positive	Negative
P10	T3N1M0	CCI+CIS	3	25		Positive	Negative	Negative
P11	T4N0M0	CCI	3	29		Negative	Negative	Negative
P12	T3N0M0	CCI	1	56		Positive	Negative	Positive

					AT	ER	PR	HER2
P13	T3N1M0	CCI	3	46		Positive	Positive	Negative
P14	T2N0M0	CCI	3	53		Negative	Negative	Negative
P15	T4N1M0	CCI	2	47		Negative	Negative	Positive
P16	T2N0M0	CCI	2	36		Negative	Positive	Negative
					CT	ER	PR	HER2
P17	T3N1MX	CCI	2	25		Negative	Negative	Positive
P18	T3N0MX	CCI	2	35		Negative	Negative	Positive
P19	T3NXMO	CCI	3	61		Negative	Negative	Negative
					FAC	ER	PR	HER2
P20	TX	CCI	2	32		Positive	Positive	Positive
P21	T3N0M0	CCI	2	66		Negative	Positive	Negative
P22	T2N0M0	CCI	3	55		Negative	Negative	Positive
P23	T2N2M0	CCI	2	46		Negative	Negative	Negative
P24	T2N1M0	CCI	2	35		Positive	Positive	NON
					FEC	ER	PR	HER2
P25	T2N0M0	CCI	3	47		Positive	Positive	Negative
P26	T4N3M0	CCI	3	49		Negative	Negative	Negative
P27	T3N1M0	CCI	2	71		Negative	Negative	Negative

P28	T3N1M0	CCI	2	34		Negative	Negative	Positive
P29	T3N0M0	CCI	2	49		Positive	Positive	Negative

Tableau 2-1: Individual Clinico-pathologic characteristics of included patientes: RE, Estrogen receptor; PR, Progesteron receptor; HER2, Human epidermal growth factor. Most of patients have high grade (2 and 3)breast cancer.

2.5.1 AKT1 and FOXO3 correlate with breast cancer grade in African women.

Initially sensitive to treatment, many cancers acquire the ability to bypass the mechanisms of drug action, thus escaping chemotherapy and becoming resistant. Our laboratory previously investigated chemoresistance in endometrial cancer using the endometrial cell lines KLE and Hec-1. From these experiments, AKT1 and AKT2 isoforms were found to be the most involved in chemotherapy resistance in endometrial cancer. Thus, in our current study, we aimed to examine the involvement of these two isoforms in breast cancer in black women. Once activated, AKT phosphorylates its substrates to inhibit apoptosis or activate cell proliferation. Substrates of AKT, FOXO3, PRAS40, and GSK3 are three substrates involved in chemoresistance in Caucasian women. Given this information, we sought to determine whether PRAS40, FOXO3, and GSK3, could also be involved in chemoresistance in black women. Additionally, we wanted to investigate which of the AKT isoforms, AKT1 or AKT2, is involved in breast cancer in the response to the treatment.

Initially, we investigated in Table 2.2 the correlation between the expression of AKT, its isoforms AKT1 and AKT2, and the substrates activated by AKT with clinicopathological characteristics (such as age, cell differentiation, and therapeutic response) in a cohort of 28 patients with invasive breast cancer. This examination was conducted through immunohistochemistry. The phospho-AKT antibody used in this study is a specialized antibody from Cell Signaling that not only demonstrates AKT activation but also the activation of AKT substrates. AKT phosphorylates substrates only at Ser/Thr in a conserved motif characterized by Arg at positions -5 and -3 and Phospho-AKT Substrate Motif (RXXS*/T*) (110B7) antibody recognizes peptides and proteins containing phospho-serine/threonine preceded by arginine at the -3 position.

Average patient's age was 46. A trend was observed in which total AKT expression is higher in histological grade II (G2) compared to grade I (G1) (Table2.4), but the results are not statistically significant. However, a statistically significant positive correlation was obtained when comparing AKT1 isoform and FOXO3 substrate with the disease grade (*p-value* =0.03 and *p*=0.02 respectively) (Table2.2).

Tableau 2-2: Spearman correlation analysis between expression of AKT isoforms, AKT substrates and clinical parameters of black women breast cancer. N=28. Positive correlation

	AKT	pAKT	AKT1	AKT2	pGSK	pPRAS4 0	pFOXO 3
Age							
Correlation coefficient	-0.2111	0.07458	-0.06482	0.06942	-0.07794	-0.2797	-0.1230
P	0.3006	0.7173	0.7531	0.7361	0.7051	0.1665	0.5496
Grade							
Correlation coefficient	0.3088	-0.03706	0.4046	0.2735	-0.02979	0.1927	0.4154
P	0.1099	0.8515	0.0327	0.1591	0.8804	0.3259	0.0279
Therapeutic response							
Correlation coefficient	-0.01870	0.1529	0.3132	0.3024	0.1260	0.0838	0.2090
P	0.9248	0.4373	0.1046	0.1178	0.5230	0.6713	0.2859
N	28	28	28	28	28	28	28

between AKT1, pFOXO3 and disease grade. N=28 and $p < 0.05$.

2.5.2 Activation of AKT in breast cancer in African women

Previous studies have shown in Caucasian breast cancer that AKT signaling plays a role in cellular defense against chemotherapy and [15] enhances multidrug resistance [16]. Thus, we compared pan AKT and Phospho- AKT immunohistochemistry staining of breast cancer sections before and after chemotherapy. The adjacent uninvolved area served as the negative control. Following chemotherapy, an immunohistochemical analysis revealed a strong staining of the Phospho-(Ser/Thr) AKT Substrate antibody in both the cytoplasm and nuclei of cancer cells compared to their pre-chemotherapy counterparts (Figures 2.2 versus Figure2.3). An immunohistochemical analysis also revealed staining of the AKT Substrate antibody in both the cytoplasm and nuclei of cancer cells compared to their pre-chemotherapy counterparts but nothing significant. Statistical analysis of IHC score and RNA-Seq revealed that global post-chemotherapy AKT overactivation (Figure 2.4) was not preceded by any significant overexpression of AKT in the chemo treated tumor tissues at both the transcriptomic and protein levels (Supplementary Figure 1). Therefore, chemotherapy activates AKT as well as AKT substrates in black female breast cancer.

Now that our signaling pathway of interest, PI3K/AKT, was activated in the African population, we wanted to determine if there was a correlation between the clinical parameters of our patients and the activation of AKT, its isoforms, and the substrates of AKT already implicated in the chemoresistance of breast cancer.

a) **Before CT**

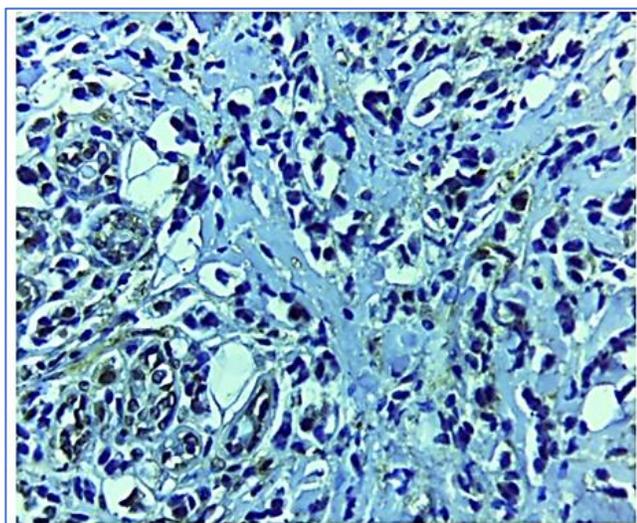


Figure 2.1 : AKT activation (pAKT substrates) in invasive breast cancer. Immunohistochemical staining of pAKT pre chemotherapy in black women breast cancer. IHC staining before chemotherapy.

b) **After CT**

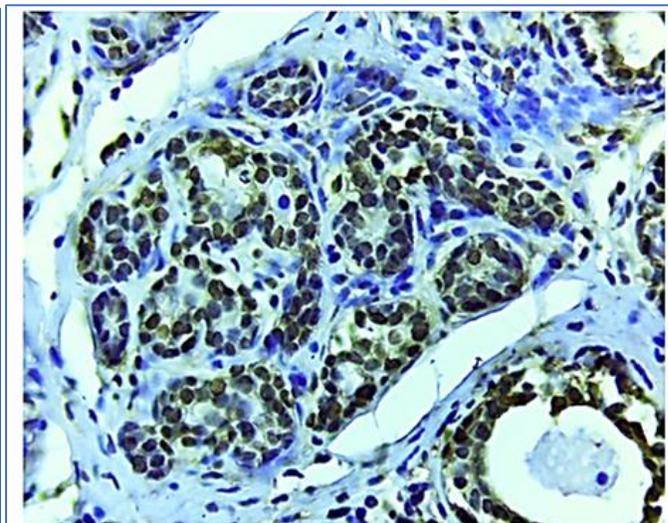


Figure 2.2: AKT activation (pAKT substrates) in invasive breast cancer. Immunohistochemical staining of p AKT post chemotherapy in black women breast cancer. IHC staining after chemotherapy

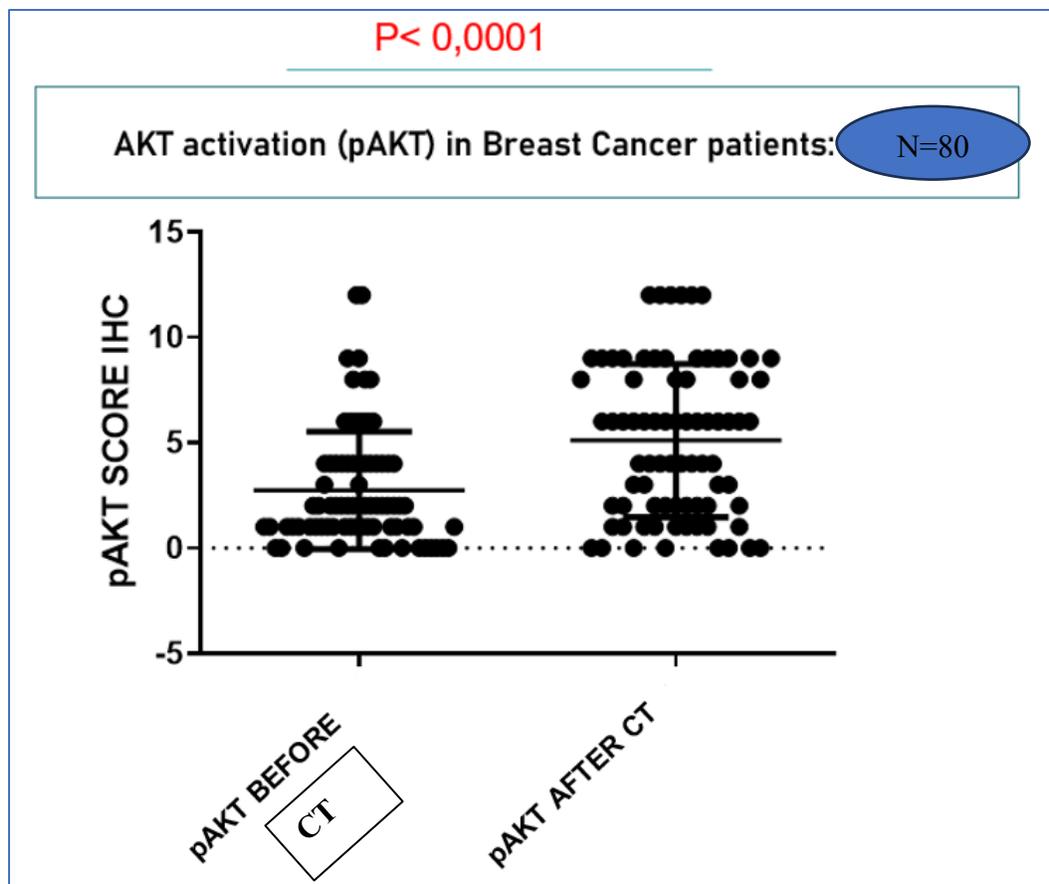


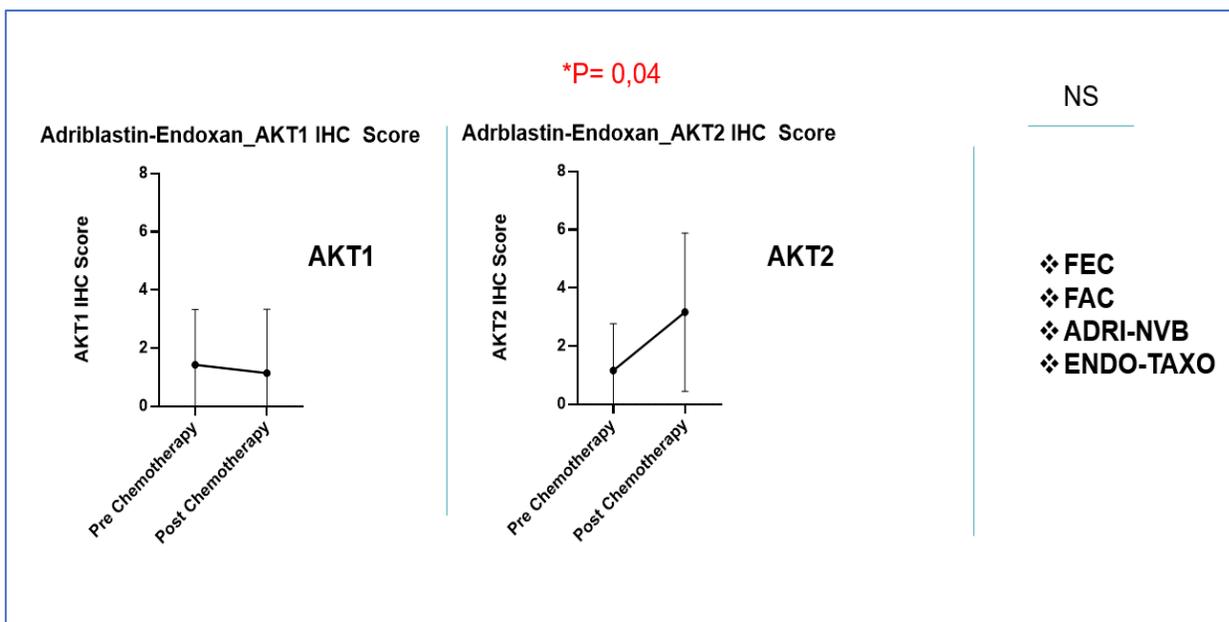
Figure 2.4: Global pAKT IHC score before and after CT

*Invasive ductal carcinoma shows clear AKT activation at protein level
N=80 and significant p-value <0.05*

2.5.3 AKT2 and FOXO3 increase significantly post chemotherapy in breast cancer in African women.

We finally want to investigate at the protein level if chemotherapy had an impact on AKT isoforms and substrates and which isoforms and substrates were involved. The IHC score shows that the AKT2 isoform (Figure 2.5-a) and the FOXO3 substrate (Figure 2.5-b) increase significantly under Adriablastin-Endoxan treatment.

a)



b)

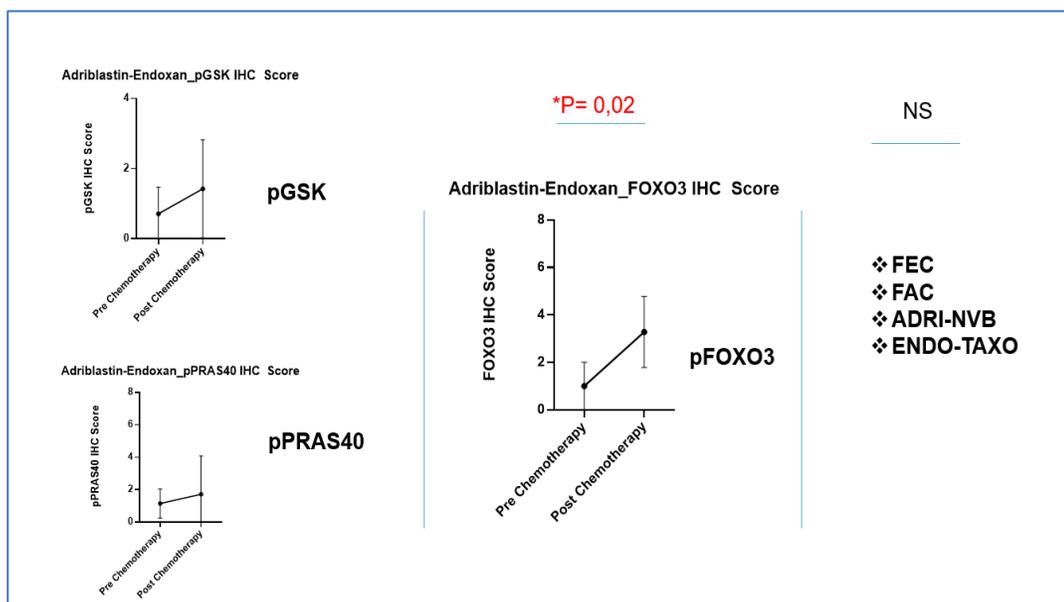


Figure 2.1 : *Immunohistochemistry score of Adriblastin- Endoxan chemotherapy for a) AKT isoforms and b) AKT substrates in breast cancer in Africanwomen.*

NS results is annexed at the end. N=28.NS=Not significant result. (AC = doxorubicin and cyclophosphamide; AN = doxorubicin and navelbin; FAC = 5-fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide; FEC = 5-fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide, ENDO-TAXO=endoxan and taxotere)

In conclusion, Pearson correlation and IHC scoring findings imply that 1) a positive correlation exists between AKT1, FOXO3 and mammary differentiation as their expression level increases with the disease grade; 2) neoadjuvant chemotherapy leads to significant activation of AKT in black women breast cancer and 3) the AKT2 isoform and FOXO3 substrate are significantly increased by doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy and not significantly increased in the other drugs.

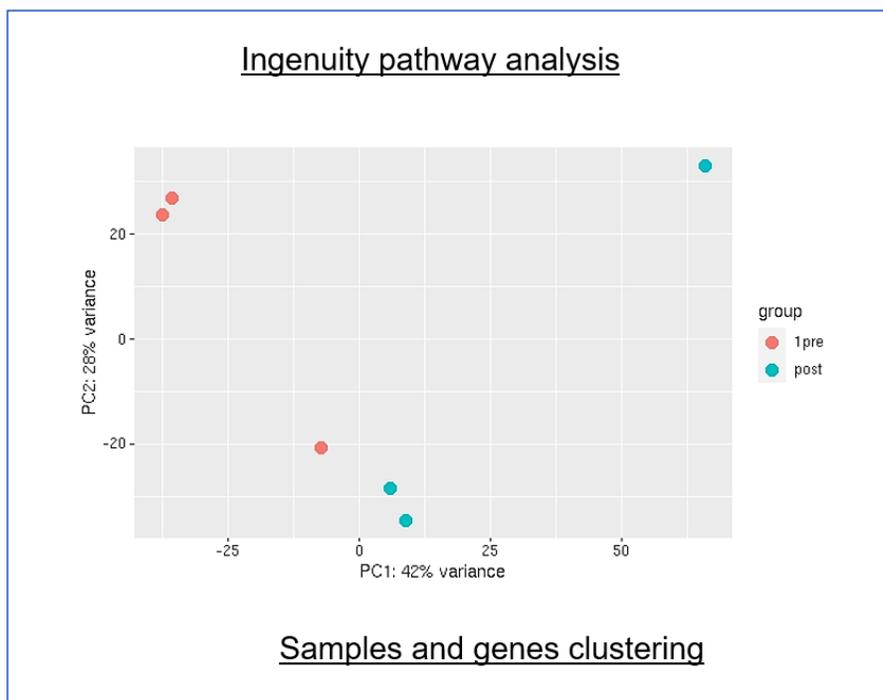
2.5.4 Breast cancer and benign tissue gene expression profiles via RNA-seq

After highlighting the involvement of AKT, its isoforms, and the substrates it activates in response to chemotherapy in black women's breast cancer, we aimed to identify new therapeutic biomarkers through RNA sequencing. We examined the genes differentially expressed in patients in response to each treatment group and explored the biological functions of these genes.

To better interpret our RNA-seq results, we will employ two commonly used graphical methods for each treatment group administered to the patients, namely PCA (Principal Component Analysis) (Figure 2.6-a) and Volcano Plot (Figure 2.6-b). PCA is often used to identify patterns, clusters, or differences between samples and helps to visualize the overall structure of the data or sources of variation. While the Volcano Plot is used to quickly visualize which genes are differentially expressed and to identify those with the most significant changes. Genes that show a large fold change and are statistically significant in Volcano Plot are often considered as potential candidates for further investigation. In our study, the 9 genes that stood out in the Volcano Plot in each of the treatment groups were AGR2, PLIN1, GJB6, CEACAM6, EGR1, CCN2, MYB, GPNMB, and AMPKalpha2. Consequently, they were subsequently considered as potential candidate biomarkers.

When exploring all the gene count data, the plotting of the two main components of the principal component analysis revealed a clustering trend in the cancer samples for post-treated versus pre-treated patients by 5-fluorouracil-doxorubicin-cyclophosphamide (FAC) and in the 4 chemoresistance tumor samples compared to benign control patients. No clustering trend was found in the 3 post-treated versus pre-treated cancer samples with Adriblastine-Endoxan (AC or doxorubicin and cyclophosphamide) and Adriblastin-Navelbine (NVB or doxorubicin and navelbin) chemotherapy compared to the controls.

a)



b)

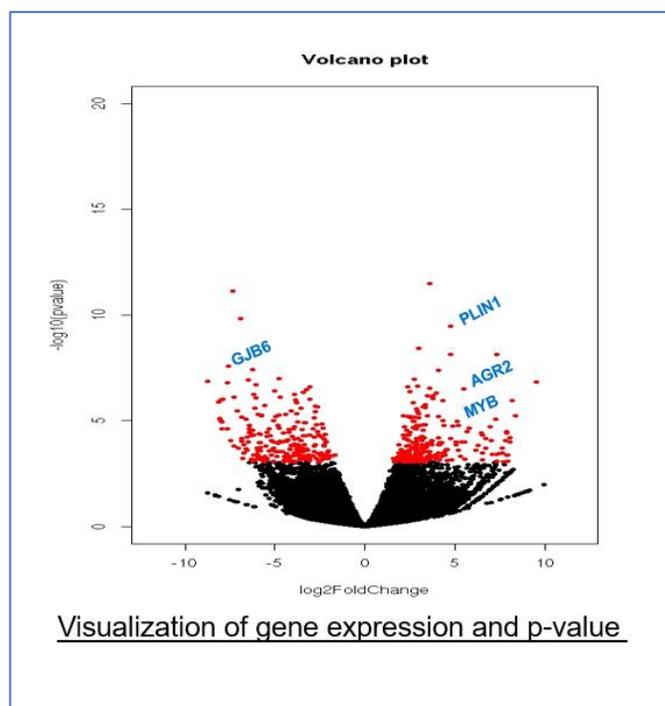


Figure 2.2: RNA-seq differentially expressed genes in FAC-treated black women.

(a) Principal component analysis showing the variance distance between the treatments groups of the 3 FAC pre/post patients. Clustering evident for pre chemotherapy patient versus post chemotherapy patient. (b) Volcano plot showing differentially expressed genes in pre FAC chemotherapy and post FAC chemotherapy patient, with labels indicating *PLIN1*, *AGR2* and *MYB* overexpressed in post FAC chemotherapy group ($P < 0.05$, $\text{Log FC} > 2$).

2.5.4.1 Gene expression profiles of patients treated with 5-fluorouracil (FAC) for breast cancer via RNA-seq.

Using DESeq2 as the main tool, we sought to find differential gene expression in cancer post-treatment versus pre-treatment or versus control using pairing information in the samples.

When comparing pre-chemotherapy and post-chemotherapy cancer tissue of patients who received FAC treatment, a total of 43820 genes were identified with 2739 genes differentially expressed for statistical significance $p\text{-value} < 0.05$. The complete list of differentially expressed genes is given in (Supplementary Excel Table). At the top of the list of genes ordered by ascending value with a p-adjusted $p < 0.1$ there are (KRT2, DSG1, PLIN1, AGR2, MYB and GJB6). Those with an adjusted $p\text{-value} < 0.1$ and a change in log2 factor (L2FC) > 2 were labeled in the volcano diagram (Supplementary Figure 2). Among our 9 selected genes, PLIN1 is the most increased (L2FC = 7) in post-treated patients compared to the control group while GJB6 decreases (L2FC = -6.8) (Table 2.5). In patients before treatment compared to control AGR2 (L2FC = 5.8) and MYB (L2FC = 4.8) are the highly expressed. Venn diagram shows in red emerging therapeutics biomarkers (Figure 2.7).

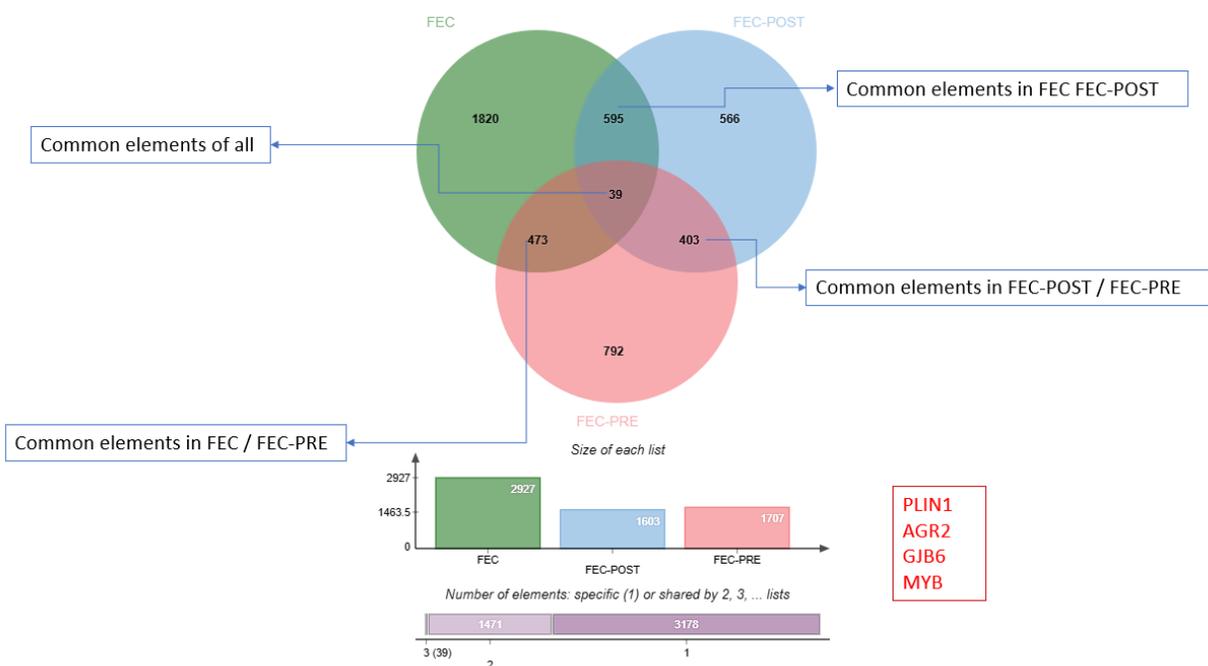


Figure 2.7: Venn diagram illustrating the number of differentially expressed genes in FAC chemotherapy patients as a function of their p-values and log2 factor change in RNA-Seq analysis of 6 pairs of 5-fluorouracil treated samples. The possible therapeutic biomarkers that emerge are in red. $P_{adj} < 0, 1$.

Log2 fold FAC	Function	Pre chemotherapy/ ctrl	Post chemotherapy/ctrl

from:			
AGR2	Oncogene	5.94	3.65
PLIN1	Tumor suppressor	5.48	7.61
GJB6	Bad prognosis	-5.18	-6.8
CEACAM6	Oncogene	4.43	-0.4
EGR1	Tumor suppressor	1.12	3.57
CCN2	Oncogene	0.11	1.4
MYB	Oncogene	4.84	2.85
AMPKα2	Tumor suppressor	5.46	-
AMPKα1	Oncogene	0.58	0.7

Tableau 2-3: Summary table of our genes of interest when compared to the control before and after FAC chemotherapy. Red genes are differentially expressed with high Fold.

The summary table (Table 2-3) shows that AGR2 and MYB oncogenes which were significantly overexpressed before the treatment (5.94 and 4.84 respectively) dropped post-treatment (3.65 and 2.85) while the tumor suppressor genes EGR1 and PLIN1 increased. However, a decrease in GJB6 and CEACAM6, although not significant, was observed.

2.5.4.2 Gene expression profiles of patientes treated with Adriblastine-Endoxan (AC) for breast cancer via RNA-seq.

Using DESeq2 as the main tool, we sought to find differential gene expression in cancer post-treatment versus pre-treatment or versus control using pairing information in the samples. When comparing cancerous patients tissue before AC chemotherapy and after AC chemotherapy of patients, a total of 46461 genes were identified with 1033 genes (549 up and 484 down) differentially expressed for statistical significance p-value < 0.05.

At the top of the list of genes ordered by ascending value with a p-adjusted $p < 0.1$, we found HBA2, AMPK α 2, GPNMB, EGR1, MYB and GJB6. *Those with an adjusted p-value < 0.1 and a change in log2 factor (L2FC) > 2* were labeled in the volcano diagram in Suppl. Figure 2. Among our selected genes, GPNMB is the most increased (L2FC = 5) in post-treated patients compared to the control group followed by EGR1 (L2FC = 3.2) and CCN2 (L2FC = 3.2). In patients before treatment compared to control GJB6 (L2FC = -4.9) and MYB (L2FC = 4.16) are the highest.

Log2Fold Adri-Endo from:	Function	PRE CT / CTRL	POST CT/CTRL
AGR2	Oncogene	4.87	4.5
PLIN1	Tumor suppressor	2.98	2.32
GJB6	Bad prognosis	-4.97	-4.33
CEACAM6	Oncogene	0.23	-1.10
EGR1	Tumor suppressor	1.82	3.26
CCN2	Oncogene	1.52	3.21
MYB	Oncogene	4.17	3.49
GPNMB	Oncogene	1	5
AMPKα1	Oncogene	0.74	0.78

Tableau 2-4: Summary table of our genes of interest when compared to the control before and after Adriblastine-Endoxan chemotherapy. Red genes are differentially expressed with high Fold2

The summary table (Table 2-4) shows that only the MYB oncogene which was significantly overexpressed before treatment dropped post treatment. On the other hand, the oncogenes GPNMB and CCN2 (CTGF) and the tumor suppressor EGR1 increased significantly in post-treatment patients. However, an increase in GJB6 and a decrease in AGR2 and PLIN1, although not significant, were observed.

2.5.4.3 Gene expression profiles of patientes treated with Adriblastine-Navelbine for breast cancer via RNA-seq.

Using DESeq2 as the main tool, we looked to find differential gene expressions in cancer post-treatment versus pre-treatment or versus control using pairing information in the samples. When comparing cancerous tissue before chemotherapy and after chemotherapy of patients who received Adribastine-Navelbine chemotherapy, a total of 44689 genes were identified with 1027 genes (870 up and 157 down) differentially expressed with statistical significance p -value < 0.05 . At the top of the list of genes ordered by ascending value with a p -adjusted $p < 0.1$, there are (HBA2, HER2,

HBG1, AGR2, MYB and GJB6). Those with an adjusted p-value < 0.1 and a change in log2 factor (L2FC) > 2 were labeled in the volcano diagram in Suppl. Among our selected genes, MYB is the most increased (L2FC = 4.7) in post-treated patients compared to the control group. In patients before treatment compared to control AGR2 (L2FC = 6.6) and GJB6 (L2FC = -5.9) are the highest.

Log2 Fold ADRI-NVB from:	Function	PRE CT/CTRL	POST CT/CTRL
AGR2	Oncogene	6.64	5.72
PLIN1	Tumor suppressor	3.05	1.43
GJB6	Bad prognosis	-5.98	-1.46
CEACAM6	Oncogene	-1.23	-2.29
EGR1	Tumor suppressor	1.41	0.98
CCN2	Oncogene	0.14	0.25
MYB	Oncogene	5.53	4.76
AMPKα2	Tumor suppressor	5.94	RAS
AMPKα1	Oncogene	0.89	0.41

Tableau 2-5: Summary table of our genes of interest when compared to control before and after Adriblastine-Navelbine chemotherapy.

The summary table (Table 2-5) shows that the MYB oncogene which was significantly overexpressed before the treatment remained significantly overexpressed after the treatment. On the other hand, the AGR2 oncogene decreases while the GJB6 increases in post-treatment patients. However, a decrease in tumor suppressors EGR1 and PLIN1, although not significant, was observed.

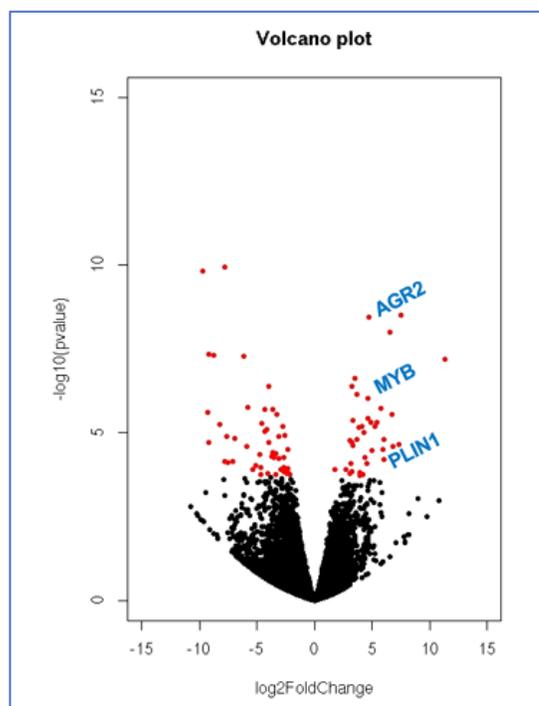
2.5.4.4 Gene expression profiles of chemoresistance patients and triple negative breast cancer patients via RNA-seq

Considering that 1) Black women are more likely to be diagnosed with triple-negative breast cancer than individuals from other ethnic groups and 2) Black women with triple-negative breast

cancer may respond differently to standard treatments compared to other ethnic groups. We examined the expression profile of a group of triple-negative breast cancer patients. After examining the differentially expressed genes in response to chemotherapy, we wanted to explore the differentially expressed genes in patients who were chemo resistant and those with a triple-negative hormonal profile. We compared 4 chemo resistant patients with 4 chemo sensitive patients, then compared chemo resistant patients with our control group, and finally compared triple-negative patients with the control group. The control group consists of patients with a benign tumor, such as a fibroadenoma.

Using DESeq2 as the main tool, we sought to find the differential gene expression in cancer patients who were chemo-resistant versus patients with benign tumor using the matching information in the samples. When comparing cancerous tissues of chemo-resistant patients versus control, a total of 48688 genes were identified with 1348 genes (697 up and 651 down) differentially expressed at the level of statistical significance of the value. $P < 0.05$. The complete list of differentially expressed genes is given in Suppl. Table. At the top of the list of genes ordered by ascending value with a p-adjusted $p < 0.1$, there are (MYB, ANKRD30A, CAPN13, AGR2 and PLIN1). *Those with an adjusted p-value < 0.1 and a change in log2 factor (L2FC) > 2 were labeled in the volcano diagram (Figure 2.8).* Among our 9 selected genes, AGR2 is the most increased (L2FC = 6.5) followed by MYB (L2FC = 4.7) and PLIN1 (L2FC = 3.3) (Figure 2.8) in chemoresistance patients compared to the control group. Interestingly, chemo-sensitive patients compared to chemo-resistant patients had a significant decrease in CEACAM6 (L2FC = -5) while post-treated chemo-resistant patients had a significant decrease in AMPK α 2 (PRKAA2) (L2FC = -8.6) (Figure 2.9).

a)



b)

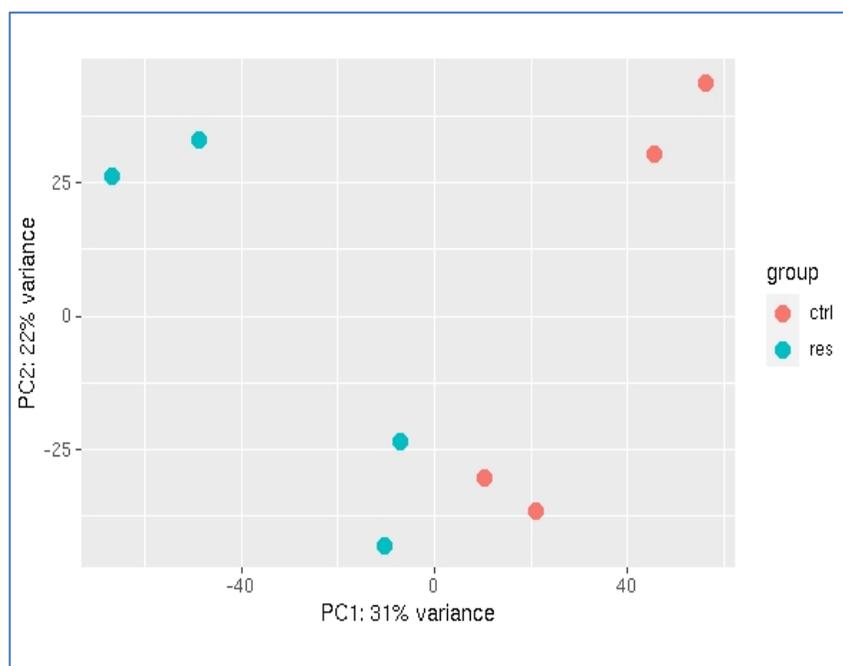


Figure 2.3 : Chemo resistant RNA-seq identifies genes differentially expressed in chemo resistant breast cancer in black women.

(a) Principal component analysis showing the variance distance between treatment groups of the 8 patients, clustering clear for chemo-resistant cancer compared to non-cancer control; (b) Volcano plot illustrating the number of differentially expressed genes as a function of their p -values and \log_2 factor change in the analysis of 8 samples. ($P < 0.05$, $\text{Log FC} > 2$).

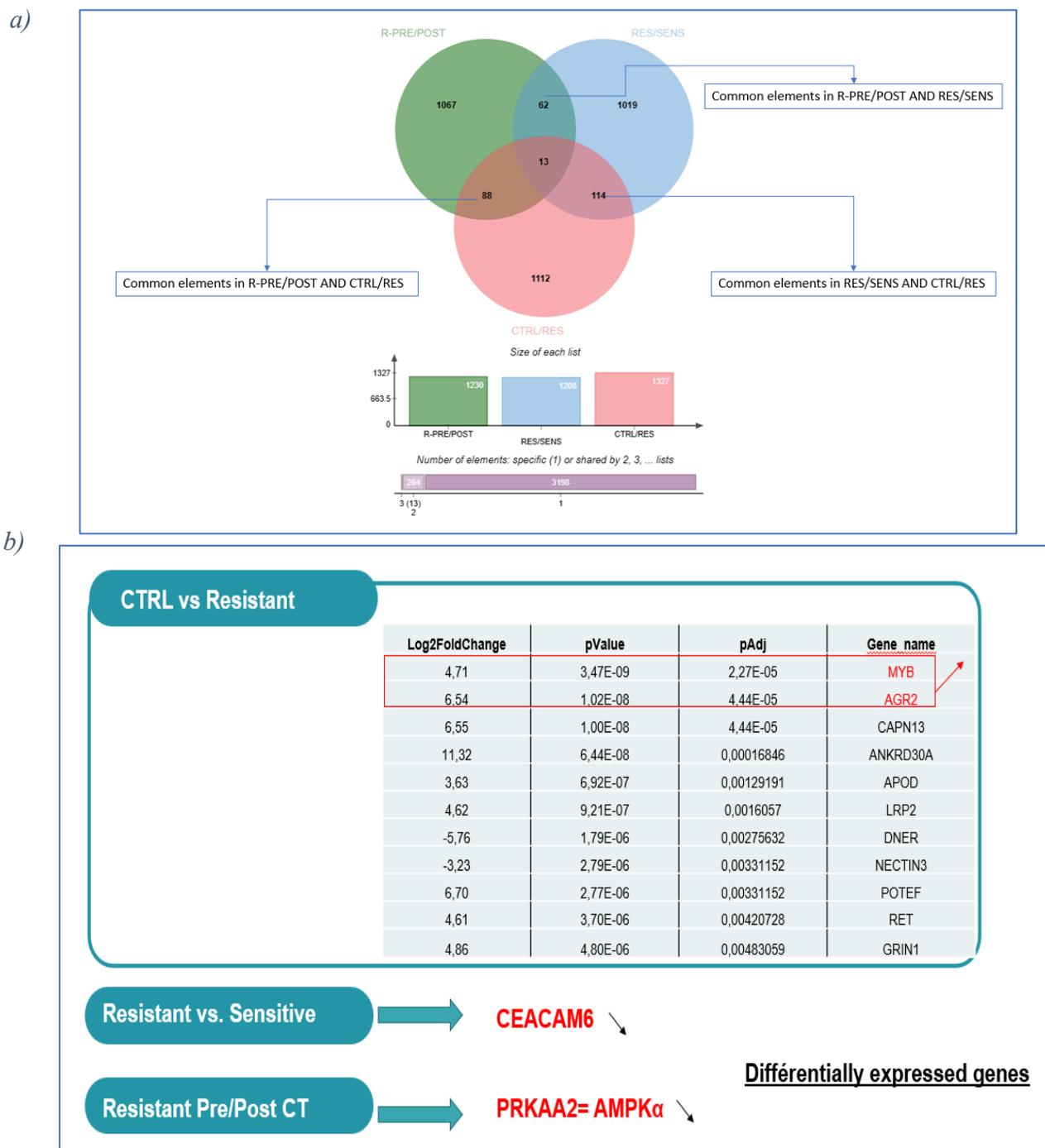


Figure 2.9: Summary of genes in chemo-resistant

a) Venn diagram illustrating the number of differentially expressed genes as a function of their p -values and log₂-fold change in the analysis of 7 pairs of chemo-resistant samples. b) Differential expression of genes in chemo-resistant tumors. ($P < 0.05$, Log FC > 2).

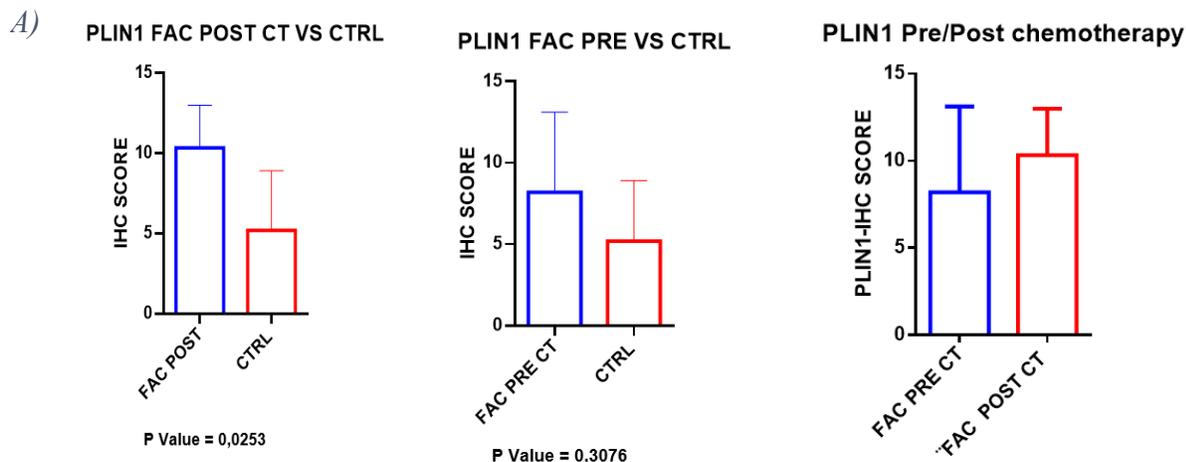
2.5.5 Validation of RNA seq analysis protein by Immunohistochemistry

RNA-seq can generate complex data, and validation through an independent method enhances the reliability of the results. IHC validation is crucial here to confirm RNA-seq findings as it helps determine whether changes in gene expression have biological significance in a tissue context. IHC validation confirms that changes in gene expression are also reflected at the protein level, thereby contributing to establishing the biological relevance of the identified biomarkers.

2.5.5.1 PLIN1

The 5 member proteins of the Perilipin family (PLIN) are the most important lipid droplet (LD)-associated proteins because they are involved in the formation and degradation of LDs. PLIN2 and PLIN3 are ubiquitously expressed while PLIN1, PLIN4 and PLIN5 are mainly restricted to adipocytes, skeletal muscle and cardiac muscle [35,36]. Recent studies demonstrated that aberrant expression of PLIN family genes may serve as a potential prognostic biomarker in breast cancer [37,38] and that PLIN family genes were strongly associated with clinical outcomes of breast cancer. Mounting evidence shows that PLIN1 inhibits the proliferation, migration and invasion of breast cancer cells [39-41].

However, no studies exist on the expression profiles and prognostic value of PLIN1 in breast cancer in Africanwomen. Therefore, we first performed an RNA-seq to look at the differential expression of PLIN1 in breast tissue before and after chemotherapy. With 3 matched RNA samples from the RNA-seq project, relative expression of PLIN1 in post-chemotherapy tissues was found to be more than 7 times higher than in control tissues. PLIN1 is also one of the genes differentially increased in the FAC (Post CT/Ctrl) treatment groups, in the drug resistance and triple negative groups.



B)

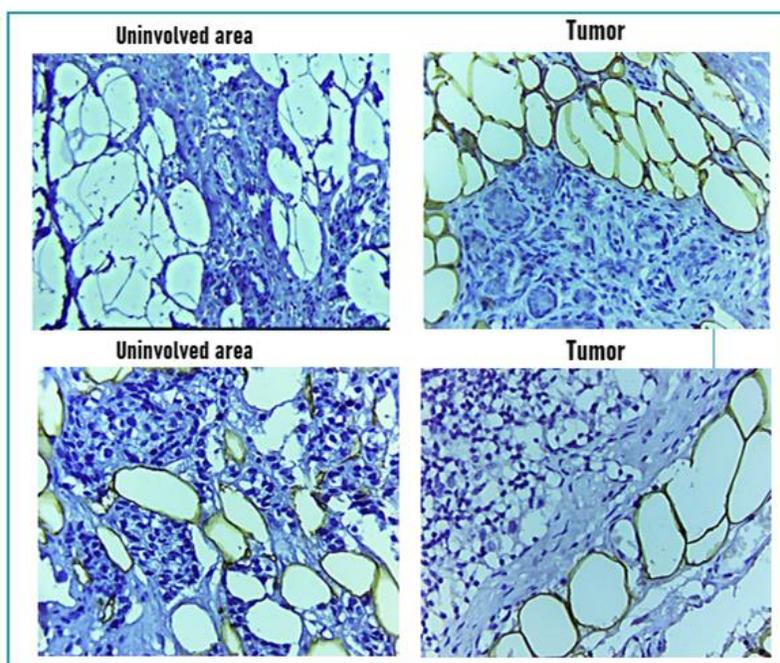


Figure 2.10: Expression of PLIN 1 in breast cancer.

A) IHC PLIN 1 score of patients treated with FAC. PLIN1 levels increase in patients pre and post treated with FAC compared to the control. AGR2 levels decrease in chemotherapy-resistant patients who have not yet received treatment compared to the controls. . B) IHC staining of PLIN1 shows membrane staining, top left is the adjacent normal consisting of non-cancerous cells, while cancer cells on the right side have strongly brown stained adipocytes indicating higher level of expression. Significant for $p < 0.05$.

As further characterization of PLIN1 expression with respect to microscopic characteristics of cancer requires immunohistochemistry, we assessed PLIN1 expression at the protein level in patient FFPE materials which showed highly significant difference on RNA-seq. Normal stroma and glands usually have negative or weak staining, while breast cancer has stronger staining (Figure 2.10). The staining pattern of adipocytes is membranous. The IHC score in figure 2.10-a demonstrates an overexpression of PLIN1 in cancer compared to control patients, as PLIN1 increases in patients before treatment compared to controls and after treatment compared to controls. It can be seen that the immunohistochemistry curve (IHC score) shows the significant increase of PLIN1 in the post-treated patients compared to the control patients and the non-significant increase in the post-treated patients compared to the patients before the treatment (Figure 2.10-a). This result correlates with the RNA-seq result of PLIN1 (Table 2.6)

2.5.5.2 AGR2

Human anterior gradient 2 (AGR2), one of many targets of estrogen, was first discovered as an overexpressed gene in ER-positive breast cancer cell lines [42,43]. Its overexpression in ER-positive breast cancer is associated with poor prognosis, especially in hormone-resistant tumors [43]. AGR2 acts by promoting cell proliferation, cell survival and metastasis of breast cancer cells [44]. In addition, AGR2 is a secreted protein [45] that can promote breast cancer metastasis by regulating tumor cell adhesion and dissemination. However, to date, there are no published data detailing AGR2 expression in African female breast cancer. We first performed an RNA-seq to look at the differential expression of AGR2 in breast tissue before and after chemotherapy. With 3 matched RNA samples from the RNA-seq project, relative expression in pre-chemotherapy tissues was found to be more than 6 times higher than in control tissues. AGR2 is also one of the genes differentially expressed in the FAC (Pre CT/Ctrl), NVB (Post CT/Ctrl), drug resistance and triple negative treatment groups.

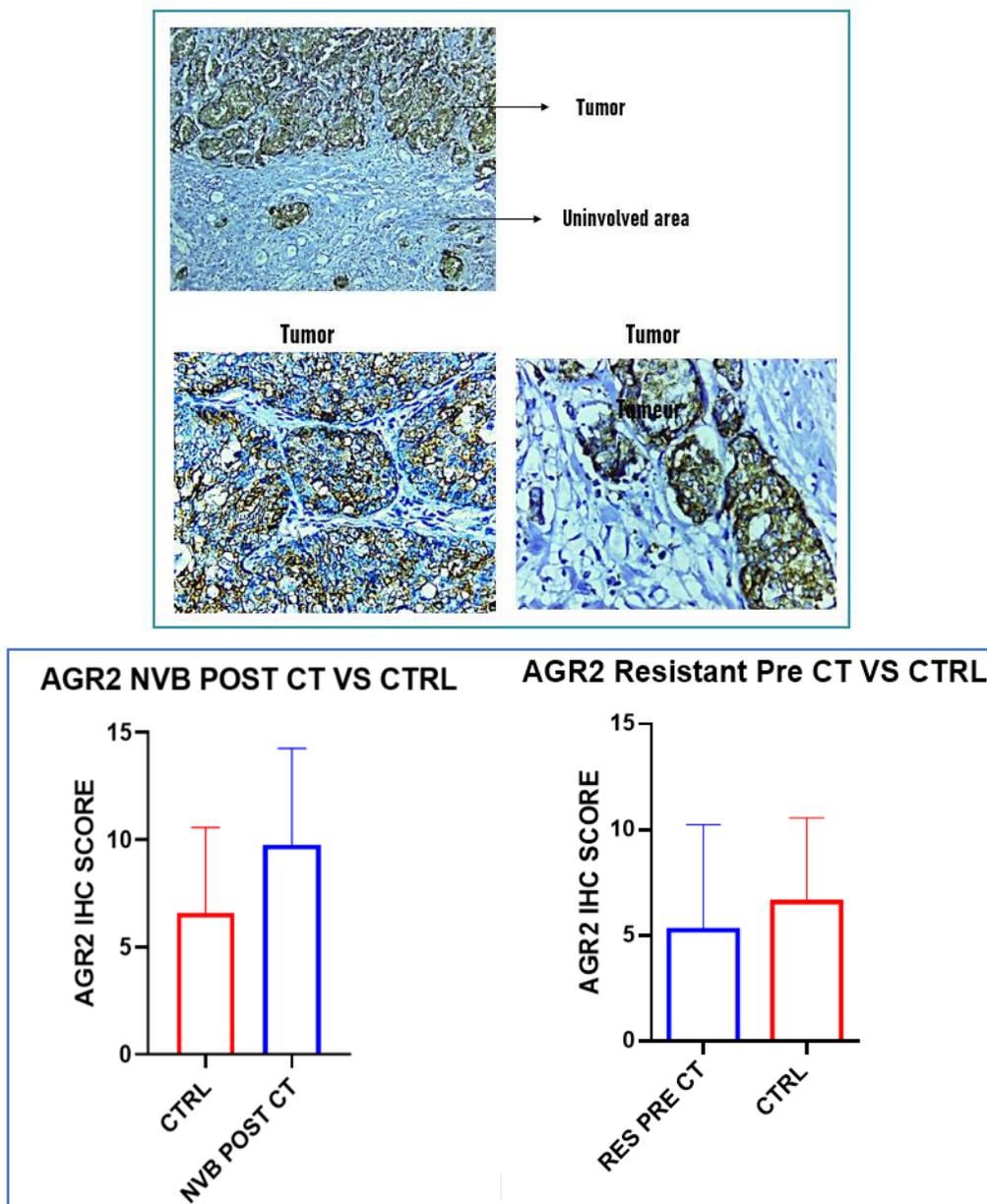


Figure 2.11: AGR2 expression in breast cancer.

IHC staining of AGR2 in chemo-resistant patients. The uninvolved tumor area consists of non-cancerous cells and shows blue color, while the cancerous cells at the top are strongly stained brown indicating higher level of expression. IHC score at right shows an elevated AGR2 in tumors patients but nothing significant. AGR2 levels increase in patients treated with Navelbine compared to the control (Figure 2.11). AGR2 levels decrease in chemotherapy-resistant patients who have not yet received treatment compared to the control.

As further characterization of AGR2 expression with respect to microscopic characteristics of cancer requires immunohistochemistry. We assessed AGR2 expression at the protein level in FFPE materials from patients which showed highly significant difference on RNA-seq. Normal stroma and glands usually have negative or weak staining, while breast cancer has stronger staining (Figure 2.11). The staining pattern is **predominantly membranous**.

It can be seen that the immunohistochemistry curve (IHC score) shows that AGR2 increases in patients treated with Navelbin compared to the control (Figure 2.11), as observed in the RNA-seq. However, AGR2 decreases in chemo resistant patients who have not yet been treated compared to the control, and this result contradicts that observed in the RNA-seq (Table at the end).

2.5.5.3 CEACAM6

The family of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAMs) are transmembrane glycoproteins that belong to the immunoglobulin superfamily. They are involved in several biological processes [46], such as cell growth, differentiation, cell recognition, immune response and cell adhesion [47]. Four members of CEACAMs (namely, CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6 and CEACAM7) have been found in epithelia [48] and can mediate multiple cells signaling pathways and induce tumor suppression/promotion, angiogenesis, lymphocyte activation, cell cycle and adhesion [49]. CEACAM6, also known as *CD66c*, belongs to the carcinoembryonic antigen (CEA) family [50]. It is overexpressed in breast cancer and may promote cancer progression by inducing epithelial-mesenchymal transition (EMT) [51]. However, to date, there are no published data detailing the expression of CEACAM6 in breast cancer in African women. We first performed an RNA-seq to look at the differential expression of CEACAM6 in breast tissue before and after chemotherapy. With 3 paired RNA samples from the RNA-seq project, the relative expression in pre-chemotherapy tissues was found to be more than 4 times higher than in control tissues. CEACAM6 is also one of the genes differentially expressed in the FAC treatment group (Pre CT/Ctrl) and in the chemo-resistant group compared to the chemo-sensitive (L2FC = -5). (Table 2.6).

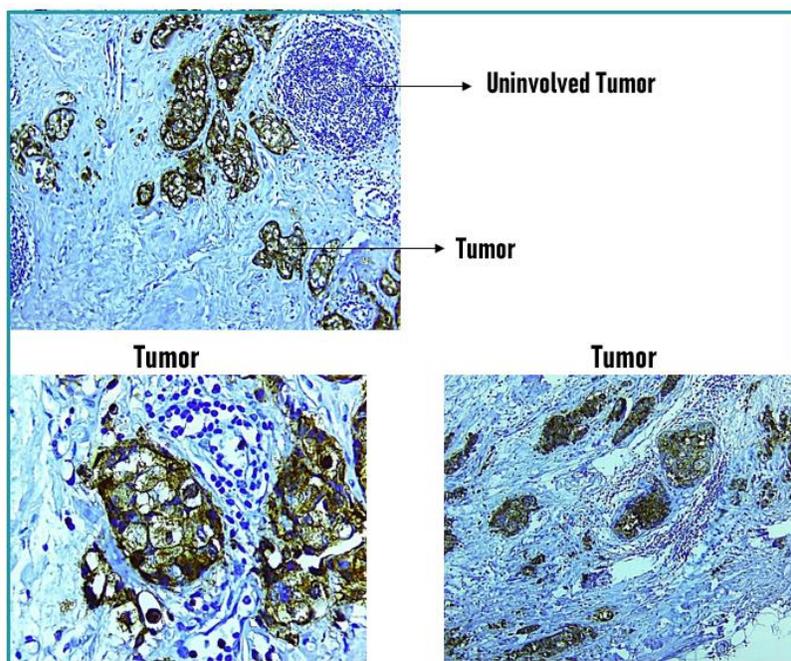
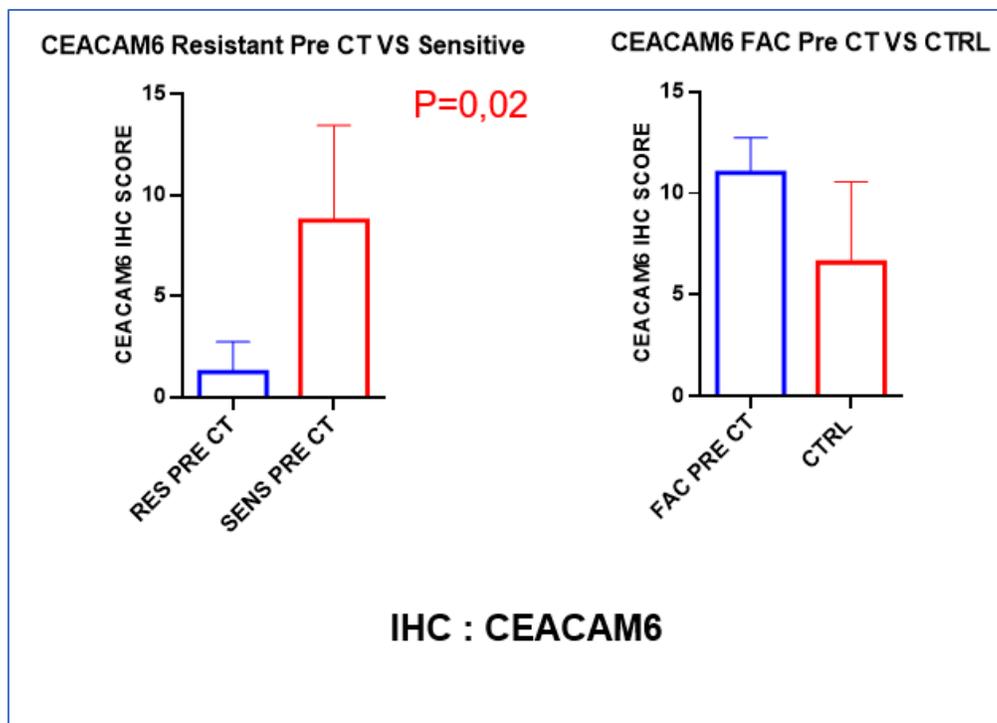


Figure 2.12: Expression of CEACAM6 in breast cancer.

IHC staining of CEACAM6, the uninvolved tumor area consists of non-cancerous cells shows blue staining, while the cancerous cells or tumor area are strongly stained brown indicating a higher level of CEACAM6 expression. IHC score at right shows that CEACAM 6 decreased in chemo resistant. $P < 0.05$

As further characterization of CEACAM6 expression with respect to microscopic features of cancer requires immunohistochemistry, we assessed CEACAM6 expression at the protein level in patients FFPE materials which showed highly significant difference on RNA-seq. Normal adjacent usually have negative or weak staining, while breast cancer has stronger staining (Figure 2.12). The staining pattern is both membranous and cytoplasmic, but not all of the cytoplasm, with a patchy distribution within cells, often concentrated at one end of stained cells.

It can be seen that the immunohistochemistry curve (IHC score) shows a significant reduction in CEACAM6 in the chemo-resistant patients compared to the chemo-sensitive patients as observed with RNA-seq (L2FC=-5) (Figure 2.12). However, a non-significant increase in CEACAM6 was observed in patients before chemotherapy compared to control patients, whereas this increase was very significant on RNA-seq. (Figure 2.12) (Table 2.8).

2.5.5.4 EGR1

The early growth response gene 1 (EGR1) encodes a protein belonging to the early growth response (EGR) protein family, a family of zinc finger transcription factors. In addition, EGR1 is a direct regulator of several tumor suppressors, such as transforming growth factor beta 1 (TGF β 1), tumor protein P53 (p53), and phosphatase and tensing homolog (PTEN). Overexpression of EGR1 has also been reported to arrest cell cycle progression in breast cancer. However, there are no published data detailing EGR1 expression in African female breast cancer. We first performed RNA-seq to look at the differential expression of EGR1 in breast tissue before and after chemotherapy. With 3 matched RNA samples from the RNA-seq project, relative expression in post-chemotherapy tissues was found to be more than 3-fold higher than in control tissues. EGR1 is also one of the genes differentially expressed in the FAC (Post CT/ Ctrl) and ENDO (Post CT/ Ctrl) treatment groups as well as in the triple negative group compared to the controls (L2FC = 2.3).

As further characterization of EGR1 expression with respect to microscopic characteristics of cancer we performed immunohistochemistry. We assessed EGR1 expression at the protein level in patients FFPE materials which showed highly significant difference by RNA-seq. Normal stroma and glands usually stain negative or weak, while breast cancer stains stronger (Figure 2.13). The staining pattern is nuclear.

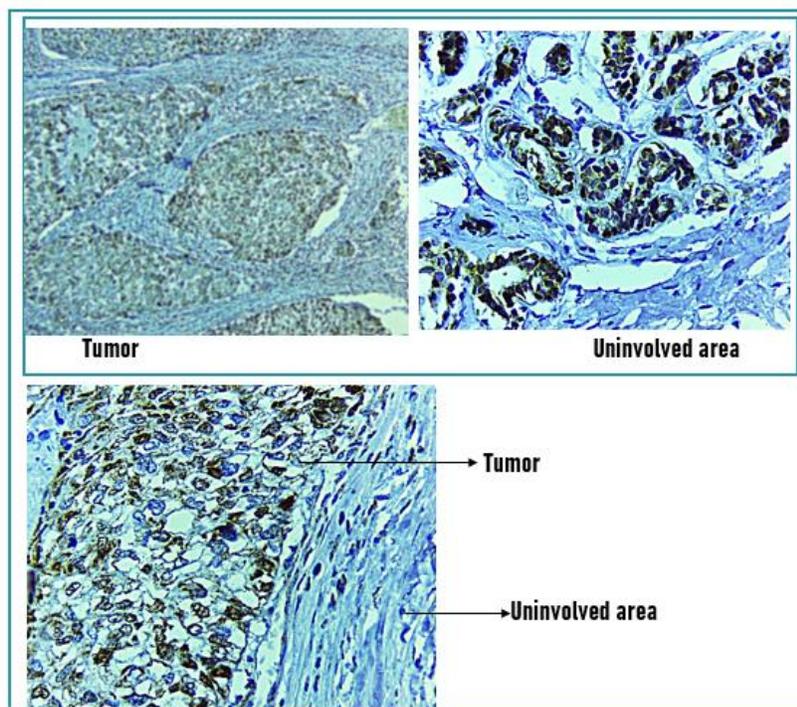
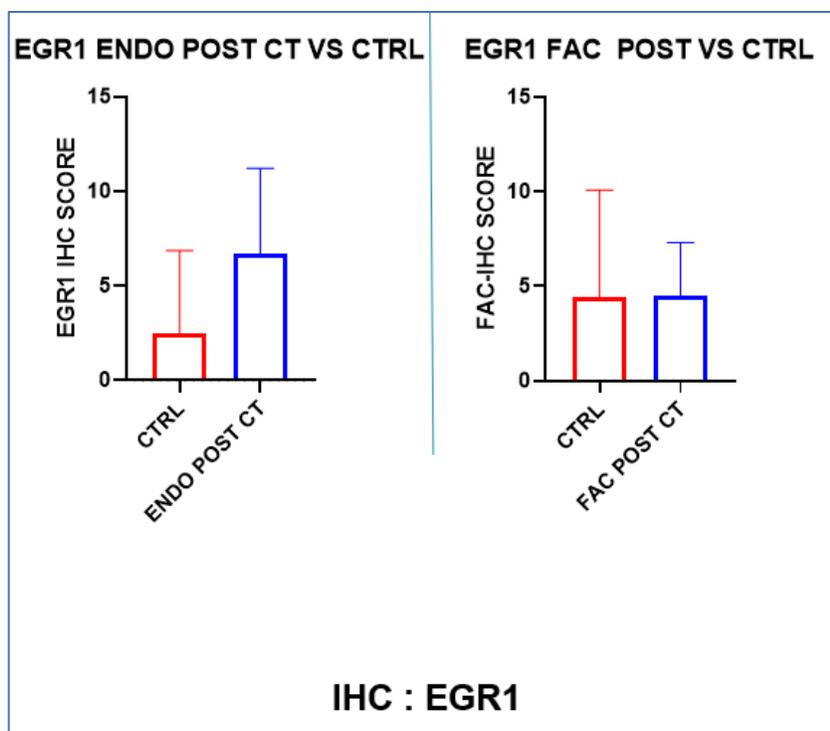


Figure 2.13: EGR1 expression in breast cancer.

IHC staining of EGR1, the normal adjacent area consists of non-cancerous cells are blue, while cancerous cells or Tumor area are strongly stained brown indicating higher level of expression. $P < 0.05$

The immunohistochemistry curve (IHC score) shows a significant increase in EGR1 in patients after Endoxan chemotherapy compared with control patients, as observed with RNA-seq. However, the significant increase in EGR1 observed in the RNA-seq of post-treated FAC patients compared to the controls is not found in IHC. (Table 2.8).

In a summary table (Table 2-6), we aimed to compare the results obtained by RNA-seq with the results of immunohistochemistry used for validation. 84% of significant results obtained in RNA-seq could be confirmed by IHC. The most relevant IHC results were included in the article, and the additional IHC results were placed in the supplementary material.

GENE	RNA sequencing result	IHC result	Remarks
CTGF in ENDO POST CT/CTRL	Increases in significant POST CT	Increases in POST CT	
GPNMB in ENDO PRE/ ENDO POST CT	Increases in POST CT significant	Increases in PRE CT	
GPNMB in ENDO POST CT/CTRL	Increases in POST CT significant	Increases in POST CT	
EGR1 in ENDO POST CT/CTRL	Increases in POST CT significant	Increases in POST CT	
EGR1 in FEC POST CT /CTRL	Increases in POST CT significant	Invariable	
EGR1 in TRIPLE NEGATIVE/ CTRL	Increases in TRIPLE NEGATIVE. significant	Increases in TRIPLE NEGATIVE	
PLIN1 in FEC POST CT/CTRL	Increases in POST CT significant	Increases in POST CT	
PLIN1 in FEC PRE/CTRL	Increases in PRE CT significant	Increases in PRE CT	
PLIN1 in TRIPLE NEGATIVE/CTRL	Increases in TRIPLE NEGATIVE. significant	Increases in TRIPLE NEGATIVE	
AGR2 in FEC PREC CT/ CTRL	Increases in PRE CT Significant	Decreases in PRE CT	REVERSE
AGR2 in NVB PRE CT/CTRL	Increases in PRE CT Significant	Increases in PRE CT	

AGR2 in NVB POST CT /CTRL	Increases in POST CT Significant	Increases in POST CT	
AGR2 RESISTANT PRE CT/CTRL	Increases in RESISTANT PRE CT	Decreases in RESISTANT PRE CT	REVERSE
AGR2 TRIPLE NEGATIVE/CTFL	Increases in TRIPLE NEGATIVE. Significant	Decreases in TRIPLE NEGATIVE	REVERSE
CEACAM6 FEC PRE CT/CTRL	Increases in PRE CT Significant	Increases in PRE CT	
CEACAM6 SENSITIVE/RESISTANT CT	Decreases in SENSITIVE	Increases in SENSITIVE	REVERSE
AMPK α 2 NVB POST CT/ PRECT	Increases in POST CT	Increases in NVB POST CT	
AMPK α 2 RESISTANT PRE CT/ POST CT	Decreases in resistant POST CT	Decreases in RESISTANT POST CT	
MYB RESISTANT PRE CT/CTRL	Increases in RESISTANT PRE CT	Increases in RESISTANT PRE CT	
MYB NVB PRE CT/CTRL	Increases in PRE CT	Increases NVB in PRE CT	
MYB NVB POST CT/CTRL	Increases in POST CT	Increases in NVB POST CT	
MYB FEC PRE CT/ CTRL	Increases in FEC PRE CT	Increases in FEC PRE CT	
MYB ENDO PRE CT/CTRL	Increases in ENDO PRE CT	Increases in ENDO PRE CT	
MYB TRIPLE NEGATIVE/CTRL	Increases in TRIPLE NEGATIVE	Increases in TRIPLE NEGATIVE	

Tableau 2-6: Summary table of our genes of interest comparing our IHC score with our RNA-Seq results. Reverse shows inverse correlation between IHC expression and RNA-Sequencing. Four out of the 24 RNA-seq results show inverse correlation and could not be validated by IHC. 84% of correlation between RNA-Seq and IHC score.

Expression status of our genes of interest in TCGA RNA-seq data

To reinforce the validation by IHC of our RNA-seq we associated an in-Silico validation of our genes. As a means of in silico validation, we studied in the TCGA RNA-seq dataset via the UALCAN web portal [28] and compared with our RNA-Seq results.

We want here to show the difference of expressions of our breast cancer genes in Caucasians and Afro-Americans to better compare with Africans.

The TCGA covers a wide range of cancer types by providing analyses related to gene expression, mutations, copy number variations, and clinical parameters. TCGA used in silico validation is often more cost-effective and faster compared to experimental validations in the laboratory. Researchers can quickly analyze large datasets without the need for extensive laboratory work [28]. So, in silico validation with the TCGA is crucial for the discovery of potential biomarkers. While the TCGA provides valuable clinical data, it may be limited in certain specific clinical features. Some clinically relevant parameters for a particular study may not be available or may be insufficiently detailed. In our study, not only did we have one gene that could not be found in TCGA, but we also did not find data before and after chemotherapy, only tumor/normal comparisons.

As of November 2017, normalized RNA expression data from 33 cancer types is available in UALCAN. This data comparing tumor to normal tissue in breast cancer is the equivalent of our comparison of tissue before chemotherapy with control tissue in our study. The UALCAN shows that AGR2, CEACAM6, MYB and to a lesser extent GJB6 genes had higher expression in tissues from breast cancer and 7 other cancer types compared to their corresponding normal controls.

- AGR2: Arginase catalyzes the hydrolysis of arginine to ornithine and urea

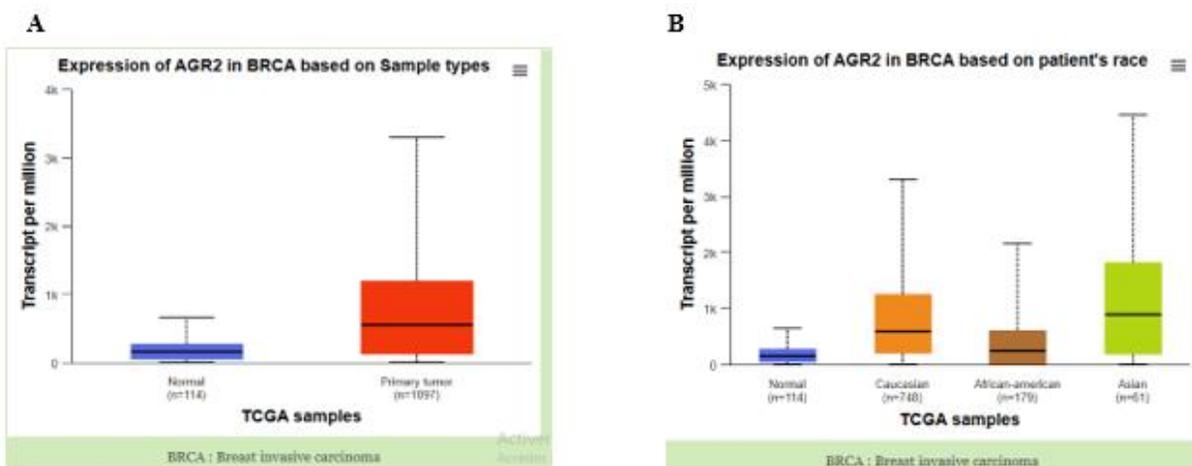


Figure 2.14: Differential gene expression of AGR2 using UALCAN online tool in BRCA A (based on Sample types) and B (based on patient's race)

A-This is a box plot comparing AGR2 gene expression in invasive breast cancer (BRCA) samples between normal tissue and primary tumors. AGR2 gene expression is significantly higher in primary tumor samples than in normal tissue. The median and quartiles of gene expression in

primary tumors are significantly higher than in normal tissue. Variability in AGR2 gene expression is greater (wider interquartile range) in primary tumor samples than in normal tissue.

B-This graph is a boxplot comparing AGR2 gene expression in invasive breast cancer (BRCA) samples according to patient race. AGR2 gene expression is lowest in normal versus tumor samples of all races. Caucasian patients show greater variability and higher median AGR2 gene expression compared to other racial groups. Asian patients also have significant variability in AGR2 gene expression, with a median higher than that of African-American patients but lower than that of Caucasian patients. African-American patients show lower median AGR2 gene expression than Caucasian and Asian patients, but still higher than normal samples.

➤ BRCA

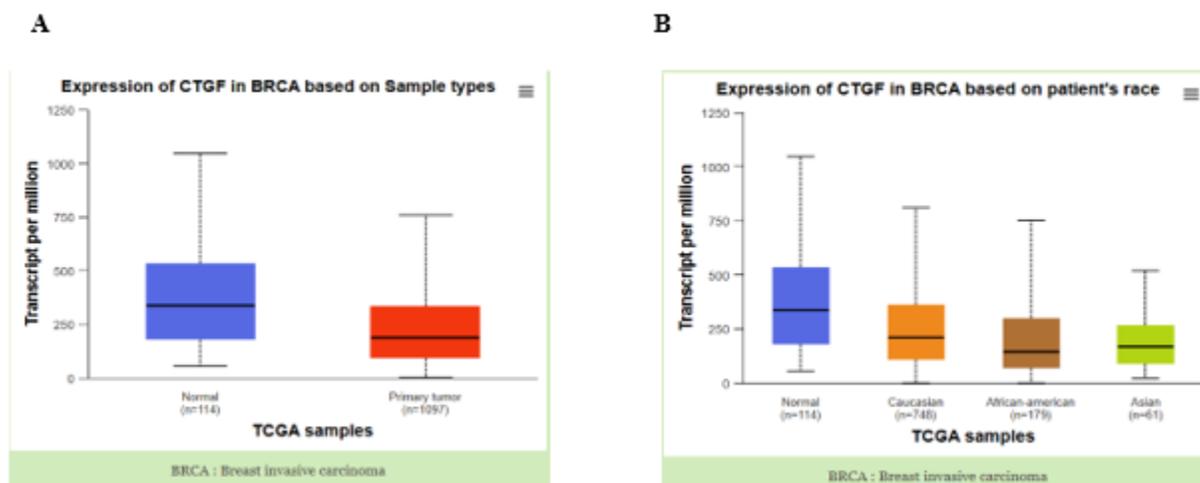


Figure 2.15: Differential gene expression of CTGF using UALCAN online tool in BRCA A (based on Sample types) and B (based on patient's race)

A-This graph is a boxplot comparing CTGF gene expression in invasive breast cancer (BRCA) samples between normal tissue and primary tumors. CTGF gene expression is higher in normal samples compared to primary tumor samples. The median and quartiles of gene expression in normal tissues are significantly higher than in primary tumors. There is greater variability (wider interquartile range) in CTGF gene expression among normal samples compared with primary tumors.

B-This graph is a boxplot comparing the expression of the CTGF gene in samples of invasive breast cancer (BRCA) based on the race of the patients. The expression of the CTGF gene is highest in normal samples compared to tumor samples across all races. Caucasian patients show greater variability and a higher median expression of the CTGF gene compared to African American and Asian patients. Asian patients exhibit CTGF gene expression variability similar to that of African American patients, with slightly lower medians. Normal tissues have the highest expression and widest variability in CTGF gene expression compared to racial groups of breast cancer patients.

➤ CEACAM6

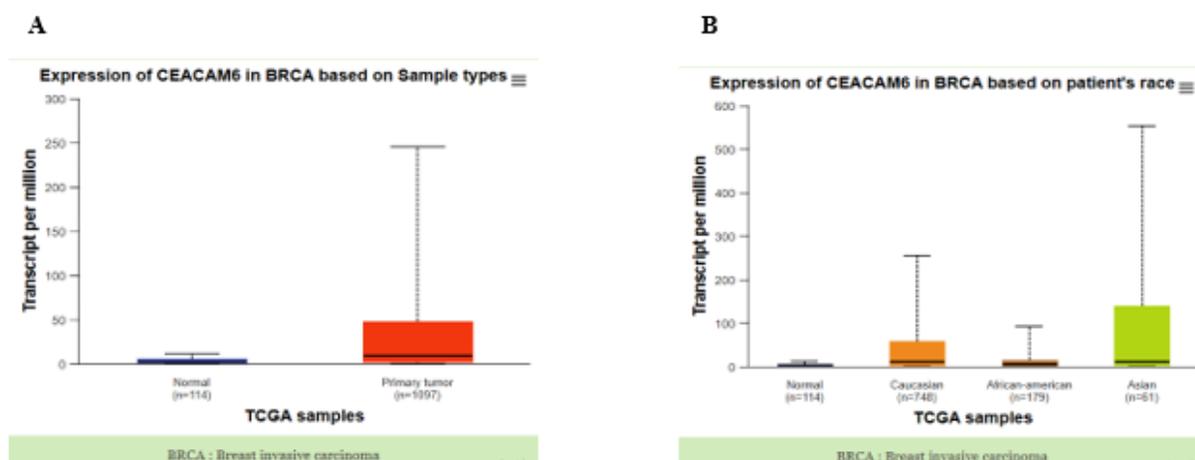


Figure 2.16: Differential gene expression of CEACAM6 using UALCAN online tool in BRCA A (based on Sample types) and B (based on patient's race)

A-This is a box plot comparing CEACAM6 gene expression in invasive breast cancer (BRCA) samples between normal tissue and primary tumors. CEACAM6 gene expression is significantly higher in primary tumor samples than in normal tissue. The median and quartiles of gene expression in primary tumors are significantly higher than in normal tissue. CEACAM6 gene expression variability is greater (wider interquartile range) in primary tumor samples than in normal tissue.

B-This graph is a boxplot comparing CEACAM6 gene expression in invasive breast cancer (BRCA) samples according to patient race. CEACAM6 gene expression is higher in primary tumor samples compared to normal tissue for all races represented. Asian patients show the greatest variability and highest median CEACAM6 gene expression compared to other racial groups. Caucasian patients also have high and variable CEACAM6 gene expression, but lower than Asian

patients. African-American patients show the lowest median CEACAM6 gene expression among racial groups, but this expression remains higher than in normal tissues.

➤ MYB

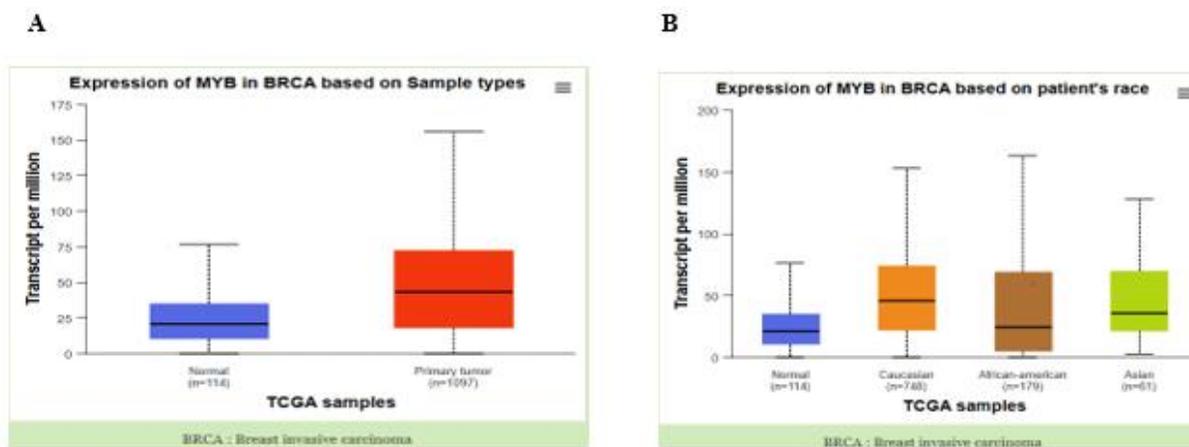


Figure 2.17: Differential gene expression of MYB using UALCAN online tool in BRCA A (based on Sample types) and B (based on patient's race)

A-This graph is a boxplot comparing MYB gene expression in invasive breast cancer (BRCA) samples between normal tissue and primary tumors. Gene expression is higher in primary tumor samples compared to normal tissue. The median and quartiles of gene expression in primary tumors are significantly higher than in normal tissue. There is greater variability (wider interquartile range) in MYB gene expression among primary tumor samples compared to normal tissue.

B-This graph is a boxplot comparing MYB gene expression in invasive breast cancer (BRCA) samples as a function of patient race. MYB gene expression is higher in tumor samples compared to normal tissue for all races represented. Caucasian and African-American patients show greater variability and higher median MYB gene expression compared with Asian patients and normal tissue. Asian patients have similar variability of MYB gene expression to Caucasian and African-American patients, with slightly lower medians. Normal tissues have the lowest MYB gene expression, with less variability.

➤ PLIN1

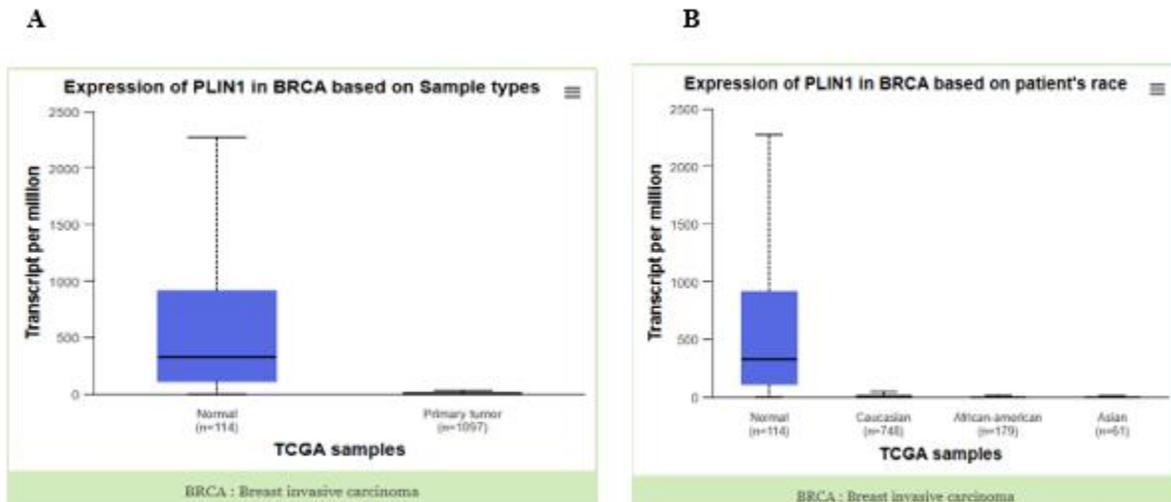


Figure 2.18: Differential gene expression of PLIN1 using UALCAN online tool in BRCA A (based on Sample types) and B (based on patient's race)

A-This graph is a boxplot comparing PLIN1 gene expression in invasive breast cancer (BRCA) samples between normal tissue and primary tumors. PLIN1 gene expression is significantly higher in normal tissue samples compared to primary tumors. The median and quartiles of gene expression in normal tissue are significantly higher than in primary tumors. There is high variability (wide interquartile range) in PLIN1 gene expression among normal tissue samples compared with primary tumors.

B-This graph is a boxplot comparing PLIN1 gene expression in invasive breast cancer (BRCA) samples according to patient race. PLIN1 gene expression is significantly higher in normal tissue samples compared to tumor samples for all races represented. Caucasian, African-American and Asian patients show very low PLIN1 gene expression, with medians close to zero. Normal tissues have much higher PLIN1 gene expression, with great variability.

➤ PRKAA2

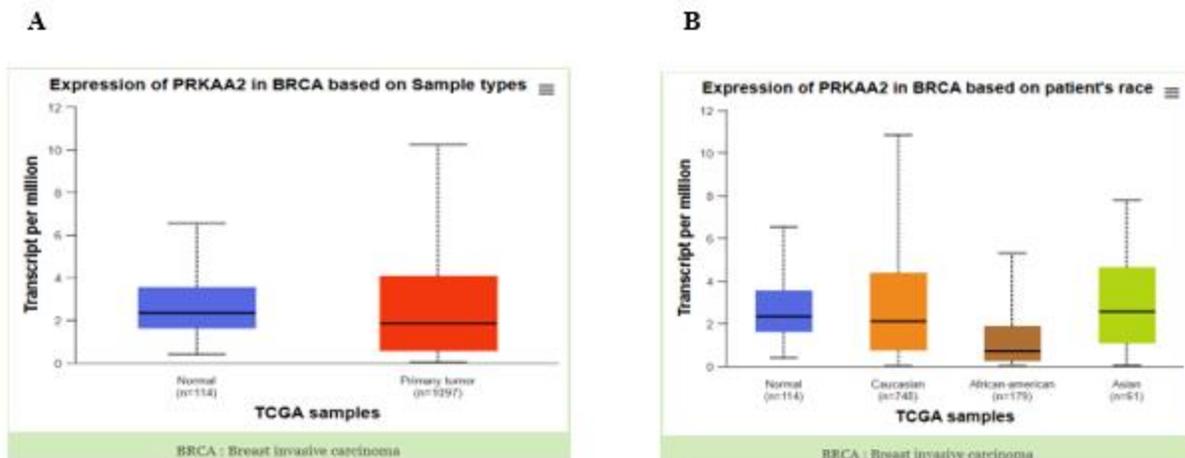


Figure 2.19: Differential gene expression of PRKAA2 using UALCAN online tool in BRCA A (based on Sample types) and B (based on patient's race)

A- This graph is a boxplot comparing PRKAA2 gene expression in invasive breast cancer (BRCA) samples between normal tissue and primary tumors. PRKAA2 gene expression is slightly higher in primary tumor samples compared to normal tissue. The median and quartiles of gene expression in primary tumors are slightly higher than in normal tissue. There is a slightly wider variability (interquartile range) in PRKAA2 gene expression among primary tumor samples compared with normal tissue.

B- This graph is a boxplot that compares PRKAA2 gene expression in invasive breast cancer (BRCA) samples based on patient race. PRKAA2 gene expression is similar between normal tissues and tumor samples of different races. Caucasian patients show slightly higher variability and median PRKAA2 gene expression compared to African American and Asian patients. Asian patients have similar variability in PRKAA2 gene expression to Caucasian patients, but with a slightly lower median. Normal tissues have more concentrated expression of the PRKAA2 gene with less variability.

➤ GSK3B

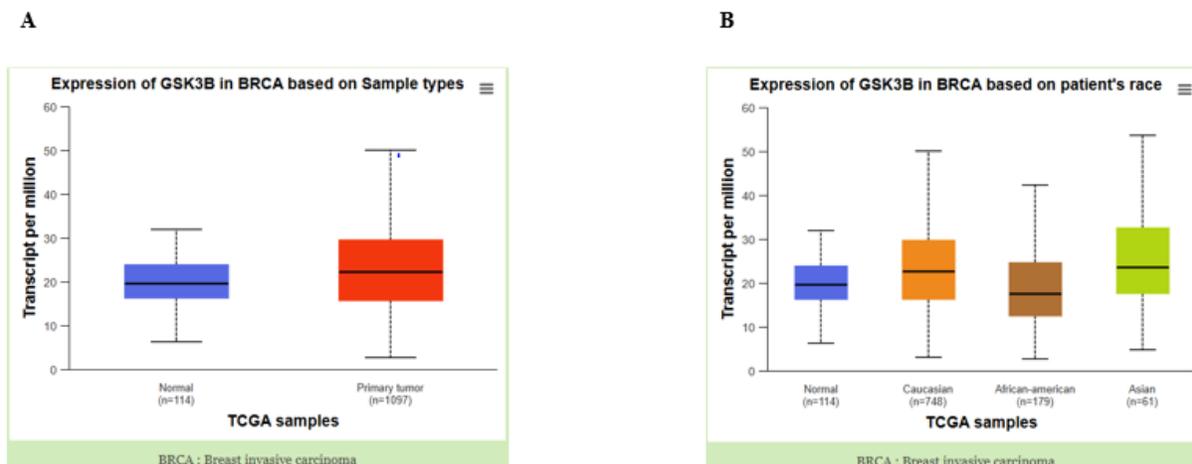


Figure 2.20: Differential gene expression of GSK3B using UALCAN online tool in BRCA A (based on Sample types) and B (based on patient's race)

A-This graph is a boxplot comparing GSK3B gene expression in invasive breast cancer (BRCA) samples between normal tissue and primary tumors. GSK3B gene expression is slightly higher in primary tumor samples compared to normal tissue. The median and quartiles of gene expression in primary tumors are slightly higher than in normal tissue. There is a slightly wider variability (interquartile range) in GSK3B gene expression among primary tumor samples compared with normal tissue.

B-This graph is a boxplot comparing GSK3B gene expression in invasive breast cancer (BRCA) samples according to patient race. GSK3B gene expression is similar between normal tissue and tumor samples of different races. Caucasian patients show slightly higher variability and median GSK3B gene expression than African-American and Asian patients. Asian patients have similar variability of GSK3B gene expression to Caucasian patients, with a slightly lower median. Normal tissues have more concentrated GSK3B gene expression with less variability.

➤ GPNMB

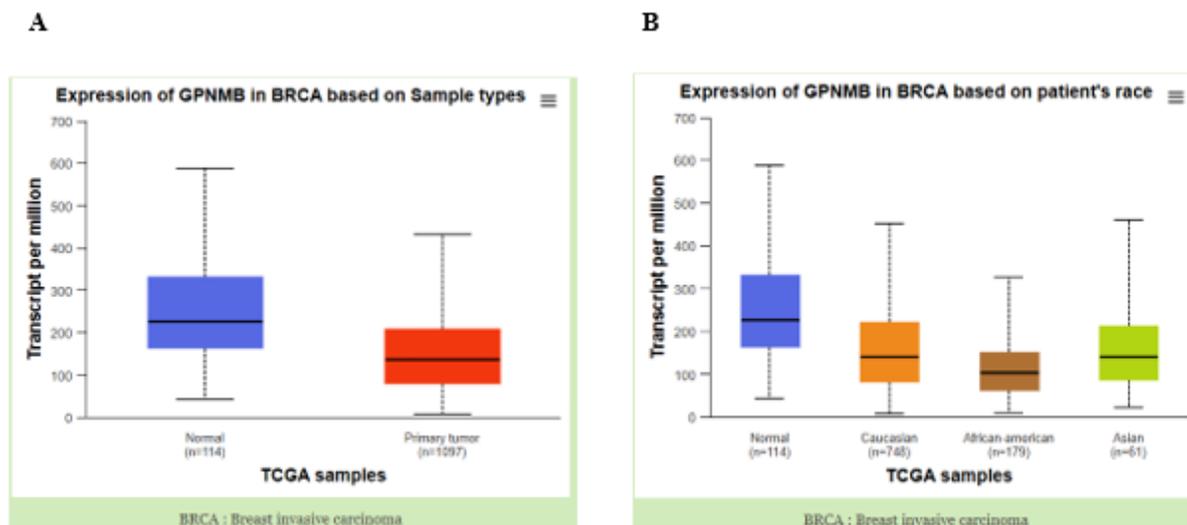


Figure 2.21: Differential gene expression of GPNMB using UALCAN online tool in BRCA A (based on Sample types) and B (based on patient's race)

A-This graph is a boxplot comparing GPNMB gene expression in invasive breast cancer (BRCA) samples between normal tissue and primary tumors. GPNMB gene expression is higher in normal tissue compared to primary tumor samples. The median and quartiles of gene expression in normal tissues are significantly higher than in primary tumors. There is greater variability (wider interquartile range) in GPNMB gene expression among normal tissue samples compared with primary tumors.

B-This graph is a boxplot comparing GPNMB gene expression in invasive breast cancer (BRCA) samples as a function of patient race. GPNMB gene expression is higher in normal tissue compared to tumor samples for all races represented. Caucasian and African-American patients show lower variability and median GPNMB gene expression compared to normal tissues. Asian patients have similar variability of GPNMB gene expression to Caucasian patients, with a slightly lower median. Normal tissues have more concentrated GPNMB gene expression with wider variability

➤ EGR1

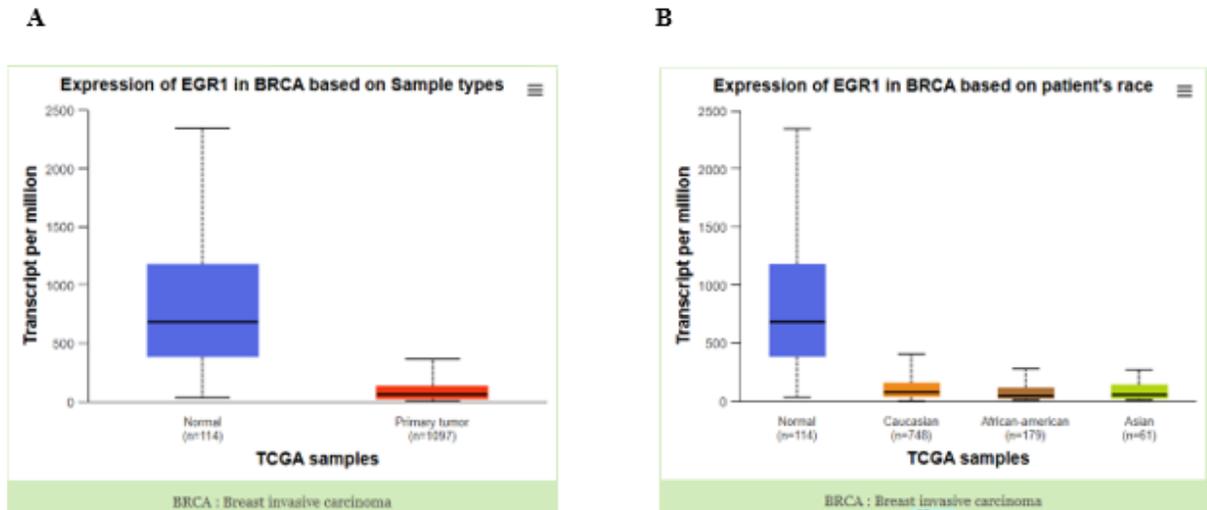


Figure 2.22: Differential gene expression of EGR1 using UALCAN online tool in BRCA A (based on Sample types) and B (based on patient's race)

A-This graph is a boxplot comparing EGR1 gene expression in invasive breast cancer (BRCA) samples between normal tissue and primary tumors. EGR1 gene expression is much higher in normal tissues than in primary tumor samples. The median and quartiles of gene expression in normal tissues are significantly higher than in primary tumors. There is greater variability (wider interquartile range) in EGR1 gene expression among normal tissue samples compared with primary tumors.

B-This graph is a boxplot comparing EGR1 gene expression in invasive breast cancer (BRCA) samples according to patient race. EGR1 gene expression is significantly higher in normal tissue compared to tumor samples for all races represented. Caucasian, African-American and Asian patients show very low EGR1 gene expression, with medians close to zero. Normal tissues have much higher EGR1 gene expression, with great variability.

➤ FOXO3

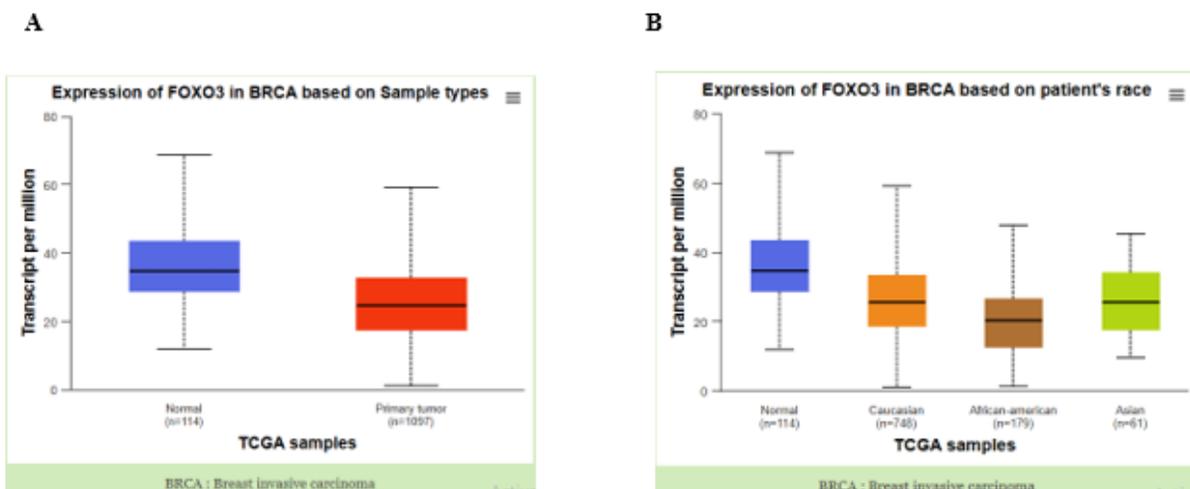


Figure 2.23: Differential gene expression of GPNMB using UALCAN online tool in BRCA A (based on Sample types) and B (based on patient's race)

A-This graph is a boxplot comparing FOXO3 gene expression in invasive breast cancer (BRCA) samples between normal tissue and primary tumors. FOXO3 gene expression is higher in normal tissue compared to primary tumor samples. The median and quartiles of gene expression in normal tissues are higher than in primary tumors. There is greater variability (wider interquartile range) in FOXO3 gene expression among normal tissue samples compared with primary tumors.

B-This graph is a boxplot comparing FOXO3 gene expression in invasive breast cancer (BRCA) samples according to patient race. FOXO3 gene expression is higher in normal tissue compared with tumor samples for all races represented. Caucasian and African-American patients show lower median FOXO3 gene expression compared to normal tissues. Asian patients have similar variability of FOXO3 gene expression to Caucasian patients, with a slightly higher median. Normal tissues have higher FOXO3 gene expression, with high variability.

Abbrev.	type of cancer	Sample ⁽¹⁾	Expression level ⁽²⁾ in Tumor	
GPNMB	Invasive breast carcinoma	Normal Tumor	Down	-
EGR1	Invasive breast carcinoma	Normal Tumor	Down	-
GJB6	Invasive breast carcinoma	Normal Tumor	Up	-
AGR2	Invasive breast carcinoma	Normal Tumor	Up	-

CTGF	Invasive breast carcinoma	Normal Tumor	Down	-
CEACAM6	Invasive breast carcinoma	Normal Tumor	Up	-
MYB	Invasive breast carcinoma	Normal Tumor	Up	-
PLIN-1	Invasive breast carcinoma	Normal Tumor	Down	-

Tableau 2-7: Summary table of our genes of interest in the UALCAN TCGA RNA-Seq database

Abbrev.	type of cancer	Sample ⁽¹⁾	Expression level ⁽²⁾ in Tumor	
GPNMB	Invasive breast carcinoma	Normal Tumor	Down	-
EGR1	Invasive breast carcinoma	Normal Tumor	Down	-
GJB6	Invasive breast carcinoma	Normal Tumor	Up	-
AGR2	Invasive breast carcinoma	Normal Tumor	Up	-
CTGF	Invasive breast carcinoma	Normal Tumor	Down	-
CEACAM6	Invasive breast carcinoma	Normal Tumor	Up	-
MYB	Invasive breast carcinoma	Normal Tumor	Up	-
PLIN-1	Invasive breast carcinoma	Normal Tumor	Down	-

Comparison of gene expression profiles of patients from RNA-seq with those of cell lines

This validation results by RNA-seq as well as the short list of differentially expressed retained genes that we obtained during immunohistochemistry prompted us to further evaluate the expression of our genes on breast cell lines. We used two common breast cell lines in order to better understand the function the biomarkers we had selected through RNA-seq. Validation on cell lines serves to confirm both the reproducibility of results of identified biomarkers obtained through sequencing. By studying on cell lines, one can confirm whether the observed changes are linked to specific biological mechanisms. This can aid in understanding the underlying molecular pathways and interpreting RNA-sequencing results accurately.

Some of the genes selected by RNA-seq where not expressed in the two cell lines we used in the case. As for of those that were expressed, we examined their interaction with total AKT, active AKT (P-AKT), AKT isoforms (AKT1, AKT2, and AKT3), and the apoptosis pathways PARP4 and cleaved caspase-3 through Western blot analysis.

In our study, the cell lines used as models for breast cancer are MDA-MB-231 and MCF-7[73]. MDA-MB-231 cells are triple-negative (ER-) breast cancer cells, while MCF-7 cells are Luminal A (ER+) breast cancer. Briefly, MD-MB231 is an aggressive non-hormone-dependent breast cancer cell while MCF7 cells are non-invasive and hormone-dependent breast cancer cells [54]. Here, we systematically explored the expression of gene that were significantly increased in our RNA sequencing study in response to doxorubicin in ER-positive and ER-negative breast cancer cell lines. The MD-MB231 and MCF7 cells were treated for 24 h with the chemotherapeutic agent DOX (200 n M) [54].

Doxorubicin can interfere with the PI3K/AKT/mTOR axis in breast cancer cell lines.

We first investigated the ability of doxorubicin (DOX) to inhibit or activate various proteins that were significantly upregulated in black female breast cancer. By treating our invasive and non-invasive cell lines with doxorubicin, we assess the variations in the protein expression of our potential biomarkers obtained by RNA-Seq (AMPK α and its activated form, GPNMB, EGR1, GJB6, CTGF, AGR2, MYB) induced by this chemotherapeutic drug. We also investigated the interaction of our biomarkers with AKT, its active form, and its isoforms AKT1, AKT2, and AKT3 [55] and AMPK α (protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 2) phosphorylation on threonine 172. The AMPK α kinase is activated by a high AMP/ATP ratio due to cellular and environmental stress, such as heat shock, hypoxia, and ischemia (56). The tumor suppressor LKB1, in association with the accessory proteins STRAD and MO25, phosphorylates AMPK α at Thr172 in the activation loop, and this phosphorylation is required for AMPK activation. AMPK α is also phosphorylated at Thr258 and Ser485 (for α 1; Ser491 for α 2). The upstream kinase and the biological significance of these phosphorylation events are yet to be elucidated (56). AMPK α act as a tumor suppressor because normally AMPK inhibits mTor and prevents protein synthesis [56].

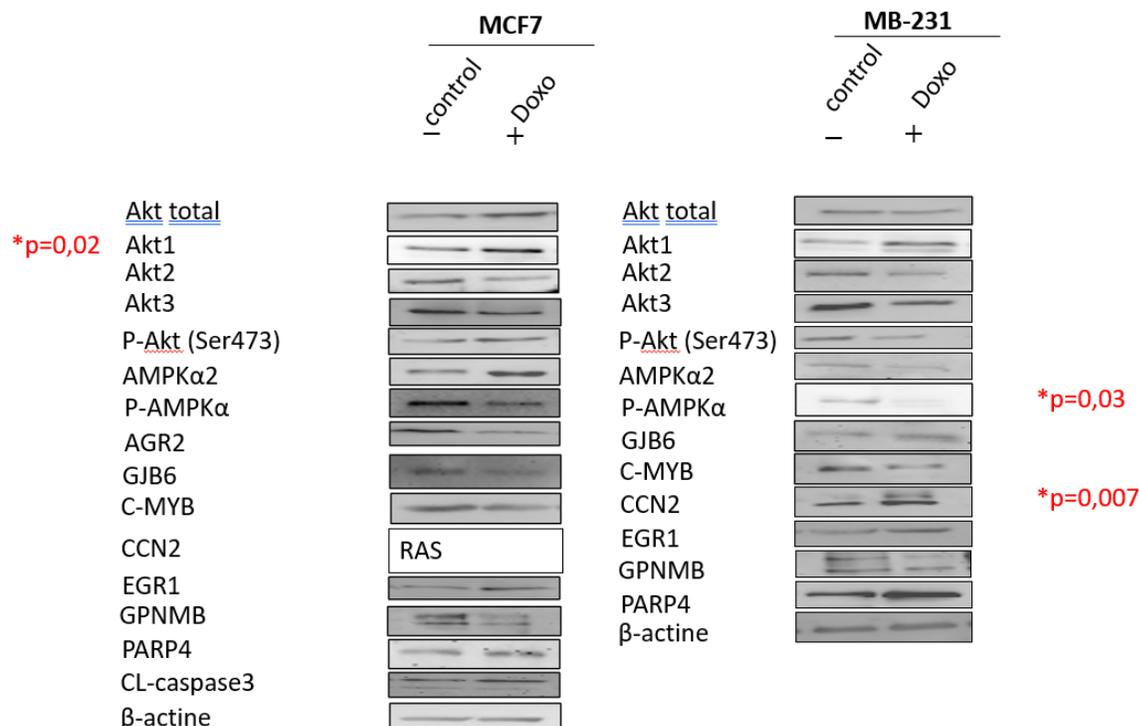


Figure 2.24: Analyse Western Blot de la Sensibilité des Lignes Cellulaires au Traitement DOX avec Mesure des Isoformes AKT et des Marqueurs de Chimiorésistance

Figure 2.24 above shows western blot data for cell line susceptibility to DOX treatment. we measured AKT isoforms (AKT1, AKT2, AKT3) and potential chemoresistance markers such as oncogenes AGR2, CX30(GJB6), CTGF(CCN2), GPNMB, AMPK α 2, MYB and suppressor of EGR1 tumor. We treated MCF7 [57] and MD-MB231, an aggressive, invasive and undifferentiated triple [57]. CCN2 shows nothing MCF7 in Western Blot. Tree times experiments done.

For MCF7, the results show that DOX treatment significantly increase AKT1 and decrease AKT2 and AKT3. Although not significant, DOX treatment increases total AKT and its phosphorylation. Interestingly, the oncogenes significantly regulated in breast cancer AGR2, MYB, CX30, GPNMB and the tumor suppressor EGR1 are increased in doxorubicin (DOX)-treated MCF7 cells (Figure 2.25).

For MB231, the western blot results show that DOX significantly decreases AMPK phosphorylation more likely by decreasing total AKT and its total phosphorylated form (Figure 2.25). The AKT1 isoform also increases in MB231 western blot as in MCF7 but not significantly while AKT2 and AKT3 decrease. Regarding our genes of interest, the CTGF oncogene increases significantly while the CX30 oncogene and the tumor suppressor EGR1 increase although not

significantly in MD-MB231 cells treated with DOX. DOX on the other hand, decreased MYB expression, an effect that is consistent with its oncogenic activity.

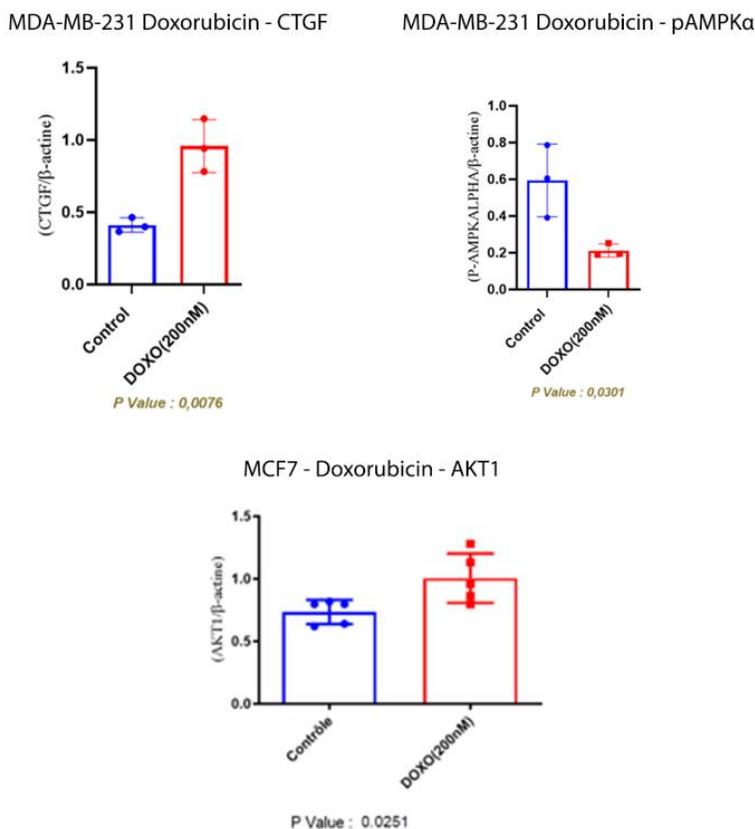


Figure 2.25: Analysis of protein expression in MCF-7 and MB231 cells

Western blot analysis showed the expression of protein of interest in breast cancer cell lines (MCF7, MDA-231). (a) Protein expression in MCF-7 cells treated with Doxorubicin. Untreated cells are used as control and β -actin was used as loading control. (b) Protein expression in doxorubicin-treated MD-MB231 cells on at least three cell lysates. Untreated cells are used as a control and β -actin was used as a loading control. RAS shows no protein expressed. $P < 0.5$. The experiment was repeated on at least three cell lysates

2.6 Discussion

We aimed to investigate the activation of the PI3K/AKT signaling pathway and its implication in the therapeutic response of breast cancer in African black women. It was important to evaluate this pathway because African black women, like African American women, have a high mortality rate

from breast cancer and present with aggressive breast cancer types. The PI3K/AKT pathway is implicated in poor prognosis and chemoresistance in breast cancer among Caucasian women.

2.6.1.1 Activation of AKT and overexpression of AKT1 and FOXO3 post chemotherapy

As a crucial kinase for cell survival, AKT is activated by various growth factors. However, in tumors, oncogenic events often lead to its constitutive activation, thereby promoting cancer cell survival. Studies have highlighted the existence of three isoforms of AKT (AKT1, AKT2, and AKT3) [27], each exhibiting similar but also distinct physiological functions. These isoforms have been shown to contribute differentially to the therapeutic response and chemoresistance of breast cancer cells in Caucasians.

In the present study we want to determine if AKT is also an important factor in breast cancer in African black women. Our study showed an overactivation of AKT post chemotherapy in breast cancer in black women. Activation of AKT in human breast cancer has already been associated with poor prognosis and resistance to treatment. [26-30,55]. So AKT overactivation in black African women breast cancer can be involved in breast cancer prognosis. Additionally, previous studies have demonstrated that each isoform of AKT, when overexpressed or inhibited, produces distinct physiological responses. Based on the previous results, we focused on the two isoforms AKT1 and AKT2 in our study and examined their tissue expression in black women's breast cancer. Our results are in accordance with what has been described in Caucasians women. Our results show that AKT1 expression positively correlates with the cancer grade, or in other words, AKT1 is predominantly expressed in high-grade breast cancer in black women. It has also been shown that AKT1 protein is overexpressed in approximately 40% of breast and ovarian cancers, in over 50% of prostate carcinomas, and in about 20% of gastric carcinomas [29]. This increase in AKT1 protein expression has been reported as a recurrent phenomenon in these specific types of cancers. Overexpression of AKT2 has been confirmed in 25% of primary breast carcinomas, 30% of pancreatic and ovarian cancers, as well as 40% of hepatocellular cancers [27-29]. In addition, our laboratory previously worked on chemoresistance in endometrial cancer using the endometrial cell lines KLE and Hec-1. From these experiments, AKT1 and AKT2 isoforms were the most involved in endometrial cancer chemotherapy resistance. On the other hand, a functional role of AKT1 and AKT2 isoforms in the development of mouse mammary carcinoma has been demonstrated in transgenic mouse models. AKT1 is known to trigger tumor growth, while AKT2 promotes metastasis of Balb-neuT mammary tumors [28-29].

Our study demonstrates that AKT2 is significantly overexpressed in black women's breast cancer patients post-treated with doxorubicin compared to untreated patients, suggesting the role of this isoform in therapeutic response. Doxorubicin is the primary chemotherapy treatment for aggressive breast cancer and the therapeutic response indicates whether the treatment has been effective in achieving its intended goals, such as reducing tumor size, halting disease progression, or improving symptoms. Studies have associated the roles of AKT isoforms in therapeutic response and chemoresistance for different types of cancer. They revealed that AKT1 overexpression in lung cancer cells conferred resistance to cisplatin, and inhibition of this isoform reversed this resistance phenotype [30]. Similarly, inhibition of AKT2 in breast cancer cells overexpressing the survival factor Twist sensitized these cells to cell death after paclitaxel treatment [31]. AKT2 has also been linked to docetaxel resistance in breast and ovarian cancer

cells [32]. Constant AKT2 expression in ovarian cancer cells prevented apoptosis in response to cisplatin [33]. In accordance with what has been described in Caucasians women, AKT2 overexpressed in black women breast cancer may be linked to doxorubicin resistance.

For instance, we examined the post-chemotherapy expression of FOXO3, GSK-3, and PRAS40. We demonstrated a positive correlation of pFOXO3 with the grade of black women's breast cancer. Since AKT is activated at the plasma membrane and that its activation is crucial to activate some of its substrates, we examined the post-chemotherapy expression of three key substrates in response to chemotherapy in black women's breast cancer. Indeed, AKT exerts its anti-apoptotic activity, notably by preventing the release of cytochrome c from the mitochondria [17,19]. Moreover, it can phosphorylate and inactivate the proapoptotic protein Bad, a member of the Bcl-2 family, thereby preventing it from counteracting the action of anti-apoptotic proteins Bcl-2 and B-cell lymphoma extra-large (Bcl-xL). Additionally, AKT deactivates procaspase-9 and the Forkhead box 0 (FOXO) transcription factor, which regulates the expression of genes crucial for triggering apoptosis [35]. AKT activation also plays a regulatory role in the cell cycle progression by inactivating glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) through phosphorylation [38]. Initially identified as an enzyme regulating glucose synthesis in response to insulin, the involvement of GSK-3 in cell survival has been demonstrated in studies conducted on Rat-I and PCI2 murine cells. Overexpression of GSK-3 induces apoptosis, while its inactivation blocks cell death by apoptosis [38]. Furthermore, AKT stimulates the mTOR kinase, which can associate with PRAS40, a protein known to promote protein synthesis [36]. Previous studies have associated FOXO3, GSK3 and PRAS40 with breast cancer. The positive correlation of pFOXO3 with the grade of black women's breast cancer, suggesting that FOXO3 was inactivated by AKT in high-grade breast tumors. We also showed that FOXO3 is overexpressed in patients post-treated with doxorubicin compared to untreated patients. FOXO3 is already known to play a crucial role in controlling cancer development and susceptibility to chemotherapeutic drugs in Caucasian women's breast cancer [33]. More importantly, FOXO3 is negatively regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-AKT/Protein Kinase signaling pathways [34], and FOXO3 inactivation has often been observed in human tumors, largely due to the activation of the PI3K-AKT pathway [34,35]. It would be interesting to delve deeper into our results and understand why AKT-inactivated FOXO3 would be predominantly expressed in high-grade breast cancer in black African women.

It would therefore seem in our study that cancer cells protect themselves from the cytotoxicity of chemotherapeutic agents by activating AKT and over-expressing AKT2. In addition, activated AKT may negatively regulate FOXO3 overexpressed by chemotherapy. These results are agreed with the result obtained on Caucasians women and suggest an involvement of the PI3K/AKT pathway in chemoresistance in breast cancer in black women.

2.6.1.2 Gene expression profile expression in response to chemotherapy

RNA-seq is a powerful tool for finding differentially expressed genes between groups of tumor samples, as it is high throughput and a reliable tool for quantification [59,2]. To consolidate the RNA-Seq, we performed a double validation (in silico and IHC validation) of the selected genes. UALCAN is a web tool used for in silico validation that can complement RNA sequencing. Indeed,

UALCAN is an interactive and user-friendly web portal for conducting in-depth analyses of TCGA gene expression data. UALCAN is publicly accessible and could be extremely useful in expediting cancer research [42]. The Cancer Genome Atlas (TCGA) allows for a comprehensive molecular characterization of various types of cancer. The genomic data and large number of samples present in TCGA provide an excellent opportunity to address questions related to tumor heterogeneity [43]. It enables cancer researchers and clinicians to explore data to discover new therapeutic and diagnostic biomarkers. Additionally, researchers can perform specific TCGA data analyses using computational tools such as UALCAN [42]. Data from TCGA like UALCAN makes gene expression profiling with RNA-Seq easier because it has data from large number of patients [60-65]. As explained in the previous paragraphs, TCGA is a valuable resource for the evaluation of breast cancer molecular markers. However, the lack of information on normal tissue or benign lesions of African women in the RNA-seq data of the TCGA's publication on breast cancer piqued our interest. Focusing on our 9 genes of interest, we examined the correlation of our RNA sequencing results with those from RNA-seq data found in TCGA.

Faced with the extensive list of differentially expressed genes from UALCAN and RNA sequencing, functional profiling tools are used to extract specific biological significant gene in aspecific study. Specific RNA sequencing analysis packages such as Gene Ontology (GO) and KEGGREST (KEGG) are available [62-64]. Our use of the gene functional classification tool like GO, KEGG and Venn diagrams allowed us to select a group of 9 genes. Since there is an increase body of evidence that African women gene expression is differently expressed than American women, we wanted to analyse the gene expression of GPNMB, EGR1, GJB6, AGR2, CTGF, CEACAM6, MYB, and PLIN1 because they are redundant genes in all chemotherapeutic groups. We focused on them and explored their expression in response to chemotherapeutic drugs in invasive breast carcinoma in black women.

Chemotherapy is widely used in the treatment of many types of cancer, but drug resistance limits its effectiveness [66]. Doxorubicin is an effective chemotherapeutic agent used in the treatment of several types of cancer, including breast cancer [67]. To treat aggressive black women's breast cancer, doxorubicin-based combination therapies such as FAC, AC, and NVB may be recommended.

In our study, FAC chemotherapy leads to a significant overexpression of PLIN1 in post-chemotherapy patientes compared to benign patientes. The significant increase in PLIN1 following FAC treatment in breast cancer in black women suggests that PLIN1 could be a favorable FAC therapeutic target and could serve as a prognostic marker for the disease. For instance, Zhou et al. showed that PLIN1 inhibits the proliferation, migration and invasion of breast cancer cells. Other studies have also shown that aberrant expression of PLIN family genes may serve as a potential prognostic biomarker in breast cancer because low levels of PLIN1 expression were correlated with shorter patiente survival. [68].

Regarding AC chemotherapy, in our study it leads to a significant overexpression of GPNMB in post-chemotherapy patientes compared to benign patientes. GPNMB is expressed in aggressive breast cancer and promotes angiogenesis, cancer cell migration, invasion and bone metastasis of breast cancer in Caucasians [69] [70-72]. AC chemotherapy also resulted in overexpression of CCN2 in post-chemotherapy patientes. Knowing that increased expression of CCN2 in human

breast cancer is correlated with poor patient outcomes and drug resistance [73]. These results suggest that CCN2 and GPNMB may be mechanisms of chemoresistance in breast cancer in black women and most likely serve as a poor prognostic biomarker. On the other hand, EGR1 is a direct regulator of several tumor suppressors, such as transforming growth factor beta 1 (TGFβ1), phosphatase and tensin homolog (PTEN), and tumor protein P53 (p53). Overexpression of EGR1 prevents the mobility, growth, and proliferation of rhabdomyosarcoma cells [100]. It has also been reported that positive regulation of EGR1 halts the cell cycle progression in breast cancer cells of Caucasian women [100]. Therefore, the overexpression of the tumor suppressor EGR1 by AC chemotherapy suggests that EGR1 could be a therapeutic target of AC.

Regarding NVB chemotherapy, we saw a significant overexpression of MYB in post-chemotherapy patients compared to benign patients. Additionally, we observed a significant increase in AGR2 and MYB in tumor compared to normal tissues and in chemoresistant patients for all treatment groups. This result correlates with that found in TCGA for Caucasian breast cancer. Overexpression of AGR2 in Caucasian women has been shown to be implicated in breast cancer pathogenesis, including tumor growth, drug resistance, and metastasis. This AGR2 overexpression is associated with poor prognosis [74 75-77]. Our results suggest that AGR2 may be an important mediator of drug resistance in breast cancer thus serving as a therapeutic biomarker.

In our study, *in silico* validation correlated with our RNA sequencing results. Like our study, it identified AGR2, CEACAM6, and MYB as genes significantly overexpressed in tumors compared to normal tissue. Data limitations of TCGA were constraints in our study. Indeed, the expression levels of other genes could not be compared with those of TCGA because the samples used in RNA sequencing had already undergone chemotherapy before being compared to control samples, and TCGA does not contain this type of information.

The second validation was immunohistochemistry and allowed us to look directly at protein expression of the different gene analysed. IHC validation confirms that changes in gene expression are also reflected at the protein level. Genetic sequencing techniques like RNA-Seq can generate complex data, and validation by an independent method like IHC enhances the reliability of the results [70]. Currently, immunohistochemistry (IHC) remains a method of choice for detecting the expression of cancer biomarkers in most clinical laboratories around the world [78]. A study on lung cancer found a strong correlation between IHC and qRT-PCR [79,80]. However, RNA sequencing is an even more accurate method to measure the expression of biomarkers [59]. Unlike IHC, RNA sequencing quantifies the number of mRNA transcripts expressed throughout the tumor microenvironment without discrimination of cell type [59]. Some previous studies have investigated the used RNA sequencing data to predict the IHC status of five conventional breast cancer biomarkers: ER, HER2, PGR, Ki67, and Nottingham histological grade (NHG) [78,81-83]. The authors observed a good concordance between the protein status determined by IHC and the level of gene expression determined by RNA sequencing. It had demonstrated a high and statistically significant correlation between RNA sequencing and immunohistochemical measurements for the HER2, ER and PGR genes in breast cancer.

The expression profile revealed by our immunohistochemical analyzes in breast cancer in black women confirms the localization of AGR2, CEACAM6, PLIN1 on the cell membrane and in the

cytoplasm while EGR1 and MYB had a nuclear localisation. We confirmed the differential expression of GPNMB, EGR1, PLIN1, AGR2, CEACAM6 MYB in cancerous tissues compared to normal tissues by immunohistochemistry. Expression of AGR2 and MYB is higher in cancer than in benign breast tissue.

Only four of our IHC analysis out of the twenty-four conducted, especially those for the AGR2 and CEACAM6 genes, are inconsistent with those obtained through RNA sequencing. Normally, the proteomic landscape of the cell is regulated post-transcriptionally, translationally and post-translationally [84]. This can therefore lead to inconsistencies between the results of RNA sequencing and protein analysis. However, our validation results in immunohistochemistry correlated with those of RNA-Seq. Several previous studies have like us reported a high degree of concordance between these methods, at least for clinically relevant genes. Taken together, these results provide the evidence that RNA sequencing can complement IHC to measure cancer biomarkers [78]. The limiting factor of our study was the size of the sample in IHC which could have modified the genes strongly regulated by post-transcriptional or post-translational modifications and explain the contradictory results obtained. Indeed, mRNA levels do not always directly correspond to protein levels due to post-transcriptional regulation. Mechanisms such as mRNA degradation, protein stability, and translation of mRNA into proteins can influence the results. Furthermore, proteins undergo post-translational modifications that can influence their activity and stability. These modifications are not reflected in RNA analyses. Therefore, the correlation between RNA sequencing and IHC of our biomarkers should be validated on larger cohort. Another limiting factor of this study is its retrospective nature of testing archival samples to assess the presence of a dynamically regulable biomarker that may change over the course of the disease. Therefore, the status of our nine genes by RNA sequencing needs to be further validated in future prospective clinical trials.

The correlation between our RNA sequencing results and the results obtained by IHC in this study and different clinical laboratories suggests that RNA sequencing can be used as an alternative or in addition to IHC to ensure the robustness of the obtained results on FFPE cancerous tissue samples. In addition to simply profiling a few clinical biomarker genes for black female breast cancer, our RNA sequencing data has allowed us, as in other labs, to identify differentially expressed drug target genes [85] and to look at the activation of the PI3K/AKT (unpublished data) [86,87] molecular pathway. Among other things, it enables personalized patient-oriented ranking of cancer drugs with known molecular specificities [88-90].

The drawback of RNA-seq lies in the requirement for complex bioinformatic analysis to interpret the resulting data. Moreover, transcript quantification can be biased by experimental factors such as platform and protocol divergence, leading to differing results. To overcome this, we used the same samples for RNA sequencing and IHC to ensure that our transcripts are also at the protein level. We have defined the experimental procedure and the analytical pipeline used to obtain the results in order to ensure their reproducibility. We used the human reference genome for RNA-seq to compare differential expression [91]. To obtain and analyze RNA sequencing data, we strictly followed the previously published procedure for generating the Atlas of Human Normal Tissue Transcriptomes (i.e., the Oncobox Atlas of Normal Tissue Expression) [68]. It was previously demonstrated that this experimental and analytical procedure guarantees obtaining high-quality transcriptomic data strongly correlated to gene expression values measured by IHC. [69]. The

correlation of over 83% between RNA-seq and IHC obtained in our study is a significant achievement.

Our study is the first to investigate the association between the expression of the GPNMB, EGR1, GJB6, AGR2, CTGF, CEACAM6, MYB and PLIN1 genes, the response to chemotherapy and chemoresistance in breast cancer in African black women. It is also the first study on breast cancer in black women that shows that total RNA sequencing of archived FFPE materials provides a reliable estimate of protein levels and can be complementary to immunohistochemistry in the clinic. These results show that in the future, RNA sequencing can complement immunohistochemistry for reliable measurements of biomarkers in FFPE cancer samples.

2.6.1.3 Expression profile of genes expression on MCF7 and MB231 cell lines

Finally, to better understand the effect of doxorubicin treatment specifically targeting each of our potential biomarkers, their protein expression on cell lines was measured. Consequently, we aimed to examine the individual variations of each selected biomarker in our study within the cell lines. We also sought to investigate their interaction with the PI3K/AKT pathway. Here, we systematically explored the expression of RNA-Seq-significant genes in response to doxorubicin in ER-positive and negative breast cancer cell lines.

Consistent with previous observations [61], we have established that doxorubicin exposure increases AKT phosphorylation in MCF7 human breast cancer cell lines, but not in the MB231 cell line. It had already been demonstrated that MCF7 cells rendered resistant to doxorubicin exhibit constitutive levels of AKT phosphorylation, which would explain AKT phosphorylation in MCF7 human breast cancer cell lines in our results.

In contrast to RNA Seq patients' data, expression level of AKT2 was unaffected in human breast cancer cell lines MB231 and MCF7 after 24 hours of chemotherapy exposure while AKT1 increased significantly in MCF7. The reasons for this discrepancy in results remain to be elucidated, but could be due either to the longer period of exposure to chemotherapy in patients, or to the fact that the cells lines come from Caucasians and not blacks, or even to the mixture of tumor cells and stroma in patient's tumor samples, in contrast to pure tumor cell content in *in vitro* cells cultures. Interestingly a significant increase in AMPK α 2 and CTGF phosphorylation was observed in MB231 but not in MCF7 but the underlying molecular mechanisms remain to be determined.

In conclusion, our data show nine genes (GPNMB, AMPK α 2, EGR1, GJB6, AGR2, CTGF, CEACAM6, MYB and PLIN1) that can serve as therapeutic biomarkers in breast cancer in black women. Our results also demonstrate that RNA-seq is a very sensitive and robust assay for measuring novel biomarkers across a continuum of expression levels. Moreover, with the rapid emergence of new biomarkers and their introduction into clinical practice, RNA seq associated with *In Silico* validation and immunohistochemistry could potentially become at least as useful and cost-effective a solution and promote therapeutic management in the black woman aggressive breast cancer.

2.7 References article RNA sequencing

1. Marioni J. C., Mason C. E., Mane S. M., Stephens M., Gilad Y. RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Research*. 2008;**18**(9):1509–1517. doi: 10.1101/gr.079558.108. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

2. Tomczak K., Czerwińska P., Wiznerowicz M. The Cancer Genome Atlas (TCGA): An immeasurable source of knowledge. *Współczesna Onkologia*. 2015;**1A**:A68–A77. doi: 10.5114/wo.2014.47136. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

3. Chin L., Hahn W. C., Getz G., Meyerson M. Making sense of cancer genomic data. *Genes & Development*. 2011;**25**(6):534–555. doi: 10.1101/gad.2017311. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

4. International Cancer C., Genome T. J., Anderson W. International network of cancer genome projects, Nature. Proceedings of the International network of cancer genome projects, Nature; 2010; p. p. 993. [[Google Scholar](#)]

5. Wilkinson L, Gathani T. Understanding breast cancer as a global health concern. *Br J Radiol*. 2022 Feb 1;**95**(1130):20211033. doi: 10.1259/bjr.20211033. Epub 2021 Dec 14. PMID: 34905391; PMCID: PMC8822551.

6. <https://seer.cancer.gov/>

7. Giaquinto AN, Miller KD, Tossas KY, Winn RA, Jemal A, Siegel RL. Cancer statistics for AfricanAmerican/Black People 2022. *CA Cancer J Clin*. 2022 May;**72**(3):202-229. doi: 10.3322/caac.21718. Epub 2022 Feb 10. PMID: 35143040.

8. Yedjou CG, Sims JN, Miele L, Noubissi F, Lowe L, Fonseca DD, Alo RA, Payton M, Tchounwou PB. Health and Racial Disparity in Breast Cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2019;**1152**:31-49. doi: 10.1007/978-3-030-20301-6_3. PMID: 31456178; PMCID: PMC6941147.

9. Newman LA, Kaljee LM. Health Disparities and Triple-Negative Breast Cancer in AfricanAmerican Women: A Review. *JAMA Surg.* 2017 May 1;152(5):485-493. doi: 10.1001/jamasurg.2017.0005. PMID: 28355428.

10. Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/AKT signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal.* 2002;14:381–395. doi: 10.1016/S0898-6568(01)00271-6. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

11. Cheng GZ, Chan J, Wang Q, Zhang W, Sun CD, Wang LH. Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel. *Cancer Res.* 2007;67:1979–1987. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1479. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

12. Amiri A, Noei F, Jeganathan S, Kulkarni G, Pinke DE, Lee JM. eEF1A2 activates AKT and stimulates AKT-dependent actin remodeling, invasion and migration. *Oncogene.* 2007;26:3027–3040. doi: 10.1038/sj.onc.1210101. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

13. Jetzt A, Howe JA, Horn MT, Maxwell E, Yin Z, Johnson D, Kumar CC. Adenoviral-mediated expression of a kinase-dead mutant of AKT induces apoptosis selectively in tumor cells and suppresses tumor growth in mice. *Cancer Res.* 2003;63:6697–6706. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

14. Jin W, Wu L, Liang K, Liu B, Lu Y, Fan Z. Roles of the PI-3K and MEK pathways in Ras-mediated chemoresistance in breast cancer cells. *Br J Cancer.* 2003;89:185–191. doi: 10.1038/sj.bjc.6601048. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

15. Knuefermann C, Lu Y, Liu B, Jin W, Liang K, Wu L, Schmidt M, Mills GB, Mendelsohn J, Fan Z. HER2/PI-3K/AKT activation leads to a multidrug resistance in human breast adenocarcinoma cells. *Oncogene.* 2003;22:3205–3212. doi: 10.1038/sj.onc.1206394. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

16. Yu Z, Weinberger PM, Sasaki C, Egleston BL, Speier WF, 4th, Haffty B, Kowalski D, Camp R, Rimm D, VairAKTaris E, Burtness B, Psyrri A. Phosphorylation of AKT (Ser473) predicts poor clinical outcome in oropharyngeal squamous cell cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers*

Prev. 2007;**16**:553–558. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-06-0121. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

17. Lim J, Kim JH, Paeng JY, Kim MJ, Hong SD, Lee JI, Hong SP. Prognostic value of activated AKT expression in oral squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol.* 2005;**58**:1199–1205. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

18. Tsurutani J, Fukuoka J, Tsurutani H, Shih JH, Hewitt SM, Travis WD, Jen J, Dennis PA. Evaluation of two phosphorylation sites improves the prognostic significance of AKT activation in non-small-cell lung cancer tumors. *J Clin Oncol.* 2006;**24**:306–314. doi: 10.1200/JCO.2005.02.4133. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

19. Tokunaga E, Kimura Y, Oki E, Ueda N, Futatsugi M, Mashino K, Yamamoto M, Ikebe M, Kakeji Y, Baba H, Maehara Y. AKT is frequently activated in HER2/neu-positive breast cancers and associated with poor prognosis among hormone-treated patients. *Int J Cancer.* 2006;**118**:284–289. doi: 10.1002/ijc.21358. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

20. Tokunaga E, Kataoka A, Kimura Y, Oki E, Mashino K, Nishida K, Koga T, Morita M, Kakeji Y, Baba H, Ohno S, Maehara Y. The association between AKT activation and resistance to hormone therapy in metastatic breast cancer. *Eur J Cancer.* 2006;**42**:629–635. doi: 10.1016/j.ejca.2005.11.025. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

21. Kirkegaard T, Witton CJ, McGlynn LM, Tovey SM, Dunne B, Lyon A, Bartlett JM. AKT activation predicts outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *J Pathol.* 2005;**207**:139–146. doi: 10.1002/path.1829. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

22. Stål O, Pérez-Tenorio G, Akerberg L, Olsson B, Nordenskjöld B, Skoog L, Rutqvist LE. AKT kinases in breast cancer and the results of adjuvant therapy. *Breast Cancer Res.* 2003;**5**:R37–R44. doi: 10.1186/bcr569. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

23. Schmitz KJ, Otterbach F, Callies R, Levkau B, Hölscher M, Hoffmann O, Grabellus F, Kimmig R, Schmid KW, Baba HA. Prognostic relevance of activated AKT kinase in node-negative breast

cancer: a clinicopathological study of 99 cases. *Mod Pathol.* 2004;**17**:15–21. doi: 10.1038/modpathol.3800002. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

24. Shi Z., Stack M. An Update on Immunohistochemistry in Translational Cancer Research. *Cancer Translational Medicine.* 2015;**1**(4):p. 115. doi: 10.4103/2395-3977.163802. [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

25. Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, Mehrotra S, Bhat-Nakshatri P et al. (2006) CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res* 8: R59. doi: 10.1186/bcr1474. PubMed: [17062128](#). [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

26. Tokunaga E, Kimura Y, Mashino K, Oki E, Kataoka A, Ohno S, Morita M, Kakeji Y, Baba H, Maehara Y. Activation of PI3K/AKT signaling and hormone resistance in breast cancer. *Breast Cancer.* 2006;**13**:137–144. doi: 10.2325/jbcs.13.137. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

27. Kirkegaard T, Witton CJ, McGlynn LM, Tovey SM, Dunne B, Lyon A, Bartlett JM. AKT activation predicts outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *J Pathol.* 2005;**207**:139–146. doi: 10.1002/path.1829. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

28. Stål O, Pérez-Tenorio G, Akerberg L, Olsson B, Nordenskjöld B, Skoog L, Rutqvist LE. AKT kinases in breast cancer and the results of adjuvant therapy. *Breast Cancer Res.* 2003;**5**:R37–R44. doi: 10.1186/bcr569. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

29. Messersmith W, Oppenheimer D, Peralba J, Sebastiani V, Amador M, Jimeno A, Embuscado E, Hidalgo M, Iacobuzio-Donahue C. Assessment of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in paired colorectal cancer and normal colon tissue samples using computer aided immunohistochemical analysis. *Cancer Biol Ther.* 2005;**4**:1381–1386. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

30. Bose S, Chandran S, Mirocha JM, Bose N. The AKT pathway in human breast cancer: a tissue-array-based analysis. *Mod Pathol.* 2006;**19**:238–245. doi: 10.1038/modpathol.3800525. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

- 31.**Massarelli E, Liu DD, Lee JJ, El-Naggar AK, Muzio LL, Staibano S, Placido SD, Myers JN, Papadimitrakopoulou VA. AKT activation correlates with adverse outcome in tongue cancer. *Cancer*. 2005;**104**:2430–2436. doi: 10.1002/cncr.21476. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
- 32.**Ogino S, Meyerhardt JA, Cantor M, Brahmandam M, Clark JW, Namgyal C, Kawasaki T, Kinsella K, Michelini AL, Enzinger PC, Kulke MH, Ryan DP, Loda M, Fuchs CS. Molecular alterations in tumors and response to combination chemotherapy with gefitinib for advanced colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;**11**:6650–6656. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0738. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
- 33.**Schmitz KJ, Grabellus F, Callies R, Otterbach F, Wohlschlaeger J, Levkau B, Kimmig R, Schmid KW, Baba HA. High expression of focal adhesion kinase (p125^{FAK}) in node-negative breast cancer is related to overexpression of HER-2/neu and activated AKT Kinase but does not predict outcome. *Breast Cancer Res*. 7:R194–R203. doi: 10.1186/bcr977. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
- 34.** Alessi DR, Caudwell FB, Andjelkovic M, Hemmings BA, Cohen P. Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Lett*. 1996 Dec 16;399(3):333-8. doi: 10.1016/s0014-5793(96)01370-1. PMID: 8985174.
- 35.** Zhou C, Wang M, Zhou L, Zhang Y, Liu W, Qin W, He R, Lu Y, Wang Y, Chen XZ, Tang J. Prognostic significance of PLIN1 expression in human breast cancer. *Oncotarget*. 2016 Aug 23;7(34):54488-54502. doi: 10.18632/oncotarget.10239. PMID: 27359054; PMCID: PMC5342357.
- 36.** Kimmel AR, Sztalryd C. Les périlipines : principales protéines associées aux gouttelettes lipidiques cytosoliques et leurs rôles dans le stockage, la mobilisation et l'homéostasie systémique des lipides cellulaires. *Ann Rév Nutr*. 2016 ; 36 : 471-509. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- 37.** Bickel PE, Tansey JT, Welte MA. Protéines PAT, une ancienne famille de protéines de gouttelettes lipidiques qui régulent les réserves lipidiques cellulaires. *Biochim Biophys Acta*. 2009 ; 1791 : 419-440. [[Article gratuit PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

- 38.** Straub BK, Witzel HR, Pawella LM, Renner M, Eiteneuer E, Hashani M, Schirmacher P, Roth W, Mechtersheimer G. L'expression de Perilipin 1 différencie le liposarcome des autres types de sarcome des tissus mous. *Je suis J Pathol.* 2019 ; 189 : 1547-1558. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- 39.** Asimakopoulou A, Vucur M, Luedde T, Schneiders S, Kalampoka S, Weiss TS, Weiskirchen R. Perilipin 5 et expression de la lipocaline 2 dans le carcinome hépatocellulaire. *Cancers (Bâle)* 2019 ; 11 : 385. [[Article gratuit PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- 40.** Cao Q, Ruan H, Wang K, Song Z, Bao L, Xu T, Xiao H, Wang C, Cheng G, Tong J, Meng X, Liu D, Yang H, Chen K, Zhang X. Surexpression de PLIN2 est un marqueur pronostique et atténue la progression tumorale dans le carcinome rénal à cellules claires. *Int J Oncol.* 2018 ; 53 : 137-147. [[Article gratuit PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- 41.** Zhou C, Wang M, Zhou L, Zhang Y, Liu W, Qin W, He R, Lu Y, Wang Y, Chen XZ, Tang J. Signification pronostique de l'expression de PLIN1 dans le cancer du sein humain. *Sur la cible.* 2016 ; 7 : 54488-54502. [[Article gratuit PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- 42.** Kuang WW, Thompson DA, Hoch RV, Weigel RJ. Le criblage différentiel et l'hybridation soustractive de suppression ont identifié des gènes exprimés de manière différentielle dans une lignée cellulaire de carcinome du sein positive aux récepteurs d'œstrogènes. *Acides nucléiques Res.* 1998 ; **26** : 1116-1123. est ce que je : 10.1093/nar/26.4.1116. [[Article gratuit PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
- 43.** Thompson DA, Weigel RJ. hAG-2, l'homologue humain du gène XAG-2 de la glande cimentaire de *Xenopus laevis* , est coexprimé avec le récepteur des œstrogènes dans les lignées cellulaires du cancer du sein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 ; **251** : 111-116. est ce que je: 0.1006/bbrc.1998.9440. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
- 43.** Vanderlaag KE, Hudak S, Bald L, Fayadat-Dilman L, Sathe M, Grein J, Janatpour MJ. Le gradient antérieur 2 joue un rôle essentiel dans la croissance et la survie des cellules cancéreuses du sein en modulant la cycline D1, le récepteur alpha des œstrogènes et la survivine. *Cancer du sein Rés.* 2010 ; **12** :R32. est ce que je: 10.1186/bcr2586. [[Article gratuit PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

44. Liu D, Rudland PS, Sibson DR, Platt-Higgins A, Barraclough R. Homologue humain de la protéine de la glande cimentière, un nouvel inducteur de métastases associé aux carcinomes du sein. *Cancer Rés.* 2005 ; **65** : 3796-3805. est ce que je: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3823. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
45. Norris AM, Gore A, Balboni A, Young A, Longnecker DS, Korc M. AGR2 est un gène supprimable par SMAD4 qui module les niveaux de MUC1 et favorise l'initiation et la progression de la néoplasie intraépithéliale pancréatique. *Oncogène.* 2012. sous presse est ce que je: 10.1038. [[Article gratuit PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)]
46. Paxton R.J., Mooser G., Pande H., Lee T.D., Shively J.E. Sequence analysis of carcinoembryonic antigen: identification of glycosylation sites and homology with the immunoglobulin supergene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987;84:920–924. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
47. Beauchemin N., Draber P., Dveksler G., et al. Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen. *Exp. Cell Res.* 1999;252(2):243–249. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
48. Chan C.H., Stanners C.P. Recent advances in the tumour biology of the GPI-anchored carcinoembryonic antigen family members CEACAM5 and CEACAM6. *Curr. Oncol.* 2007;14:70–73. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
49. Hammarstrom S., Olsen A., Teglund S., Baranov V. In: *The nature and expression of the human CEA family. Cell Adhesion and Communication Mediated by the CEA Family: Basic and Clinical Perspectives.* Stanners C.P., editor. Amsterdam: Hardwood Academic Publishers; 1998. pp. 31–55. [[Google Scholar](#)]
50. Johnson B, Mahadevan D. Emerging Role and Targeting of Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 6 (CEACAM6) in Human Malignancies. *Clin Cancer Drugs.* 2015 Feb;2(2):100-111. doi: 10.2174/2212697X02666150602215823. PMID: 27595061; PMCID: PMC4997943.

- 51.** Lewis-Wambi JS, Cunliffe HE, Kim HR, Willis AL, Jordan VC. Overexpression of CEACAM6 promotes migration and invasion of oestrogen-deprived breast cancer cells. *Eur J Cancer*. 2008 Aug;44(12):1770-9. doi: 10.1016/j.ejca.2008.05.016. Epub 2008 Jul 7. PMID: 18614350; PMCID: PMC2778047.
- 52.** Blaschke F, Bruemmer D, Law RE. Egr-1 is a major vascular pathogenic transcription factor in atherosclerosis and restenosis. *Rev Endocr Metab Dis*. 2004;5:249–254. doi: 10.1023/B:REMD.0000032413.88756.ee. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
- 53.** Saha SK, Islam SMR, Saha T, Nishat A, Biswas PK, Gil M, Nkenyereye L, El-Sappagh S, Islam MS, Cho SG. Prognostic role of EGR1 in breast cancer: a systematic review. *BMB Rep*. 2021 Oct;54(10):497-504. doi: 10.5483/BMBRep.2021.54.10.087. PMID: 34488929; PMCID: PMC8560464.
- 54.** Freischel AR, Damaghi M, Cunningham JJ, Ibrahim-Hashim A, Gillies RJ, Gatenby RA, Brown JS. Frequency-dependent interactions determine outcome of competition between two breast cancer cell lines. *Sci Rep*. 2021 Mar 1;11(1):4908. doi: 10.1038/s41598-021-84406-3. PMID: 33649456; PMCID: PMC7921689.
- 55.** Manning BD & Toker A (2017) AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* 169(3), 381–405. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- 56.** Chun Y, Kim J. AMPK-mTOR Signaling and Cellular Adaptations in Hypoxia. *Int J Mol Sci*. 2021 Sep 9;22(18):9765. doi: 10.3390/ijms22189765. PMID: 34575924; PMCID: PMC8465282.
- 58.** Liu Y, Zheng D, Liu M, Bai J, Zhou X, Gong B, Lu J, Zhang Y, Huang H, Luo W, Huang G. Downregulation of glypican-3 expression increases migration, invasion, and tumorigenicity of human ovarian cancer cells. *Tumour Biol*. 2015 [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- 59.** Chandrashekar DS, Bashel B, Balasubramanya SAH, Creighton CJ, Ponce-Rodriguez I, Chakravarthi BVSK, Varambally S. UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and Survival Analyses. *Neoplasia*. 2017 Aug;19(8):649-658. doi: 10.1016/j.neo.2017.05.002. Epub 2017 Jul 18. PMID: 28732212; PMCID: PMC5516091.

- 60.** Anders S., Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology*. 2010;**11**(10, article R106) doi: 10.1186/gb-2010-11-10-r106. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
- 61.** Conesa A., Madrigal P., Tarazona S., et al. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biology*. 2016;**17**(1, article no. 181):p. 13. doi: 10.1186/s13059-016-0881-8. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
- 62.** Zhu Y., Qiu P., Ji Y. TCGA-assembler: Open-source software for retrieving and processing TCGA data. *Nature Methods*. 2014;**11**(6):599–600. doi: 10.1038/nmeth.2956. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
- 63.** Harris MA, Clark J, Ireland A, et al. The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: D258–D261. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- 64.** Organizer GB, Goode JA. *The KEGG database* Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2008, pp.91–103. [[Google Scholar](#)]
- 65.** Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, et al. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. *Bioinformatics* 2011; 27: 431–432. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- 66.** Chen W, Qin Y, Wang D, Zhou L, Liu Y, Chen S, Yin L, Xiao Y, Yao XH, Yang X, Ma W, Chen W, He X, Zhang L, Yang Q, Bian X, Shao ZM, Liu S. CCL20 triggered by chemotherapy hinders the therapeutic efficacy of breast cancer. *PLoS Biol*. 2018 Jul 27;**16**(7):e2005869. doi: 10.1371/journal.pbio.2005869. PMID: 30052635; PMCID: PMC6082578.
- 67.** Katsuta E, Yan L, Nagahashi M, Raza A, Sturgill JL, Lyon DE, Rashid OM, Hait NC, Takabe K. Doxorubicin effect is enhanced by sphingosine-1-phosphate signaling antagonist in breast cancer. *J Surg Res*. 2017 Nov;**219**:202–213. doi: 10.1016/j.jss.2017.05.101. Epub 2017 Jun 29. PMID: 29078883; PMCID: PMC5661979.

- 68.** Zhou C, Wang M, Zhou L, Zhang Y, Liu W, Qin W, He R, Lu Y, Wang Y, Chen XZ, Tang J. Prognostic significance of PLIN1 expression in human breast cancer. *Oncotarget*. 2016 Aug 23;7(34):54488-54502. doi: 10.18632/oncotarget.10239. PMID: 27359054; PMCID: PMC5342357.
- 69.** Huang YH, Chu PY, Chen JL, Huang CT, Huang CC, Tsai YF, Wang YL, Lien PJ, Tseng LM, Liu CY. Expression pattern and prognostic impact of glycoprotein non-metastatic B (GPNMB) in triple-negative breast cancer. *Sci Rep*. 2021 Jun 9;11(1):12171. doi: 10.1038/s41598-021-91588-3. PMID: 34108545; PMCID: PMC8190094.
- 70 .** Rose AA, et al. Osteoactivin promotes breast cancer metastasis to bone. *Mol. Cancer Res*. 2007;5:1001–1014. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-07-0119. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
- 71.** Rose AA, et al. ADAM10 releases a soluble form of the GPNMB/Osteoactivin extracellular domain with angiogenic properties. *PLoS ONE*. 2010;5:e12093. doi: 10.1371/journal.pone.0012093. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
- 72.** Onaga M, et al. Osteoactivin expressed during cirrhosis development in rats fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet, accelerates motility of hepatoma cells. *J. Hepatol*. 2003;39:779–785. doi: 10.1016/S0168-8278(03)00361-1. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
- 73.** Chien W., O’Kelly J., Lu D., Leiter A., Sohn J., Yin D., Karlan B., Vadgama J., Lyons K.M., Koeffler H.P. Expression of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in breast cancer cells is associated with increased migration and angiogenesis. *Int. J. Oncol*. 2011;38:1741–1747. doi: 10.3892/ijo.2011.985. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
- 74.** Hrstka R, Nenutil R, Fourtouna A, Maslon MM, Naughton C, Langdon S, Murray E, Larionov A, Petrakova K, Muller P, et al. The pro-metastatic protein anterior gradient-2 predicts poor prognosis in tamoxifen-treated breast cancers. *Oncogene*. 2010;29:4838–4847. doi: 10.1038/onc.2010.228. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

75. Hrstka R, Brychtova V, Fabian P, Vojtesek B, Svoboda M. AGR2 predicts tamoxifen resistance in postmenopausal breast cancer patients. *Dis Markers*. 2013;35:207–212. doi: 10.1155/2013/761537. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
76. Li Z, Zhu Q, Hu L, Chen H, Wu Z, Li D. Anterior gradient 2 is a binding stabilizer of hypoxia inducible factor-1 α that enhances CoCl₂-induced doxorubicin resistance in breast cancer cells. *Cancer Sci*. 2015;106:1041–1049. doi: 10.1111/cas.12714. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
77. Adam J., Le Stang N., Rouquette I., Cazes A., Badoual C., Pinot-Roussel H., Tixier L., Danel C., Damiola F., Damotte D., et al. Multicenter harmonization study for PD-L1 IHC testing in non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol*. 2018;29:953–958. doi: 10.1093/annonc/mdy014. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
78. Conroy J.M., Pabla S., Nesline M.K., Glenn S.T., Papanicolau-Sengos A., Burgher B., Andreas J., Giamo V., Wang Y., Lenzo F.L., et al. Next generation sequencing of PD-L1 for predicting response to immune checkpoint inhibitors. *J. Immunother. Cancer*. 2019;7:18. doi: 10.1186/s40425-018-0489-5. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
79. Paluch B.E., Glenn S.T., Conroy J.M., Papanicolau-Sengos A., Bshara W., Omilian A.R., Brese E., Nesline M., Burgher B., Andreas J., et al. Robust detection of immune transcripts in FFPE samples using targeted RNA sequencing. *Oncotarget*. 2017;8:3197–3205. doi: 10.18632/oncotarget.13691. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
80. Tsimafeyeu I., Imyanitov E., Zavalishina L., Raskin G., Povilaitite P., Savelov N., Kharitonova E., Rumyantsev A., Pugach I., Andreeva Y., et al. Agreement between PDL1 immunohistochemistry assays and polymerase chain reaction in non-small cell lung cancer: CLOVER comparison study. *Sci. Rep*. 2020;10:3928. doi: 10.1038/s41598-020-60950-2. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
81. Brueffer C., Vallon-Christersson J., Grabau† D., Ehinger A., Häkkinen J., Hegardt C., Malina J., Chen Y., Bendahl P.-O., Manjer J., et al. Clinical Value of RNA Sequencing–Based Classifiers for Prediction of the Five Conventional Breast Cancer Biomarkers: A Report From the Population-

Based Multicenter Sweden Cancerome Analysis Network—Breast Initiative. *JCO Precis. Oncol.* 2018;1–18. doi: 10.1200/PO.17.00135. [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

82. Bossel Ben-Moshe N., Gilad S., Perry G., Benjamin S., Balint-Lahat N., Pavlovsky A., Halperin S., Markus B., Yosepovich A., Barshack I., et al. mRNA-seq whole transcriptome profiling of fresh frozen versus archived fixed tissues. *BMC Genom.* 2018;19:419. doi: 10.1186/s12864-018-4761-3. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

83. Sorokin M, Ignatev K, Poddubskaya E, Vladimirova U, Gaifullin N, Lantsov D, Garazha A, Allina D, Suntsova M, Barbara V, Buzdin A. RNA Sequencing in Comparison to Immunohistochemistry for Measuring Cancer Biomarkers in Breast Cancer and Lung Cancer Specimens. *Biomedicines.* 2020 May 9;8(5):114. doi: 10.3390/biomedicines8050114. PMID: 32397474; PMCID: PMC7277916.

84. Liu Y., Beyer A., Aebersold R. On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell.* 2016;165:535–550. doi: 10.1016/j.cell.2016.03.014. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

85. Lazar V., Rubin E., Depil S., Pawitan Y., Martini J.-F., Gomez-Navarro J., Yver A., Kan Z., Dry J.R., Kehren J., et al. A simplified interventional mapping system (SIMS) for the selection of combinations of targeted treatments in non-small cell lung cancer. *Oncotarget.* 2015;6:14139–14152. doi: 10.18632/oncotarget.3741. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

86. Buzdin A., Sorokin M., Garazha A., Sekacheva M., Kim E., Zhukov N., Wang Y., Li X., Kar S., Hartmann C., et al. Molecular pathway activation—New type of biomarkers for tumor morphology and personalized selection of target drugs. *Semin. Cancer Biol.* 2018;53 doi: 10.1016/j.semcancer.2018.06.003. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

87. Buzdin A.A., Prassolov V., Zhavoronkov A.A., Borisov N.M. Bioinformatics Meets Biomedicine: OncoFinder, a Quantitative Approach for Interrogating Molecular Pathways Using Gene Expression Data. *Methods Mol. Biol.* 2017;1613:53–83. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

- 88.** Buzdin A., Sorokin M., Garazha A., Sekacheva M., Kim E., Zhukov N., Wang Y., Li X., Kar S., Hartmann C., et al. Molecular pathway activation—New type of biomarkers for tumor morphology and personalized selection of target drugs. *Semin. Cancer Biol.* 2018;53 doi: 10.1016/j.semcancer.2018.06.003. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
- 89.** Buzdin A.A., Prassolov V., Zhavoronkov A.A., Borisov N.M. Bioinformatics Meets Biomedicine: OncoFinder, a Quantitative Approach for Interrogating Molecular Pathways Using Gene Expression Data. *Methods Mol. Biol.* 2017; 1613:53–83. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- 90.** Buzdin A., Sorokin M., Glusker A., Garazha A., Poddubskaya E., Shirokorad V., Naskhletashvili D., Kashintsev K., Sokov D., Suntsova M., et al. Activation of intracellular signaling pathways as a new type of biomarkers for selection of target anticancer drugs. *J. Clin. Oncol.* 2017;35: e23142. doi: 10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.e23142. [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
- 91.** Buzdin A., Sorokin M., Garazha A., Glusker A., Aleshin A., Poddubskaya E., Sekacheva M., Kim E., Gaifullin N., Giese A., et al. RNA sequencing for research and diagnostics in clinical oncology. *Semin. Cancer Biol.* 2019 doi: 10.1016/j.semcancer.2019.07.010. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
- 92.** Suntsova M., Gaifullin N., Allina D., Reshetun A., Li X., Mendeleeva L., Surin V., Sergeeva A., Spirin P., Prassolov V., et al. Atlas of RNA sequencing profiles for normal human tissues. *Sci. Data.* 2019; 6:36. doi: 10.1038/s41597-019-0043-4. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
- 93.** Grossman R.L., Heath A.P., Ferretti V., Varmus H.E., Lowy D.R., Kibbe W.A., Staudt L.M. Toward a Shared Vision for Cancer Genomic Data. *N. Engl. J. Med.* 2016; 375:1109–1112. doi: 10.1056/NEJMp1607591. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

CHAPITRE 3- DISCUSSION

DISCUSSION

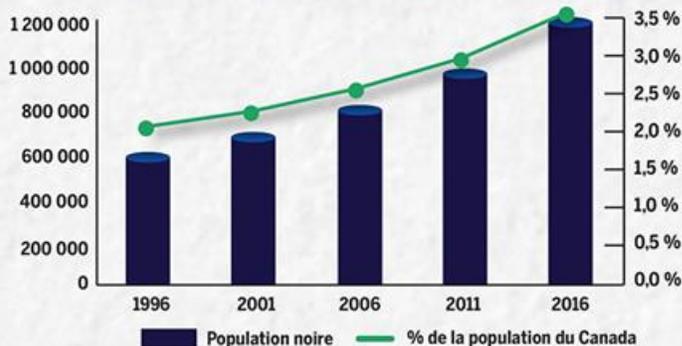
3.1 Validation de l'agressivité tumorale dans le cancer du sein de la femme noire de la population Africaine.

L'un des buts primordiaux de notre étude était de proposer de nouveaux biomarqueurs de cancer du sein agressif de la femme noire.

Le cancer du sein est une cause importante de morbidité et de mortalité chez les Canadiennes et l'influence de facteurs sociaux-démographiques comme la race sur la morbidité et la mortalité de ce cancer est bien établie dans la littérature [280]. Des différences significatives dans l'incidence, le diagnostic et le pronostic du cancer du sein ont été démontrées entre les groupes ethniques et raciaux aux États-Unis, au Canada et au Royaume-Uni [281,282]. Par ailleurs, un certain nombre d'études ont démontré que des différences démographiques et histo moléculaires telles que le type histologique inflammatoire, l'âge précoce, les tumeurs de plus grande taille, le grade avancé, le statut hormonal triple négatif et l'atteinte des ganglions lymphatiques peuvent contribuer au mauvais pronostic du cancer du sein [283-284]. La population noire au Canada est en pleine croissance (Figure 3.1) et cette forte croissance pourrait éventuellement impacter le taux de mortalité par cancer du sein observé au Canada.

LA POPULATION NOIRE AU CANADA EN CROISSANCE ET DIVERSIFIÉE

En 2016, la population noire atteignait près 1,2 million de personnes, représentant 3,5 % de la population totale au Canada

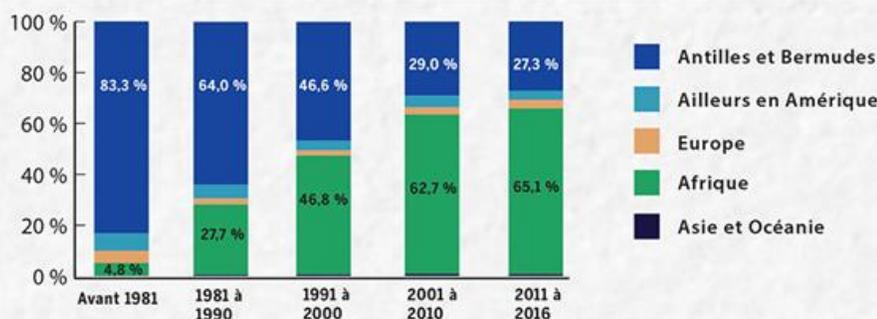


La population noire au Canada a doublé entre 1996 et 2016.

En 2016, 26,6 % de la population noire était âgée de moins de 15 ans, comparativement à 16,9 % parmi l'ensemble de la population canadienne.

De manière semblable à l'ensemble de la population canadienne, les femmes noires (51,6 %) étaient un peu plus nombreuses que les hommes noirs.

Les régions sources des immigrants noirs ont changé au fil du temps



La majorité des immigrants noirs arrivés au Canada avant 1981 sont nés en Jamaïque et en Haïti.

Les principaux pays de naissance des immigrants noirs récents (de 2011 à 2016) : Haïti, Nigéria, Jamaïque, Cameroun et République démocratique du Congo.

Sources: Statistique Canada, Recensement de la population, 1996, 2001, 2006 et 2016; Enquête nationale auprès des ménages de 2011.



Statistics Canada
Statistique Canada

www.statcan.gc.ca

Canada

Figure 3.1 : La population noire au Canada, Tirée de statistiques Canada. En 2016.

La population noire atteignait près de 1,2 million de personnes, représentant 3,5 % de la population totale au Canada. Les femmes noires (51,6 %) étaient un peu plus nombreuses que les hommes noirs.

Le cancer inflammatoire du sein (CIS) est une forme rare et agressive de cancer du sein qui représente 2 à 4 % de tous les cancers du sein et a un taux de survie global à 5 ans de 30 à 40 % [285, 287]. Son taux d'incidence est plus élevé chez les femmes noires que chez les femmes blanches. Son mauvais pronostic est lié à une atteinte ganglionnaire précoce, à un risque élevé de métastases à distance et à un grade histologique élevé [285, 287, 288]. La prise en charge standard du CIS non métastatique comprend un traitement néoadjuvant, une mastectomie complète avec curage ganglionnaire axillaire et une radiothérapie adjuvante locorégionale (thérapie trimodale) [285,289-290]. Malgré l'amélioration de la survie avec le traitement trimodal mentionné plus haut, ce cancer reste une maladie de mauvais pronostic.

Le CIS étant associé à la femme noire et de mauvais pronostic, il nous fallait une cohorte d'étude qui intégrait ce type de cancer. Nous avons voulu dans un premier temps vérifier l'agressivité tumorale dans le cancer du sein au sein de cette population. Nous avons sélectionné pour une étude épidémiologique 700 patientes ayant un cancer du sein. Nos résultats ont validé l'agressivité tumorale au sein de cette population car leur cancer est généralement de type inflammatoire, l'âge moyen au moment du diagnostic était de 49 ans versus 63 ans au Canada (Figure supplémentaire 3). 47% des patientes présentaient un cancer de grade 3 (Figure supplémentaire 3), 20% des cancers étaient triple négatif et le taux de mortalité par cancer du sein était de 18%. Nous avons dans une étude précédente montré que les patientes gabonaises à l'instar des femmes subsahariennes présentaient généralement un cancer du sein à un stade avancé car la plupart de leurs mammographies étaient anormales (classées BI-RADS 3, 4 et 5) [291].

3.2 Déterminer la contribution de AKT dans la chimiorésistance

Nous disions plus haut que le cancer du sein triple négatif est plus fréquent chez les femmes noires. Par ailleurs les cellules du cancer du sein triple négatif ont généralement un PTEN altéré donc une signalisation PI3K/AKT suractivée [293,294]. Le but de notre étude ici était de déterminer l'implication de la voie de signalisation PI3K/AKT dans la réponse thérapeutique et la chimiorésistance du cancer du sein agressif de la femme noire.

AKT, également connue sous le nom de protéine kinase B (PKB), figure parmi les protéines effectrices clés activées directement par la voie de la PI3K. Cette protéine kinase sérine/thréonine

joue un rôle essentiel dans divers processus cellulaires tels que la survie, le métabolisme, la prolifération, la croissance et l'angiogenèse (révisé dans [306]. Toute régulation anormale de ces processus peut contribuer au développement tumoral, positionnant ainsi cette protéine comme une cible thérapeutique significative dans la recherche sur le cancer [306, 307].

La chimiothérapie est cruciale pour freiner la progression et la dissémination des cellules cancéreuses chez les patientes atteintes d'un cancer de stade avancé [302]. Cependant, son efficacité est entravée par le développement par les cellules cancéreuses de la résistance aux médicaments. Initialement sensibles au traitement, de nombreux cancers acquièrent la capacité de contourner les mécanismes d'action des médicaments, échappant ainsi à la chimiothérapie et devenant résistants. Ce phénomène, appelé chimiorésistance, constitue la principale raison de l'abandon d'un médicament [303]. La résistance des cellules peut être intrinsèque ou acquise. Dans le cas de la chimiorésistance intrinsèque, les cellules sont naturellement résistantes et ne répondent jamais au traitement. Dans la chimiorésistance dite acquise, les cellules deviennent résistantes sous l'effet d'une pression de sélection exercée par les médicaments [304]. Divers mécanismes peuvent contribuer à la résistance des cellules, comme brièvement décrit ci-dessus. Dans le cadre de notre étude, nous avons pensé que le taux de mortalité élevé observé dans le cancer du sein de la femme noire par rapport à celui de la femme caucasienne pourrait être attribué à une mauvaise réponse thérapeutique ou à la chimiorésistance.

Des études antérieures ont montré que la voie PI3K/AKT joue un rôle crucial dans la chimiorésistance en régulant l'expression des transporteurs ABC, notamment la glycoprotéine P (P-gp, ABCB1), la protéine 1 associée à la multirésistance aux médicaments (MRP1, ABCC1) et la protéine de résistance au cancer du sein (BCRP, ABCG2) [293]. L'activation de ces transporteurs peut entraîner une diminution de la réponse aux médicaments de chimiothérapie et faciliter l'efflux des médicaments. Face à cela, plusieurs médicaments visant des protéines spécifiques exprimées à la surface des cellules cancéreuses du sein, comme les récepteurs tyrosine kinases et les régulateurs immunitaires, ainsi que des protéines impliquées dans le cycle cellulaire et la motilité, tels que les kinases dépendantes des cyclines, les stabilisateurs d'ADN et les modulateurs du cytosquelette, sont autorisés pour le traitement du cancer du sein [294]. Néanmoins, malgré cette gamme de traitements, le cancer du sein présente souvent une faible réponse à la chimiothérapie conventionnelle, en raison de sa résistance intrinsèque et acquise. Une

empreinte AKT est également détectable dans la majorité des cas de résistance aux médicaments [292,293,294].

3.2.1 Activation d'AKT

La suractivation d'AKT et de ses régulateurs en amont et en aval dans les cellules cancéreuses du sein résistantes est considérée comme une cible potentielle majeure pour de nouvelles thérapies anticancéreuses, ce qui suggère que la signalisation AKT agit comme un mécanisme cellulaire contre la chimiothérapie. La présente étude a montré l'activation soutenue d'AKT dans le cancer du sein de la femme noire en réponse à différents types de chimiothérapie. Il est connu que la signalisation AKT joue un rôle de défense cellulaire contre la chimiothérapie et [295]. Il améliore la multirésistance aux médicaments, [296] augmente les espèces réactives de l'oxygène dans le microenvironnement de la tumeur mammaire, [297] améliore le métabolisme anaérobie, [298] inhibe le cycle tricarboxylique, [299] favorise la régulation positive de PD-L1, [300] inhibe l'apoptose, [301] augmente l'absorption du glucose et, plus important encore, [298-299] recrute et interconnecte la membrane plasmique, le noyau, le réticulum endoplasmique, et les mitochondries permettant ainsi aux cellules cancéreuses du sein d'échapper aux effets de la chimiothérapie et de survivre. Par conséquent, la signalisation AKT est considérée comme un mécanisme de défense cellulaire utilisé contre les effets chimiothérapeutiques. Des lors, était essentiel pour nous d'examiner les isoformes et les substrats d'AKT impliqués dans la réponse thérapeutique spécifique au cancer du sein chez les femmes africaines.

3.2.2 Surexpression d'AKT1 et FOXO3 après la chimiothérapie a la doxorubicine

Dans de nombreux types de cancer, la voie PI3K/AKT est fréquemment activée par diverses aberrations génomiques [305]. Pour contrer le phénomène de chimiorésistance et réduire les taux de survie cellulaire suite à un traitement chimio thérapeutique, l'inhibition de cette voie représente une option extrêmement prometteuse.

La protéine AKT est également connue pour son association avec la résistance à l'apoptose dans divers types de cancer. En tant que kinase cruciale pour la survie cellulaire, AKT est normalement activé par différents facteurs de croissance. Cependant, dans les tumeurs, des événements oncogéniques entraînent souvent son activation constitutive, favorisant ainsi la survie des cellules

cancéreuses. Des études ont identifié l'existence de trois isoformes d'AKT (AKT1, AKT2 et AKT3) [307], chacun présentant des fonctions physiologiques distinctes. Bien que ces isoformes puissent contribuer de manière différenciée à la réponse thérapeutique et la chimiorésistance des cellules du cancer du sein, très peu d'études ont analysé leur implication dans le cancer du sein agressif chez la femme noire. Dans notre étude, nous avons montré une suractivation d'AKT après la chimiothérapie dans le cancer du sein chez les femmes noires. L'activation d'AKT dans le cancer du sein humain a déjà été associée à un mauvais pronostic et à une résistance au traitement [302-307] et dans notre étude, cette suractivation pourrait être associée à la chimiorésistance dans le cancer du sein de la femme noire.

Des études précédentes ont démontré que chacun des isoformes d'AKT lorsqu'il était surexprimé ou inhibé produisait des réponses physiologiques distinctes. Il a été aussi démontré une surexpression de la protéine AKT1 dans environ 40 % des cas de cancers du sein et de l'ovaire, dans plus de 50 % des carcinomes de la prostate, et dans environ 20 % des carcinomes gastriques [309]. Cette augmentation de l'expression de la protéine AKT1 a été signalée comme un phénomène récurrent dans ces types de cancers spécifiques. La surexpression d'AKT2 a été confirmée dans 25 % des cancers non métastatiques du sein, dans 30 % des cancers pancréatiques et ovariens, ainsi que dans 40 % des cancers hépatocellulaires [307-309]. Par ailleurs, une activité accrue d'AKT3 a été observée dans les cellules cancéreuses de la prostate résistantes à l'androgène [307]. Notre laboratoire a précédemment travaillé sur la chimiorésistance dans le cancer de l'endomètre en utilisant les lignées cellulaires endométriales KLE et Hec-1. De ces expériences les isoformes AKT1 et AKT2 étaient les plus impliqués dans la résistance à la chimiothérapie du cancer endométrial. D'un autre côté, un rôle des isoformes AKT1 et AKT2 dans le développement du carcinome mammaire de la souris a été démontré sur des modèles de souris transgéniques. AKT1 est connu pour déclencher la croissance tumorale, tandis que AKT2 favorise la métastase des tumeurs mammaires de Balb-neuT [308-309]. Au regard des résultats précédents, nous avons mis l'accent sur l'étude des deux isoformes AKT1 et AKT2 et avons regardé leur expression tissulaire dans le cancer du sein de la femme noire. En accord avec ces différentes études, Nos résultats montrent que l'expression d'AKT1 corrèle positivement avec le grade du cancer ou en d'autres termes AKT1 est majoritairement exprimé dans le cancer du sein de haut grade chez la femme noire.

Des études ont associé les rôles des isoformes d'AKT à la réponse thérapeutique et la chimiorésistance pour différents types de cancer. Elles ont révélé que la surexpression d'AKT1 dans les cellules du cancer du poumon conférait une résistance au cisplatine, et que l'inhibition de cet isoforme inversait ce phénotype de résistance [310]. De même, l'inhibition d'AKT2 dans les cellules du cancer du sein surexprimant le facteur de survie cellulaire Twist sensibilisait ces cellules à la mort cellulaire après un traitement au paclitaxel [311]. AKT2 a également été associé à la résistance au docetaxel dans les cellules du cancer du sein et de l'ovaire [312]. L'expression constante d'AKT2 dans les cellules du cancer de l'ovaire prévenait l'apoptose en réponse au cisplatine [313]. Les cellules du cancer du sein exprimant AKT3 étaient résistantes à l'apoptose induite par le Tamoxifène tandis que la diminution de l'expression d'AKT3 dans les cellules de mélanome favorisait le clivage de la caspase-3 après exposition à la staurosporine [314]. Notre étude montre qu'AKT2 est surexprimé de façon significative dans le cancer du sein de la femme noire chez les patientes post-traitées à la doxorubicine par rapport aux patientes non traitées, suggérant ainsi le rôle de cet isoforme dans la réponse thérapeutique.

Sachant qu'AKT est activée au niveau de la membrane plasmique et que son activation est primordiale pour activer certains de ses substrats, nous avons regardé l'expression de trois substrats clés en réponse à la chimiothérapie dans le cancer du sein de la femme noire. En effet, AKT activé se dissocie de la membrane plasmique pour transloquer vers le cytoplasme ou le noyau, où elle procède à la phosphorylation de diverses protéines pro ou anti-apoptotiques [203, 205].

AKT exerce son activité antiapoptotique, notamment en prévenant le relargage du cytochrome c hors de la mitochondrie [207,209]. De plus, elle peut phosphoryler et inactiver la protéine proapoptotique Bad, membre de la famille Bcl-2, l'empêchant ainsi d'inhiber l'action des protéines antiapoptotiques Bcl-2 et B-cell lymphoma extra large (Bcl-xL). Par ailleurs, AKT désactive la procaspase-9 et le facteur de transcription Forkhead box 0 (FOXO), qui régule l'expression de gènes cruciaux pour le déclenchement de l'apoptose [405]. AKT favorise également la survie cellulaire en activant l'inhibiteur kappa-B (IKB), une kinase qui contrôle l'expression du facteur nucléaire kappa-B (NF-KB) [316]. Il faut noter que le facteur nucléaire kappa-B (NF-κB) est un facteur de transcription qui régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans des processus biologiques tels que l'inflammation (l'interleukine-6 (IL-6), le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF-α), et l'interleukine-1β (IL-1β)), l'immunité (le complexe majeur d'histocompatibilité

(CMH) et les cytokines), la survie cellulaire (Bcl-2 et Bcl-x) et la prolifération (les cyclines) [316]. Par conséquent, l'activation anormale de NF- κ B peut contribuer à la progression du cancer en entraînant une croissance tumorale accrue, une invasion et une métastase.

En outre, elle influe sur le contrôle du cycle cellulaire par p53 en phosphorylant la murine double minute 2 (Mdm2) [317] qui transloque ensuite vers le noyau et provoque l'ubiquitination et la dégradation de p53 [317].

L'activation d'AKT joue également un rôle régulateur dans la progression du cycle cellulaire en inactivant la glycogène synthase kinase-3 (GSK-3) par phosphorylation. Initialement identifiée comme une enzyme régulant la synthèse du glucose en réponse à l'insuline, la participation de GSK-3 à la survie cellulaire a été démontrée dans des études menées sur des cellules murines Rat-1 et PCI2. La surexpression de GSK-3 induit l'apoptose, tandis que son inactivation bloque la mort cellulaire par apoptose [318]. Les fonctions de GSK-3 incluent la perturbation des activités mitochondriales et la modulation de l'expression de diverses protéines pro ou antiapoptotiques, bien que les cibles moléculaires précises de GSK-3 ne soient pas encore complètement élucidées. Des recherches ont néanmoins confirmé que l'apoptose induite par GSK-3 joue un rôle crucial.

AKT est nécessaire pour l'activation des caspases et est régulée par des protéines appartenant aux familles de p53 et de Bcl-2 [317, 319]. L'implication d'AKT dans la croissance et la prolifération cellulaires a également été prouvée. Après son activation, AKT stimule la kinase mTOR, une protéine reconnue pour favoriser la synthèse protéique [316]. Une fois activée, mTOR phosphoryle deux molécules effectrices, la « 70-kDa ribosomal protéine S6 kinase » (P70S6K) et la « 4E-binding protéine 1 » (4E-BP1). La P70S6K est responsable de l'augmentation de la biogenèse des ribosomes, tandis que la phosphorylation de 4E-BP1 facilite la traduction de l'ARNm. Une étude a révélé que l'activation constitutive d'AKT dans les cellules cancéreuses de la prostate est corrélée à une augmentation du niveau de phosphorylation de mTOR [316].

Nous avons examiné l'expression post-chimiothérapie de FOXO3, GSK-3 et PRAS40. Nous avons montré une corrélation positive de pFOXO3 avec le grade du cancer du sein de la femme noire suggérant ainsi que FOXO3 était inactivé par AKT dans les tumeurs mammaires de haut grade. Nous avons aussi montré que FOXO3 est surexprimé chez les patientes post-traitées à la

doxorubicine par rapport aux patientes non traitées. FOXO3 est déjà connu pour jouer un rôle prépondérant dans le contrôle du développement du cancer et la susceptibilité aux médicaments chimio thérapeutiques dans le cancer du sein de la femme caucasienne [313]. Plus important encore, FOXO3 est régulé négativement par les voies de signalisation de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) -AKT/Protein Kinase [314], et l'inactivation de FOXO3 a souvent été observée dans les tumeurs humaines, largement due à l'activation de la voie PI3K-AKT [314,315]. En effet, Lorsque AKT est activée, elle phosphoryle FOXO3, ce qui entraîne sa dissociation du noyau cellulaire et son exclusion du noyau vers le cytoplasme [314,315]. En conséquence, FOXO3 est inactivée en tant que facteur de transcription et les gènes cibles normalement régulés par FOXO3 ne sont plus exprimés. Cette action de AKT sur FOXO3 est généralement associée à la promotion de la survie cellulaire, à l'inhibition de l'apoptose et à la régulation positive de la croissance cellulaire [314,315]. Sachant qu'en inhibant FOXO3, AKT peut favoriser la prolifération et la survie des cellules, il serait alors intéressant d'approfondir nos résultats et comprendre pourquoi FOXO3 inactivé par AKT serait majoritairement exprimé dans le cancer du sein de haut grade la femme noire.

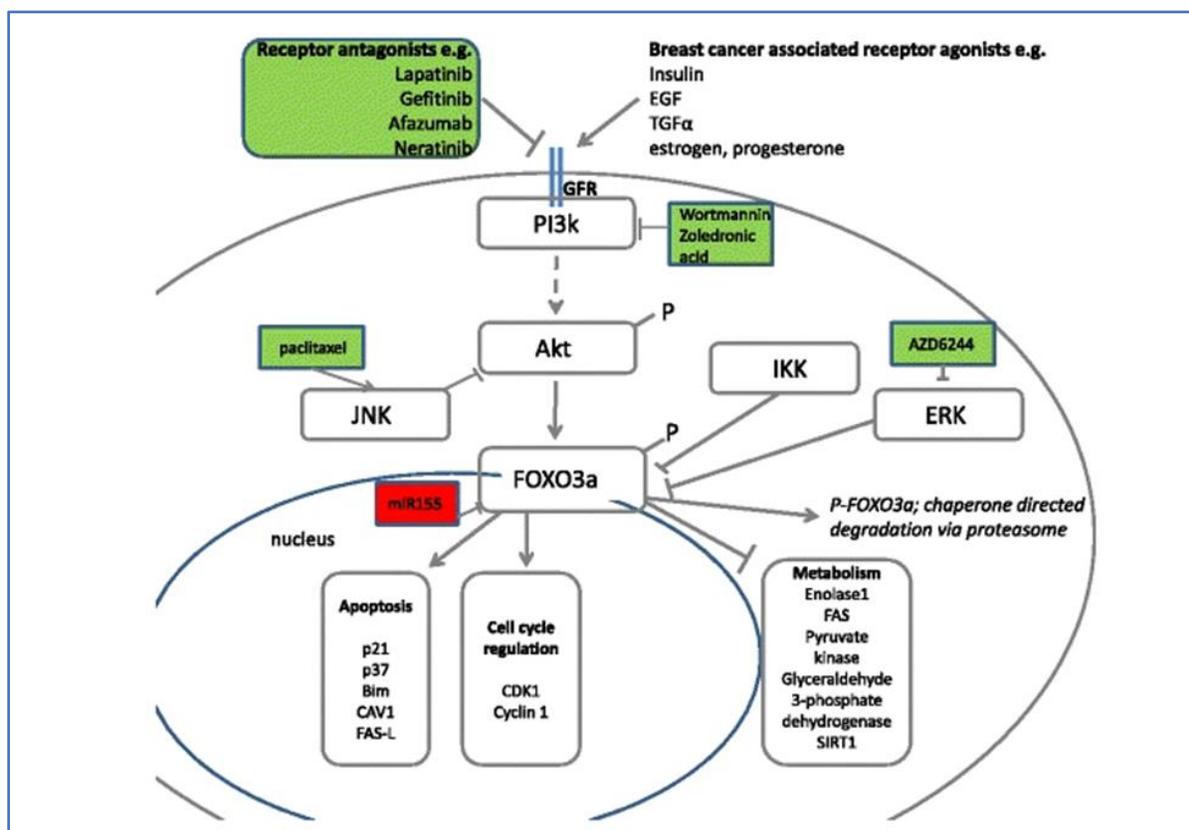


Figure 3.2: Schéma illustrant les mécanismes d'action des agents chimio thérapeutiques utilisés dans le traitement de cancer du sein en amont de l'expression de FOXO3a.

Taylor, Simon 2015. Cancer Cell International. Les agents chimiothérapeutiques dans les cases vertes augmentent l'expression/l'activité de FOXO3a ; ceux dans les cases rouges diminuent l'expression/l'activité de FOXO3a. CAV1 = cavéoline 1, CDK1 = kinase 1 dépendante de la cycline, ERK = kinases extracellulaires régulées par le signal, FAS-L = ligand FAS, FAS = synthase d'acide gras, FOXO3a – boîte de fourche O3a, GFR – récepteur du facteur de croissance $I\kappa\kappa\beta$ – inhibiteur de la kappa kinase bêta , JNK - Jun N-terminal kinases, PI3k - phosphatidylinositol 3-kinase, SIRT1 = sirtuine 1.

Nos résultats ainsi que d'autres études [313-315] montrent que les cellules cancéreuses se protègent contre la toxicité des agents chimiothérapeutiques en activant AKT et principalement en surexprimant AKT2. De plus, l'activation d'AKT peut réguler négativement FOXO3, un substrat surexprimé par la chimiothérapie. La surexpression significative de l'isoforme AKT2 et du substrat FOXO3 en réponse à la doxorubicine suggèrent que l'isoforme AKT2 pourrait être responsable de l'inactivation de FOXO3 dans le cancer du sein chez les femmes africaines. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse. Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que la voie PI3K/AKT est impliquée dans la chimiorésistance dans le cancer du sein agressif chez les femmes afro-américaines.

3.3 Identifier de nouveaux biomarqueurs thérapeutiques pour le cancer du sein agressif de la femme noire

3.3.1 Profil d'expression génique en réponse à la chimiothérapie

Le séquençage d'ARN est un outil puissant pour trouver des gènes différentiellement exprimés entre des groupes d'échantillons, car il est un séquençage à haut débit, fiable qui permet de séquencer simultanément des millions de fragments d'ARN et de les quantifier [320]. L'analyse informatique des données de séquençage d'ARN a conduit à de nombreuses avancées scientifiques, notamment de nouvelles découvertes thérapeutiques, une compréhension détaillée des régions de régulation génétique et l'identification de biomarqueurs [321]. Par exemple, dans le domaine du cancer, les données de séquençage d'ARN ont permis l'identification de mutations spécifiques dans les gènes BRCA ou de cartographier les sites de fixation des facteurs de transcription dans le génome humain.

L'Atlas du génome du cancer ou TCGA est un projet de recherche majeur aux États-Unis. Lancé en 2005, le TCGA avait pour objectif de caractériser de manière exhaustive les altérations génomiques et moléculaires dans plus de 30 types de cancer différents, en utilisant des techniques de séquençage de nouvelle génération et d'autres technologies de pointe [323]. Le TCGA a généré une énorme quantité de données génomiques, transcriptomiques et épigénomiques à partir d'échantillons de tumeurs provenant de milliers de patients atteints de cancer. Les données génomiques et le grand nombre d'échantillons présent dans le TCGA offrent une excellente occasion de répondre aux questions associées à l'hétérogénéité tumorale [323]. Il permet aux chercheurs et aux cliniciens en cancérologie d'explorer des données génomiques provenant des tumeurs des patientes afin de découvrir de nouveaux biomarqueurs thérapeutiques et diagnostiques. De plus les chercheurs peuvent effectuer des analyses de données TCGA spécifiques via des outils informatiques tel que UALCAN [322].

UALCAN, un portail Web interactif facile à utiliser pour effectuer des analyses approfondies des données d'expression des gènes dans le cancer. UALCAN fournit un accès à des données de séquençage d'ARN provenant de projets tels que le TCGA. UALCAN est accessible au public et est être extrêmement utile pour accélérer la recherche sur le cancer [322]. UALCAN utilise le TCGA et les données cliniques de 31 types de cancer et permet d'effectuer : 1) l'analyse de l'expression relative d'un ou de plusieurs gènes dans des échantillons tumoraux et normaux, ainsi que dans divers sous-groupes tumoraux en fonction des stades individuels du cancer, du grade de la tumeur, de la race, du poids corporel ou d'autres caractéristiques clinicopathologiques, 2) estimer l'effet du niveau d'expression génique et des caractéristiques clinicopathologiques sur la survie des patientes ; et 3) identifier les gènes les plus surexprimés et les plus sous-exprimés (régulés à la hausse et à la baisse) dans les différents types de cancer. C'est cette dernière fonctionnalité de l'UALCAN que nous avons exploiter dans notre étude. Cette ressource sert de plate-forme pour la validation *in silico* des gènes et pour l'identification de biomarqueurs candidats spécifiques à un sous-groupe tumoral [322-325].

Du fait que 1) les chercheurs du monde entier utilisent les données du TCGA pour comprendre les mécanismes sous-jacents du cancer, identifier de nouveaux gènes et voies de signalisation impliqués dans la maladie, développer de nouveaux outils de diagnostic et de traitement, et [326-328], 2) que le TCGA soit une ressource précieuse pour l'évaluation des marqueurs moléculaires

du cancer du sein ainsi 3) qu'il existe un manque d'informations sur les tissus normaux ou les lésions bénignes du cancer du sein des femmes africaines dans les données du séquençage d'ARN du TCGA, cet outil a suscité notre intérêt.

Face à la longue liste de gènes différentiellement exprimés, le séquençage d'ARN et accessibles sur le portail UALCAN, des outils de profilage et d'analyse sont souvent utilisés pour extraire une signification biologique de ces données. Des packages d'analyse spécifiques au séquençage d'ARN tels que Gene Ontology et KEGGREST sont disponibles [329-330]. Nous nous sommes servis des outils Gene Ontology et KEGGREST pour notre étude. Notre utilisation de l'outil de classification fonctionnelle des gènes et de nos diagrammes de Venn nous a permis de sélectionner un groupe de 9 gènes.

3.3.2 Biomarqueurs thérapeutiques du cancer du sein proposés dans cette thèse

Cette thèse a mise en évidence neuf protéines biomarqueurs. Sept de ces protéines seront détaillées de façon spécifique, suggestive et potentielle dans la discussion. Leurs rôles et leur co-relation actuelle dans le pronostic du cancer du sein seront discutés. Ces protéines ont une longueur d'avance sur les biomarqueurs conventionnels, mais leur application dans des traitements ciblés en est encore à leurs balbutiements. Leurs mécanismes moléculaires s'alignent sur les multiples mutations génétiques observées dans le cancer du sein, ce qui fait de ces protéines potentielles des cibles prometteuses pour les thérapies ciblées [192,200,210]. Elles interagissent et favorisent le microenvironnement tumoral en stimulant aussi bien les divisions cellulaires anormales, les cellules néoplasiques et les cellules stromales que les cellules immunitaires, les cellules endothéliales, les adipocytes, les cellules vasculaires et les fibroblastes [203-205].

3.3.2.1 GPNMB (Glycoprotéine Non- metastatic B Protein) : Une protéine transmembranaire de surface cellulaire

Qu'est-ce que c'est ? Structurellement, la Glycoprotéine Non- metastatic B Protein (GPNMB) également connu sous le nom d'ostéoactivine, a été isolé et découvert pour la première fois dans le mélanome métastatique en 1995[192,193]. En tant que protéine transmembranaire de type I de 572 acides aminés codés par le gène GPNMB situé en 7q15 [192], elle est composée de trois

domaines, dont un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique (Figure 2.3) [192-194].

Fonctionnellement, elle est exprimée dans de multiples tissus comme les tissus cartilagineux et les ostéoblastes ainsi que dans les cellules immunitaires comme les cellules dendritiques et les macrophages jouant des rôles essentiels de différenciation, d'adhérence, de régénération et d'inflammation dans les systèmes immunitaire et nerveux central [195].

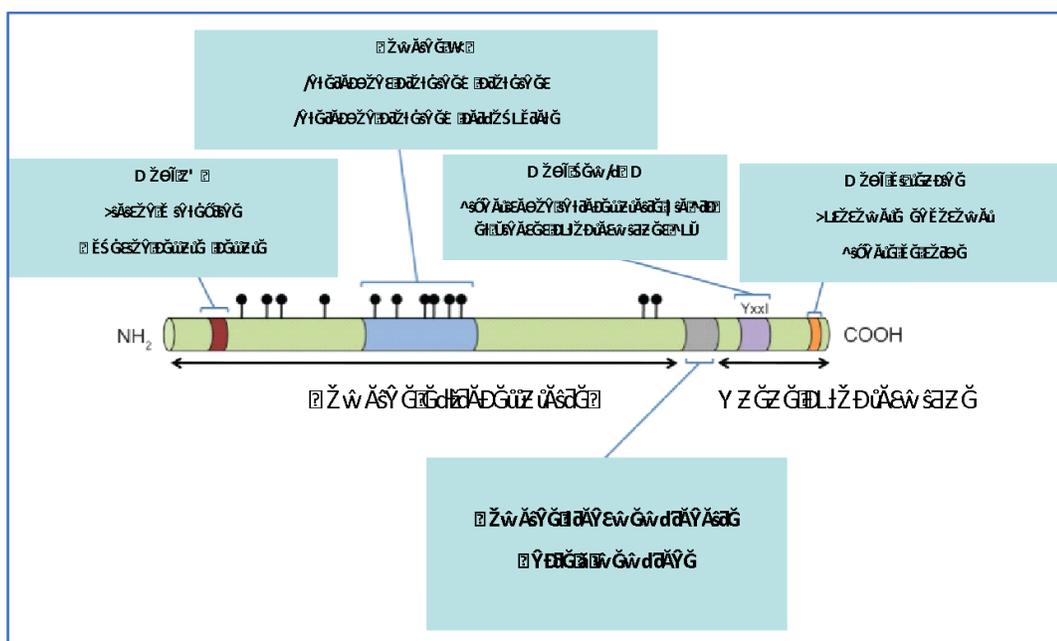


Figure 3.3 : Représentation structurale de GPNMB, Tirée de OncoTargets and therapy,2013.

Maric, Gordana. 2013. *OncoTargets and therapy*. Une représentation schématique de GPNMB indiquant les domaines et les motifs contribuant à la fonction de GPNMB. Notes : Les symboles (cercles pleins) situés au-dessus du domaine extracellulaire du GPNMB représentent les sites de glycosylation. La séquence RGD comprend un domaine de liaison à l'intégrine, où R = Arginine, G = Glycine, D = Acide aspartique. La séquence YxxI constitue un motif hemITAM, où Y = tyrosine, x = tout acide aminé, I = isoleucine. Le motif dileucine est un motif de ciblage lysosomal/endosomal de type D/ExxxLL, où D = acide aspartique, E = acide glutamique, x = tout acide aminé, L = leucine. Abréviations : GPNMB, glycoprotéine b non métastatique ; hemiTAM, motif d'activation d'immunorécepteur à base de tyrosine ; PKD, maladie polykystique des reins ; RGD, liaison d'intégrine.

La surexpression du GPNMB : Un nombre croissant d'études a montré que GPNMB était surexprimé dans plusieurs tissus cancéreux, tels que le cancer du sein [193], le cancer colorectal, le cancer du poumon [194], le cancer de l'estomac, les glioblastomes et le cancer hépatocellulaire [193]. La protéine surexprimée dans ces cancers renforce souvent les caractéristiques agressives des cellules tumorales en jouant un rôle dans les métastases osseuses, la migration, l'angiogenèse et l'invasion [192-195]. L'expression de GPNMB au niveau des gènes et des protéines s'avère être régulée positivement dans le sarcome, tandis que les niveaux d'ARNm et de protéines dans les tissus non tumoraux voisins restent normaux [193]. Une étude récente a soutenu que dans le carcinome à cellules rénales, les knock-out de GPNMB diminuent la migration cellulaire, l'invasion cellulaires et les métastases osseuses [194,196].

La Surexpression de GPNMB et son association avec le cancer du sein :

La GPNMB est surexprimé dans les cancers du sein triple négatif et de type basal, et son expression est un marqueur prédictif de mauvais pronostic au sein de ce sous-type agressif de cancer du sein. Les cancers du sein triple négatif et de type basal sont des sous-types spécifiques de cancer du sein qui partagent des caractéristiques communes telles que l'absence de récepteurs hormonaux ER, PR et HER2 et qui présentent une signature moléculaire similaire à celle des cellules basales de l'épithélium mammaire normal. La GPNMB favorise la croissance, l'invasion osseuse et la métastase du cancer du sein bien que son implication dans l'initiation des tumeurs mammaires reste inconnue. Une étude récente suggère que l'implication de GPNMB dans le cancer du sein passe en partie par l'activation de la voie de signalisation PI3K/AKT. En effet, comme illustré à la Figure 2.4, GPNMB, DANCR, miR-33a-5p, IGF-1 et AXL seront impliqués dans ce processus. DANCR (Differentiation Antagonizing Non-Protein Coding RNA) est un ARN non codant qui agit comme un régulateur de l'expression génique en modulant la transcription ou la stabilité des ARNm cibles. Il a été identifié comme un régulateur clé de la prolifération cellulaire, de la migration, de l'invasion et de la métastase dans plusieurs types de cancer, y compris le cancer du sein. Une surexpression de DANCR est souvent associée à une progression tumorale accrue par activation d'AXL et à un mauvais pronostic. AXL est un récepteur tyrosine kinase de la famille TAM (Tyro3, AXL, Mer) impliqué dans la régulation de la prolifération, la survie, la migration et l'invasion des cellules. Une surexpression d'AXL a été associée à une agressivité tumorale accrue et à un pronostic défavorable dans plusieurs types de cancer, y compris le cancer du sein. Il existe une interaction

entre AXL et la voie de signalisation PI3K dans le contexte du cancer du sein. AXL peut activer la voie PI3K/AKT en amont, soit directement par phosphorylation et activation de PI3K, soit indirectement par le recrutement de protéines adaptatrices qui activent PI3K. IGF1 est une hormone de croissance impliquée dans la régulation de la croissance, de la différenciation et de la survie cellulaire. L'IGF1 a été impliquée dans le développement et la progression de divers cancers, y compris le cancer du sein, en favorisant la survie des cellules tumorales et en stimulant leur croissance et leur invasion. GPNMB et DANCR/miR-33a-5p activent la voie PI3K/AKT en favorisant l'expression d'IGF-1 et d'AX, respectivement.

De plus, GPNMB, en activant AKT, stimule l'activation de la voie Wnt canonique en favorisant l'accumulation de β -caténine et en augmentant ainsi son activité transcriptionnelle dans les cellules cancéreuses du sein de type basal coexprimant Wnt-1 et GPNMB. Ce mécanisme renforcé de signalisation de la voie Wnt peut contribuer à la progression tumorale en favorisant la prolifération et la survie cellulaires. [196]. En effet, La voie Wnt est une voie de signalisation cellulaire importante qui régule divers processus cellulaires, y compris la prolifération, la différenciation et la survie. La β -caténine est une protéine clé dans la voie Wnt. Lorsqu'elle est activée, la β -caténine peut transloquer dans le noyau cellulaire et agir comme un facteur de transcription, régulant l'expression de gènes (cycline E1, cycline D1, Matrix Metallopeptidase 7, CD44) impliqués dans la prolifération cellulaire et d'autres processus. La surexpression de GPNMB est aussi associée à la récurrence tumorale dans le cancer du sein et une interaction entre GPNMB et certains régulateurs de la transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT) comme l'intégrine et la métalloprotéase matricielle [193,196] pourrait être favorable à cette récurrence. En effet, le processus EMT consiste en l'acquisition le phénotype mésenchymateux par des cellules épithéliales et ainsi faciliter leur migration et leur invasion. Maric et al. ont démontré que la GPNMB facilite l'adhésion des cellules du cancer du sein a la fibronectine en formant un complexe avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ présente à la surface des cellules endothéliales, pour activer des voies de signalisation en aval [193,195]. Les cellules du cancer du sein exprimant un niveau élevé de GPNMB à la surface cellulaire présentent une surexpression de gènes de cellules souches cancéreuses et de facteurs de transcription de l'EMT, montrant ainsi une forte tumorigénicité [196]. De plus, la phosphorylation de GPNMB a été montré comme impliquée dans la reprogrammation

de la glycolyse dans le cancer du sein triple négatif et associée à un pronostic plus défavorable chez les patientes atteints cancer du sein triple négatif [197].

Perspective thérapeutique du GPNMB dans le cancer du sein : Le GPNMB a la possibilité de servir de marqueur de surface cellulaire favorisant la prolifération tumorale et par conséquent servir de cible potentielle pour la thérapie ciblée dans le cancer du sein triple négatif. [197]. Des thérapies ciblant les cancers surexprimant GPNMB sont actuellement en cours. Le Glembatumumab vedotin, un conjugué anticorps-médicament qui combine un anticorps monoclonal ciblant spécifiquement le GPNMB présent à la surface des cellules cancéreuses avec l'agent chimiothérapeutique toxique, appelé monométhylauristatine E (MMAE) a été comparé à l'agent chimiothérapeutique capécitabine dans le cancer du sein. Le Glembatumumab vedotin qui n'avait démontré aucun avantage clinique sur la survie sans progression par rapport à la capécitabine dans un essai clinique de phase IIb (NCT1997333) a eu un meilleur résultat sur les cellules du cancer du sein triple négatif exprimant GPNMB [197,199]. Le Glembatumumab vedotin est liée au monométhylauristatine E (MMAE) par l'intermédiaire d'un lien clivable par une enzyme qui la maintient intrinsèquement stable. Il se lie au GPNMB à la surface des cellules et forme un complexe qui se dirige vers le cytoplasme, où la liaison MMAE est interrompue [199]. Le MMAE libre commence alors à réguler le cycle cellulaire en perturbant de manière efficace le cytosquelette. Sa cytotoxicité en a fait un outil thérapeutique efficace contre le cancer du sein triple négatif et pourrait être évaluée sur le cancer agressif de la femme noire.

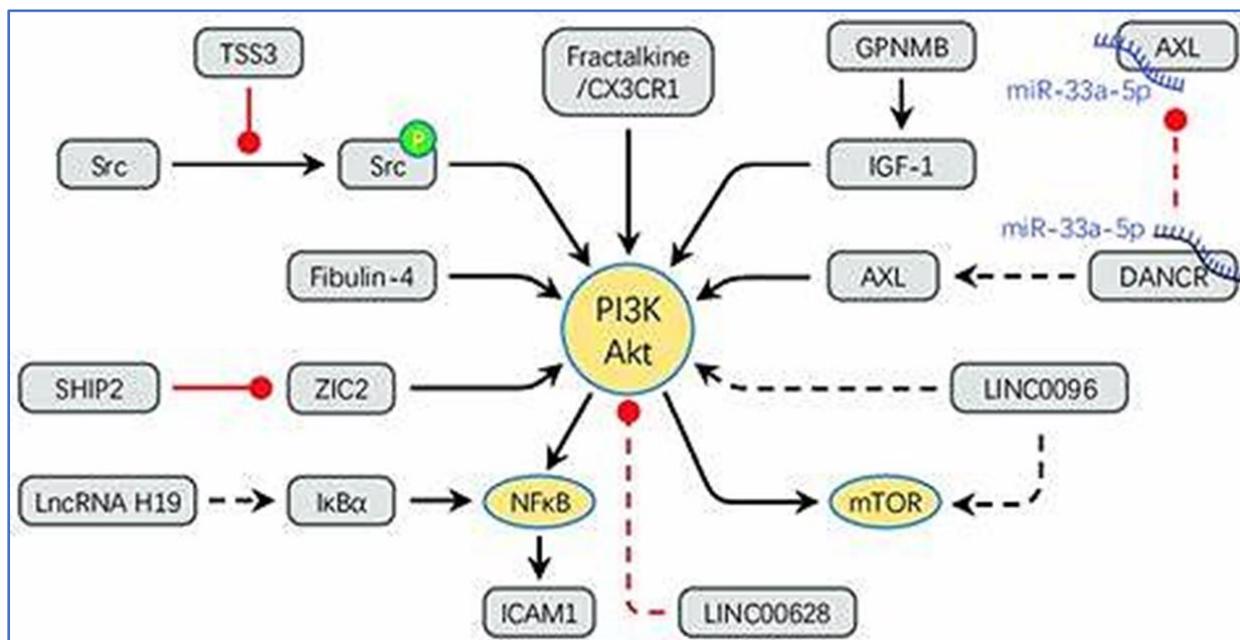


Figure 3.4 : La voie de signalisation PI3K/AKT et GPNMB, Yang, Chaofei. Bone. International journal of molecular sciences. 2021.

La plupart des facteurs activent directement la voie de signalisation PI3K/AKT pour favoriser la migration et l'invasion du système d'exploitation. Par exemple, la surexpression de Fibuline-4, Fractalkine/CX3CR1, ZIC2, LINC0096 et lncRNA H19 favorise l'activation de la voie de signal PI3K/AKT. Pendant ce temps, GPNMB et DANCR/miR-33a-5p activent la voie PI3K/AKT en favorisant l'expression d'IGF-1 et d'AX, respectivement. TSSC3 inhibe la phosphorylation de Src pour activer la voie de signalisation PI3K/AKT. À l'inverse, la surexpression de LINC00628 inhibe la phosphorylation de PI3K et AKT. Les lignes pleines font référence aux molécules protéiques et les lignes pointillées aux ARN non codants.

3.3.2.2 EGR1 (Early Growth Response 1) : un facteur de transcription

Qu'est-ce que c'est ? Structuellement, les protéines de réponse à la croissance précoce (EGR) font référence à une famille régulatrice transcriptionnelle composée de quatre membres, dont EGR1, EGR2, EGR3 et EGR4. La protéine EGR1 codé par le gène EGR1 situé à l'emplacement chromosomique 5q23-31 contient trois doigts de zinc cystéine-Histidine et est impliqué dans divers processus biologiques [200]. La protéine EGR1, comme le montre la Figure 2.5, présente une architecture modulaire avec une région régulatrice (A1, A2 et A4) hautement activée car c'est cette région qui est impliquée dans la régulation de l'activité cellulaire, en particulier dans le contrôle de l'expression des gènes. La région régulatrice hautement activée s'étend à partir de son extrémité N. [acide aminé (aa) 1 à 281] et est suivie d'une région répressive R1 composé d'environ 35 acides aminés (aa 281 à 315). Vient ensuite le domaine de liaison à l'ADN hautement conservé, composé de trois doigts de zinc de type Cys2-His2 (aa338 à 418). Au sein du domaine de liaison à l'ADN se trouve le domaine de localisation nucléaire qui comprend des signaux de localisation nucléaire bipartites (aa315 à 419). Enfin, il y a la région régulatrice de faible activation sur l'extrémité C-terminale (aa420 à 543) [201]. La séquence de réponse sérique, une région spécifique de l'ADN située dans le promoteur du gène EGR1 contient un motif de liaison appelé CARG box. Lorsqu'elle est activée, cette séquence de réponse sérique joue un rôle essentiel dans la régulation de l'expression du gène EGR1 en réponse à divers stimuli, notamment les facteurs de croissance présents dans le sérum. L'expression est régulée par la séquence de liaison EGR1 (également présente au niveau du promoteur) via une boucle de rétroaction négative [202].

Fonctionnellement, EGR1 constitue une partie essentielle des processus physiologiques tels que la différenciation, l'invasion, la prolifération et l'apoptose. Il est activé dans plusieurs types cellulaires via la signalisation MAPK en présence de stimulus tel que les facteurs de croissance, le facteur de nécrose tumorale, l'inflammation et en régulant la transcription de gène cible [203]. Il peut réguler la signalisation dans les deux sens : induire l'apoptose dans les cellules anormales ou inhiber l'apoptose en régulant négativement la transformation cellulaire. EGR1 conduit à l'apoptose en favorisant la répression de l'AKT par PTEN mais EGR1 inhibe également l'apoptose en réduisant l'activité de la caspase-3. EGR1 est un régulateur direct de plusieurs suppresseurs de tumeurs, tels que le facteur de croissance transformant bêta 1 (TGF β 1), la protéine tumorale P53 (p53) et la phosphatase et l'homologue de la tensine (PTEN). EGR1 peut être temporairement activé par des cytokines, des hormones et des agents endommageant l'ADN, et EGR1 lui-même fonctionne comme un régulateur transcriptionnel [204]. D'autre part, EGR1 a été identifié comme un suppresseur de tumeur dans le rhabdomyosarcome, car la surexpression d'EGR1 dans ce cancer empêche la prolifération, la mobilité et la croissance cellulaire [200-203]. Chez les patientes atteintes d'un cancer du poumon non à petites cellules, l'inhibition de l'expression d'EGR1 est directement associée à une faible survie [200-205]. Dans une autre étude, l'inhibition de l'EGR1 a augmenté la prolifération des cellules cancéreuses pulmonaires en supprimant l'expression de la cytokératine 18 (KRT18) [205]. La suppression de l'EGR1 a le potentiel d'induire la prolifération des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse de souris [203] et de prévenir la prolifération du gliome par une régulation négative de l'activité du promoteur CCND1 (Cycline D1) [205]. EGR1 a même été suggéré comme cible potentielle pour le cancer de la prostate [205].

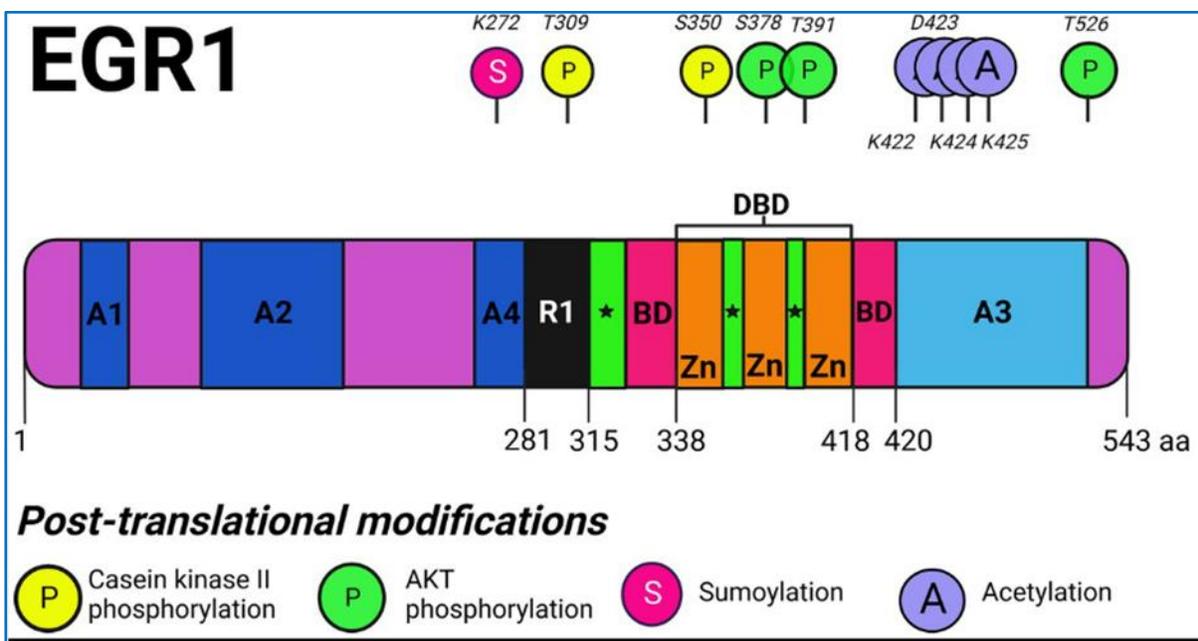


Figure 3.5 : Représentation structurale de EGR1. Caitlin M. Woodson. Tirée de *Frontiers in Micrology* 2022.

Domaines protéiques EGR1 et modifications post-traductionnelles. Les multiples domaines protéiques d'EGR1 sont représentés, notamment son domaine d'activation forte, son domaine d'activation faible, son domaine inhibiteur, son domaine de liaison à l'ADN et son domaine basique, ainsi que ses motifs en doigts de zinc et ses signaux de localisation nucléaire (NLS). EGR1 est phosphorylé par AKT sur S378, T391 et T526 et par la caséine kinase II (CKII) sur T309 et S350. EGR1 est sumoylé sur K272 et acétylé sur K422, D423, K424 et K425.

Signification d'EGR1 dans le cancer du sein. Le gène EGR1 est associé à la pathogenèse de diverses tumeurs, y compris les tumeurs du sein. EGR1 est un marqueur pronostique suggéré dans le cancer du sein car sa régulation négative a été liée à des risques élevés de cancer ER + / PR + / HER2- et donc à de mauvais résultats. En revanche, la régulation positive est suggérée pour arrêter la progression du cycle cellulaire [202]. EGR1 est un gène suppresseur de tumeur dans le cancer du sein pouvant aider à freiner la chimiorésistance. En effet, EGR1 module directement l'expression du promoteur MDR1 dans les cellules MCF7 résistantes au Paclitaxel car une diminution d'EGR1 corrèle avec une diminution de l'expression de MDR1. La diminution de l'expression de MDR1 va faciliter ainsi l'assimilation de la chimiothérapie dans le cancer du sein [203-204]. De plus, EGR1 est également impliqué dans la régulation de la protéine suppresseur de

métastases Nm23-H1 qui est cruciale dans le contrôle des métastases du cancer du sein et responsable de la plupart des décès [206]. L'expression de Nm23-H1 est inhibée dans les tumeurs agressives comme le LE CANCER DU SEIN TRIPLE NÉGATIF et peut être régulée par des facteurs transcriptionnels comme EGR1 qui possède un site de liaison au niveau du promoteur de Nm23-H1. L'EGR1 régulé à la baisse entraîne une perte de Nm23-H1 et par conséquent augmente l'agressivité tumorale dans les cancers du sein [206].

L'expression d'EGR1 varie selon les sous-types de cancer du sein : l'EGR1 est faiblement exprimé dans le cancer de sous type luminal B, tandis qu'il est fortement exprimé dans le cancer de sous type normal like [200]. Le cancer normal-like est un sous-type de cancer présentant des caractéristiques moléculaires similaires à celles des tissus normaux adjacents. Ces cancers ressemblent davantage aux tissus sains en termes de profil d'expression génique et de signature moléculaire. Par conséquent, les niveaux d'expression de l'ARNm d'EGR1 peuvent même différencier les sous-types moléculaires de cancer du sein, mais aucun schéma défini n'est connu pour identifier les stades du cancer. Les analyses statistiques ont indiqué que la surexpression d'EGR1 était positivement liée à une survie plus élevée dans les types de cancer du sein luminaux, mais à de mauvais résultats dans les deux autres types [203]. Le mécanisme moléculaire possible derrière cela est que la surexpression d'EGR1 arrête la progression du cycle cellulaire dans les tissus cancéreux en liant les promoteurs des cyclines D1, D2 et D3 [202]. Malgré les outils de recherches actuelles, l'utilisation d'un traitement ciblant EGR1 en est encore à ses débuts, et l'utilisation de son niveau d'expression comme marqueur pronostique du cancer du sein est un domaine de recherche actif. Il serait alors intéressant d'évaluer son potentiel comme biomarqueurs de cancer du sein agressif de la femme noire.

3.3.2.3 CX30 (Connexin 30) : Une jonction lacunaire B6

Qu'est-ce que c'est ? Structuellement, CX30 encore appelée GJB6 est un membre de la famille des connexines ou des protéines de jonction lacunaire (GJ) contenant 21 membres isomères qui partagent des caractéristiques structurales [207]. Le nom de la connexine est suffixé par son poids moléculaire en daltons, c'est-à-dire que CX30 est une connexine avec un poids molaire de 30 kDas [207]. Il y'a une terminaison amino N-terminale et une terminaison carboxyle C-terminale présentes à l'extrémité du cytoplasme avec quatre hélices transmembranaires hydrophobes (M1-

M4) interconnectées qui englobent deux boucles extracellulaires E1 et E2 et une boucle intracellulaire C (Figure 2.6) [209]. Les boucles extracellulaires sont constituées de séquences d'acides aminés hautement conservées dans des isoformes de connexines formant des hémicanaux oligomères hexamériques (qui peuvent être des homomères ou des hétéromères), en revanche, la queue et la boucle C-terminale sont très variables (Figure 2.6) [208]. Deux hémicanaux de cellules voisines se connectent, formant une jonction intercellulaire à la surface basolatérale (Figure 2.6).

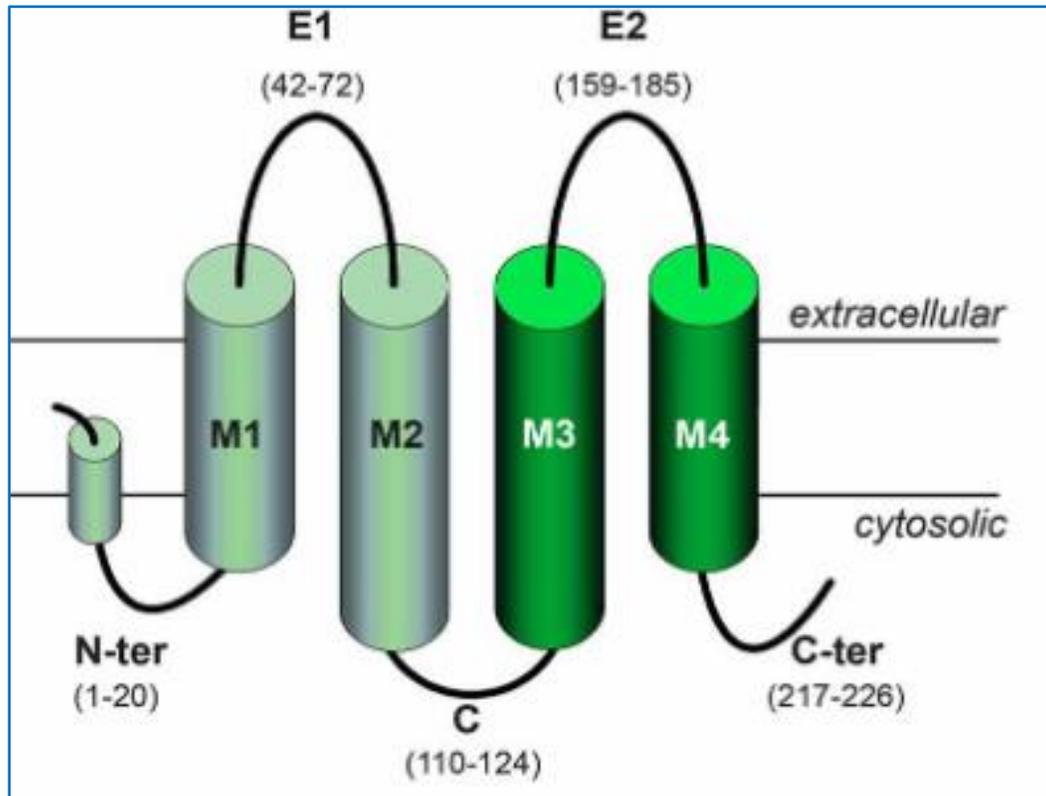


Figure 3.6 : Représentation structurelle de CX30. Del Castillo, Francisco & del Castillo, Ignacio. (2017) *Frontiers in Molecular Neuroscience*.

Tirée de Science Direct Topics 2005 Organisation topologique du monomère Cx26 avec ses différents éléments structurels. Les hélices sont représentées par des cylindres. Les hélices en vert clair tapissent le port hydrophile du canal, tandis que les hélices en vert foncé sont exposées à l'environnement hydrophobe de la bicouche lipidique. Notez la projection dans le cytosol des hélices M2 et M3.

Fonctionnellement, les jonctions lacunaires sont largement impliquées dans le transport direct de petites molécules (ions, médicaments) par communication intercellulaire. Elles permettent un développement approprié, le maintien homéostatique, l'intégration d'activités compartimentales et la différenciation dans les tissus comme la glande mammaire [207-209].

CX30 et son association avec le cancer. Les phénotypes cellulaires caractéristiques des jonctions lacunaires sont interrompus au cours du cancer. Le cycle cellulaire incontrôlé et les divisions cellulaires au cours de la tumeur font que les cellules en division perdent le GJIC (Gap Jonction intercellulaire communication). Une surexpression des connexines est bien établie pour favoriser la transmission de l'AMPc et médier la cascade de signalisation empêchant la progression tumorale [209]. Ils sont à juste titre considérés comme des suppresseurs de tumeur. CX30, ainsi que CX26, sont régulés à la hausse dans les couches épidermiques environnantes des mélanomes, suggérant un rôle lors de la métastase dans les microenvironnements stromaux. Il a été prouvé que CX30 est capable de moduler la chimiorésistance et pourrait d'une part servir de biomarqueur potentiel de progression du cancer et d'autre part servir de cible thérapeutique contre les métastases et la chimiorésistance [208-209].

CX30 et son association dans le cancer du sein. Le maintien d'une homéostasie saine dans les glandes mammaires dépend de communications directes entre les cellules, perturbées par des anomalies dans les protéines de jonction serrée telles que les claudines et les E-cadhérines. [207]. En effet, les interactions cellulaires normales dans les glandes mammaires sont essentielles pour leur équilibre et leur fonctionnement normal. Les protéines de jonction serrée telles que les claudines et les E-cadhérines sont importantes dans ces interactions car elles assurent l'étanchéité et la cohésion entre les cellules épithéliales. Cependant, lorsque ces protéines sont anormalement exprimées, altérées ou absentes, cela peut perturber les interactions cellulaires normales. Ces perturbations peuvent conduire à des dysfonctionnements cellulaires, à une altération de l'homéostasie tissulaire et éventuellement à des pathologies telles que le cancer du sein. L'expression de plusieurs connexines dans la pathogenèse du cancer du sein a été étudiée pour une meilleure compréhension des échanges croisés des cellules tumorales mammaires avec les cellules stromales voisines. CX30 (découverte pour la première fois en tant que connexine mammaire murine) est liée explicitement aux glandes mammaires [209]. L'expression de CX30 a été principalement détectée dans les cellules luminales de souris impliquées dans la lactation et cette

expression était étroitement liées à celle de CX32 car elles se compensent l'une et l'autre. Maintenant, CX30 est mieux caractérisé dans les cellules mammaires épithéliales, myoépithéliales et luminales. Les niveaux de CX30 diminuent pendant la parturition pendant que le CX32 augmente indiquant leur différenciation temporelle. Dans le cancer du sein, leur expression augmente au niveau du ganglion lymphatique métastatique et est positivement associée à l'index mitotique [208].

Des études ont montré une corrélation significative entre l'expression de CX30 et la progression de la maladie. Une forte expression de CX30 est associée à une diminution de la maladie, ce qui suggère que CX30 pourrait être un indicateur de bon pronostic [208]. La forte corrélation entre l'expression de l'ARNm et de la protéine CX30, associée à une réduction significative de la maladie, indique que CX30 pourrait être un marqueur pronostic indépendant. Ce constat souligne la nécessité d'une évaluation approfondie de son potentiel en tant que marqueur pronostic. De plus, il a été démontré que CX30 est un marqueur plus fiable que l'indice mitotique [208]. Le rôle suggéré de CX30 comme marqueur pronostic ou comme cible thérapeutique de cancer du sein pourrait être utilisé dans le cancer du sein de la femme noire.

3.3.2.4 AGR2 (protéine du gradient antérieur 2) : une protéine disulfure isomérase

Qu'est-ce que c'est ? Structuellement AGR2 illustré en Figure 2.7 est une protéine disulfure membre de la famille des isomérase qui est situé sur le chromosome 7p21.3 [210]. Il code 175 acides aminés. La protéine AGR2 du réticulum endoplasmique (ER) est largement présente dans les cellules épithéliales du tissu mammaire [211]. Il existe une séquence signal N-terminale, une séquence de rétention C-terminale et un domaine catalytique de thiorédoxine (motif CXXC) qui confèrent diverses fonctions. L'expression transcriptionnelle d'AGR2 est dépendante des œstrogènes [210].

Fonctionnellement, les protéines du gradient antérieur des mammifères, AGR1, AGR2 et AGR3, appartiennent à une famille de PDI, qui fonctionnent dans le réticulum endoplasmique pour réduire, oxyder ou isomériser les liaisons disulfures [210]. AGR2 joue un rôle important dans la régulation du réticulum endoplasmique (RE), un organe cellulaire crucial pour le repliement des protéines et la régulation du stress cellulaire. Elle est indispensable au repliement des protéines et

à la dégradation assistée par le réticulum endoplasmique des protéines. Lorsque le RE est soumis à un stress, tel qu'une accumulation de protéines non repliées ou mal repliées, il active un mécanisme de réponse appelé UPR (Unfolded Protein Response), conçu pour restaurer l'équilibre protéique. Dans le Réticulum Endoplasmique, AGR2 est l'une des protéines de la famille AGR les plus critiques. [213]. Ces caractéristiques permettent l'implication d'AGR2 dans l'isomérisation et la stabilisation des protéines en tant que chaperons vérifiant l'agrégation des protéines. Ce qui permet à AGR2 de maintenir l'homéostasie des protéines du RE [212]. AGR2 joue un rôle dans la progression du cancer en influençant la prolifération cellulaire, l'invasion, la métastase, la transformation cellulaire [92]. AGR2 favorise la prolifération cellulaire en régulant positivement des voies de signalisation cellulaires impliquées dans la croissance cellulaire, telles que la voie des facteurs de croissance épidermique (EGF) et la voie PI3K/AKT/mTOR. L'AGR2 est crucial pour la transformation cellulaire, la migration et les métastases [92]. AGR2 peut inhiber la fonction de P53 en induisant la dégradation de P53 ou en bloquant son activation, ce qui pourrait compromettre les voies de signalisation de P53 impliquées dans la régulation de la croissance cellulaire, de l'apoptose et de la réponse au stress [92].

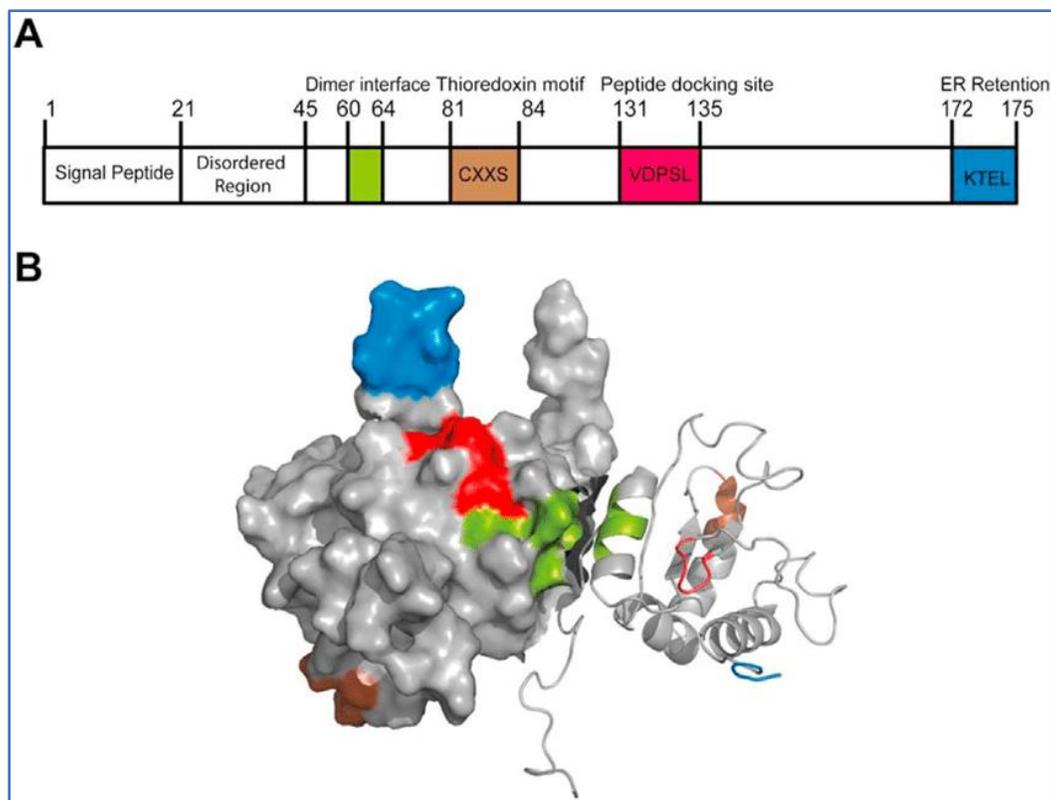


Figure 3.7 : Représentation schématique et structurale d'AGR2. Zhang Ke.2023. *Frontiers in Oncology*

A) De gauche à droite se trouvent le peptide signal, la région désordonnée interne N-terminale, le motif de dimérisation (vert), le motif thiorédoxine (marron), le site d'accueil du peptide (rouge) et le motif de rétention ER (bleu). Les domaines structuraux d'AGR2 déterminent ses diverses fonctions. B) Les motifs fonctionnels sont représentés en couleur dans la forme schématique A et la forme structurelle B. Tirée de Am J Physiol Cell, 2020.

AGR2 et son association avec le cancer. AGR2, l'une des nombreuses cibles du récepteur des œstrogènes (ER) a d'abord été découvert en tant que gène surexprimé dans le cancer du sein ER-positives [211,213] et s'est depuis avéré surexprimé dans les cancers du sein et de nombreux autres adénocarcinomes, y compris les carcinomes ovariens, pulmonaires, colorectal, œsophagien, pancréatique et de la prostate [210–213].

AGR2 est un composant essentiel du RE, et son expression élevée provoque un stress RE avec activation UPR qui peut conduire au développement de tumeurs, mais ses mécanismes sous-jacents doivent être mieux explorés [210]. Une hypothèse avancée pour expliquer ce phénomène est le déséquilibre entre les dimères et les monomères d'AGR2. Ce déséquilibre peut orienter la cellule vers une réaction de réponse pro-inflammatoire, libérant ainsi AGR2 dans le microenvironnement extracellulaire. Cette libération d'AGR2 peut influencer les interactions cellulaires et la réponse immunitaire, contribuant potentiellement à la progression tumorale. [212]. Des études ont montré qu'une expression élevée d'AGR2 peut conduire à un stress dans le RE, déclenchant ainsi l'activation de l'UPR [210-213]. Ce processus peut se produire lorsque la quantité d'AGR2 dépasse les capacités de traitement normales du RE, entraînant une accumulation de protéines non repliées et une activation de l'UPR en réponse à ce stress. L'activation de l'UPR vise à restaurer l'homéostasie protéique en régulant la synthèse protéique, en augmentant la capacité de repliement des protéines et en dégradant les protéines anormales [211]. Cependant, l'activation prolongée ou excessive de l'UPR peut également contribuer à la tumorigenèse en favorisant la survie des cellules cancéreuses et en favorisant leur croissance [212]. Ainsi, bien que l'activation de l'UPR puisse initialement être une réponse adaptative au stress induit par l'expression élevée d'AGR2, elle peut également jouer un rôle dans la progression tumorale en favorisant la survie et la prolifération des cellules cancéreuses.

AGR2 est présent dans les tissus glandulaires et sa surexpression est presque exclusivement limitée aux adénocarcinomes. AGR2 est fortement exprimé dans les tumeurs métastatiques et primaires et les lésions précancéreuses [215]. L'AGR2 surexprimé peut même se transmettre à d'autres régions cellulaires comme les membranes, le cytoplasme ou l'environnement extracellulaire avec des activités de gain de fonction affectant les protéines transformées dans le développement du cancer [211]. Cela peut être attribuable à un état cancéreux. La glycosylation de type O est un processus post-traductionnel dans lequel des résidus de sucre, en particulier des glycanes contenant du saccharose, sont ajoutés à des protéines. Dans le contexte de l'AGR2, cette glycosylation est essentielle pour l'adhésion cellulaire extracellulaire. Lorsque l'AGR2 est sécrété par les cellules épithéliales, elle subit une glycosylation de type O, ce qui signifie que des groupes de saccharose sont ajoutés à certains sites spécifiques de la protéine [214-215]. Cette modification post-traductionnelle confère des propriétés spécifiques à l'AGR2 qui sont cruciales pour son interaction avec d'autres molécules et son fonctionnement dans l'environnement extracellulaire.

En particulier, cette glycosylation peut affecter la structure et la charge électrique de l'AGR2, lui permettant d'interagir de manière sélective avec d'autres protéines, notamment des facteurs de croissance comme le facteur de croissance endothélial vasculaire A (VEGF-A) [214-215]. Ces interactions sont essentielles pour des processus biologiques tels que l'adhésion cellulaire extracellulaire et la signalisation cellulaire, qui sont importants dans le contexte du développement tumoral. Cette interaction favorise la signalisation VEGF/VEGFR2 (récepteur du VEGF) qui va augmenter la croissance vasculaire autour de la tumeur en augmentant les niveaux de VEGF et FGF2 [214]. Le VEGF est un facteur de croissance crucial impliqué dans l'angiogenèse, le processus par lequel de nouveaux vaisseaux sanguins se forment à partir des vaisseaux existants. Le FGF2 (facteur de croissance fibroblastique 2) est un autre facteur de croissance impliqué dans l'angiogenèse et la croissance tumorale. En interagissant avec son récepteur, le VEGFR2, le VEGF stimule la prolifération et la migration des cellules endothéliales, les cellules qui tapissent les parois des vaisseaux sanguins. Cela entraîne la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, un processus essentiel pour la croissance et la progression tumorale, car il fournit à la tumeur les nutriments et l'oxygène nécessaires à sa survie et à sa croissance [214].

AGR2 et son association avec le cancer du sein : AGR2 est surexprimé dans le cancer de sein positif aux œstrogènes et corrèle avec l'initiation du cancer et sa pathogenèse, car AGR2 est

retrouvée dans plus de 50% des cas [210]. L'expression d'AGR2 est inductible par l'estradiol ou le tamoxifène tandis que l'œstrogène affecte son expression dans le cancer du sein (Figure 2.8) [211]. L'AGR2 surexprimé peut réguler les protéines prolifératives telles que c- Myc, E2F1 et la cycline D1 induisant la prolifération des cellules cancéreuses [213]. AGR2 est présent de manière intracellulaire dans les cellules tumorales, médiant la croissance et augmentant l'agressivité tumorale. L'AGR2 est une protéine chaperonne impliquée dans la catalyse du repliement approprié des protéines et dans leur activation. En tant que chaperonne, AGR2 joue un rôle essentiel dans le processus de repliement des protéines, qui est crucial pour leur fonctionnalité et leur stabilité [212]. De plus, AGR2 associé à d'autres facteurs exprimés induit l'expression du facteur de croissance analogue à l'insuline 1 améliorant ainsi de manière extracellulaire la migration, la prolifération et la transition épithéliale- mésenchymateuse dans le cancer, les rendant résistants aux médicaments [212,216]. Les niveaux d'AGR2 varient selon les différents sous-types moléculaires de cancer de sein, mais conduisent généralement à un mauvais pronostic. Il existe de nombreuses études établissant le rôle de l'AGR2 extracellulaire dans la prolifération du cancer du sein. AGR2 échappe également à la sénescence en régulant négativement l'expression du marqueur de sénescence p16 et en inversant les niveaux de p21/p53. La modulation de la voie de signalisation de la rapamycine m(TOR)/AKT par AGR2 est confirmé par le modèle de sénescence induite par la chimiothérapie [216].

Une meilleure compréhension des mécanismes derrière les cascades de signalisation médiées par AGR2, la localisation et le fonctionnement associé permettra de mieux comprendre la corrélation entre leurs changements d'expression, l'homéostasie et les perturbations protéiques [215]. L'implication d'AGR2 dans les métastases tumorales, le caractère invasif et la survie propose qu'AGR2 serait un bon biomarqueur du cancer du sein. Le biomarqueur AGR2 pourrait offrir une cible immuno- thérapeutique putative pour le cancer du sein de la femme en général et particulièrement celui de la femme noire. AGR2 pourrait faciliter le diagnostic et le traitement précoce.

Connective tissue growth factor, and Nephroblastoma overexpressed gene. C'est une protéine sécrétoire de 38 kDas, riche en cystéine, située dans la matrice extracellulaire. Le gène CTGF est positionné au locus 6q23.1, comprenant 5 exons et 4 introns. Le premier exon code pour un peptide signal et quatre modules ou domaines protéiques conservés. Les quatre domaines illustrés par la Figure 2.9 comprennent le domaine de liaison au facteur de croissance analogue à l'insuline (1), le domaine von Willebrand de type C ou VWC (2), le domaine thrombospondine-1 (3) et le domaine Cysteine (4) [218]. Les domaines 1 et 2 sont situés dans la portion N-terminal tandis que les domaines 3 et 4 se trouvent dans la portion C-terminal. L'expression du CTGF est régulée par la transcription et déclenchée même par des déclencheurs externes mineurs comme la transformation précoce de la croissance au cours du cancer. Il a été identifié pour la première fois dans les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine en 1991[219].

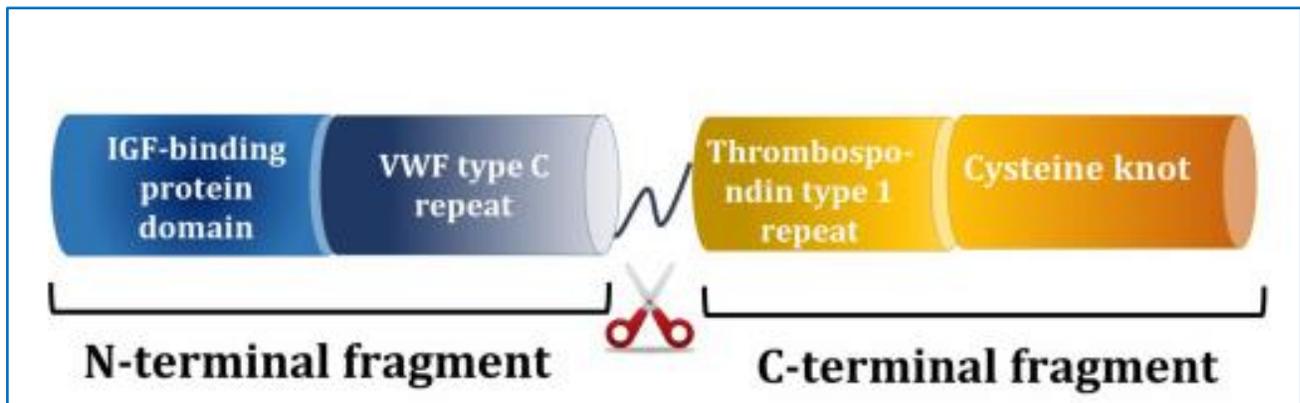


Figure 3.9 : Représentation structurale de CTGF. Yasaman_Ramazani 2018.

Basics to clinics. CCN2 est composé de quatre régions conservées : un domaine protéique de liaison au facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF), une répétition du facteur de von Willebrand de type C, une répétition de la thrombospondine de type 1 et un nœud de cystéine.

Fonctionnellement : ses rôles moléculaires distinctifs comprennent la migration, l'angiogenèse, la prolifération, l'adhésion, la synthèse de la matrice extracellulaire et la cicatrisation des plaies (Figure 2.10) [217-219]. Elle effectue également des processus biologiques complexes d'ostéogenèse et de chondrogenèse [9]. En tant que régulateur multifonctionnel, en raison de sa conformation modulaire le CTGF interagit avec divers ligands et récepteurs [219]. Ses domaines peuvent agir de manière indépendante ou interdépendante, modulant les activités cellulaires

susmentionnées qui peuvent même être influencées par des facteurs de croissance régulant les résultats biologiques de la cellule cible [217-219].

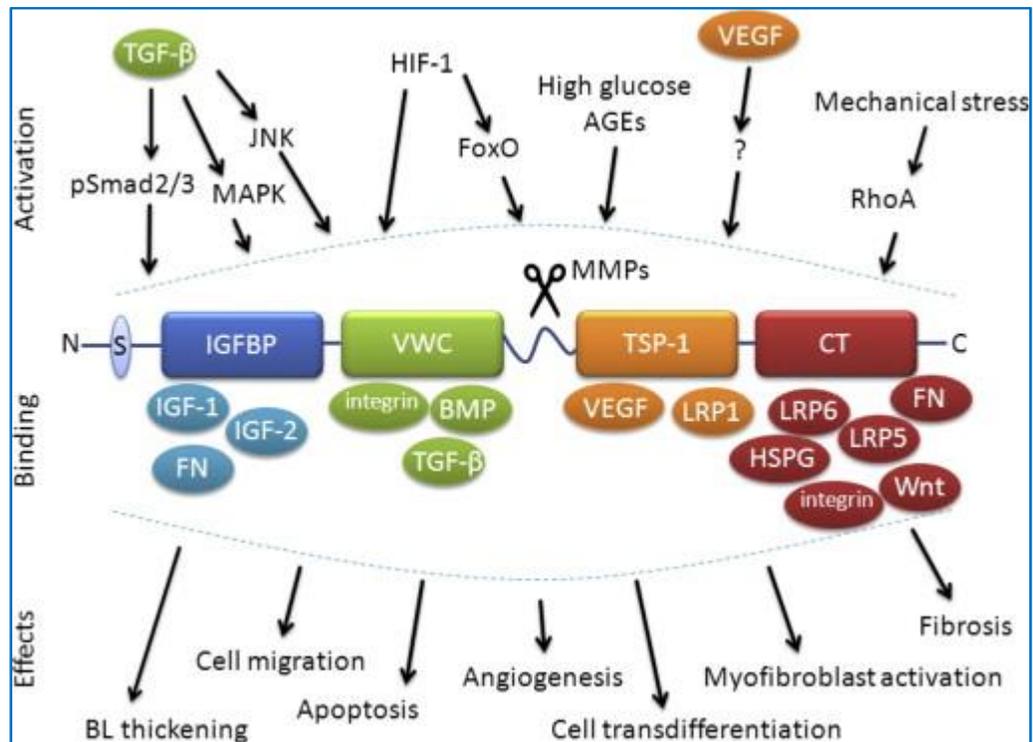


Figure 3.10 : Rôles moléculaires de CTGF : activation, liaison et effets cellulaires, Ingeborg Klaassen, 2015.

The role of CTGF in diabetic retinopathy, Les domaines sont liés par des régions charnières, sensibles au clivage de la protéase par les métalloprotéinases matricielles (MMP). Le CTGF est activé par de multiples facteurs de croissance et stimuli environnementaux (activation). Elle a de nombreux partenaires de liaison (binding) et module un large éventail de fonctions biologiques (effects). BMP, protéine morphogénétique osseuse ; C, C-terminal ; IGF, facteur de croissance analogue à l'insuline ; FN, fibronectine ; FoxO, facteurs de transcription O à tête de fourche ; HIF-1, facteur 1 induit par l'hypoxie ; HSPG, protéoglycane sulfate d'héparane ; JNK, kinase N-terminale c-Jun ; LRP, protéine liée au récepteur des lipoprotéines ; MAPK, protéine kinase activée par les mitogènes ; N, N-terminal ; RhoA, famille des gènes homologues de Ras, membre A ; TGF-β, transformateur du facteur de croissance β ; VEGF, facteur de croissance de l'endothélium vasculaire.

CTGF et son association avec le cancer. Le CTGF se lie à différentes tumeurs et se présente comme un oncogène ou comme un gène suppresseur de tumeur. L'expression aberrante du CTGF

dérégule la différenciation des myofibroblastes et l'angiogenèse et est connue pour faciliter la prolifération des cellules cancéreuses. Une trentaine de types de cancers désormais liés à l'expression aberrante du CTGF démontre que le CTGF peut avoir des fonctionnalités et des rôles opposés en fonction du tissu : rôle d'oncogène dans le cancer du sein ou de la prostate, rôle de suppresseur de tumeur dans le cancer du foie, voire les deux [217]. La corrélation du CTGF avec la croissance tumorale dépend du sous-type de cancer et de son stade évolutif.

Le rôle du CTGF dans différentes tumeurs est régi par la liaison de la protéine avec ses domaines distincts. En effet, la liaison entre l'intégrine $\alpha\beta3$ et le module CT favorise l'angiogenèse, tandis que le domaine TSP1 diminue l'activité angiogénique influencée par le facteur de croissance endothélial vasculaire VEGF [220].

CTGF et son association avec le cancer du sein. La surexpression du CTGF est reconnue pour favoriser la glycolyse aérobie dans les cas de cancer du sein de type triple négatif associant le résultat de son rôle d'oncogène à un mauvais pronostic [8]. Cette protéine favorise l'invasion, l'adhésion, l'absorption de glucose, la production de lactate et d'ATP et la migration des cellules du cancer du sein triple négatif qui conduisent à la tumorigenèse et à la prolifération du cancer [217-219]. Lorsque des niveaux élevés de CTGF sont présents, cette protéine interagit avec la protéine TGF- β par le biais du module VWC. Cette protéine réagit aussi avec l'intégrine $\alpha\beta3$ via le module CT, initiant le processus d'EMT et l'angiogenèse qui conduisent à la progression du cancer du sein [221]. Le caractère invasif et les capacités métastatiques de la progression du cancer du sein sont favorisés par la modulation de l'intégrine $\alpha\beta3$ des cellules endothéliales [221]. L'intégrine $\alpha\beta3$ est une protéine de la classe de récepteurs membranaires impliquée dans l'adhésion cellulaire et la communication avec le microenvironnement et associée à la progression tumorale dans le cancer.

Des études récentes ont révélé que l'activation de FAK/Src/NF- κ B p65 par le CTGF, suite à son interaction avec l'intégrine $\alpha\beta3$, entraîne une augmentation de l'expression transcriptionnelle de Glut3. [222]. Cette cascade de signalisation élève la production de protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire. L'abaissement/la neutralisation du CTGF supprime la tumorigenèse en diminuant les phénotypes glycolytiques dirigés par Glut3 [222]. Cela fait du CTGF un agent thérapeutique probable pour le cancer du sein triple négatif. Le CTGF interfère

avec la chimiothérapie en conférant une résistance aux médicaments dans le cancer du sein triple négatif par le biais de processus de dommages et de réparation de l'ADN, de dérégulation apoptotique, d'épigénétique ou d'efflux de médicaments [218].

Puisque la régulation négative du CTGF améliore le pronostic du cancer du sein triple négatif car son inhibition réduit considérablement les métastases osseuses et l'angiogenèse dans le cancer du sein, le CTGF serait d'une cible potentielle pour le traitement de ce type de cancer [217]. Les microARN (miARN) sont de petites molécules régulatrices qui ont été explorées pour expliquer la survenue de divers types de cancer. Leur anomalie peut provoquer une récurrence du cancer et une prolifération métastatique [218]. La diminution du miR-383-5p, induite par une augmentation de CTGF dans les cellules cancéreuses, suggère que ce dernier pourrait inhiber la survie cellulaire en réduisant la viabilité cellulaire, les métastases, la prolifération et le caractère invasif des cellules cancéreuses [217-221]. Récemment, des chercheurs ont décrit un site de liaison entre le CTGF et le miR-383-5p en étudiant les effets thérapeutiques d'un flavonoïde chinois nommé liquiritigénine, [222]. La liquiritigénine possède des effets anti-tumoraux, antioxydants et anti-inflammatoires et a montré une répression efficace de l'invasion et de la migration dans les cellules du cancer du sein triple négatif régulées par miR-383-5p. Fait intéressant, le médicament inhibe l'expression du CTGF en régulant à la hausse l'expression de miR-383-5p, affectant considérablement les capacités prolifératives, invasives et métastatiques des cellules cancéreuses en favorisant leur apoptose [223].

3.3.2.6 CEACAM6 (molécule d'adhésion cellulaire CEA 6)

Qu'est-ce que c'est ? Structurellement la molécule d'adhésion cellulaire liée à l'antigène carcinoembryonnaire 6 (CEACAM6) est un membre de la famille CEA des protéines d'adhésion cellulaire qui appartiennent à la superfamille des immunoglobulines (Figure 2.11). La molécule d'adhésion cellulaire liée à l'antigène carcinoembryonnaire 6 est un antigène à réaction croisée non spécifique, également connu sous le nom de NCA et CD66c [224]. Le gène CEACAM6 code pour la glycoprotéine de surface cellulaire ancrée au glycosyle phosphatidylinositol. Le gène est présent parmi les gènes d'adhésion cellulaire sur le chromosome 19 au locus 19q13.2 [225]. Le gène code pour une protéine de 344 acides aminés pesant 37kDas [9]. La protéine transmembranaire se trouve

principalement sur la membrane plasmique des cellules épithéliales et la surface des cellules myéloïdes [225].

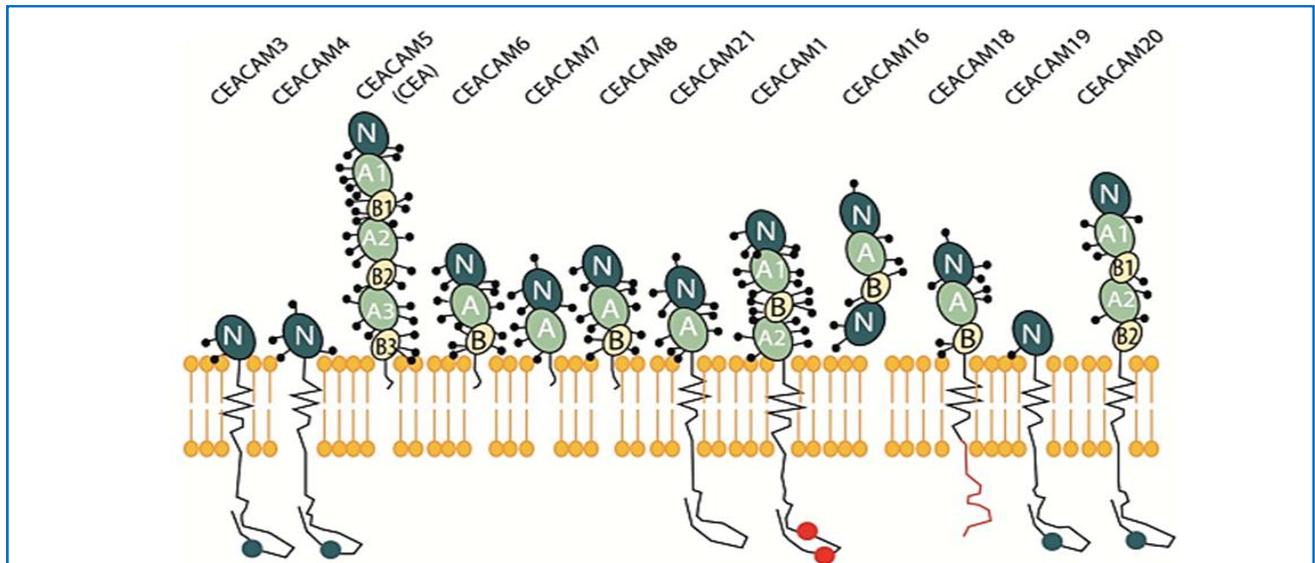


Figure 3.11 : La superfamille des gènes CEACAM. Beauchemin, Nicole. 2013. *Cancer metastasis reviews*.

Les douze membres de la famille CEA, appartenant au sous-groupe CEACAM, sont représentés ici. Les protéines CEACAM ont généralement un domaine variable identifié comme le domaine N (sauf CEACAM16 avec deux domaines N), mais elles diffèrent par le nombre de domaines constants identifiés comme A ou B.

Sur le plan fonctionnel, la protéine joue un rôle dans l'adhésion, la reconnaissance, la réponse, la croissance et la différenciation cellulaire et est connue comme marqueur sérique de cancer [9]. [224]. La glycoprotéine CEACAM6 interagit avec d'autres molécules CEACAM (CEACAM5 & CEACAM8) afin de jouer un rôle dans l'adhésion cellulaire de manière indépendante du calcium et de la fibronectine [226]. CEACAM6 présente une liaison homotypique avec d'autres membres de la famille CEA tandis qu'une liaison hétérotypique avec des récepteurs d'intégrine [225]. Il s'agit d'un oncogène suggéré favorisant la progression du cancer, les métastases, la migration, l'invasion et l'adhésion à l'endothélium. CEACAM6 coexprimé avec CEACAM1 & 5 dans plusieurs tumeurs (poumon, côlon, ovaire, endométrial, sein et cervical) pourrait servir comme marqueur pronostique et cibles thérapeutiques prospectives [224-226].

CEACAM6 et son association avec le cancer. CEACAM6 s'exprime dans les cellules mammaires, le pancréas, les cellules myéloïdes de la moelle osseuse et de la rate et l'épithélium pulmonaire. Pourtant, il ne s'exprime pas comme les autres membres du CEA dans l'intestin grêle [227]. Le CEA/CEACAM6 ancré au GPI surexprimé influence la différenciation adipogénique, myogénique, neurogène et colique, limitant l'apoptose du côlon et du pancréas, déclenchant ainsi des effets favorisant la tumeur [227]. Il est également connu pour affecter la polarisation cellulaire, augmenter le potentiel métastatique dans le foie, la thyroïde et l'estomac, la chimiorésistance contre la pharmacothérapie et interférer avec la stabilité des tissus [225-227]. Il commence par des lésions cancéreuses précurseurs dans les cancers pancréatiques et colorectaux.

CEACAM6 et son association avec le cancer du sein. Son expression augmente dans les cellules cancéreuses du sein par rapport au tissu mammaire normal [227]. La surexpression de cette protéine se produit nettement dans les cellules cancéreuses ER-. Il favorise la prolifération cellulaire, l'invasion et la métastase dans les conditions tumorales en activant la voie EMT et joue le rôle d'indicateur prédictif de la progression du cancer du sein similaire aux lésions précurseurs [224]. Ces écarts par rapport aux mécanismes standards contribuent à transformer les cellules épithéliales en cellules malignes, marquant l'initiation des malignités à médiation épithéliale. Le taux d'expression de CEACAM6 le plus élevé (~ 70%) est retrouvé dans le sous-type de cancer du sein HER2+ alors que son taux le plus bas (~ 20%) est dans le cancer du sein triple négatif indiquant le rôle de HER2 dans sa surexpression [9]. L'expression de CEACAM6 en outre favorise les métastases osseuses et l'interaction entre les cascades de signalisation TGF et HER2 [228,225].

Plusieurs études rétrospectives affirment que la surexpression de CEACAM6 provoque une résistance endocrine et conduit à un potentiel invasif favorisant la migration des tumeurs [224-228]. L'inversion de la surexpression de CEACAM6 par le knock out restaure la sensibilité endocrinienne [228]. CEACAM6 hautement exprimée restructure la matrice extracellulaire (ECM), favorisant l'invasion tumorale en activant le microenvironnement tumoral. La signalisation complexe de restructuration implique ici l'élévation du SRC qui va entraîner une augmentation de la libération d'IGF-1 et activer la voie PI3K/AKT ce qui conduit à l'augmentation de MMP2, la perturbation de l'ECM et déclenche ainsi la malignité (Figure 2.12) [229]. La protéine SRC ou protéine tyrosine kinase SRC, est une protéine kinase non réceptrice qui agit comme un

régulateur clé de plusieurs processus cellulaires, y compris la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire.

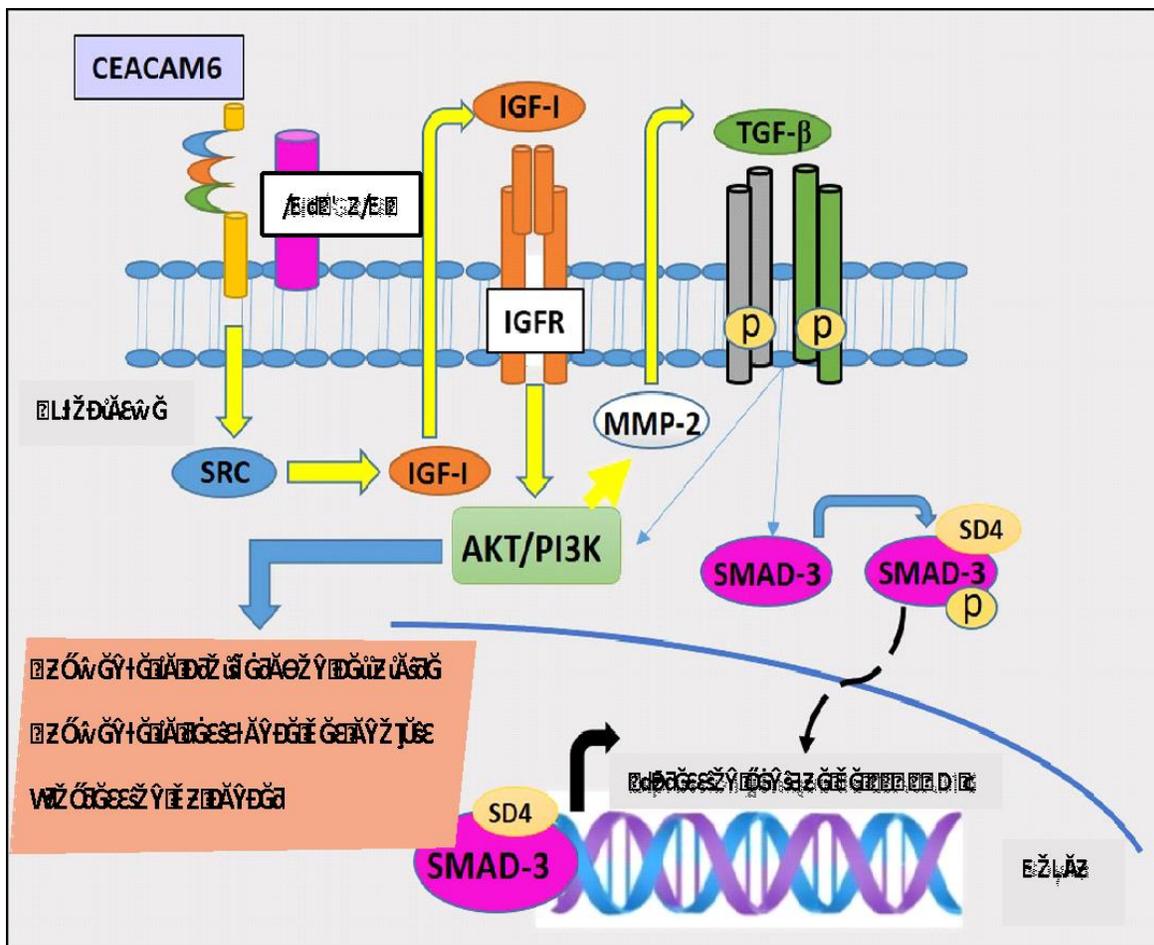


Figure 3.12 : CEACAM 6 dans le cancer Tirée de Cancer Science 2017, Zang, Mingde. 2017.Scientific Reports.

CEACAM6 déclenche l'activation de Src, conduisant à l'activation du facteur de croissance IGF-1R. Par conséquent, la voie PI3K/AKT est activée, favorisant la stimulation paracrine de l'IGF-I. L'expression élevée de l'IGF-I active la métalloprotéinase matricielle 2 (MMP-2), qui modifie la MEC et favorise la prolifération du cancer.

3.3.2.7 C- Myb (Cellular myeloblastosis viral oncogene cellular homolog) : Un facteur de transcription

Qu'est-ce que c'est ? Structurellement le gène de c- myb code pour un facteur de transcription proto-oncogène comprenant trois domaines de liaison à l'ADN hélice-tour-hélice. La protéine comprend 640 acides aminés et pèse environ 72,3 kDas [230]. Les trois domaines de c-Myb sont : le domaine N-terminal de liaison à l'ADN, caractérisé par la présence de trois répétitions en tandem. Ce domaine est responsable de l'interaction avec l'ADN, ce qui permet à la protéine d'exercer son rôle de régulation de la transcription en se liant à des séquences spécifiques d'ADN. Le domaine d'activation transcriptionnelle (TAD) situé dans la partie centrale de la protéine [230-231]. Ce domaine est impliqué dans l'activation de la transcription des gènes cibles en recrutant d'autres protéines et coactivateurs nécessaires à ce processus. Enfin, il y a le domaine C-terminal transcriptionnellement répressif et conservé, qui comprend une zone acide et une répétition leucine-zipper. Ce domaine agit généralement comme un régulateur négatif de la transcription en interférant avec l'activité des domaines activateurs ou en recrutant des co-répresseurs pour supprimer l'expression des gènes cibles [230-231]. Dans les cellules, c-Myb est exprimé dans le noyau cellulaire où il exerce ses fonctions de régulation génique. Il peut également être retenu dans le nucléoplasme ou même dans le cytosol. Cette localisation subcellulaire varie en fonction du contexte et des signaux environnementaux, et peut influencer les fonctions biologiques de c-Myb.

Fonctionnellement, la protéine c- Myb est un régulateur transcriptionnel jouant un rôle crucial dans la différenciation et la prolifération des cellules hématopoïétiques progénitrices, des cellules souches et des cellules épithéliales et médie la signalisation ESR [231]. Elle joue un rôle crucial dans la duplication cellulaire en modulant l'activité de Cdk (kinase dépendante de la cycline) [232]. C- Myb module son auto-expression en s'engageant dans des boucles régulatrices de Cdks et de cyclines impliquées dans les phases du cycle cellulaire. Tous les membres de la famille MYB reconnaissent et se lient à la même séquence consensus d'ADN [PyAAC(G/T) G] pour activer l'expression génique. Avec le développement de technologies génomiques plus avancées,

différents groupes ont tenté d'identifier les gènes cibles de MYB au niveau mondial.

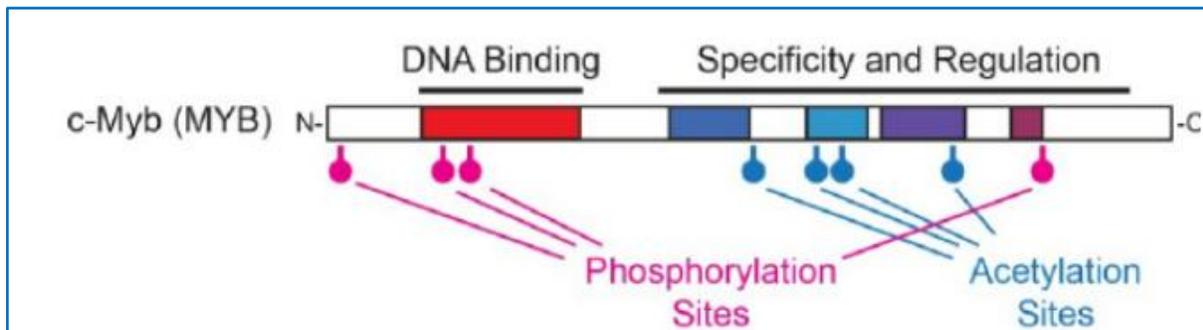


Figure 3.13 : Représentation structurale de c-Myb. George, Olivia (2014). The Cell Cycle and Oncogenesis. Cancers. 6. 2049-71. 10.3390/cancers6042049.

Les sites de phosphorylation et d'acétylation de c-Myb sont indiqués.

Myb et son association avec le cancer. Comme illustrée par la Figure 2.14, les facteurs de transcription MYB jouent un rôle crucial dans la régulation de la croissance, de la prolifération, de l'invasion et des métastases dans divers types de cancer. MYB et MYBL2 favorisent la prolifération cellulaire en induisant l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire et en soutenant les cascades de signalisation d'activation responsables de la prolifération des cellules tumorales au niveau des sites primaires et métastatiques [234]. Les facteurs de transcription MYB favorisent également l'invasion et les métastases des cellules cancéreuses en augmentant l'expression de protéines impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire (MMP9, Cathepsine D), l'acquisition du phénotype migratoire (DDR2, signalisation Wnt/ β -caténine, Smad2/3 SNAI1, TWIST et ANGPT2) et probablement une résistance à l'anoikis grâce à une régulation positive des gènes associés à la survie (Bcl-2, MCL-1, Bcl-xL, Survivin et Clusterin) [232].

Myb et son association avec le cancer du sein. Plus de 70 % des cancers du sein humains sont positifs aux récepteurs d'œstrogènes (ER+) et expriment MYB [230]. En se liant à plus de 10 000 promoteurs dans les cellules cancéreuses du sein, MYB est un activateur clé des gènes impliqués dans la progression et la métastase du cancer, tels que la cyclooxygénase-2 (COX-2), MYC, JUN, BCL2, BCLXL, KLF4, NANOG et CXCR4 [235]. Certaines études ont rapporté que l'inhibition de l'expression de MYB réduit la prolifération des lignées cellulaires de cancer du sein ER+, mais

celle des lignées ER⁻ suggérant un rôle saillant du facteur de transcription MYB dans la prolifération et le développement des tumeurs mammaires[230,233]. De plus, l'expression de MYB dans le cancer du sein ER⁺ est dépendante des œstrogènes, puisque l'on a observé une surexpression de MYB 24 heures après la stimulation des cellules cancéreuses par le bêta-estradiol, suggérant une forte corrélation entre l'expression du proto-oncogène et le statut ER dans le cancer du sein. Des lors, MYB pourrait être une cible thérapeutique dans le cancer du sein ER⁺ et les inhibiteurs de CDK9 pourraient être utilisés pour cibler indirectement MYB dans ce cancer [232]. En effet, l'inhibition de CDK9 entraîne la mort apoptotique des lignées cellulaires de cancer du sein, entrave la prolifération cellulaire et la progression du cycle cellulaire, induisant un arrêt aux phases G1/S et G2/M du cycle cellulaire. De plus, cela a entraîné la régulation à la baisse des gènes cibles de MYB impliqués dans la progression du cycle cellulaire tels que CCNB1 et CCNE1. un autre rôle de MYB dans le cancer du sein est son implication dans l'EMT et la résistance aux médicaments [236]. Il a été démontré que la sensibilité des lignées cellulaires de cancer du sein à la thérapie au tamoxifène augmente après l'inhibition de l'expression de MYB [230]. La transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT) est un mécanisme par lequel les cellules cancéreuses acquièrent une résistance aux thérapies ciblées et les micro-ARN-200 ont été impliqués dans ce processus. Suite à une surexpression de miARN-200 dans des cellules résistantes aux médicaments, les niveaux d'expression de MYB ont diminué, indiquant qu'il s'agit d'une cible des miARN-200s [232]. De plus, les marqueurs d'EMT telle que la vimentine, ZEB1 et ZEB2 étaient régulés à la baisse après un Knock out de MYB, soutenant davantage l'hypothèse selon laquelle MYB est impliquée dans l'EMT et la résistance aux médicaments dans le cancer du sein.

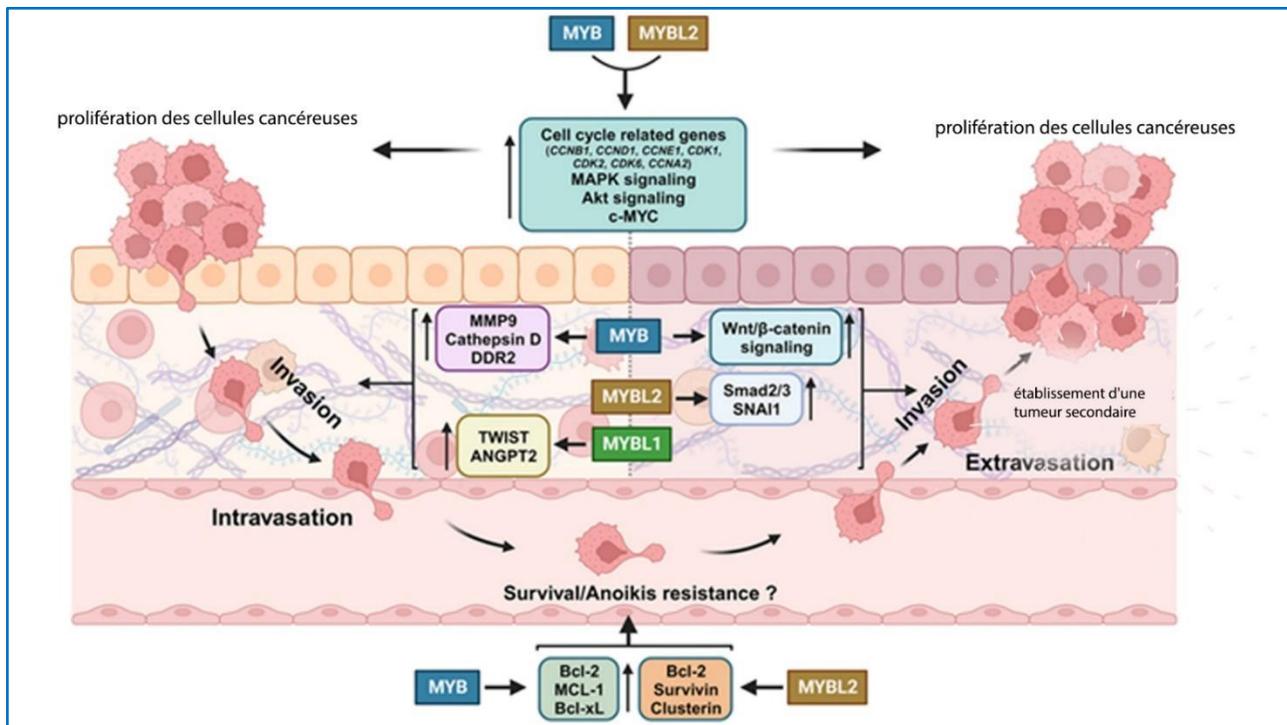


Figure 3.14 : C-MYB dans le cancer, Anand, Shashi (2023). *Cancer and Metastasis Reviews*.

MYB et MYBL2 favorisent la prolifération cellulaire en induisant l'expression de gènes liés au cycle cellulaire, c-MYC, et en soutenant les cascades de signalisation d'activation responsables de la prolifération des cellules tumorales sur les sites primaires et métastatiques. Les facteurs de transcription MYB favorisent également l'invasion et la métastase des cellules cancéreuses en augmentant l'expression des protéines impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire (MMP9, Cathepsine D), l'acquisition du phénotype migratoire (DDR2, signalisation Wnt/β-caténine, Smad2/3 SNAI1, TWIST et ANGPT2) et probablement la résistance à l'anoikis par la régulation positive des gènes associés à la survie (Bcl-2, MCL-1, Bcl-xL, Survivin et Clusterin)

L'utilisation de ces facteurs comme cibles dans les thérapies du cancer du sein n'est pas encore validée, mais leurs mécanismes moléculaires sont en cours d'évaluation, en concevant cliniquement des cibles alternatives comme le ciblage des gènes et des protéines sur lesquels ils agissent. Les sept protéines caractérisées discutées ci-dessus en tant que biomarqueurs potentiels de cancer du sein sont résumées ici dans le tableau 3.1.

PROTÉINE	LIEU D'EXPRESSION	FONCTIONNEMENT EN CONDITION NORMALE	CO-RELATION AVEC LE CANCER DU SEIN
GPNMB (Glycoprotéine protéine B non métastatique)	Transmembranaire exprimée dans les cellules épithéliales mammaires [193].	Différenciation, adhésion, régénération et inflammation du système immunitaire et du système nerveux central [192].	La surexpression favorise l'invasion osseuse, les métastases à distance, la reprogrammation glycolytique et la prolifération par dialogue avec l'EMT, l'intégrine et la MMP [195].
EGR1 (Réponse de croissance précoce 1)	Le facteur de transcription s'exprime dans l'endothélium et de nombreux tissus [200-205].	La signalisation MAPK impliquant la différenciation, induisant et neutralisant l'apoptose, la prolifération et l'invasion [201].	La régulation à la baisse ne peut pas arrêter la progression du cycle cellulaire et est donc un gène suppresseur de tumeur limitant la résistance endocrinienne [210].
CX30 (Connexine 30)	Membranes cellulaires formant des jonctions lacunaires au niveau des cellules mammaires épithéliales myoépithéliales et luminales [208].	Communication intercellulaire (GJIC) et transport de petites molécules [207].	Interaction avec les cellules stromales voisines, augmente l'indice mitotique et l'agressivité tumorale [209].
AGR2 (protéine du gradient antérieur 2)	ER dans les cellules épithéliales principalement des organes dérivés de l'endoderme comme le tissu mammaire [211-212].	L'expression intracellulaire dans ER médie le trafic de protéines approprié [210].	La sécrétion extracellulaire est corrélée aux métastases cancéreuses, à la prolifération et à l'angiogenèse [213].
CTGF (facteur de croissance du tissu conjonctif)	Protéine de matrice extracellulaire sécrétoire [220].	Rôles biologiques complexes comme l'ostéogenèse, l'angiogenèse, la chondrogenèse [217].	La surexpression favorise la prolifération cellulaire, l'angiogenèse et le métabolisme dans le cancer du sein triple négatif [223].

CEACAM6 (molécule d'adhésion cellulaire liée à l'antigène carcinoembryonnaire 6)	Surface cellulaire et espace extracellulaire des cellules épithéliales [225].	Favorise l'adhésion cellulaire, l'homéostasie, l'embryogenèse et les réponses immunitaires [224].	La surexpression provoque une invasion, des métastases, une prolifération incontrôlée, une résistance à l'anoïkis, une migration et une progression du BrC en activant le processus EMT [226].
c- Myb (Cellulaire	Noyau, nucléoplasme et cytosol [232].	Facteur de transcription de liaison à l'ADN impliqué dans la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques, des cellules souches et des cellules épithéliales [230].	La surexpression provoque une régulation aberrante des gènes de progression du cancer comme BRCA1 et p53. [234].

Tableau 3-1: Table résumant les sept protéines discutées dans l'article avec leur niveau d'expression, leur fonctionnement en condition normale et pathologique dans le cancer du sein

Comme GPNMB, EGR1, GJB6, AGR2, CTGF, CEACAM6, MYB et PLIN1, sont des gènes redondants dans tous les groupes de traitement, nous nous sommes concentrés sur eux et avons exploré leur expression en réponse au traitement chimio thérapeutique dans le carcinome mammaire invasif chez les femmes noires.

La chimiothérapie administrée en néoadjuvant est largement utilisée dans le traitement de nombreux types de cancers et facilite la compréhension de la résistance médicamenteuse [331]. En effet, avec une chimiothérapie en néoadjuvant, on peut évaluer la réponse tumorale directement sur le tissu tumoral, on peut adapter le traitement si la patiente ne répond pas bien à celui qui est administré. En observant la réponse tumorale à la chimiothérapie néoadjuvante, on peut identifier les mécanismes par lesquels les cellules cancéreuses deviennent résistantes aux médicaments. Cela peut conduire à de nouvelles stratégies pour surmonter cette résistance. C'est ce mode d'administration chimio thérapeutique que nous avons exploité dans notre étude car elle permet de comparer la réponse thérapeutique avant et après chimiothérapie. La doxorubicine est un agent chimio thérapeutique efficace utilisé dans le traitement de plusieurs types de cancer, y compris le

cancer du sein [332]. Pour traiter le cancer du sein agressif chez les femmes noires, des thérapies combinées à base de doxorubicine telles que FAC, AC et NVB peuvent être recommandées et ont été incluses dans notre étude.

Nous avons pu ainsi constater que la chimiothérapie FAC entraîne une surpression significative de PLIN1 chez les patientes ayant reçu une chimiothérapie (post-chimiothérapie) par rapport aux patientes témoins. L'augmentation significative de PLIN1 après le traitement FAC dans le cancer du sein chez les femmes noires suggère que PLIN1 pourrait être une cible thérapeutique de FAC et pourrait servir de marqueur pronostique pour la maladie. Zhou et al. ont montré que PLIN1 inhibe la prolifération, la migration et l'invasion des cellules du cancer du sein. Des études récentes ont également montré que l'expression aberrante des gènes de la famille PLIN pourrait servir de biomarqueur pronostique potentiel dans le cancer du sein des femmes caucasiennes [333].

En ce qui concerne la chimiothérapie AC, nous avons observé qu'elle entraîne une surexpression significative de GPNMB chez les patientes post-chimiothérapie par rapport aux patientes témoins. GPNMB est exprimé dans le cancer du sein agressif et favorise les métastases osseuses du cancer du sein chez les femmes Caucasiennes [334]. Un nombre croissant d'études ont montré qu'un niveau plus élevé de GPNMB favorise l'angiogenèse, la migration, l'invasion et les métastases des cellules cancéreuses [334-335]. La chimiothérapie AC a également entraîné une surpression de CCN2 chez les patientes post-chimiothérapie. Sachant que l'augmentation de l'expression de CCN2 dans le cancer du sein humain est corrélée à de mauvais résultats pour les patientes et à une résistance aux médicaments [337], nos résultats suggèrent que CCN2 et GPNMB peuvent être des mécanismes de chimiorésistance dans le cancer du sein chez les femmes noires et peuvent donc servir de biomarqueurs thérapeutiques. D'autre part, la surexpression du suppresseur de tumeur EGR1 suggère qu'EGR1 serait une cible thérapeutique de AC. En ce qui concerne la chimiothérapie NVB, nous avons observé une surexpression significative de MYB chez les patientes post-chimiothérapie par rapport aux patientes témoins.

De plus, nous avons observé une augmentation significative d'AGR2 et MYB dans la tumeur par rapport aux tissus normaux et chez les patientes chimiorésistantes pour tous les groupes de traitement. Ce résultat corrobore avec celui obtenu *in silico* via UALCAN dans le cancer du sein de la femme caucasienne. La surexpression d'AGR2 est impliquée dans la pathogenèse du cancer

du sein chez les patientes caucasiennes, et est impliqué dans la croissance tumorale, la résistance aux médicaments et la formation des métastases, ce qui est associé à la surexpression d'AGR2 à un mauvais pronostic [336]. La surexpression intrinsèque ou acquise d'AGR2 a également été impliquée dans la médiation de la résistance à la doxorubicine dans les cellules cancéreuses mammaires [336, 338-339]. Nos résultats suggèrent qu'AGR2 est un médiateur important de la résistance aux médicaments dans le cancer du sein de la femme noire. AGR2 peut donc être utilisé comme biomarqueur de la chimiorésistance et servir de cible thérapeutique. Les résultats sont en accord avec ceux obtenus dans le cancer du sein de la femme caucasienne [338-339].

3.3.3 Méthodes de Validation des résultats obtenus par le séquençage d'ARN

Pour consolider la valeur des résultats obtenus par le séquençage d'ARN, nous avons effectué une double validation (validation *in silico* et immunohistochimique) des gènes sélectionnés. Une telle approche a permis une estimation fiable des biomarqueurs du cancer et a fourni davantage de données d'expression génique à plus grande échelle.

La première étape était la validation de nos résultats *in silico* via la ressource en ligne UALCAN et en utilisant les données TCGA. UALCAN et TCGA décrits dans les paragraphes précédents permettent d'identifier des biomarqueurs potentiels et contribue à une compréhension plus approfondie de la biologie du cancer.

Dans notre étude, AGR2, MYB sont surexprimés chez nos patientes par rapport au contrôle. Ce qui corrèle avec la validation *in silico* qui nous montre que AGR2 augmente dans la tumeur par rapport au tissu sain. AGR2 est plus élevé chez les caucasiens que les Afro-Américaines dans UALCAN alors que nous trouvons une surexpression chez la femme noire Africaine, ce qui représente une différence entre la femme Afro-Américaine et Africaine.

La validation *in silico* avec le TCGA est connu dans la biologie de cancer. Les chercheurs effectuent une validation *in silico* en utilisant les données de la TCGA pour plusieurs raisons [322-325] : 1) les données variées du TCGA permettent aux chercheurs d'analyser les motifs d'expression des gènes, d'identifier des biomarqueurs potentiels et d'explorer le paysage moléculaire de divers cancers. 2) La validation *in silico* avec UALCAN permet de tester ces hypothèses en utilisant l'ensemble de données varié et étendu de la TCGA, offrant un contexte plus

large pour leur recherche. 3) La TCGA couvre une large gamme de types de cancer en offrant des analyses liées à l'expression génique, aux mutations, aux variations du nombre de copies et aux paramètres cliniques. 4) Le TCGA en fournissant des données de survie pour les patients atteints de cancer aide à évaluer la signification pronostique potentielle des gènes mutés ou surexprimés et leur association avec la survie des patients. Ceci permet aux chercheurs d'effectuer une analyse de survie basée sur la mutation ou les niveaux d'expression des gènes d'intérêt. 5) La validation *in silico* aide à évaluer si les résultats observés dans un contexte expérimental ou en laboratoire peuvent être généralisés à une population de patients plus vaste et plus diverse. Les données de la TCGA fournissent un échantillon représentatif de cas de cancer, permettant aux chercheurs d'évaluer la robustesse et la généralisation de leurs résultats. 6) La validation *in silico* est souvent plus rentable et plus rapide par rapport aux validations expérimentales en laboratoire. Les chercheurs peuvent analyser rapidement de grands ensembles de données sans avoir besoin de travaux de laboratoire étendus. 7) La validation *in silico* avec la TCGA est cruciale pour la découverte de biomarqueurs potentiels. Les chercheurs peuvent identifier des gènes régulièrement mal régulés dans le cancer et évaluer leur valeur diagnostique ou pronostique en exploitant l'ensemble de données de la TCGA à grande échelle. C'est cette fonctionnalité que nous avons exploitée dans notre étude. 8) De plus, la validation *in silico* offre la possibilité d'intégrer les résultats computationnels avec les données expérimentales, créant une compréhension plus complète des mécanismes biologiques sous-jacents au cancer.

Bien que la validation *in silico* par TCGA offre de nombreux avantages et soit une étape précieuse dans la recherche biomédicale, il est essentiel de reconnaître ses limites et de compléter ces analyses par des approches expérimentales pour renforcer la validité des découvertes. En effet, la validation *in silico* par TCGA présente également certains inconvénients et considérations à prendre en compte [340-342]. Voici quelques points à garder à l'esprit nous paraissant importants à retenir : 1) Les données de la TCGA proviennent de multiples centres médicaux, ce qui peut entraîner une certaine hétérogénéité dans les protocoles d'échantillonnage, de séquençage, et de traitement des données. Cette variabilité peut influencer les résultats et nécessite une attention particulière lors de l'interprétation des données. 2) L'absence de validation expérimentale : La validation *in silico* par TCGA est souvent utilisée comme une étape préliminaire, mais elle ne remplace pas la nécessité d'une validation expérimentale en laboratoire. Les résultats *in silico*

doivent être confirmés par des expériences en laboratoire afin de garantir leur validité biologique. 3) Les technologies de séquençage et d'analyse évoluent rapidement. Les données plus anciennes retrouvées dans le TCGA peuvent être basées sur des technologies qui sont maintenant obsolètes, ce qui peut influencer la comparabilité des résultats avec des données plus récentes. 4) Les analyses *in silico* complexes nécessitent une compréhension approfondie de la bio-informatique et des statistiques. Des erreurs d'analyse peuvent conduire à des interprétations incorrectes, soulignant l'importance d'une expertise appropriée. 5) Bien que la TCGA fournisse des données cliniques utiles, elles peuvent être limitées dans certaines caractéristiques cliniques spécifiques. Certains paramètres cliniques pertinents pour une étude particulière peuvent ne pas être disponibles ou peuvent être insuffisamment détaillés. 6) Les outils en ligne, tels que ceux utilisés pour accéder aux données de la TCGA, peuvent avoir des limitations en termes de personnalisation et de flexibilité d'analyse par rapport à des approches plus avancées. Les limitations 5 et 6 sont celles auxquelles nous avons fait face dans notre étude.

Dans notre étude, la validation *in silico* a corrélé avec nos résultats de séquençage d'ARN. Comme notre étude, elle a identifié AGR2, CEACAM6 et MYB comme des gènes surexprimés de manière très différentielle dans les tumeurs par rapport au tissu normal. Les limitations 5 et 6 du TCGA ont été une contrainte dans notre étude. En effet, les niveaux d'expression des autres gènes n'ont pu être comparés avec ceux de TCGA car les échantillons utilisés dans le séquençage d'ARN avaient déjà été traités par une chimiothérapie avant d'être comparés aux échantillons contrôles et le TCGA ne contient pas ce type d'information.

La deuxième validation était l'immunohistochimie (IHC). Actuellement, l'IHC reste une méthode de choix pour détecter l'expression des biomarqueurs du cancer dans la plupart des laboratoires cliniques du monde entier [351]. En combinant le séquençage d'ARN et l'IHC, on intègre dans notre étude les informations sur l'expression génique et protéique et on obtient une compréhension plus complète de la biologie moléculaire d'un échantillon. Cette approche multi-plateforme renforce la robustesse des résultats et offre une perspective plus complète sur les mécanismes biologiques sous-jacents. En effet, valider un séquençage d'ARN avec une IHC pourrait devenir une étape essentielle en pratique clinique pour plusieurs raisons [343-345] : 1) La validation par IHC permet de confirmer que les changements dans l'expression génique se reflètent également au niveau des protéines : Le séquençage d'ARN mesure les niveaux d'expression génique, tandis que

l'IHC permet de visualiser et de quantifier les protéines au niveau cellulaire et tissulaire [350]. 2) Les techniques de séquençage génétique peuvent produire des données complexes, et la validation par une méthode indépendante renforce la fiabilité des résultats. Dans notre étude elle a été utilisée pour confirmer les résultats obtenus par le séquençage d'ARN. 3) Notre objectif principal étant la découverte de nouveaux biomarqueurs, la validation par IHC a contribué à établir la pertinence biologique des biomarqueurs identifiés. Elle a permis de déterminer si les changements dans l'expression génique ont une signification biologique dans un contexte tissulaire. 4) De plus, L'IHC permet de localiser l'expression de la protéine dans des cellules ou des régions spécifiques. Cette information peut être cruciale pour comprendre la biologie cellulaire et tissulaire. 5) Enfin, notre étude étant une étude translationnelle, notre objectif est d'utiliser les résultats pour des applications cliniques. Dans ce cas, la possibilité de valider les résultats par IHC est souvent nécessaire, car les techniques d'analyse tissulaire sont celles couramment utilisées dans le contexte clinique. La validation par IHC en confirmant l'expression au niveau protéique des gènes sélectionnés permet de renforcer la justification de leur utilisation comme des cibles thérapeutiques.

Les études précédentes ont permis d'établir une corrélation entre l'IHC et d'autres techniques de laboratoire. Une étude sur le cancer du poumon a trouvé une forte corrélation entre l'IHC et les résultats de qRT-PCR [348]. Le séquençage d'ARN est une méthode encore plus précise pour mesurer l'expression des biomarqueurs [332-334]. Le séquençage d'ARN quantifie le nombre de transcrits d'ARNm exprimés dans tout le microenvironnement tumoral sans discrimination du type de cellule [346-347]. Certaines études antérieures ont exploré la possibilité d'utiliser les données de séquençage d'ARN pour prédire le statut IHC de cinq cancers du sein conventionnels et ont obtenu des résultats satisfaisants [347].

Des biomarqueurs tels que l'ESR, HER2, PGR, Ki67 et le grade histologique de Nottingham (NHG) ont été évalués dans des échantillons de tissu tumoral du cancer du sein provenant de femmes noires. Une bonne concordance a été observée entre le statut protéique déterminé par l'IHC et le niveau d'expression génique correspondant déterminé par le séquençage d'ARN. Une étude [347] plus récente, corrélant le séquençage d'ARN et les profils d'expression mesurés par l'IHC pour des biomarqueurs cliniquement exploitables dans des échantillons de tissu tumoral du sein inclus dans des blocs de paraffine (FFPE), avait déjà été réalisée. Elle avait démontré une corrélation élevée et statistiquement significative entre le séquençage d'ARN et les mesures

immunohistochimiques pour les gènes HER2, ER1 et PGR dans le cancer du sein de la femme noire.

Le profil d'expression révélé par nos analyses IHC dans le cancer du sein chez les femmes noires confirme la localisation de AGR2, CEACAM6, PLIN1 sur la membrane cellulaire et dans le cytoplasme, ainsi que la localisation nucléaire de EGR1 et MYB. Nous avons également confirmé l'expression différentielle de GPNMB, EGR1, PLIN1, AGR2, CEACAM6 et MYB dans les tissus cancéreux par rapport aux tissus normaux par IHC. L'expression de AGR2 et MYB est plus élevée dans le cancer que dans le tissu mammaire bénin.

Quatre de nos résultats d'IHC sur les vingt-quatre réalisés, en particulier ceux des gènes AGR2 et CEACAM6, sont contraires à ceux obtenus via le séquençage d'ARN. Normalement, le paysage protéomique de la cellule est parfois régulé post-transcriptionnellement, translationnellement et post-traductionnellement, ce qui peut entraîner des incohérences entre les résultats du séquençage d'ARN et de l'IHC mesurant les biomarqueurs du cancer. Cependant, la plupart de nos résultats de validation en IHC ont été en corrélation avec ceux du séquençage d'ARN. Plusieurs études antérieures [346,347,350] comme la nôtre, ont rapporté un degré élevé de concordance entre ces méthodes, du moins pour les gènes cliniquement pertinents, fournissant ainsi des preuves que le séquençage d'ARN peut compléter l'IHC pour mesurer les biomarqueurs du cancer.

Les facteurs limitatifs de notre étude comprennent la taille restreinte de l'échantillon utilisé en IHC, ce qui pourrait biaiser l'analyse des gènes soumis à une forte régulation par des modifications post-transcriptionnelles ou post-traductionnelles. Ces contraintes pourraient expliquer les divergences observées dans les résultats obtenus. Ainsi, la corrélation entre le séquençage d'ARN et l'immunohistochimie de nos biomarqueurs devrait être validée de manière indépendante sur une plus grande cohorte. Un autre facteur limitatif de cette étude est sa nature rétrospective, qui utilise des échantillons d'archives pour évaluer la présence d'un biomarqueur dynamiquement régulable qui peut évoluer au cours de la maladie. Par conséquent, le statut de nos neuf gènes identifiés par séquençage d'ARN doit être validé de manière approfondie dans de futures études cliniques prospectives.

La corrélation entre nos résultats de séquençage d'ARN et les résultats obtenus par IHC dans cette étude et dans différents laboratoires cliniques suggère que le séquençage d'ARN peut être utilisé comme alternative ou en complément de l'IHC pour sélectionner la stratégie de traitement optimale pour les échantillons de tissu tumoral FFPE [346,347]. En plus de caractériser quelques gènes biomarqueurs cliniques pour le cancer du sein chez les femmes noires, notre analyse de séquençage d'ARN nous a permis, comme dans d'autres centres de recherche, d'identifier des gènes cibles de médicaments dont l'expression varie et de quantifier l'activation de la voie moléculaire PI3K/AKT. Cette approche nous permet notamment de classifier de manière personnalisée les médicaments anticancéreux en fonction de leurs spécificités moléculaires connues.

Le véritable défi du séquençage d'ARN réside dans la divergence des plates-formes et des protocoles, générant souvent des résultats incompatibles. Pour surmonter cela et améliorer la méthode, nous avons défini dans cette étude la procédure expérimentale et le pipeline analytique utilisés pour obtenir des résultats afin d'assurer leur reproductibilité. Nous avons utilisé des tissus de référence normaux pour comparer l'expression différentielle d'ARN entre le tissu normal et expérimental. Afin d'obtenir et d'analyser les données de séquençage d'ARN, Nous avons suivi strictement la procédure précédemment publiée pour générer l'Atlas des Transcriptomes Tissulaires Normaux Humains (c'est-à-dire l'Atlas d'Expression Tissulaire Normale Oncobox) [348]. Il a été démontré précédemment que cette procédure expérimentale et analytique garantit l'obtention de données transcriptomiques de haute qualité fortement corrélées aux valeurs d'expression génique mesurées par l'IHC [349-350].

Notre étude est la première à explorer l'association entre l'expression des gènes GPNMB, EGR1, GJB6, AGR2, CTGF, CEACAM6, MYB et PLIN1, la réponse à la chimiothérapie et la chimiorésistance dans le cancer du sein chez les femmes noires. C'est également la première étude sur le cancer du sein chez les femmes noires qui montre que le séquençage total de l'ARN des échantillons d'archives inclus dans des blocs de paraffine (FFPE) fournit une estimation fiable des niveaux d'ARN et peut être complémentaire à l'immunohistochimie en clinique. Ces résultats montrent qu'à l'avenir, le séquençage de l'ARN peut compléter l'immunohistochimie pour des mesures fiables de biomarqueurs dans les échantillons de cancer FFPE.

3.3.4 Profil d'expression des gènes sur les lignées cellulaires MCF7 et MD-MB231

Afin de mieux comprendre l'effet du traitement à la doxorubicine dirigés spécifiquement contre chacun de nos biomarqueurs potentiels, leur expression protéique sur les lignées cellulaires a été mesurée. Des lors, nous avons voulu regarder les variations individuelles de chacun des biomarqueurs sélectionnés dans les lignées cellulaires. Nous avons aussi voulu regarder leurs interactions avec la voie PI3K/AKT. Les lignées cellulaires sont souvent utilisées comme modèles expérimentaux *in vitro*. La validation sur des lignées cellulaires permet de confirmer la reproductibilité des résultats obtenus par séquençage d'ARN. La validation sur des lignées cellulaires peut aider à évaluer la pertinence biologique de chacun des biomarqueurs identifiés. En validant sur des lignées cellulaires, on comprend mieux les voies moléculaires sous-jacentes à l'expression des protéines. Dans notre étude, les lignées utilisées comme modèles de cancer du sein sont les MDA-MB-231 et les MCF-7[353]. Les MDA-MB-231 sont des cellules de cancer du sein triple négatif, alors que les MCF-7, sont positives pour les récepteurs œstrogène et progestérone (ER+ ; PR+). Ici, nous avons exploré systématiquement l'expression des gènes significatifs identifiés lors du séquençage d'ARN suite à la doxorubicine dans des lignées cellulaires de cancer du sein ER-positif et ER-négatif. Conformément à des observations antérieures [341], nous avons établi que l'exposition à la doxorubicine augmente la phosphorylation de l'AKT dans les lignées cellulaires de cancer du sein humain MCF7, mais pas dans la lignée cellulaire MB231. Il avait déjà été démontré que les cellules MCF7 rendues résistantes à la doxorubicine présentent des niveaux constitutifs de phosphorylation d'AKT [352].

Contrairement aux données obtenues chez les patientes, les niveaux d'expression d'AKT2 n'ont pas été affectés dans les lignées cellulaires de cancer du sein humain MDA-MB231 et MCF7 après 24 heures d'exposition à la chimiothérapie, tandis qu'AKT1 a augmenté de manière significative dans la lignée cellulaire MCF7. Les raisons de cette disparité restent à élucider, mais cela pourrait être dû soit à la période plus longue d'exposition à la chimiothérapie chez les patientes (les patientes sont traitées en cure de 21 jours à la doxorubicine), soit au fait que les lignées proviennent de personnes caucasiennes et non noires, ou même au mélange de cellules tumorales et de stroma dans les échantillons tumoraux des patientes, contrairement à un contenu pur de cellules tumorales dans les cultures *in vitro*. De manière intéressante, une augmentation significative de la phosphorylation d'AMPK α 2 et de CTGF a été observée dans la lignée cellulaire MDA-MB231

mais pas dans la lignée cellulaire MCF7, mais les mécanismes moléculaires sous-jacents restent à déterminer.

Dans l'ensemble, les données de notre séquençage d'ARN ainsi que nos méthodes de validation suggèrent que les neuf gènes GPNMB, AMPK α 2, EGR1, GJB6, AGR2, CTGF, CEACAM6, MYB et PLIN1 peuvent servir de biomarqueurs thérapeutiques dans le cancer du sein chez les femmes noires. Nos résultats démontrent également que le séquençage de l'ARN est un outil très sensible et robuste pour mesurer de nouveaux biomarqueurs sur un continuum d'expression. De plus, avec l'émergence rapide de nouveaux biomarqueurs comme ceux que nous avons identifiés et leur introduction dans la pratique clinique, le séquençage de l'ARN associé à l'immunohistochimie pourrait potentiellement devenir une solution au moins aussi utile et rentable qu'une association du séquençage d'ARN avec une qPcr, favorisant la gestion thérapeutique du cancer du sein agressif chez la femme noire.

3.4 Conclusion et perspectives à venir

3.4.1 Conclusion

Dans cette étude, l'activation d'AKT et la surexpression d'AKT1 dans le cancer du sein de la femme noire a été induite par des anthracyclines telles que la doxorubicine. Par conséquent, l'administration de schémas de chimiothérapie excluant les médicaments capables d'activer AKT, tels que les anthracyclines, aux patientes exprimant AKT serait une solution logique pour surmonter la résistance aux médicaments.

De plus, de nouvelles stratégies de traitement pourraient être développées contre la chimiorésistance de cancer du sein agressif de la femme noire. Nous avons dans notre étude proposé 9 gènes (GPNMB, EGR1, CX30, AGR2, CTGF, CEACAM6, c-Myb, PLIN-1 et AMPK α) pertinents pouvant servir de biomarqueurs thérapeutiques à investiguer. Des thérapies ciblant ces 9 gènes pourraient être indiquées.

Un autre fait intéressant et accessible dans notre étude est la méthodologie. En effet nous avons validé par immunohistochimie et Validation *in silico* via TCGA notre séquençage d'ARN contrairement aux validations par RT-PCR des études précédentes. Les études précédentes qui ont comparées la méthode RT-PCR et l'immunohistochimie ont trouvé une grande corrélation dans

les résultats. Cependant, la disponibilité généralisée, le coût plus bas, la facilité d'application et la possibilité d'analyses rétrospectives favorisent l'utilisation de l'IHC dans les études portant sur la résistance multi-médicamenteuse. Par conséquent, notre méthodologie serait facilement transposable en pratique Clinique.

Bien que la recherche visant à développer de nouvelles stratégies dans le traitement du cancer soit coûteuse et demande du temps, il est impossible de quantifier la valeur des bénéfices obtenus grâce à cette recherche. Il faudrait donc miser sur la thérapie ciblée pour traiter chaque patiente atteinte du cancer de sein agressif et réduire la disparité raciale dans le taux de mortalité. En effet, la thérapie ciblée est une stratégie qui augmentera la concentration du médicament sur le site de la tumeur et préviendra les effets secondaires systémiques indésirables des médicaments. La thérapie ciblée a une action sur des cellules spécifiques contrairement à la chimiothérapie qui est un traitement généralisé. Ainsi, des doses plus faibles pourraient être administrées avec des taux de réponse plus élevés.

3.4.2 Perspectives à venir

Dans notre étude nous avons proposé 9 biomarqueurs thérapeutiques (GPNMB, EGR1, CX30, AGR2, CTGF, CEACAM6, c-Myb, PLIN-1, AMPK α) potentiels de cancer du sein agressif de la femme noire. Nous avons dans un premier temps regardé l'expression protéique de ces biomarqueurs en réponse à la doxorubicine dans deux lignées cellulaires couramment utilisé en laboratoire : MDA-MB231 et MCF7. Les deux lignées cellulaires mammaires que nous avons utilisées sont d'ascendance européenne mais ne représentent que deux des quatre sous-types moléculaires de cancer du sein alors qu'il nous aurait fallu tous les représenter, La suite logique serait d'utiliser au minimum trois des lignées cancéreuses mammaires d'ascendance africaine en prenant les deux lignées triple négative MDA-MB157 ET MDA-MB-468 et la lignée MDA-MB175VII (ER+). Dans chacune de ces lignées cellulaires mammaires d'origine africaine, on pourrait induire une perte de fonction stable et spécifique de chacun des biomarqueurs (GPNMB, EGR1, CX30, AGR2, CTGF, CEACAM6, c-Myb, PLIN-1, AMPK α) par l'utilisation de shRNAs. Par la suite, on pourrait induire l'activation de chacun des biomarqueurs en utilisant des vecteurs constitutivement actifs codant pour chaque protéine. Sur ces modèles on peut évaluer l'impact de

ces biomarqueurs sur la prolifération cellulaire mammaire et aussi regarder par western blot lesquels des biomarqueurs peuvent activer la voie PI3K/AKT et l'isoforme AKT impliqué.

En reprenant nos expériences mais cette fois ci sur nos trois lignées cellulaires mammaire d'ascendance noire traitées à la doxorubicine, l'inhibition et l'activation de chacun des biomarqueurs nous permettra d'évaluer, pour la première fois, la contribution de chacun de nos biomarqueurs dans la chimiorésistance des cancers agressif du sein. Pour cela, nous devons vérifier par cytométrie en flux, si la diminution d'expression spécifique de chaque biomarqueur induit une augmentation de la mort cellulaire après un traitement a la doxorubicine. Nous pourrions démontrer l'implication de chaque biomarqueur dans la résistance à la doxorubicine en montrant que dans notre modèle la surexpression du biomarqueur a eu pour effet de diminuer les niveaux d'expression des facteurs proapoptotiques. L'analyse de facteurs pro-apoptotiques tels que les capases-3, -9 et PARP clivés indiquent que la voie mitochondriale de l'apoptose est induite. Afin de comparer ces niveaux de mort cellulaire avec les niveaux d'apoptose induite par cette drogue dans notre modèle, nous pouvons colorer au Hoechst les noyaux cellulaires et procéder au décompte des cellules apoptotiques. Ces résultats vont permettre de déterminer l'inhibition du biomarqueur a amélioré l'action de la chimiothérapie en augmentant la mort cellulaire par apoptose. La présence de fragments clivés des caspases-3, -6, -9 et de la « poly adenosine diphosphate ribose polymerase » (PARP) détectée par Western blot à la suite de l'exposition des cellules a la doxorubicine pourrait confirmer que dans nos lignées, cette drogue active bien la voie mitochondriale de l'apoptose.

Pour déterminer l'impact de chacun de nos biomarqueurs (GPNMB, EGR1, CX30, AGR2, CTGF, CEACAM6, c-Myb, PLIN-1, AMPK α) sur la prolifération post chimiothérapie, on pourrait faire des tests de formation de colonies. Le test de formation de colonie est nécessaire pour confirmer que chaque biomarqueur est nécessaire aux cellules de nos lignées pour poursuivre leur division à la suite d'un traitement a la doxorubicine. En effet, si nous prenons le biomarqueur CTGF sur la lignée MDA-MB157 par exemple et faisons une inhibition par shRNA. Suite à notre inhibition, si aucune colonie n'est visible à la suite du traitement des cellules de MDA-MB157/shRNA CTGF alors qu'elles étaient visibles sur MDA-MB157-CTGF, on dira que CTGF est responsable de la formation de colonies après un traitement.

Pour déterminer si l'implication de nos biomarqueurs (GPNMB, EGR1, CX30, AGR2, CTGF, CEACAM6, c-Myb, PLIN-1, AMPK α) dans la chimiorésistance varie selon la drogue utilisée, nous pouvons également conduire nos expériences en utilisant deux autres drogues antinéoplasiques largement utilisées pour traiter les cancers du sein comme la cyclophosphamide et le taxol, Bien qu'elles entraînent toutes la mort cellulaire par apoptose. Les deux drogues ne le font pas selon le même mécanisme. Le taxol par exemple interfère avec les fonctions normales des microtubules cytoplasmiques alors que le cyclophosphamide agit par alkylation de l'ADN [46]. Nous pourrions ainsi démontrer que nos biomarqueurs sont impliqués dans la chimiorésistance, indépendamment de la drogue utilisée.

Pour ce qui est de l'expérience clinique, une validation externe par des grandes études prospectives renforcerait l'utilité clinique de nos biomarqueurs. En effet nous avons travaillé en rétrospectif et notre cohorte était limitée. Une étude en prospectif sur une plus grande cohorte serait utile. De plus nous avons suggéré de par nos résultats que la surexpression d'AKT1 pouvait servir à inactiver FOXO3 dans le cancer du sein agressif de la femme noire. Il serait intéressant de confirmer cela en regardant cette fois ci pFOXO3 et en établissant une corrélation avec AKT1. Nous avons montré une activation générale significative d'AKT chez toutes nos patientes traitées mais n'avons pas pu ressortir cette différence significative par groupe de traitement probablement dû au faible nombre de patientes inclus dans chaque groupe. Une cohorte plus grande aurait accentué la différence et l'aurait rendu significative.

Une validation analytique supplémentaire sur une cohorte distincte de patientes potentiellement par qPCR apporterait une valeur ajoutée à notre étude. Nous avons validé par immunohistochimie et expliqué plus haut les avantages de notre démarche. Cependant la quantité limitée de notre ARN et sa dégradation ne nous a pas permis de faire une qPCR. Il serait intéressant d'ajouter une valeur à nos résultats en les retrouvant par qPCR.

Le caractère prédictif ou pronostique de nos biomarqueurs doit être validé statistiquement par une corrélation clinique. Nous avons proposé 9 biomarqueurs potentiels du cancer de sein agressif de la femme noire. Il serait intéressant sur une grande cohorte de valider leur action thérapeutique via des courbes de survie et des courbes de réponses thérapeutiques.

Faire une étude comparative par séquençage d'ARN de nos résultats avec ceux d'une cohorte africaine canadienne et une cohorte caucasienne canadienne serait intéressant. Notre cohorte est d'ascendance africaine et provient d'Afrique donc présente les gènes à l'état sauvage. Il serait intéressant de la comparer avec une cohorte africaine qui a migrée au Canada et voir s'il n'y a pas eu de modifications génétiques suite au changement d'environnement et d'alimentation.

Regarder la régulation de nos biomarqueurs sur des lignées de cancer du sein et sur un modèle Ex-Vivo. Nous avons dans notre étude utilisé des modèles in-Vivo et in-Vitro. Il serait intéressant de regarder les variations que nous avons obtenu in-Vitro dans un modèle Ex-Vivo.

Références bibliographiques

1. F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, RL Siegel, LA Torre et A. Jemal, « **Statistiques mondiales sur le cancer 2018 : estimations GLOBOCAN de l'incidence et de la mortalité dans le monde pour 36 cancers dans 185 pays** », CA : A Cancer Journal *for Cliniciens*, vol. 68, non. 6, pages 394 à 424, 2018
2. Heer E, Harper A, Escandor N, Sung H, McCormack V, Fidler-Benaoudia MM. **Global burden, and trends in premenopausal and postmenopausal breast cancer: a population-based study. Lancet Glob Health. 2020 Aug;8(8):e1027-e1037. doi: 10.1016/S2214-109X(20)30215-1. PMID: 32710860.**
3. **Survival rates for breast cancer.** (2021).<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/breast-cancer-survival-rates.html>
4. AI Riggio, KE Varley et AL Welm, « **Les mystères persistants de la récurrence métastatique du cancer du sein** », 2021, <https://www.nature.com/articles/s41416-020-01161-4> .Consulter sur : Google Scholar
5. Sung H, et al. (2021). **Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.** <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21660>
6. Denu RA, et al. (2017). **Racial and socioeconomic disparities are more pronounced in inflammatory breast cancer than other breast cancers.** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5574219/>
7. **Evaluation of racial/ethnic differences in treatment and mortality in women with triple-negative breast cancer.** (2021). <https://jamanetwork.com/journals/jamaoncology/article-abstract/2780032>

8. Hall IJ et al. (2005) **Comparative analysis of breast cancer risk factors among African American women and white women.** *Am J Epidemiol* 161(1):40–51 [PubMed] [Google Scholar]
9. Chlebowski RT et al. (2005) **Ethnicity and breast cancer: factors influencing differences in incidence and outcome.** *J Natl Cancer Inst* 97(6):439–48 [PubMed] [Google Scholar]
10. Yedjou CG, Sims JN, Miele L, Noubissi F, Lowe L, Fonseca DD, Alo RA, Payton M, Tchounwou PB. **Health and Racial Disparity in Breast Cancer.** *Adv Exp Med Biol.* 2019;1152:31-49. doi: 10.1007/978-3-030-20301-6_3. PMID: 31456178; PMCID: PMC6941147
11. Friebel TM, Andrulis IL, Balmana J, Blanco AM, Couch FJ, Daly MB, et al. **BRCA1 and BRCA2 pathogenic sequence variants in women of African origin or ancestry.** *Hum Mutat.* 2019;40(10):1781–1796. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
12. Hall MJ, Reid JE, Burbidge LA, Pruss D, Deffenbaugh AM, Frye C, et al. **BRCA1 and BRCA2 mutations in women of different ethnicities undergoing testing for hereditary breast-ovarian cancer.** *Cancer.* 2009;115(10):2222–2233. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
13. Keenan T, Moy B, Mroz EA, Ross K, Niemierko A, Rocco JW, et al. **Comparison of the genomic landscape between primary breast cancer in African American versus White women and the Association of racial differences with tumor recurrence.** *J Clin Oncol.* 2015;33(31):3621–3627. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
14. Huo D, Hu H, Rhie SK, Gamazon ER, Cherniack AD, Liu J, et al. **Comparison of breast cancer molecular features and survival by African and European Ancestry in The Cancer Genome Atlas.** *JAMA Oncol.* 2017;3(12):1654–1662. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

15. Pitt JJ, Riester M, Zheng Y, Yoshimatsu TF, Sanni A, Oluwasola O, et al. **Characterization of Nigerian breast cancer reveals prevalent homologous recombination deficiency and aggressive molecular features.** *Nat Commun.* 2018;9(1):4181. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
16. Dookeran, K.A., Dignam, J.J., Holloway, N. *et al.* **Race and the Prognostic Influence of p53 in Women with Breast Cancer.** *Ann Surg Oncol* 19, 2334–2344 (2012). <https://doi.org/10.1245/s10434-011-1934-6>
17. Yang X, Amgad M, Cooper LAD, Du Y, Fu H, Ivanov AA. **High expression of MKK3 is associated with worse clinical outcomes in African American breast cancer patients.** *J Transl Med.* 2020 Sep 1;18(1):334. doi: 10.1186/s12967-020-02502-w. PMID: 32873298; PMCID: PMC7465409.
18. Prakash O, Hossain F, Danos D, Lassak A, Scribner R, Miele L. **Racial Disparities in Triple Negative Breast Cancer: A Review of the Role of Biologic and Non-biologic Factors.** *Front Public Health.* 2020 Dec 22;8:576964. doi: 10.3389/fpubh.2020.576964. PMID: 33415093; PMCID: PMC7783321.
19. Cho B, Han Y, Lian M, Colditz GA, Weber JD, Ma C, Liu Y. **Evaluation of Racial/Ethnic Differences in Treatment and Mortality Among Women With Triple-Negative Breast Cancer.** *JAMA Oncol.* 2021 Jul 1;7(7):1016-1023. doi: 10.1001/jamaoncol.2021.1254. PMID: 33983438; PMCID: PMC8120441.
20. Mavingire N, Campbell P, Wooten J, Aja J, Davis MB, Loaiza-Perez A, Brantley E. **Cancer stem cells: Culprits in endocrine resistance and racial disparities in breast cancer outcomes.** *Cancer Lett.* 2Mar 1;500:64-74. doi: 10.1016/j.canlet.2020.12.014. Epub 2020 Dec 9. PMID: 33309858; PMCID: PMC7872014.

21. Mollie E. Barnard, Caroline E. Boeke, Rulla M. Tamimi, **Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* - Reviews on Cancer**, Volume 1856, Issue 1,2015, Pages 73-85,
22. Toss A, Grandi G, Cagnacci A, Marcheselli L, Pavesi S, De Matteis E, Razzaboni E, Tomasello C, Cascinu S, Cortesi L. **The impact of reproductive life on breast cancer risk in women with family history or BRCA mutation. *Oncotarget***. 2017 Feb 7;8(6):9144-9154. doi: 10.18632/oncotarget.13423. PMID: 27880720; PMCID: PMC5354721.
23. Moorman PG, Iversen ES, Marcom PK, Marks JR, Wang F; Kathleen Cuningham Consortium for Research into Familial Breast Cancer; Lee E, Ursin G, Rebbeck TR, Domchek SM, Arun B, Susswein L, Isaacs C, Garber JE, Visvanathan K, Griffin CA, Sutphen R, Brzosowicz J, Gruber S, Finkelstein DM, Schildkraut JM. **Evaluation of established breast cancer risk factors as modifiers of BRCA1 or BRCA2: a multi-center case-only analysis. *Breast Cancer Res Treat***. 2010 Nov;124(2):441-51. doi: 10.1007/s10549-010-0842-y. Epub 2010 Mar 23. PMID: 20309627; PMCID: PMC2925060.
24. Carbine NE, Lostumbo L, Wallace J, Ko H. **Risk-reducing mastectomy for the prevention of primary breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev***. 2018 Apr 5;4(4):CD002748. doi: 10.1002/14651858.CD002748.pub4. PMID: 29620792; PMCID: PMC6494635.
25. Berry DA, Cronin KA, Plevritis SK, Fryback DG, Clarke L, Zelen M, et al. **Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. *The New England journal of medicine***. 2005;353(17):1784-92.
26. Michalski TA, Nattinger AB (1997) **The influence of black race and socioeconomic status on the use of breast-conserving surgery for Medicare beneficiaries. *Cancer* 79(2):314–319 [PubMed] [Google Scholar]**

27. Barone I, Caruso A, Gelsomino L, Giordano C, Bonofiglio D, Catalano S, Andò S. **Obesity and endocrine therapy resistance in breast cancer: Mechanistic insights and perspectives.** *Obes Rev.* 2022 Feb;23(2):e13358. doi: 10.1111/obr.13358. Epub 2021 Sep 24. PMID: 34559450; PMCID: PMC9285685.

28. van den Brandt PA, Spiegelman D, Yaun SS, et al. **Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk.** *Am J Epidemiol.* 2000;152:514-527. 10.1093/aje/152.6.514 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

29. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. **Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies.** *Lancet.* 2008;371:569-578. 10.1016/S0140-6736(08)60269-X [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

30. Suzuki R, Orsini N, Saji S, Key TJ, Wolk A. **Body weight and incidence of breast cancer defined by estrogen and progesterone receptor status—a meta-analysis.** *Int J Cancer.* 2009;124:698-712. 10.1002/ijc.23943 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

31. Loi S, Milne RL, Friedlander ML, et al. **Obesity and outcomes in premenopausal and postmenopausal breast cancer.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14:1686-1691. 10.1158/1055-9965.EPI-05-0042 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

32. Caan BJ, Kwan ML, Hartzell G, et al. **Pre-diagnosis body mass index, post-diagnosis weight change, and prognosis among women with early-stage breast cancer.** *Cancer Causes Control.* 2008;19:1319-1328. 10.1007/s10552-008-9203-0 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

33. Majed B, Senouci K, Asselain B. **Shortened survival and more metastasis recurrences among overweight breast cancer patientes.** *Breast J.* 2009;15:557-559. 10.1111/j.1524-4741.2009.00785.x [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

34. Rosenberg L, Czene K, Hall P. **Obesity and poor breast cancer prognosis: an illusion because of hormone replacement therapy?** *Br J Cancer*. 2009;100:1486-1491. 10.1038/sj.bjc.6605025 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
35. Niehoff N., White A. J., McCullough L. E., et al. **Polycyclic aromatic hydrocarbons and postmenopausal breast cancer: an evaluation of effect measure modification by body mass index and weight change.** *Environmental research* . 2017;152:17–25. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
36. Ma H., Ursin G., Xu X., et al. **Body mass index at age 18 years and recent body mass index in relation to risk of breast cancer overall and ER/PR/HER2-defined subtypes in white women and African American women: a pooled analysis.** *Breast Cancer Research* . 2018;20(1):1–14. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
37. McDonald J. A., Goyal A., Terry M. B. **Alcohol intake and breast cancer risk: weighing the overall evidence.** *Current breast cancer reports* . 2013;5(3):208–221. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
38. Smith-Warner S. A., Spiegelman D., Yaun S. S., et al. **Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies.** *JAMA*. 1998;279(7):535–540. [PubMed] [Google Scholar]
39. Hamajima N., Hirose K., Tajima K., et al. **Alcohol, tobacco and breast cancer - collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58 515 women with breast cancer and 95 067 women without the disease.** *British journal of cancer* . 2002;87(11):1234–1245. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
40. Hovey R.C., Trott J.F., Vonderhaar B.K. **Establishing a framework for the functional mammary gland: From endocrinology to morphology.** *J. Mammary Gland Biol.*

Neoplasia. 2002;7:17–38. doi: 10.1023/A:1015766322258. [PubMed]
[CrossRef] [Google Scholar]

41. Peaker M. **The mammary gland in mammalian evolution: A brief commentary on some of the concepts.** *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. 2002;7:347. doi: 10.1023/A:1022860902083. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
42. Muschler J., Streuli C.H. **Cell-matrix interactions in mammary gland development and breast cancer.** *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010;2:a003202. doi: 10.1101/cshperspect.a003202. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
43. Watson C.J., Khaled W.T. **Mammary development in the embryo and adult: A journey of morphogenesis and commitment.** *Development*. 2008;135:995–1003. doi: 10.1242/dev.005439. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
44. Sternlicht M.D. **Key stages in mammary gland development: The cues that regulate ductal branching morphogenesis.** *Breast Cancer Res.* 2006;8:201. doi: 10.1186/bcr1368. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
45. Visvader JE. **Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis.** *Genes Dev.* 2009 Nov 15;23(22):2563-77. doi: 10.1101/gad.1849509. PMID: 19933147; PMCID: PMC2779757.
46. Bodelon C, Oh H, Chatterjee N, Garcia-Closas M, Palakal M, Sherman ME, Pfeiffer RM, Geller B, Vacek P, Weaver DL, Chicoine R, Papatomas D, Xiang J, Patel DA, Khodr ZG, Linville L, Clare SE, Visscher DW, Mies C, Hewitt SM, Brinton LA, Storniolo AMV, He C, Chanock SJ, Gierach GL, Figueroa JD. **Association between breast cancer genetic susceptibility variants and terminal duct lobular unit involution of the breast.** *Int J Cancer*. 2017 Feb 15;140(4):825-832. doi: 10.1002/ijc.30512. Epub 2016 Nov 18. PMID: 27859137; PMCID: PMC5167645.

47. Russo J, Hu YF, Yang X, et al. **Developmental, cellular, and molecular basis of human breast cancer.** *J Natl Cancer Inst Monogr* 2000; 17–37.
48. Milanese TR, Hartmann LC, Sellers TA, et al. **Age-related lobular involution and risk of breast cancer.** *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 1600–7.
49. Oh H, Bodelon C, Palakal M, Chatterjee N, Sherman ME, Linville L, Geller BM, Vacek PM, Weaver DL, Chicoine RE, Papathomas D, Patel DA, Xiang J, Clare SE, Visscher DW, Mies C, Hewitt SM, Brinton LA, Storniolo AM, He C, Garcia-Closas M, Chanock SJ, Gierach GL, Figueroa JD. **Ages at menarche- and menopause-related genetic variants in relation to terminal duct lobular unit involution in normal breast tissue.** *Breast Cancer Res Treat.* 2016 Jul;158(2):341-50. doi: 10.1007/s10549-016-3859-z. Epub 2016 Jun 24. PMID: 27342457; PMCID: PMC5144736.
50. Ohuchi N. **Breast-conserving surgery for invasive cancer: a principle based on segmental anatomy.** *Tohoku J Exp Med.* 1999 Jun;188(2):103-18. doi: 10.1620/tjem.188.103. PMID: 10526872.
51. Badve SS, Gökmen-Polar Y. Ductal carcinoma in situ of breast: update 2019. *Pathology.* 2019 Oct;51(6):563-569. doi: 10.1016/j.pathol.2019.07.005. Epub 2019 Aug 28. PMID: 31472981; PMCID: PMC6788802. Mehta AK, Kadel S, Townsend MG, Oliwa M, Guerriero JL. **Macrophage Biology and Mechanisms of Immune Suppression in Breast Cancer.** *Front Immunol.* 2021 Apr 23;12:643771. doi: 10.3389/fimmu.2021.643771. PMID: 33968034; PMCID: PMC8102870.
52. Qiao A, Gu F, Guo X, Zhang X, Fu L. **Breast cancer-associated fibroblasts: their roles in tumor initiation, progression and clinical applications.** *Front Med.* 2016 Mar;10(1):33-40. doi: 10.1007/s11684-016-0431-5. Epub 2016 Jan 20. PMID: 26791754.

53. Badodekar N, Sharma A, Patil V, Telang G, Sharma R, Patil S, Vyas N, Somasundaram I. Angiogenesis induction in breast cancer: **A paracrine paradigm**. *Cell Biochem Funct*. 2021 Oct;39(7):860-873. doi: 10.1002/cbf.3663. Epub 2021 Sep 9. PMID: 34505714.
54. Marrero-Rodríguez D, Taniguchi-Ponciano K, Kerbel J, Cano-Zaragoza A, Remba-Shapiro I, Silva-Román G, Vela-Patiño S, Andonegui-Elguera S, Valenzuela-Perez A, Mercado M. **The hallmarks of cancer... in pituitary tumors?** *Rev Endocr Metab Disord*. 2023 Apr;24(2):177-190. doi: 10.1007/s11154-022-09777-y. Epub 2022 Dec 31. PMID: 36586070.
55. Senga SS, Grose RP. **Hallmarks of cancer-the New Testament**. *Open Biol*. 2021 Jan;11(1):200358. doi: 10.1098/rsob.200358. Epub 2021 Jan 20. PMID: 33465324; PMCID: PMC7881179.
56. Hanahan D, Weinberg RA. **The hallmarks of cancer**. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9. PMID: 10647931.
57. Zarychta, Elżbieta, and Barbara Ruzzkowska-Ciastek. 2022. **"Cooperation between Angiogenesis, Vasculogenesis, Chemotaxis, and Coagulation in Breast Cancer Metastases Development: Pathophysiological Point of View"** *Biomedicines* 10, no. 2: 300. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020300>
58. Lin, L.; Chen, Y.S.; Yao, Y.D.; Chen, J.Q.; Chen, J.N.; Huang, S.Y.; Zeng, Y.J.; Yao, H.R.; Zeng, S.H.; Fu, Y.S.; et al. **CCL18 from tumor-associated macrophages promotes angiogenesis in breast cancer**. *Oncotarget* 2015, 6, 34758–34773. [Google Scholar] [CrossRef][Green Version]
59. Farzaneh Behelgardi, M.; Zahri, S.; Gholami Shahvir, Z.; Mashayekhi, F.; Mirzanejad, L.; Asghari, S.M. **Targeting signaling pathways of VEGFR1 and VEGFR2 as a potential target in the treatment of breast cancer**. *Mol. Biol. Rep.* 2020, 47, 2061–2071. [Google Scholar] [CrossRef]

60. Pastushenko I, Blanpain C. **EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis.** Trends Cell Biol. 2019 Mar;29(3):212-226. doi: 10.1016/j.tcb.2018.12.001. Epub 2018 Dec 26. PMID: 30594349.
61. Shen X, Zhao B. **Efficacy of PD-1 or PD-L1 inhibitors and PD-L1 expression status in cancer: meta-analysis.** BMJ. 2018 Sep 10;362: k3529. doi: 10.1136/bmj. k3529. PMID: 30201790; PMCID: PMC6129950.
62. Armitage P, Doll R. **A two-stage theory of carcinogenesis in relation to the age distribution of human cancer.** Br J Cancer. 1957;11(2):161-9.
63. Armitage P, Doll R. **The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis.** Br J Cancer. 1954;8(1):1-12.
64. Frank SA. **Commentary: Mathematical models of cancer progression and epidemiology in the age of high throughput genomics.** Int J Epidemiol. 2004;33(6):1179-81.
65. Moolgavkar SH. **Commentary: Fifty years of the multistage model: remarks on a landmark paper.** Int J Epidemiol. 2004;33(6):1182-3.
66. Pike MC, Krailo MD, Henderson BE, Casagrande JT, Hoel DG. **'Hormonal' risk factors, 'breast tissue age' and the age-incidence of breast cancer.** Nature. 1983;303(5920):767-70.
67. Pathak DR, Whittemore AS. **Combined effects of body size, parity, and menstrual events on breast cancer incidence in seven countries.** Am J Epidemiol. 1992;135(2):153-68

68. Anderson WF, Rosenberg PS, Prat A, Perou CM, Sherman ME. **How many etiological subtypes of breast cancer: two, three, four, or more?** *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(8):36. Reis-Filho JS, Pusztai L.
69. **Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction.** *Lancet.* 2011;378(9805):1812-23.
70. Bonnet D, Dick JE. **Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell.** *Nat Med.* 1997;3(7):730-7.
71. Nowell PC. **The clonal evolution of tumor cell populations.** *Science.* 1976;194(4260):23-8.
72. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. **Stem cells, cancer, and cancer stem cells.** *Nature.* 2001;414(6859):105-11.
73. Campbell LL, Polyak K. **Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution?** *Cell cycle (Georgetown, Tex).* 2007;6(19):2332-8.
74. Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC. **Cancer as an evolutionary and ecological process.** *Nat Rev Cancer.* 2006;6(12):924-35.
75. Turner NC, Reis-Filho JS. **Genetic heterogeneity and cancer drug resistance.** *Lancet Oncol.* 2012;13(4):e178-85.
76. Klevebring D, Rosin G, Ma R, Lindberg J, Czene K, Kere J, et al. **Sequencing of breast cancer stem cell populations indicates a dynamic conversion between differentiation states in vivo.** *Breast Cancer Res.* 2014;16(4): R72

77. Wellings SR, Jensen HM, Marcum RG. **An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions.** J Natl Cancer Inst. 1975;55(2):231-73.
78. Reis-Filho JS, Simpson PT, Gale T, Lakhani SR. **The molecular genetics of breast cancer: the contribution of comparative genomic hybridization.** Pathol Res Pract. 2005;201(11):713-25.
79. Simpson PT, Reis-Filho JS, Gale T, Lakhani SR. **Molecular evolution of breast cancer.** J Pathol. 2005 ;205(2):248-54.
80. Ma XJ, Salunga R, Tuggle JT, Gaudet J, Enright E, McQuary P, et al. **Gene expression profiles of human breast cancer progression.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(10):5974-9.
81. Balleine RL, Webster LR, Davis S, Salisbury EL, Palazzo JP, Schwartz GF, et al. **Molecular grading of ductal carcinoma in situ of the breast.** Clin Cancer Res. 2008 ;14(24):8244-52.
82. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. **Molecular portraits of human breast tumours.** Nature. 2000 ;406(6797):747-52.
83. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. **Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(19):10869-74.
84. Hu Z, Fan C, Oh DS, Marron JS, He X, Qaqish BF, et al. **The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms.** BMC Genomics. 2006;7:96
85. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. **Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites.** Nat Rev Cancer. 2002;2(8):563-72. 64. Disibio G, French SW. Metastatic

patterns of cancers: results from a large autopsy study. *Arch Pathol Lab Med*. 2008;132(6):931-9.

86. Cummings MC, Simpson PT, Reid LE, Jayanthan J, Skerman J, Song S, et al. **Metastatic progression of breast cancer: insights from 50 years of autopsies.** *J Pathol*. 2014;232(1):23-31.
87. Anders CK, Carey LA. **Biology, metastatic patterns, and treatment of patientes with triple-negative breast cancer.** *Clin Breast Cancer*. 2009;9 Suppl 2(Suppl 2):S73-S81.
88. Ullah I, Karthik GM, Alkodsí A, Kjallquist U, Stalhammar G, Lovrot J, et al. **Evolutionary history of metastatic breast cancer reveals minimal seeding from axillary lymph nodes.** *J Clin Invest*. 2018;128(4):1355-70.
89. Fiorica JV. **Breast Cancer Screening, Mammography, and Other Modalities.** *Clin Obstet Gynecol*. 2016 Dec;59(4):688-709. doi: 10.1097/GRF.0000000000000246. PMID: 27741212.
90. Løberg M, Lousdal ML, Bretthauer M, Kalager M. Benefits and harms of mammography screening. **Breast Cancer Res**. 2015 May 1;17(1):63. doi: 10.1186/s13058-015-0525-z. PMID: 25928287; PMCID: PMC4415291.
91. Rodriguez-Ruiz A, Lång K, Gubern-Merida A, Broeders M, Gennaro G, Clauser P, Helbich TH, Chevalier M, Tan T, Mertelmeier T, Wallis MG, Andersson I, Zackrisson S, Mann RM, Sechopoulos I. Stand-Alone **Artificial Intelligence for Breast Cancer Detection in Mammography: Comparison With 101 Radiologists.** *J Natl Cancer Inst*. 2019 Sep 1;111(9):916-922. doi: 10.1093/jnci/djy222. PMID: 30834436; PMCID: PMC6748773.

92. **National care program breast cancer** [internet]. Regional Cancer Center; 2020 [Aug 15, 2020]. Available from: <https://www.cancercentrum.se/samverkan/cancerdiagnoser/brost/vardprogram/>
93. **National quality registry for breast cancer (NKBC), annual report 2019** [Internet]. Regional Cancer Center.; 2020 [July 19, 2020]. Available from: <https://statistik.incanet.se/brostcancer/>.
94. Marmot MG, Altman DG, Cameron DA, Dewar JA, Thompson SG, Wilcox M. **The benefits and harms of breast cancer screening: an independent review.** *Br J Cancer.* 2013;108(11):2205-40
95. Chong A, Weinstein SP, McDonald ES, Conant EF. **Digital Breast Tomosynthesis: Concepts and Clinical Practice.** *Radiology.* 2019 Jul;292(1):1-14. doi: 10.1148/radiol.2019180760. Epub 2019 May 14. PMID: 31084476; PMCID: PMC6604796.
96. Lotter W, Diab AR, Haslam B, Kim JG, Grisot G, Wu E, Wu K, Onieva JO, Boyer Y, Boxerman JL, Wang M, Bandler M, Vijayaraghavan GR, Gregory Sorensen A. **Robust breast cancer detection in mammography and digital breast tomosynthesis using an annotation-efficient deep learning approach.** *Nat Med.* 2021 Feb;27(2):244-249. doi: 10.1038/s41591-020-01174-9. Epub 2021 Jan 11. PMID: 33432172; PMCID: PMC9426656.
97. Comstock CE, Gatsonis C, Newstead GM, Snyder BS, Gareen IF, Bergin JT, Rahbar H, Sung JS, Jacobs C, Harvey JA, Nicholson MH, Ward RC, Holt J, Prather A, Miller KD, Schnall MD, Kuhl CK. **Comparison of Abbreviated Breast MRI vs Digital Breast Tomosynthesis for Breast Cancer Detection Among Women With Dense Breasts Undergoing Screening.** *JAMA.* 2020 Feb 25;323(8):746-756. doi: 10.1001/jama.2020.0572. Erratum in: *JAMA.* 2020 Mar 24;323(12):1194. PMID: 32096852; PMCID: PMC7276668.

98. Liberatore M, Cucchi JM, Fighiera M, Binet A, Missana MC, Brunner P, Mourou MY, Iannessi A. **Interest of systematic tomosynthesis (3D mammography) with synthetic 2D mammography in breast cancer screening.** *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2017 Dec 16;32(2):j/hmbci.2017.32.issue-2/hmbci-2017-0024/hmbci-2017-0024.xml. doi: 10.1515/hmbci-2017-0024. PMID: 29252195.
99. Penny SM. **Sonography of Benign and Malignant Breast Lesions.** *Radiol Technol.* 2021 Sep;93(1):75M-91M. PMID: 34588289.
100. Choudhery S, Xiao L, Zingula S. **Review of Nonmammary Metastases to the Breast: Imaging and Clinical Presentation.** *Curr Probl Diagn Radiol.* 2021 Jul-Aug;50(4):495-498. doi: 10.1067/j.cpradiol.2020.04.010. Epub 2020 May 17. PMID: 32534793.
101. Naeem M, Zulfiqar M, Ballard DH, Billadello L, Cao G, Winter A, Lowdermilk M. **"The unusual suspects"-Mammographic, sonographic, and histopathologic appearance of atypical breast masses.** *Clin Imaging.* 2020 Oct;66:111-120. doi: 10.1016/j.clinimag.2020.04.039. Epub 2020 May 3. PMID: 32470708; PMCID: PMC7415612.
102. Verma P, Sharma R, Sharma N, Gulati A, Parashar A, Kaundal A. **Fine-Needle Aspiration Cytology versus Core-Needle Biopsy for Breast Lesions: A Dilemma of Superiority between the Two.** *Acta Cytol.* 2021;65(5):411-416. doi: 10.1159/000517005. Epub 2021 Jun 30. PMID: 34192704.
103. Wang M, He X, Chang Y, Sun G, Thabane L. **A sensitivity and specificity comparison of fine needle aspiration cytology and core needle biopsy in evaluation of suspicious breast lesions: A systematic review and meta-analysis.** *Breast.* 2017 Feb;31:157-166. doi: 10.1016/j.breast.2016.11.009. Epub 2016 Nov 17. PMID: 27866091.

104. Nggada HA, Tahir MB, Musa AB, Gali BM, Mayun AA, Pindiga UH, Yawe KD, Khalil MI. **Correlation between histopathologic and fine needle aspiration cytology diagnosis of palpable breast lesions: a five-year review.** *Afr J Med Med Sci.* 2007 Dec;36(4):295-8. PMID: 18564643.
105. Liu Q, Qi Y, Kong X, Wang X, Zhang W, Zhai J, Yang Y, Fang Y, Wang J. **Molecular and Clinical Characterization of CCT2 Expression and Prognosis via Large-Scale Transcriptome Profile of Breast Cancer.** *Front Oncol.* 2021 Apr 2;11:614497. doi: 10.3389/fonc.2021.614497. PMID: 33869000; PMCID: PMC8050343.
106. Wang J, Ma G, Ge H, Han X, Mao X, Wang X, Veeramootoo JS, Xia T, Liu X, Wang S. **Circulating tRNA-derived small RNAs (tsRNAs) signature for the diagnosis and prognosis of breast cancer.** *NPJ Breast Cancer.* 2021 Jan 5;7(1):4. doi: 10.1038/s41523-020-00211-7. PMID: 33402674; PMCID: PMC7785726.
107. Giulianelli S, Riggio M, Guillardoy T, Pérez Piñero C, Gorostiaga MA, Sequeira G, Pataccini G, Abascal MF, Toledo MF, Jacobsen BM, Guerreiro AC, Barros A, Novaro V, Monteiro FL, Amado F, Gass H, Abba M, Helguero LA, Lanari C. **FGF2 induces breast cancer growth through ligand-independent activation and recruitment of ER α and PRBA4 isoform to MYC regulatory sequences.** *Int J Cancer.* 2019 Oct 1;145(7):1874-1888. doi: 10.1002/ijc.32252. Epub 2019 Mar 28. PMID: 30843188.
108. Hirashima T, Tamura Y, Han Y, Hashimoto S, Tanaka A, Shiroyama T, Morishita N, Suzuki H, Okamoto N, Akada S, Fujishima M, Kadota Y, Sakata K, Nishitani A, Miyazaki S, Nagai T. **Efficacy and safety of concurrent anti-Cancer and anti-tuberculosis chemotherapy in Cancer patientes with active Mycobacterium tuberculosis: a retrospective study.** *BMC Cancer.* 2018 Oct 12;18(1):975. doi: 10.1186/s12885-018-4889-1. PMID: 30314434; PMCID: PMC6186130.

109. Khan SA, Bhandare D, Chatterton RT Jr. **The local hormonal environment and related biomarkers in the normal breast.** *Endocr Relat Cancer*. 2005 Sep;12(3):497-510. doi: 10.1677/erc.1.00732. PMID: 16172189.
110. Tang SN, Zuber V, Tsilidis KK. **Identifying and ranking causal biochemical biomarkers for breast cancer: a Mendelian randomisation study.** *BMC Med*. 2022 Nov 23;20(1):457. doi: 10.1186/s12916-022-02660-2. PMID: 36424572; PMCID: PMC9685978.
111. Yoshioka T, Hosoda M, Yamamoto M, Taguchi K, Hatanaka KC, Takakuwa E, Hatanaka Y, Matsuno Y, Yamashita H. **Prognostic significance of pathologic complete response and Ki67 expression afterneoadjuvant chemotherapy in breast cancer.** *Breast Cancer*. 2015 Mar;22(2):185-91. doi: 10.1007/s12282-013-0474-2. Epub 2013 May 5. PMID: 23645542.
112. Cairat M, Rinaldi S, Navionis AS, Romieu I, Biessy C, Viallon V, Olsen A, Tjønneland A, Fournier A, Severi G, Kvaskoff M, Fortner RT, Kaaks R, Aleksandrova K, Schulze MB, Masala G, Tumino R, Sieri S, Grasso C, Mattiello A, Gram IT, Olsen KS, Agudo A, Etxezarreta PA, Sánchez MJ, Santiuste C, Barricarte A, Monninkhof E, Hiensch AE, Muller D, Merritt MA, Travis RC, Weiderpass E, Gunter MJ, Dossus L. **Circulating inflammatory biomarkers, adipokines and breast cancer risk-a case-control study nested within the EPIC cohort.** *BMC Med*. 2022 Apr 18;20(1):118. doi: 10.1186/s12916-022-02319-y. PMID: 35430795; PMCID: PMC9014562.
113. Bauwens J, Azaïs H, Devouge P, Phalippou J, Boulanger L, Collinet P. **Place de l'oncoplastie dans la prise en charge des carcinomes canauxaires in situ [Oncoplastic breast surgery for the management of ductal carcinoma *in situ*].** *Gynecol Obstet Fertil*. 2015 Nov;43(11):735-9. French. doi: 10.1016/j.gyobfe.2015.08.001. Epub 2015 Sep 14. PMID: 26381930.

114. Modesto A, Gandy C, Mery E, Filleron T, Massabeau C, Izar F, Charitansky H, Roché H, de Lafontan B. **Carcinome canalaire *in situ* avec micro-invasion : spécificités anatomopathologiques et implications cliniques [Breast ductal carcinoma *in situ* with microinvasion: pathological review and clinical implications]**. Cancer Radiother. 2014 Mar;18(2):107-10. French. doi: 10.1016/j.canrad.2013.12.007. Epub 2014 Mar 14. PMID: 24637020.
115. Le Bouëdec G, de Lapasse C, Mishellany F, Chêne G, Michy T, Gimbergues P, Dauplat J. **Cancer canalaire *in situ* du sein avec micro-invasion. Place du ganglion sentinelle [Ductal carcinoma *in situ* of the breast with microinvasion. Role of sentinel lymph node biopsy]**. Gynecol Obstet Fertil. 2007 Apr;35(4):317-22. French. doi: 10.1016/j.gyobfe.2006.12.024. Epub 2007 Mar 6. PMID: 17344087.
116. **Types histologiques des tumeurs du sein deuxième édition Organisation Mondiale de la Santé Genève, 1981 [Histological typing of breast tumors. Second edition. World Health Organization. Geneva, 1981]**. Ann Pathol. 1982;2(2):91-105. French. PMID: 7104074.
117. Trapani D, Ginsburg O, Fadelu T, Lin NU, Hassett M, Ilbawi AM, Anderson BO, Curigliano G. **Global challenges and policy solutions in breast cancer control**. Cancer Treat Rev. 2022 Mar;104:102339. doi: 10.1016/j.ctrv.2022.102339. Epub 2022 Jan 19. PMID: 35074727.
118. Ayadi EZ, Cherif B, Ben Hamed Y, Mokni M, Rebai A, Ayadi H, Jlidi R. **Prognostic Value of BCL2 in Women Patientes with Invasive Breast Cancer**. Asian Pac J Cancer Prev. 2018 Dec 25;19(12):3557-3564. doi: 10.31557/APJCP.2018.19.12.3557. PMID: 30583683; PMCID: PMC6428546.
119. Bergeron A, MacGrogan G, Bertaut A, Ladoire S, Arveux P, Desmoulins I, Bonnefoi H, Loustalot C, Auriol S, Beltjens F, Degrolard-Courcet E, Charon-Barra C, Richard C, Boidot R, Arnould L. **Triple-negative breast lobular carcinoma: a luminal**

- androgen receptor carcinoma with specific ESRRA mutations.** *Mod Pathol.* 2021 Jul;34(7):1282-1296. doi: 10.1038/s41379-021-00742-9. Epub 2021 Mar 22. PMID: 33753865; PMCID: PMC8216909.
120. Li J, Chen Z, Su K, Zeng J. **Clinicopathological classification and traditional prognostic indicators of breast cancer.** *Int J Clin Exp Pathol.* 2015 Jul 1;8(7):8500-5. PMID: 26339424; PMCID: PMC4555752.
121. Sawaki M, Shien T, Iwata H. **TNM classification of malignant tumors (Breast Cancer Study Group).** *Jpn J Clin Oncol.* 2019 Mar 1;49(3):228-231. doi: 10.1093/jjco/hyy182. PMID: 30541035.
122. Cserni G, Chmielik E, Cserni B, Tot T. **The new TNM-based staging of breast cancer.** *Virchows Arch.* 2018 May;472(5):697-703. doi: 10.1007/s00428-018-2301-9. Epub 2018 Jan 27. PMID: 29380126.
123. Mercante G, Gaino F, Giannitto C, Ferrelli F, De Virgilio A, Franzese C, Marrari A, Malvezzi L, Colombo G, Scorsetti M, Spriano G. **Discrepancies between UICC and AJCC TNM classifications for oral cavity tumors in the 8th editions and following versions.** *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2022 Jan;279(1):527-531. doi: 10.1007/s00405-021-06964-6. Epub 2021 Jul 2. PMID: 34213607.
124. Abbasvandi F, Bayat M, Akbari A, Shojaeian F, Zandi A, Rahmani J, Hashemi MO, Akbari ME. **Tumor characteristics and survival rate of HER2-low breast cancer patientes: a retrospective cohort study.** *Sci Rep.* 2023 Oct 4;13(1):16719. doi: 10.1038/s41598-023-43186-8. PMID: 37794050; PMCID: PMC10550984.
125. Marchiò C, et al. *Seminars in Cancer Biology.* Elsevier; 2021. **Evolving Concepts in HER2 Evaluation in Breast Cancer: Heterogeneity, HER2-Low Carcinomas and Beyond;** pp. 123–135. – PubMed

126. Takada M, Toi M. **Neoadjuvant treatment for HER2-positive breast cancer.** *Chin Clin Oncol.* 2020 Jun;9(3):32. doi: 10.21037/cco-20-123. Epub 2020 Jun 3. PMID: 32527117.
127. Penault-Llorca F, Radosevic-Robin N. **Biomarkers of residual disease after neoadjuvant therapy for breast cancer.** *Nat Rev Clin Oncol.* 2016 Aug;13(8):487-503. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.1. Epub 2016 Feb 9. PMID: 26856744.
128. Chávez-MacGregor M, González-Angulo AM. **Breast cancer, neoadjuvant chemotherapy and residual disease.** *Clin Transl Oncol.* 2010 Jul;12(7):461-7. doi: 10.1007/s12094-010-0538-0. PMID: 20615822.
129. Valenza C, Trapani D, Curigliano G. **Circulating tumour DNA dynamics for assessment of molecular residual disease and for intercepting resistance in breast cancer.** *Curr Opin Oncol.* 2022 Nov 1;34(6):595-605. doi: 10.1097/CCO.0000000000000905. Epub 2022 Sep 7. PMID: 36083118.
130. Zagami P, Carey LA. **Triple negative breast cancer: Pitfalls and progress.** *NPJ Breast Cancer.* 2022 Aug 20;8(1):95. doi: 10.1038/s41523-022-00468-0. PMID: 35987766; PMCID: PMC9392735.
131. Li X, Yang J, Peng L, Sahin AA, Huo L, Ward KC, O'Regan R, Torres MA, Meisel JL. **Triple-negative breast cancer has worse overall survival and cause-specific survival than non-triple-negative breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat.* 2017 Jan;161(2):279-287. doi: 10.1007/s10549-016-4059-6. Epub 2016 Nov 25. PMID: 27888421.
132. Zhou Y, Tian Q, Wang BY, Yang J, Zhao SD, Yang J. **The prognostic significance of TILs as a biomarker in triple-negative breast cancer: what is the role of TILs in TME of LE CANCER DU SEIN TRIPLE NÉGATIF?** *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2021 Apr;25(7):2885-2897. doi: 10.26355/eurrev_202104_25542. PMID: 33877653.

133. Maughan KL, Lutterbie MA, Ham PS. **Treatment of breast cancer.** *Am Fam Physician.* 2010 Jun 1;81(11):1339-46. PMID: 20521754.
134. Fisusi FA, Akala EO. **Drug Combinations in Breast Cancer Therapy.** *Pharm Nanotechnol.* 2019;7(1):3-23. doi: 10.2174/2211738507666190122111224. PMID: 30666921; PMCID: PMC6691849.
135. Kerr AJ, Dodwell D, McGale P, Holt F, Duane F, Mannu G, Darby SC, Taylor CW. **Adjuvant and neoadjuvant breast cancer treatments: A systematic review of their effects on mortality.** *Cancer Treat Rev.* 2022 Apr;105:102375. doi: 10.1016/j.ctrv.2022.102375. Epub 2022 Mar 4. PMID: 35367784; PMCID: PMC9096622.
136. Ben-Dror J, Shalamov M, Sonnenblick A. **The History of Early Breast Cancer Treatment.** *Genes (Basel).* 2022 May 27;13(6):960. doi: 10.3390/genes13060960. PMID: 35741721; PMCID: PMC9222657.
137. Prat A, Pineda E, Adamo B, Galván P, Fernández A, Gaba L, Díez M, Viladot M, Arance A, Muñoz M. **Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer.** *Breast.* 2015 Nov;24 Suppl 2:S26-35. doi: 10.1016/j.breast.2015.07.008. Epub 2015 Aug 5. PMID: 26253814.
138. Wöckel A, Albert US, Janni W, Scharl A, Kreienberg R, Stüber T. **The Screening, Diagnosis, Treatment, and Follow-Up of Breast Cancer.** *Dtsch Arztebl Int.* 2018 May 4;115(18):316-323. doi: 10.3238/arztebl.2018.0316. PMID: 29807560; PMCID: PMC5987060.
139. Pan H, Zhang K, Wang M, Ling L, Zhou W, Wang S. **Palliative Local Surgery for Locally Advanced Breast Cancer Depending on Hormone Receptor Status in Elderly Patientes.** *Clin Breast Cancer.* 2019 Feb;19(1):e247-e260. doi: 10.1016/j.clbc.2018.09.007. Epub 2018 Sep 27. PMID: 30348592.

140. Wyld L, Audisio RA, Poston GJ. **The evolution of cancer surgery and future perspectives.** *Nat Rev Clin Oncol.* 2015 Feb;12(2):115-24. doi: 10.1038/nrclinonc.2014.191. Epub 2014 Nov 11. PMID: 25384943.
141. Boughey JC, Suman VJ, Mittendorf EA, Ahrendt GM, Wilke LG, Taback B, Leitch AM, Kuerer HM, Bowling M, Flippo-Morton TS, Byrd DR, Ollila DW, Julian TB, McLaughlin SA, McCall L, Symmans WF, Le-Petross HT, Haffty BG, Buchholz TA, Nelson H, Hunt KK; **Alliance for Clinical Trials in Oncology. Sentinel lymph node surgery after neoadjuvant chemotherapy in patients with node-positive breast cancer: the ACOSOG Z1071 (Alliance) clinical trial.** *JAMA.* 2013 Oct 9;310(14):1455-61. doi: 10.1001/jama.2013.278932. PMID: 24101169; PMCID: PMC4075763.
142. Boughey JC, Ballman KV, Le-Petross HT, McCall LM, Mittendorf EA, Ahrendt GM, Wilke LG, Taback B, Feliberti EC, Hunt KK. **Identification and Resection of Clipped Node Decreases the False-negative Rate of Sentinel Lymph Node Surgery in Patients Presenting With Node-positive Breast Cancer (T0-T4, N1-N2) Who Receive Neoadjuvant Chemotherapy: Results From ACOSOG Z1071 (Alliance).** *Ann Surg.* 2016 Apr;263(4):802-7. doi: 10.1097/SLA.0000000000001375. PMID: 26649589; PMCID: PMC4777661.
143. Shah C, Bauer-Nilsen K, McNulty RH, Vicini F. **Novel radiation therapy approaches for breast cancer treatment.** *Semin Oncol.* 2020 Aug;47(4):209-216. doi: 10.1053/j.seminoncol.2020.05.003. Epub 2020 May 29. PMID: 32513420.
144. **Updates in the Treatment of Breast Cancer with Radiotherapy.** Castaneda SA, Strasser J. *Surg Oncol Clin N Am.* 2017 Jul;26(3):371-382. doi: 10.1016/j.soc.2017.01.013. Epub 2017 May 11 PMID: 28576177 Review.

145. **Advances in Breast Cancer Radiotherapy: Implications for Current and Future Practice.** Shah C, Al-Hilli Z, Vicini F. *JCO Oncol Pract.* 2021 Dec;17(12):697-706. doi: 10.1200/OP.21.00635. Epub 2021 Oct 15. PMID: 34652952
146. Zhang A, Wang X, Fan C, Mao X. The Role of Ki67 in **Evaluating Neoadjuvant Endocrine Therapy of Hormone Receptor-Positive Breast Cancer.** *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021 Nov 3;12:687244. doi: 10.3389/fendo.2021.687244. PMID: 34803903; PMCID: PMC8597938.
147. Reinbolt RE, Mangini N, Hill JL, Levine LB, Dempsey JL, Singaravelu J, Koehler KA, Talley A, Lustberg MB. Endocrine therapy in breast cancer: **the neoadjuvant, adjuvant, and metastatic approach.** *Semin Oncol Nurs.* 2015 May;31(2):146-55. doi: 10.1016/j.soncn.2015.02.002. Epub 2015 Feb 17. PMID: 25951743.
148. Glassman D, Hignett S, Rehman S, Linforth R, Salhab M. **Adjuvant Endocrine Therapy for Hormone-positive Breast Cancer, Focusing on Ovarian Suppression and Extended Treatment: An Update.** *Anticancer Res.* 2017 Oct;37(10):5329-5341. doi: 10.21873/anticancer.11959. PMID: 28982841.
149. Arpino G, De Angelis C, Giuliano M, Giordano A, Falato C, De Laurentiis M, De Placido S. **Molecular mechanism and clinical implications of endocrine therapy resistance in breast cancer.** *Oncology.* 2009;77 Suppl 1:23-37. doi: 10.1159/000258493. Epub 2010 Feb 2. PMID: 20130429.
150. Tevaarwerk AJ, Wisinski KB, O'Regan RM. **Endocrine Therapy in Premenopausal Hormone Receptor-Positive Breast Cancer.** *J Oncol Pract.* 2016 Nov;12(11):1148-1156. doi: 10.1200/JOP.2016.016865. PMID: 27858538; PMCID: PMC6469352.
151. Leon-Ferre RA, Hieken TJ, Boughey JC. **The Landmark Series: Neoadjuvant Chemotherapy for Triple-Negative and HER2-Positive Breast Cancer.** *Ann Surg*

Oncol. 2021 Apr;28(4):2111-2119. doi: 10.1245/s10434-020-09480-9. Epub 2021 Jan 23. PMID: 33486641; PMCID: PMC8818316.

152. Characterization of Weakly Hormone Receptor (HR)-Positive, **HER2-Negative Breast Cancer and Current Treatment Strategies**. Poterala JE, Havighurst T, Braun Wisinski K. Clin Breast Cancer. 2022 Aug;22(6):611-618. doi: 10.1016/j.clbc.2022.05.001. Epub 2022 May 5. PMID: 35676188
153. **The Evolving Role of Neoadjuvant Therapy for Operable Breast Cancer**. Spring LM, Bar Y, Isakoff SJ. J Natl Compr Canc Netw. 2022 Jun;20(6):723-734. doi: 10.6004/jnccn.2022.7016. PMID: 35714678 Review.
154. **Prognostic value of Ki67 expression in HR-negative breast cancer before and after neoadjuvant chemotherapy**. Tan QX, Qin QH, Yang WP, Mo QG, Wei CY. Int J Clin Exp Pathol. 2014 Sep 15;7(10):6862-70. eCollection 2014. PMID: 25400769 Free PMC article.
155. **Relationship Between Breast and Axillary Pathologic Complete Response in Women Receiving Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer**. Lim DW, Greene BD, Look Hong NJ.
156. Ann Surg Oncol. 2021 Oct;28(10):5495-5506. doi: 10.1245/s10434-021-10519-8. Epub 2021 Aug 10. PMID: 34374914
157. Provenzano E. **Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer: Moving Beyond Pathological Complete Response in the Molecular Age**. Acta Med Acad. 2021 Apr;50(1):88-109. doi: 10.5644/ama2006-124.328. PMID: 34075766.
158. **Conservative surgery after neoadjuvant chemotherapy in patientes with operable breast cancer**. Franceschini G, Di Leone A, Natale M, Sanchez MA, Masett R. Ann Ital Chir. 2018;89:290. PMID: 30352955

159. Bergh J. **Adjuvant chemotherapy for breast cancer--"one fits all"?** *Breast.* 2005 Dec;14(6):564-9. doi: 10.1016/j.breast.2005.08.020. Epub 2005 Oct 21. PMID: 16243525.
160. **Polychemotherapy for early breast cancer: results from the international adjuvant breast cancer chemotherapy randomized trial.** Adjuvant Breast Cancer Trials Collaborative Group. *J Natl Cancer Inst.* 2007 Apr 4;99(7):506-15. doi: 10.1093/jnci/djk108. PMID: 17405995 Clinical Trial.
161. Hulst MB, Grocholski T, Neefjes JJC, van Wezel GP, Metsä-Ketelä M. **Anthracyclines: biosynthesis, engineering and clinical applications.** *Nat Prod Rep.* 2022 Apr 20;39(4):814-841. doi: 10.1039/d1np00059d. PMID: 34951423.
162. **Anthracyclines as Topoisomerase II Poisons: From Early Studies to New Perspectives.** Marinello J, Delcuratolo M, Capranico G. *Int J Mol Sci.* 2018 Nov 6;19(11):3480. doi: 10.3390/ijms19113480. PMID: 30404148 Free PMC article. Review.
163. Corremans R, Adão R, De Keulenaer GW, Leite-Moreira AF, Brás-Silva C. **Update on pathophysiology and preventive strategies of anthracycline-induced cardiotoxicity.** *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2019 Mar;46(3):204-215. doi: 10.1111/1440-1681.13036. Epub 2018 Oct 30. PMID: 30244497.
164. Mattioli R, Ilari A, Colotti B, Mosca L, Fazi F, Colotti G. **Doxorubicin and other anthracyclines in cancers: Activity, chemoresistance and its overcoming.** *Mol Aspects Med.* 2023 Oct;93:101205. doi: 10.1016/j.mam.2023.101205. Epub 2023 Jul 27. PMID: 37515939.
165. **Doxorubicin and Aclarubicin: Shuffling Anthracycline Glycans for Improved Anticancer Agents.** Wander DPA, van der Zanden SY, van der Marel GA, Overkleeft HS,

- Neefjes J, Codée JDC. *J Med Chem.* 2020 Nov 12;63(21):12814-12829. doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c01191. Epub 2020 Oct 16. PMID: 33064004 Free PMC article.
166. Herbst RS, Khuri FR. **Mode of action of docetaxel - a basis for combination with novel anticancer agents.** *Cancer Treat Rev.* 2003 Oct;29(5):407-15. doi: 10.1016/s0305-7372(03)00097-5. PMID: 12972359.
167. **Docetaxel in breast cancer and a rationale for combination therapy.** Hortobágyi G. *Oncology (Williston Park).* 1997 Jun;11(6 Suppl 6):11-5. PMID: 9213321 Review.
168. Fisher, B., Redmond, C. K. & Fisher, E. R. **Evolution of knowledge related to breast cancer heterogeneity: a 25-year retrospective.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26, 2068-2071, doi:10.1200/JCO.2007.14.1804 (2008).
169. Allott, E. H. et al. **Intratumoral heterogeneity as a source of discordance in breast cancer biomarker classification.** *Breast Cancer Res* 18, 68, doi:10.1186/s13058-016-0725-1 (2016).
170. Turashvili, G. & Brogi, E. **Tumor Heterogeneity in Breast Cancer.** *Frontiers in medicine* 4, 227, doi:10.3389/fmed.2017.00227 (2017).
171. Jamal-Hanjani, M., Quezada, S. A., Larkin, J. & Swanton, C. **Translational implications of tumor heterogeneity.** *Clin Cancer*
172. Krupp, L. B. & Pollina, D. A. **Mechanisms and management of fatigue in progressive Neurological disorders.** *Current opinion in neurology* 9, 456-460, doi:10.1097/00019052-199612000-00011 (1996).

173. Plym, A. et al. **Impact of chemotherapy, radiotherapy, and endocrine therapy on sick leave in women with early-stage breast cancer during a 5-year period: a population-based cohort study.** *Breast cancer research and treatment*, doi:10.1007/s10549-020-05720-4 (2020).
174. Bower, J. E. et al. **Fatigue in long-term breast carcinoma survivors: a longitudinal investigation.** *Cancer* 106, 751-758, doi:10.1002/cncr.21671 (2006).
175. Economics, O. **Kreft i Norge — kostnader for pasientene, helsetjenesten og samfunnet.** (Oslo, Norway, 2016).
176. Mehraj U, Dar AH, Wani NA, Mir MA. **Tumor microenvironment promotes breast cancer chemoresistance.** *Cancer Chemother Pharmacol.* 2021 Feb;87(2):147-158. doi: 10.1007/s00280-020-04222-w. Epub 2021 Jan 9. PMID: 33420940.
177. Ahmadpour ST, Orre C, Bertevello PS, Mirebeau-Prunier D, Dumas JF, Desquirit-Dumas V. **Breast Cancer Chemoresistance: Insights into the Regulatory Role of lncRNA.** *Int J Mol Sci.* 2023 Nov 2;24(21):15897. doi: 10.3390/ijms242115897. PMID: 37958880; PMCID: PMC10650504.
178. Thakur K.K., Kumar A., Banik K., Verma E., Khatoon E., Harsha C., Sethi G., Gupta S.C., Kunnumakkara A.B. **Long noncoding RNAs in triple-negative breast cancer: A new frontier in the regulation of tumorigenesis.** *J. Cell. Physiol.* 2021;236:7938–7965. doi: 10.1002/jcp.30463. - DOI – PubMed
179. Goldhirsch A., Wood W.C., Coates A.S., Gelber R.D., Thürlimann B., Senn H.-J., Panel Members **Strategies for subtypes—Dealing with the diversity of breast cancer: Highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011.** *Ann. Oncol.* 2011;22:1736–1747. doi: 10.1093/annonc/mdr304. - DOI - PMC – PubMed

180. Mehraj U, Dar AH, Wani NA, Mir MA. **Tumor microenvironment promotes breast cancer chemoresistance.** *Cancer Chemother Pharmacol.* 2021 Feb;87(2):147-158. doi: 10.1007/s00280-020-04222-w. Epub 2021 Jan 9. PMID: 33420940.
181. Mesquita-Neto JW, Manoharan J, Dailey W, Macedo FI, Merchant NB. **National Institutes of Health Research Funding to Academic Surgical Oncologists: Who Are We and Where Do We Stand?** *Ann Surg Oncol.* 2021 Aug;28(8):4195-4202. doi: 10.1245/s10434-020-09495-2. Epub 2021 Jan 11. PMID: 33432489.
182. Wu L, Qu X. **Cancer biomarker detection: recent achievements and challenges.** *Chem Soc Rev.* 2015 May 21;44(10):2963-97. doi: 10.1039/c4cs00370e. Epub 2015 Mar 5. PMID: 25739971.
183. Hristova VA, Chan DW. **Cancer biomarker discovery and translation: proteomics and beyond.** *Expert Rev Proteomics.* 2019 Feb;16(2):93-103. doi: 10.1080/14789450.2019.1559062. Epub 2018 Dec 24. PMID: 30556752; PMCID: PMC6635916.
184. **Innovative methods for biomarker discovery in the evaluation and development of cancer precision therapies.** Umelo IA, Costanza B, Castronovo V. *Cancer Metastasis Rev.* 2018 Mar;37(1):125-145. doi: 10.1007/s10555-017-9710-0. PMID: 29392535 Review.
185. Zou J, Wang E. **Cancer Biomarker Discovery for Precision Medicine: New Progress.** *Curr Med Chem.* 2019;26(42):7655-7671. doi: 10.2174/0929867325666180718164712. PMID: 30027846.
186. Bradshaw SH, Pidutti D, Gravel DH, Song X, Marginean EC, Robertson SJ. **Predicting OncoDx recurrence scores with immunohistochemical markers.** *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2013 Dec;21(6):490-6. doi: 10.1097/PAI.0b013e3182810b8e. PMID: 23455176.

187. Dubsy P, Van't Veer L, Gnant M, Rudas M, Bago-Horvath Z, Greil R, Lujinovic E, Buresch J, Rinnerthaler G, Hulla W, Moinfar F, Egle D, Herz W, Dreezen C, Frantal S, Filipits M. **A clinical validation study of MammaPrint in hormone receptor-positive breast cancer from the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group 8 (ABC SG-8) biomarker cohort.** *ESMO Open.* 2021 Feb;6(1):100006. doi: 10.1016/j.esmoop.2020.100006. Epub 2020 Dec 31. PMID: 33399073; PMCID: PMC7807937.
188. Andre F, Ismaila N, Allison KH, Barlow WE, Collyar DE, Damodaran S, Henry NL, Jhaveri K, Kalinsky K, Kuderer NM, Litvak A, Mayer EL, Puztai L, Raab R, Wolff AC, Stearns V. **Biomarkers for Adjuvant Endocrine and Chemotherapy in Early-Stage Breast Cancer: ASCO Guideline Update.** *J Clin Oncol.* 2022 Jun 1;40(16):1816-1837. doi: 10.1200/JCO.22.00069. Epub 2022 Apr 19. Erratum in: *J Clin Oncol.* 2022 Aug 1;40(22):2514. PMID: 35439025.
189. Best MG, Wesseling P, Wurdinger T. **Tumor-Educated Platelets as a Noninvasive Biomarker Source for Cancer Detection and Progression Monitoring.** *Cancer Res.* 2018 Jul 1;78(13):3407-3412. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0887. Epub 2018 Jun 19. PMID: 29921699.
190. Mahdavi M, Nassiri M, Kooshyar MM, Vakili-Azghandi M, Avan A, Sandry R, Pillai S, Lam AK, Gopalan V. **Hereditary breast cancer; Genetic penetrance and current status with BRCA.** *J Cell Physiol.* 2019 May;234(5):5741-5750. doi: 10.1002/jcp.27464. Epub 2018 Dec 14. PMID: 30552672.
191. Huang YH, Chu PY, Chen JL, Huang CT, Huang CC, Tsai YF, Wang YL, Lien PJ, Tseng LM, Liu CY. **Expression pattern and prognostic impact of glycoprotein non-metastatic B (GPNMB) in triple-negative breast cancer.** *Sci Rep.* 2021 Jun 9;11(1):12171. doi: 10.1038/s41598-021-91588-3. PMID: 34108545; PMCID: PMC8190094.

192. Taya M, Hammes SR. **Glycoprotein Non-Metastatic Melanoma Protein B (GPNMB) and Cancer: A Novel Potential Therapeutic Target.** *Steroids*. 2018 May;133:102-107. doi: 10.1016/j.steroids.2017.10.013. Epub 2017 Oct 31. PMID: 29097143; PMCID: PMC6166407.
193. Zhuo H, Zhou L. **Gpnmb/osteoactivin: an indicator and therapeutic target in tumor and nontumorous lesions.** *Pharmazie*. 2016 Oct 1;71(10):555-561. doi: 10.1691/ph.2016.6683. PMID: 29441921.
194. Maric G, Rose AA, Annis MG, Siegel PM. **Glycoprotein non-metastatic b (GPNMB): A metastatic mediator and emerging therapeutic target in cancer.** *Onco Targets Ther*. 2013 Jul 9;6:839-52. doi: 10.2147/OTT.S44906. PMID: 23874106; PMCID: PMC3711880.
195. Maric G, Annis MG, MacDonald PA, Russo C, Perkins D, Siwak DR, Mills GB, Siegel PM. **GPNMB augments Wnt-1 mediated breast tumor initiation and growth by enhancing PI3K/AKT/mTOR pathway signaling and β -catenin activity.** *Oncogene*. 2019 Jun;38(26):5294-5307. doi: 10.1038/s41388-019-0793-7. Epub 2019 Mar 26. PMID: 30914799.
196. Wang B, Li M, Su A, Gao Y, Shi Y, Li C, Liu W, Su L, Li W, Ma Y. **Prognostic Value of GPNMB, EGFR, p-PI3K, and Ki-67 in Patientes with Esophageal Squamous Cell Carcinoma.** *Anal Cell Pathol (Amst)*. 2022 Aug 31;2022:9303081. doi: 10.1155/2022/9303081. PMID: 36090016; PMCID: PMC9452951.
197. Jin R, Jin YY, Tang YL, Yang HJ, Zhou XQ, Lei Z. **GPNMB silencing suppresses the proliferation and metastasis of osteosarcoma cells by blocking the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway.** *Oncol Rep*. 2018 Jun;39(6):3034-3040. doi: 10.3892/or.2018.6346. Epub 2018 Mar 30. PMID: 29620278.

198. Vahdat LT, Schmid P, Forero-Torres A, Blackwell K, Telli ML, Melisko M, Möbus V, Cortes J, Montero AJ, Ma C, Nanda R, Wright GS, He Y, Hawthorne T, Bagley RG, Halim AB, Turner CD, Yardley DA. **Glembatumumab vedotin for patients with metastatic, gpNMB overexpressing, triple-negative breast cancer ("METRIC"): a randomized multicenter study.** NPJ Breast Cancer. 2021 May 20;7(1):57. doi: 10.1038/s41523-021-00244-6. PMID: 34016993; PMCID: PMC8137923.
199. itenay D, Baron VT. **Is EGR1 a potential target for prostate cancer therapy?** Future oncology. 2009;5(7):993–1003. - PMC – PubMed
200. Krones-Herzig A, Mittal S, Yule K, Liang H, English C, Urcis R, et al. **Early growth response 1 acts as a tumor suppressor in vivo and in vitro via regulation of p53.** Cancer Res. 2005;65(12):5133–43. – PubMed
201. Yamamoto C, Basaki Y, Kawahara A, Nakashima K, Kage M, Izumi H, et al. **Loss of PTEN expression by blocking nuclear translocation of EGR1 in gefitinib-resistant lung cancer cells harboring epidermal growth factor receptor-activating mutations.** Cancer Res. 2010;70(21):8715–25. – PubMed
202. Livingston MJ, Zhang M, Kwon SH, Chen JK, Li H, Manicassamy S, Dong Z. **Autophagy activates EGR1 via MAPK/ERK to induce FGF2 in renal tubular cells for fibroblast activation and fibrosis during maladaptive kidney repair.** Autophagy. 2023 Nov 18:1-22. doi: 10.1080/15548627.2023.2281156. Epub ahead of print. PMID: 37978868.
203. Inoue K, Fry EA. **Tumor suppression by the EGR1, DMP1, ARF, p53, and PTEN Network.** Cancer Invest. 2018;36(9-10):520-536. doi: 10.1080/07357907.2018.1533965. Epub 2018 Nov 5. PMID: 30396285; PMCID: PMC6500763.

204. Chen DG, Zhu B, Lv SQ, Zhu H, Tang J, Huang C, Li Q, Zhou P, Wang DL, Li GH. **Inhibition of EGR1 inhibits glioma proliferation by targeting CCND1 promoter.** *J Exp Clin Cancer Res.* 2017 Dec 15;36(1):186. doi: 10.1186/s13046-017-0656-4. PMID: 29246166; PMCID: PMC5732438.
205. Wong KM, Song J, Wong YH. **CTCF and EGR1 suppress breast cancer cell migration through transcriptional control of Nm23-H1.** *Sci Rep.* 2021 Jan 12;11(1):491. doi: 10.1038/s41598-020-79869-9. PMID: 33436746; PMCID: PMC7804126.
206. Teleki I, Szasz AM, Maros ME, Gyorffy B, Kulka J, Meggyeshazi N, Kiszner G, Balla P, Samu A, Krenacs T. **Correlations of differentially expressed gap junction connexins Cx26, Cx30, Cx32, Cx43 and Cx46 with breast cancer progression and prognosis.** *PLoS One.* 2014 Nov 10;9(11):e112541. doi: 10.1371/journal.pone.0112541. PMID: 25383624; PMCID: PMC4226536.
207. Artesi M, Kroonen J, Bredel M, Nguyen-Khac M, Deprez M, Schoysman L, Poulet C, Chakravarti A, Kim H, Scholtens D, Seute T, Rogister B, Bours V, Robe PA. **Connexin 30 expression inhibits growth of human malignant gliomas but protects them against radiation therapy.** *Neuro Oncol.* 2015 Mar;17(3):392-406. doi: 10.1093/neuonc/nou215. Epub 2014 Aug 25. PMID: 25155356; PMCID: PMC4483098.
208. Sarver AE, Sarver AL, Thayanithy V, Subramanian S. **Identification, by systematic RNA sequencing, of novel candidate biomarkers and therapeutic targets in human soft tissue tumors.** *Lab Invest.* 2015 Sep;95(9):1077-88. doi: 10.1038/labinvest.2015.80. Epub 2015 Jun 29. PMID: 26121316.
209. Obacz J, Takacova M, Brychtova V, Dobes P, Pastorekova S, Vojtesek B, Hrstka R. **The role of AGR2 and AGR3 in cancer: similar but not identical.** *Eur J Cell Biol.* 2015 Mar-Apr;94(3-4):139-47. doi: 10.1016/j.ejcb.2015.01.002. Epub 2015 Jan 21. PMID: 25666661.

210. Zhang K, Li Y, Kong X, Lei C, Yang H, Wang N, Wang Z, Chang H, Xuan L. **AGR2: a secreted protein worthy of attention in diagnosis and treatment of breast cancer.** *Front Oncol.* 2023 May 1;13:1195885. doi: 10.3389/fonc.2023.1195885. PMID: 37197416; PMCID: PMC10183570.
211. Zhou M, Gan XL, Ren YX, Chen QX, Yang YZ, Weng ZJ, Zhang XF, Guan JX, Tang LY, Ren ZF. **AGR2 and FOXA1 as prognostic markers in ER-positive breast cancer.** *BMC Cancer.* 2023 Aug 11;23(1):743. doi: 10.1186/s12885-023-10964-6. PMID: 37568077; PMCID: PMC10416444.
212. Tian S, Chu Y, Hu J, Ding X, Liu Z, Fu D, Yuan Y, Deng Y, Wang G, Wang L, Wang Z. **Tumour-associated neutrophils secrete AGR2 to promote colorectal cancer metastasis via its receptor CD98hc-xCT.** *Gut.* 2022 Dec;71(12):2489-2501. doi: 10.1136/gutjnl-2021-325137. Epub 2022 Jan 27. PMID: 35086885.
213. Guo H, Zhu Q, Yu X, Merugu SB, Mangukiya HB, Smith N, Li Z, Zhang B, Negi H, Rong R, Cheng K, Wu Z, Li D. **Tumor-secreted anterior gradient-2 binds to VEGF and FGF2 and enhances their activities by promoting their homodimerization.** *Oncogene.* 2017 Sep 7;36(36):5098-5109. doi: 10.1038/onc.2017.132. Epub 2017 May 8. PMID: 28481872.
214. Ullah S, Khan SU, Khan A, Junaid M, Rafiq H, Htar TT, Zhao Y, Shah SAA, Wadood A. **Prospect of Anterior Gradient 2 homodimer inhibition via repurposing FDA-approved drugs using structure-based virtual screening.** *Mol Divers.* 2022 Jun;26(3):1399-1409. doi: 10.1007/s11030-021-10263-x. Epub 2021 Jun 28. PMID: 34181147.
215. Liu QG, Li YJ, Yao L. **Knockdown of AGR2 induces cell apoptosis and reduces chemotherapy resistance of pancreatic cancer cells with the involvement of**

- ERK/AKT axis.** *Pancreatology*. 2018 Sep;18(6):678-688. doi: 10.1016/j.pan.2018.07.003. Epub 2018 Jul 7. PMID: 30055941.
216. Chu CY, Chang CC, Prakash E, Kuo ML. **Connective tissue growth factor (CTGF) and cancer progression.** *J Biomed Sci*. 2008 Nov;15(6):675-85. doi: 10.1007/s11373-008-9264-9. Epub 2008 Jul 13. PMID: 18622762.
217. Shen YW, Zhou YD, Chen HZ, Luan X, Zhang WD. **Targeting CTGF in Cancer: An Emerging Therapeutic Opportunity.** *Trends Cancer*. 2021 Jun;7(6):511-524. doi: 10.1016/j.trecan.2020.12.001. Epub 2020 Dec 25. PMID: 33358571.
218. Ponticos M. **Connective tissue growth factor (CCN2) in blood vessels.** *Vascul Pharmacol*. 2013 Mar;58(3):189-93. doi: 10.1016/j.vph.2013.01.004. Epub 2013 Feb 4. PMID: 23380714.
219. Lee HS. **Paracrine role for TGF- β -induced CTGF and VEGF in mesangial matrix expansion in progressive glomerular disease.** *Histol Histopathol*. 2012 Sep;27(9):1131-41. doi: 0.14670/HH-27.1131. PMID: 22806900.
220. Zhu X, Zhong J, Zhao Z, Sheng J, Wang J, Liu J, Cui K, Chang J, Zhao H, Wong S. **Epithelial derived CTGF promotes breast tumor progression via inducing EMT and collagen I fibers deposition.** *Oncotarget*. 2015 Sep 22;6(28):25320-38. doi: 10.18632/oncotarget.4659. PMID: 26318291; PMCID: PMC4694834.
221. Kim H, Son S, Ko Y, Lee JE, Kim S, Shin I. **YAP, CTGF and Cyr61 are overexpressed in tamoxifen-resistant breast cancer and induce transcriptional repression of ER α .** *J Cell Sci*. 2021 Jun 1;134(11):jcs256503. doi: 10.1242/jcs.256503. Epub 2021 Jun 7. PMID: 34096606.

222. Chen YC, Chen BC, Yu CC, Lin SH, Lin CH. **miR-19a, -19b, and -26b Mediate CTGF Expression and Pulmonary Fibroblast Differentiation.** *J Cell Physiol.* 2016 Oct;231(10):2236-48. doi: 10.1002/jcp.25341. Epub 2016 Mar 14. PMID: 26873752.
223. Ihnen M, Kilic E, Köhler N, Löning T, Witzel I, Hagel C, Höller S, Kersten JF, Müller V, Jänicke F, Milde-Langosch K. **Protein expression analysis of ALCAM and CEACAM6 in breast cancer metastases reveals significantly increased ALCAM expression in metastases of the skin.** *J Clin Pathol.* 2011 Feb;64(2):146-52. doi: 10.1136/jcp.2010.082602. PMID: 21262777.
224. Lewis-Wambi JS, Cunliffe HE, Kim HR, Willis AL, Jordan VC. **Overexpression of CEACAM6 promotes migration and invasion of oestrogen-deprived breast cancer cells.** *Eur J Cancer.* 2008 Aug;44(12):1770-9. doi: 10.1016/j.ejca.2008.05.016. Epub 2008 Jul 7. PMID: 18614350; PMCID: PMC2778047.
225. Skubitz KM, Skubitz AP. **Two new synthetic peptides from the N-domain of CEACAM1 (CD66a) stimulate neutrophil adhesion to endothelial cells.** *Biopolymers.* 2011;96(1):25-31. doi: 10.1002/bip.21447. PMID: 20560140.
226. Balk-Møller E, Kim J, Hopkinson B, Timmermans-Wielenga V, Petersen OW, Villadsen R. **A marker of endocrine receptor-positive cells, CEACAM6, is shared by two major classes of breast cancer: luminal and HER2-enriched.** *Am J Pathol.* 2014 Apr;184(4):1198-208. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.12.013. PMID: 24655379.
227. Han SU, Kwak TH, Her KH, Cho YH, Choi C, Lee HJ, Hong S, Park YS, Kim YS, Kim TA, Kim SJ. **CEACAM5 and CEACAM6 are major target genes for Smad3-mediated TGF-beta signaling.** *Oncogene.* 2008 Jan 24;27(5):675-83. doi: 10.1038/sj.onc.1210686. Epub 2007 Jul 23. PMID: 17653079.
228. Johnson B, Mahadevan D. **Emerging Role and Targeting of Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 6 (CEACAM6) in Human Malignancies.** *Clin*

Cancer Drugs. 2015 Feb;2(2):100-111. doi: 10.2174/2212697X02666150602215823. PMID: 27595061; PMCID: PMC4997943.

229. Gonda TJ, Leo P, Ramsay RG. **Estrogen and MYB in breast cancer: potential for new therapies.** Expert Opin Biol Ther. 2008 Jun;8(6):713-7. doi: 10.1517/14712598.8.6.713. PMID: 18476782.
230. Gonda TJ, Leo P, Ramsay RG. **Estrogen and MYB in breast cancer: potential for new therapies.** Expert Opin Biol Ther. 2008 Jun;8(6):713-7. doi: 10.1517/14712598.8.6.713. PMID: 18476782.
231. Wijeratne TU, Guiley KZ, Lee HW, Müller GA, Rubin SM. **Cyclin-dependent kinase-mediated phosphorylation and the negative regulatory domain of transcription factor B-Myb modulate its DNA binding.** J Biol Chem. 2022 Sep;298(9):102319. doi: 10.1016/j.jbc.2022.102319. Epub 2022 Aug 1. PMID: 35926712; PMCID: PMC9478404.
232. Fry EA, Inoue K. **c-Myb and DMTF1 in Cancer.** Cancer Invest. 2019;37(1):46-65. doi: 10.1080/07357907.2018.1550090. Epub 2019 Jan 2. PMID: 30599775; PMCID: PMC6431554.
233. Barinfeld O, Zahavi A, Weiss S, Toledano H, Michowiz S, Goldenberg-Cohen N. **Genetic Alteration Analysis of IDH1, IDH2, CDKN2A, MYB and MYBL1 in Pediatric Low-Grade Gliomas.** Front Surg. 2022 Apr 28;9:880048. doi: 10.3389/fsurg.2022.880048. PMID: 35574540; PMCID: PMC9096721.
234. Quintana AM, Liu F, O'Rourke JP, Ness SA. **Identification and regulation of c-Myb target genes in MCF-7 cells.** BMC Cancer. 2011 Jan 25;11:30. doi: 10.1186/1471-2407-11-30. PMID: 21261996; PMCID: PMC3038977.

235. Anand S, Vikramdeo KS, Sudan SK, Sharma A, Acharya S, Khan MA, Singh S, Singh AP. **From modulation of cellular plasticity to potentiation of therapeutic resistance: new and emerging roles of MYB transcription factors in human malignancies.** *Cancer Metastasis Rev.* 2023 Nov 10. doi: 10.1007/s10555-023-10153-8. Epub ahead of print. PMID: 37950087.
236. Aronson JK, Ferner RE. **Biomarkers-A General Review.** *Curr Protoc Pharmacol.* 2017 Mar 17;76:9.23.1-9.23.17. doi: 10.1002/cpph.19. PMID: 28306150.
237. Sobsey CA, Ibrahim S, Richard VR, Gaspar V, Mitsa G, Lacasse V, Zahedi RP, Batist G, Borchers CH. **Targeted and Untargeted Proteomics Approaches in Biomarker Development. Proteomics.** 2020 May;20(9):e1900029. doi: 10.1002/pmic.201900029. Epub 2020 Jan 30. PMID: 31729135.
238. Aikin R, Baume N, Equey T, Rabin O. **Biomarkers of doping uses, discovery and validation.** *Bioanalysis.* 2020 Jun;12(11):791-800. doi: 10.4155/bio-2020-0035. Epub 2020 Jun 1. PMID: 32479739.
239. Sørensen KD, Ørntoft TF. **Discovery of prostate cancer biomarkers by microarray gene expression profiling.** *Expert Rev Mol Diagn.* 2010 Jan;10(1):49-64. doi: 10.1586/erm.09.74. PMID: 20014922.
240. Kolar V, Vastrad B, Vastrad C, Kotturshetti S, Tengli A. **Identification of candidate biomarkers and therapeutic agents for heart failure by bioinformatics analysis.** *BMC Cardiovasc Disord.* 2021 Jul 4;21(1):329. doi: 10.1186/s12872-021-02146-8. PMID: 34218797; PMCID: PMC8256614.
241. Xin L, Liu YH, Martin TA, Jiang WG. **The Era of Multigene Panels Comes? The Clinical Utility of Oncotype DX and MammaPrint.** *World J Oncol.* 2017 Apr;8(2):34-40. doi: 10.14740/wjon1019w. Epub 2017 May 4. PMID: 29147432; PMCID: PMC5649994.

242. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Electronic address: bc.overview@ctsu.ox.ac.uk; Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). **Anthracycline-containing and taxane-containing chemotherapy for early-stage operable breast cancer: a patient-level meta-analysis of 100 000 women from 86 randomised trials.** *Lancet.* 2023 Apr 15;401(10384):1277-1292. doi: 10.1016/S0140-6736(23)00285-4. PMID: 37061269.
243. Ikram MA, Brusselle GGO, Murad SD, van Duijn CM, Franco OH, Goedegebure A, Klaver CCW, Nijsten TEC, Peeters RP, Stricker BH, Tiemeier H, Uitterlinden AG, Vernooij MW, Hofman A. **The Rotterdam Study: 2018 update on objectives, design and main results.** *Eur J Epidemiol.* 2017 Sep;32(9):807-850. doi: 10.1007/s10654-017-0321-4. Epub 2017 Oct 24. PMID: 29064009; PMCID: PMC5662692.
244. Clarke CH, Buckley JA, Fung ET. **SELDI-TOF-MS proteomics of breast cancer.** *Clin Chem Lab Med.* 2005;43(12):1314-20. doi: 10.1515/CCLM.2005.225. PMID: 16309366.
245. Liu C. **The application of SELDI-TOF-MS in clinical diagnosis of cancers.** *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:245821. doi: 10.1155/2011/245821. Epub 2011 May 23. PMID: 21687541; PMCID: PMC3114543.
246. Bertevello PS, Teixeira-Gomes AP, Labas V, Cordeiro L, Blache MC, Papillier P, Singina G, Uzbekov R, Maillard V, Uzbekova S. **MALDI-TOF Mass Spectrometry Revealed Significant Lipid Variations in Follicular Fluid and Somatic Follicular Cells but Not in Enclosed Oocytes between the Large Dominant and Small Subordinate Follicles in Bovine Ovary.** *Int J Mol Sci.* 2020 Sep 11;21(18):6661. doi: 10.3390/ijms21186661. PMID: 32932995; PMCID: PMC7554725.
247. Zambonin C, Aresta A. **MALDI-TOF/MS Analysis of Non-Invasive Human Urine and Saliva Samples for the Identification of New Cancer Biomarkers.**

Molecules. 2022 Mar 16;27(6):1925. doi: 10.3390/molecules27061925. PMID: 35335287; PMCID: PMC8951187.

248. Poon TC. **Opportunities and limitations of SELDI-TOF-MS in biomedical research: practical advice.** Expert Rev Proteomics. 2007 Feb;4(1):51-65. doi: 10.1586/14789450.4.1.51. PMID: 17288515.
249. Tyagi NK, Dhesy-Thind S. **Clinical practice guidelines in breast cancer.** Curr Oncol. 2018 Jun;25(Suppl 1):S151-S160. doi: 10.3747/co.25.3729. Epub 2018 Jun 13. PMID: 29910658; PMCID: PMC6001762.
250. Harbeck N, Thomssen C, Gnant M. St. Gallen 2013: **brief preliminary summary of the consensus discussion.** Breast Care (Basel). 2013 May;8(2):102-9. doi: 10.1159/000351193. PMID: 24000280; PMCID: PMC3683952.
251. Balic M, Thomssen C, Gnant M, Harbeck N. St. Gallen/Vienna 2023: **Optimization of Treatment for Patientes with Primary Breast Cancer - A Brief Summary of the Consensus Discussion.** Breast Care (Basel). 2023 Apr;18(3):213-222. doi: 10.1159/000530584. Epub 2023 Apr 7. PMID: 37383954; PMCID: PMC10294024.
252. Tian Z, He W, Tang J, Liao X, Yang Q, Wu Y, Wu G. **Identification of Important Modules and Biomarkers in Breast Cancer Based on WGCNA.** Onco Targets Ther. 2020 Jul 12;13:6805-6817. doi: 10.2147/OTT.S258439. PMID: 32764968; PMCID: PMC7367932.
253. Rai MF, Tycksen ED, Sandell LJ, Brophy RH. **Advantages of RNA-seq compared to RNA microarrays for transcriptome profiling of anterior cruciate ligament tears.** J Orthop Res. 2018 Jan;36(1):484-497. doi: 10.1002/jor.23661. Epub 2017 Aug 29. PMID: 28749036; PMCID: PMC5787041.

254. Hussen BM, Abdullah ST, Salihi A, Sabir DK, Sidiq KR, Rasul MF, Hidayat HJ, Ghafouri-Fard S, Taheri M, Jamali E. **The emerging roles of NGS in clinical oncology and personalized medicine.** *Pathol Res Pract.* 2022 Feb;230:153760. doi: 10.1016/j.prp.2022.153760. Epub 2022 Jan 10. PMID: 35033746.
255. Sabour L, Sabour M, Ghorbian S. **Clinical Applications of Next-Generation Sequencing in Cancer Diagnosis.** *Pathol Oncol Res.* 2017 Apr;23(2):225-234. doi: 10.1007/s12253-016-0124-z. Epub 2016 Oct 8. PMID: 27722982.
256. Mantilla WA, Sanabria-Salas MC, Baldion AM, Sua LF, Gonzalez DM, Lema M. **NGS in Lung, Breast, and Unknown Primary Cancer in Colombia: A Multidisciplinary Consensus on Challenges and Opportunities.** *JCO Glob Oncol.* 2021 Jun;7:1012-1023. doi: 10.1200/GO.21.00046. PMID: 34185572; PMCID: PMC8457807.
257. Porta C, Paglino C, Mosca A. **Targeting PI3K/AKT/mTOR Signaling in Cancer.** *Front Oncol.* 2014 Apr 14;4:64. doi: 10.3389/fonc.2014.00064. PMID: 24782981; PMCID: PMC3995050.
258. Brasseur K, Gévry N, Asselin E. **Chemoresistance and targeted therapies in ovarian and endometrial cancers.** *Oncotarget.* 2017 Jan 17;8(3):4008-4042. doi: 10.18632/oncotarget.14021. PMID: 28008141; PMCID: PMC5354810.
259. Chaudhry P, Asselin E. **Resistance to chemotherapy and hormone therapy in endometrial cancer.** *Endocr Relat Cancer.* 2009 Jun;16(2):363-80. doi: 10.1677/ERC-08-0266. Epub 2009 Feb 3. PMID: 19190080.
260. Sun P, Meng LH. **Emerging roles of class I PI3K inhibitors in modulating tumor microenvironment and immunity.** *Acta Pharmacol Sin.* 2020 Nov;41(11):1395-1402. doi: 10.1038/s41401-020-00500-8. Epub 2020 Sep 16. PMID: 32939035; PMCID: PMC7656798.

261. **Canadian Cancer Statistics 2017.** Toronto; 2017.
262. **Prognostic factors in cancer.** 3rd ed. New Jersey: J. Wiley and Sons; 2006.
263. Vahabi M, Lofters A, Kumar M, Glazier RH. **Breast cancer screening disparities among immigrant women by world region of origin: a population-based study in Ontario, Canada.** *Cancer Med.* 2016;5(7):1670–86. <https://doi.org/10.1002/cam4.700>
264. Afifi N, Barrero CA. **Understanding Breast Cancer Aggressiveness and Its Implications in Diagnosis and Treatment.** *J Clin Med.* 2023 Feb 9;12(4):1375. doi: 10.3390/jcm12041375. PMID: 36835911; PMCID: PMC9959372.
265. Chippa V, Barazi H. **Inflammatory Breast Cancer.** [Updated 2023 Apr 16]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564324/>
266. Wingo PA, Jamison PM, Young JL, Gargiullo P. **Population-based statistics for women diagnosed with inflammatory breast cancer (United States).** *Cancer Causes Control.* 2004 Apr;15(3):321-8. [PubMed]
267. Goldner B, Behrendt CE, Schoellhammer HF, Lee B, Chen SL. **Incidence of inflammatory breast cancer in women, 1992-2009, United States.** *Ann Surg Oncol.* 2014 Apr;21(4):1267-70. - PMC – PubMed
268. Van Uden DJ, van Laarhoven HW, Westenberg AH, de Wilt JH, Blanken-Peeters CF. **Inflammatory breast cancer: an overview.** *Crit Rev Oncol Hematol.* 2015 Feb;93(2):116-26. – PubMed
269. Dawood S, Merajver SD, Viens P, Vermeulen PB, Swain SM, Buchholz TA, Dirix LY, Levine PH, Lucci A, Krishnamurthy S, Robertson FM, Woodward WA, Yang WT, Ueno NT, Cristofanilli M. **International expert panel on inflammatory breast cancer:**

consensus statement for standardized diagnosis and treatment. *Ann Oncol.* 2011 Mar;22(3):515-523. [PMC free article] [PubMed] [Reference list]

270. **Inflammatory breast cancer.** American Cancer Society. Updated March 1, 2023. Accessed October 20, 2023.
271. Ivanga M, Koumakpayi IH, Engohan-Aloghe C, Ebinda Mipinda G, Mboumba C, Chansy K Ankely J, Belembaogo E. **Abnormal BI-RADS Breast Lesions in Gabon.** *Breast J.* 2017 Sep;23(5):615-616. doi: 10.1111/tbj.12807. Epub 2017 Mar 21. PMID: 28322481.
272. Nedeljković M, Damjanović A. **Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer-How We Can Rise to the Challenge.** *Cells.* 2019 Aug 22;8(9):957. doi: 10.3390/cells8090957. PMID: 31443516; PMCID: PMC6770896.
273. Pascual J, Turner NC. **Targeting the PI3-kinase pathway in triple-negative breast cancer.** *Ann Oncol.* 2019 Jul 1;30(7):1051-1060. doi: 10.1093/annonc/mdz133. PMID: 31050709.
274. Chai C, Wu HH, Abuetabh Y, Sergi C, Leng R. **Regulation of the tumor suppressor PTEN in triple-negative breast cancer.** *Cancer Lett.* 2022 Feb 28;527:41-48. doi: 10.1016/j.canlet.2021.12.003. Epub 2021 Dec 10. PMID: 34902523.
275. Dong C, Wu J, Chen Y, Nie J, Chen C. **Activation of PI3K/AKT/mTOR Pathway Causes Drug Resistance in Breast Cancer.** *Front Pharmacol.* 2021 Mar 15;12:628690. doi: 10.3389/fphar.2021.628690. PMID: 33790792; PMCID: PMC8005514.
276. Liu Q, Turner KM, Alfred Yung WK, Chen K, Zhang W. **Role of AKT signaling in DNA repair and clinical response to cancer therapy.** *Neuro Oncol.* 2014

Oct;16(10):1313-23. doi: 10.1093/neuonc/nou058. Epub 2014 May 7. PMID: 24811392; PMCID: PMC4165418.

Liu Y, Shi C, He Z, Zhu F, Wang M, He R, Zhao C, Shi X, Zhou M, Pan S, Gao Y, Li X, Qin R. **Inhibition of PI3K/AKT signaling via ROS regulation is involved in Rhein-induced apoptosis and enhancement of oxaliplatin sensitivity in pancreatic cancer cells.** *Int J Biol Sci* 2021; 17(2):589-602. doi:10.7150/ijbs.49514.

277. 297- Yu L., Chen X., Wang L., Chen S. The sweet trap in tumors: aerobic glycolysis and potential targets for therapy. *Oncotarget*. 2016; 7: 38908-38926. Retrieved from <https://www.oncotarget.com/article/7676/text/>

278. Shaerzadeh F, Motamedi F, Khodagholi F. **Inhibition of AKT phosphorylation diminishes mitochondrial biogenesis regulators, tricarboxylic acid cycle activity and exacerbates recognition memory deficit in rat model of Alzheimer's disease.** *Cell Mol Neurobiol*. 2014 Nov;34(8):1223-33. doi: 10.1007/s10571-014-0099-9. Epub 2014 Aug 19. PMID: 25135709.

279. Lastwika KJ, Wilson W 3rd, Li QK, Norris J, Xu H, Ghazarian SR, Kitagawa H, Kawabata S, Taube JM, Yao S, Liu LN, Gills JJ, Dennis PA. **Control of PD-L1 Expression by Oncogenic Activation of the AKT-mTOR Pathway in Non-Small Cell Lung Cancer.** *Cancer Res*. 2016 Jan 15;76(2):227-38. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3362. Epub 2015 Dec 4. PMID: 26637667.

280. Masuyama N, Oishi K, Mori Y, Ueno T, Takahama Y, Gotoh Y. **AKT inhibits the orphan nuclear receptor Nur77 and T-cell apoptosis.** *J Biol Chem*. 2001 Aug 31;276(35):32799-805. doi: 10.1074/jbc.M105431200. Epub 2001 Jul 3. PMID: 11438550.

281. Cao J, Zhang M, Wang B, Zhang L, Fang M, Zhou F. **Chemoresistance and Metastasis in Breast Cancer Molecular Mechanisms and Novel Clinical Strategies.**

Front Oncol. 2021 Jul 1;11:658552. doi: 10.3389/fonc.2021.658552. Erratum in: Front Oncol. 2021 Aug 17;11:745052. PMID: 34277408; PMCID: PMC8281885.

282. McKenna M, McGarrigle S, Pidgeon GP. **The Next Generation of PI3K-AKT-mTOR Pathway Inhibitors in Breast Cancer Cohorts.** *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* (2018) 1870(2):185–97. 10.1016/j.bbcan.2018.08.001 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar] [Ref list]
283. Nedeljković M, Damjanović A. **Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer-How We Can Rise to the Challenge.** *Cells-Basel* (2019) 8(9). 10.3390/cells8090957 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar] [Ref list]
284. Paplomata E, O'Regan R. **The PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer: targets, trials and biomarkers.** *Ther Adv Med Oncol.* 2014 Jul;6(4):154-66. doi: 10.1177/1758834014530023. PMID: 25057302; PMCID: PMC4107712.
285. Li H, Prever L, Hirsch E, Gulluni F. **Targeting PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Breast Cancer.** *Cancers (Basel).* 2021 Jul 14;13(14):3517. doi: 10.3390/cancers13143517. PMID: 34298731; PMCID: PMC8304822.
286. Hinz, N., Jücker, M. **Distinct functions of AKT isoforms in breast cancer: a comprehensive review.** *Cell Commun Signal* 17, 154 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0450-3>
287. Basu A, Lambring CB. **AKT Isoforms: A Family Affair in Breast Cancer.** *Cancers (Basel).* 2021 Jul 9;13(14):3445. doi: 10.3390/cancers13143445. PMID: 34298660; PMCID: PMC8306188.

288. Riggio, M., Perrone, M., Polo, M. et al. **AKT1 and AKT2 isoforms play distinct roles during breast cancer progression through the regulation of specific downstream proteins.** *Sci Rep* 7, 44244 (2017). <https://doi.org/10.1038/srep44244>
289. Liu LZ, Zhou XD, Qian G, Shi X, Fang J, Jiang BH. **AKT1 amplification regulates cisplatin resistance in human lung cancer cells through the mammalian target of rapamycin/p70S6K1 pathway.** *Cancer Res.* 2007 Jul 1;67(13):6325-32. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4261. PMID: 17616691.
290. Cheng GZ, Chan J, Wang Q, Zhang W, Sun CD, Wang LH. **Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel.** *Cancer Res.* 2007 Mar 1;67(5):1979-87. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1479. PMID: 17332325.
291. Xing, H., Cao, Y., Weng, D. et al. **Fibronectin-mediated activation of AKT2 protects human ovarian and breast cancer cells from docetaxel-induced apoptosis via inhibition of the p38 pathway.** *Apoptosis* 13, 213–223 (2008). <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0158-5>
292. Yuan ZQ, Feldman RI, Sussman GE, Coppola D, Nicosia SV, Cheng JQ. **AKT2 inhibition of cisplatin-induced JNK/p38 and Bax activation by phosphorylation of ASK1: implication of AKT2 in chemoresistance.** *J Biol Chem.* 2003 Jun 27;278(26):23432-40. doi: 10.1074/jbc.M302674200. Epub 2003 Apr 15. Retraction in: *J Biol Chem.* 2016 Oct 21;291(43):22847. PMID: 12697749.
293. Faridi J, Wang L, Endemann G, Roth RA. **Expression of constitutively active AKT-3 in MCF-7 breast cancer cells reverses the estrogen and tamoxifen responsivity of these cells in vivo.** *Clin Cancer Res.* 2003 Aug 1;9(8):2933-9. PMID: 12912939.
294. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. **AKT promotes cell survival by phosphorylating and**

- inhibiting a Forkhead transcription factor.** *Cell.* 1999 Mar 19;96(6):857-68. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80595-4. PMID: 10102273.
295. Dan HC, Cooper MJ, Cogswell PC, Duncan JA, Ting JP, Baldwin AS. **AKT-dependent regulation of NF- κ B is controlled by mTOR and Raptor in association with IKK.** *Genes Dev.* 2008 Jun 1;22(11):1490-500. doi: 10.1101/gad.1662308. PMID: 18519641; PMCID: PMC2418585.
296. Gottlieb TM, Leal JF, Seger R, Taya Y, Oren M. **Cross-talk between AKT, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis.** *Oncogene.* 2002 Feb 14;21(8):1299-303. doi: 10.1038/sj.onc.1205181. PMID: 11850850.
297. Gao C, Yuan X, Jiang Z, Gan D, Ding L, Sun Y, Zhou J, Xu L, Liu Y, Wang G. **Regulation of AKT phosphorylation by GSK3 β and PTEN to control chemoresistance in breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat.* 2019 Jul;176(2):291-301. doi: 10.1007/s10549-019-05239-3. Epub 2019 Apr 20. PMID: 31006103.
298. Dai Y., Jin S., Li X., Wang D. **The involvement of Bcl-2 family proteins in AKT-regulated cell survival in cisplatin resistant epithelial ovarian cancer.** *Oncotarget.* 2017; 8: 1354-1368. Retrieved from <https://www.oncotarget.com/article/13817/text/>
299. Conesa, A., Madrigal, P., Tarazona, S. et al. **A survey of best practices for RNA-seq data analysis.** *Genome Biol* 17, 13 (2016). <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0881-8>
300. Han, Y., Gao, S., Muegge, K., Zhang, W. et Zhou, B. (2015). **Applications avancées du séquençage de l'ARN et défis.** *Bioinformation. Biol. Aperçus* 9, BBI.S28991. est ce que je:10.4137/bbi.s28991.Texte intégral CrossRef | Google Scholar
301. Darshan Shimoga Chandrashekar, Santhosh Kumar Karthikeyan, Praveen Kumar Korla, Henalben Patel, Ahmedur Rahman Shovon, Mohammad Athar, George J. Netto,

- Zhaohui S. Qin, Sidharth Kumar, Upender Manne, Chad J. Creighton, Sooryanarayana Varambally, **UALCAN: An update to the integrated cancer data analysis platform, Neoplasia,**
302. Foster MW, Mulvihill JJ, Sharp RR. **Investments in cancer genomics: who benefits and who decides.** Am J Public Health. 2006 Nov;96(11):1960-4. doi: 10.2105/AJPH.2005.075424. Epub 2006 Oct 3. PMID: 17018822; PMCID: PMC1751797.
303. Zheng Hong, Zhang Guosen, Zhang Lu, Wang Qiang, Li Huimin, Han Yali, Xie Longxiang, Yan Zhongyi, Li Yongqiang, An Yang, Dong Huan, Zhu Wan, Guo Xiangqian. **Comprehensive Review of Web Servers and Bioinformatics Tools for Cancer Prognosis Analysis.** JOURNAL=Frontiers in Oncology
304. Chandrashekar DS, Karthikeyan SK, Korla PK, Patel H, Shovon AR, Athar M, Netto GJ, Qin ZS, Kumar S, Manne U, Creighton CJ, Varambally S. **UALCAN: An update to the integrated cancer data analysis platform.** Neoplasia. 2022 Mar; 25:18-27. doi: 10.1016/j.neo.2022.01.001. Epub 2022 Jan 22. PMID: 35078134; PMCID: PMC8788199.
305. Li Chen, Fenghao Sun, Xiaodong Yang, Yulin Jin, Mengkun Shi, Lin Wang, Yu Shi, Cheng Zhan, Qun Wang, **Correlation between RNA-Seq and microarrays results using TCGA data,** Gene Volume 628,2017.
306. Peng, L., Bian, X., Li, D. et al. **Large-scale RNA-Seq Transcriptome Analysis of 4043 Cancers and 548 Normal Tissue Controls across 12 TCGA Cancer Types.** Sci Rep 5, 13413 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep13413>
307. Yang J, Fan Y, Xie B, Yang D. **A Combination of RNA-Seq Analysis and Use of TCGA Database for Determining the Molecular Mechanism and Identifying Potential Drugs for GJB1 in Ovarian Cancer.** Onco Targets Ther. 2021 Apr 14;14:2623-2633. doi: 10.2147/OTT.S303589. PMID: 33883906; PMCID: PMC8055374.

308. Liu, P., Ewald, J., Pang, Z. et al. **ExpressAnalyst: A unified platform for RNA-sequencing analysis in non-model species.** *Nat Commun* 14, 2995 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38785-y>
309. Liu P, Ewald J, Galvez JH, Head J, Crump D, Bourque G, Basu N, Xia J. **Ultrafast functional profiling of RNA-seq data for nonmodel organisms.** *Genome Res.* 2021 Apr;31(4):713-720. doi: 10.1101/gr.269894.120. Epub 2021 Mar 17. PMID: 33731361; PMCID: PMC8015844.
310. Korde LA, Somerfield MR, Carey LA, Crews JR, Denduluri N, Hwang ES, Khan SA, Loibl S, Morris EA, Perez A, Regan MM, Spears PA, Sudheendra PK, Symmans WF, Yung RL, Harvey BE, Hershman DL. **Neoadjuvant Chemotherapy, Endocrine Therapy, and Targeted Therapy for Breast Cancer: ASCO Guideline.** *J Clin Oncol.* 2021 May 1;39(13):1485-1505. doi: 10.1200/JCO.20.03399. Epub 2021 Jan 28. PMID: 33507815; PMCID: PMC8274745.
311. Smith L, Watson MB, O'Kane SL, Drew PJ, Lind MJ, Cawkwell L. **Analysis of doxorubicin resistance in human breast cancer cells using antibody microarrays.** *Mol Cancer Ther.* 2006 Aug;5(8):2115-20. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0190. PMID: 16928833.
312. Zhou C, Wang M, Zhou L, Zhang Y, Liu W, Qin W, He R, Lu Y, Wang Y, Chen XZ, Tang J. Prognostic **significance of PLIN1 expression in human breast cancer.** *Oncotarget.* 2016 Aug 23;7(34):54488-54502. doi: 10.18632/oncotarget.10239. PMID: 27359054; PMCID: PMC5342357.
313. Huang YH, Chu PY, Chen JL, Huang CT, Huang CC, Tsai YF, Wang YL, Lien PJ, Tseng LM, Liu CY. **Expression pattern and prognostic impact of glycoprotein non-metastatic B (GPNMB) in triple-negative breast cancer.** *Sci Rep.* 2021 Jun 9;11(1):12171. doi: 10.1038/s41598-021-91588-3. PMID: 34108545; PMCID: PMC8190094.

314. Yardley DA, Weaver R, Melisko ME, Saleh MN, Arena FP, Forero A, Cigler T, Stopeck A, Citrin D, Oliff I, Bechhold R, Loutfi R, Garcia AA, Cruickshank S, Crowley E, Green J, Hawthorne T, Yellin MJ, Davis TA, Vahdat LT. **EMERGE: A Randomized Phase II Study of the Antibody-Drug Conjugate Glembatumumab Vedotin in Advanced Glycoprotein NMB-Expressing Breast Cancer.** *J Clin Oncol.* 2015 May 10;33(14):1609-19. doi: 10.1200/JCO.2014.56.2959. Epub 2015 Apr 6. PMID: 25847941.
315. Salmans, M.L., Zhao, F. & Andersen, B. **The estrogen-regulated anterior gradient 2 (AGR2) protein in breast cancer: a potential drug target and biomarker.** *Breast Cancer Res* 15, 204 (2013). <https://doi.org/10.1186/bcr3408>
316. Ahmed KA, Hasib TA, Paul SK, Saddam M, Mimi A, Saikat ASM, Faruque HA, Rahman MA, Uddin MJ, Kim B. **Potential Role of CCN Proteins in Breast Cancer: Therapeutic Advances and Perspectives.** *Current Oncology.* 2021; 28(6):4972-4985. <https://doi.org/10.3390/currenol28060417>
317. Zhang K, Li Y, Kong X, Lei C, Yang H, Wang N, Wang Z, Chang H, Xuan L. **AGR2: a secreted protein worthy of attention in diagnosis and treatment of breast cancer.** *Front Oncol.* 2023 May 1;13:1195885. doi: 10.3389/fonc.2023.1195885. PMID: 37197416; PMCID: PMC10183570.
318. Tian, Sb., Tao, Kx., Hu, J. et al. **The prognostic value of AGR2 expression in solid tumours: a systematic review and meta-analysis.** *Sci Rep* 7, 15500 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15757-z>
319. Learned, K., Durbin, A., Currie, R. et al. **Barriers to accessing public cancer genomic data.** *Sci Data* 6, 98 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41597-019-0096-4>

320. Talhouk, A., McConechy, M., Leung, S. et al. **A clinically applicable molecular-based classification for endometrial cancers.** Br J Cancer 113, 299–310 (2015). <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.190>
321. Gonzalez Bosquet J, Devor EJ, Newton AM, Smith BJ, Bender DP, Goodheart MJ, McDonald ME, Braun TA, Thiel KW, Leslie KK. **Creation and validation of models to predict response to primary treatment in serous ovarian cancer.** Sci Rep. 2021 Mar 16;11(1):5957. doi: 10.1038/s41598-021-85256-9. PMID: 33727600; PMCID: PMC7971042.
322. Kim S.-J., Kim S., Kim D.-W., Kim M., Keam B., Kim TM, Lee Y., Koh J., Jeon YK, Heo DS **Modifications de l'expression PD-L1 Associé à l'acquisition de la résistance aux inhibiteurs d'ALK dans le cancer du poumon réarrangé par ALK.** Cancer Rés. Traiter. 2018 est ce que je: 10.4143/crt.2018.486. [Article gratuit PMC] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
323. Smith NR, Womack C. **Une approche matricielle pour guider le développement de biomarqueurs tissulaires basés sur l'IHC dans la découverte de médicaments oncologiques.** J. Pathol. 2014 ; 232 : 190-198. est ce que je: 10.1002/chemin.4262. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
324. Adam J., Le Stang N., Rouquette I., Cazes A., Badoual C., Pinot-Roussel H., Tixier L., Danel C., Damiola F., Damotte D., et al. **Étude d'harmonisation multicentrique pour les tests PD-L1 IHC dans le cancer du poumon non à petites cellules.** Anne. Oncol. 2018 ; 29 : 953-958. est ce que je: 10.1093/annonc/mdy014. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
325. Conroy JM, Pabla S., Nesline MK, Glenn ST, Papanicolau-Sengos A., Burgher B., Andreas J., Giamo V., Wang Y., Lenzo FL et al. **Séquençage de nouvelle génération de PD-L1 pour prédire la réponse aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaires.** J.

Immunautre. Cancer. 2019 ; 7h18 . est ce que je : 10.1186/s40425-018-0489-5. [Article gratuit PMC] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

326. Brueffer C., Vallon-Christersson J., Grabau† D., Ehinger A., Häkkinen J., Hegardt C., Malina J., Chen Y., Bendahl P.-O., Manjer J. et al... **Valeur clinique des classificateurs basés sur le séquençage d'ARN pour la prédiction des cinq biomarqueurs conventionnels du cancer du sein : un rapport du réseau multicentrique suédois d'analyse du cancer du sein basé sur la population - Initiative du sein. JCO Précis.** Oncol. 2018 : 1-18. est ce que je: 10.1200/PO.17.00135. [Article gratuit PMC] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
327. Tsimafeyeu I., Imyanitov E., Zavalishina L., Raskin G., Povilaitite P., Savelov N., Kharitonova E., Rummyantsev A., Pugach I., Andreeva Y. et al. **Accord entre les tests d'immunohistochimie PDL1 et la réaction en chaîne par polymérase dans le cancer du poumon non à petites cellules : étude comparative CLOVER.** Sci. Rép. 2020 ; 10 : 3928. est ce que je: 10.1038/s41598-020-60950-2. [Article gratuit PMC] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
328. Liu Y., Beyer A., Aebersold R. Sur la **dépendance des niveaux de protéines cellulaires sur l'abondance de l'ARNm.** Cellule. 2016 ; 165 : 535-550. est ce que je: 10.1016/j.cell.2016.03.014. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
329. Lazar V., Rubin E., Depil S., Pawitan Y., Martini J.-F., Gomez-Navarro J., Yver A., Kan Z., Dry JR, Kehren J. et al. **Un système de cartographie interventionnelle simplifié (SIMS) pour la sélection de combinaisons de traitements ciblés dans le cancer du poumon non à petites cellules.** Sur la cible. 2015 ; 6 : 14139-14152. est ce que je: 10.18632/oncotarget.3741. [Article gratuit PMC] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
330. Zhu Y., Piehowski PD, Kelly RT, Qian W.-J. **La nanoprotéomique arrive à maturité.** Expert Révérend Proteom. 2018 ; 15 : 865-871. est ce que je:

10.1080/14789450.2018.1537787. [Article gratuit PMC] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

331. Fang, X. J., Jiang, H., Zhu, Y. Q., Zhang, L. Y., Fan, Q. H., Tian, Y. "**Doxorubicin induces drug resistance and expression of the novel CD44st via NF- κ B in human breast cancer MCF-7 cells**". *Oncology Reports* 31.6 (2014): 2735-2742.
332. Lingrand M, Lalonde S, Jutras-Carignan A, et al. **SCD1 activity promotes cell migration via a PLD-mTOR pathway in the MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cell line**. *Breast Cancer (Tokyo, Japan)*. 2020 Jul;27(4):594-606. DOI: 10.1007/s12282-020-01053-8. PMID: 31993937.

REFERENCES AJOUTEES

333. Foy KC, et al., **Disparités dans les caractéristiques des tumeurs du cancer du sein, le traitement, le délai de traitement et la probabilité de survie chez les femmes afro-américaines et blanches . Cancer du sein NPJ , 2018. 4 : p. 7.** [Article gratuit PMC] [PubMed] [Google Scholar]
334. Wu Y, et al., **Les tumeurs du sein triple négatives chez les femmes afro-américaines et hispaniques/latinas sont riches en CD44+, faibles en CD24+ et présentent une perte de PTEN . PLoS One , 2013. 8 (10) : p. e78259.** [Article gratuit PMC] [PubMed] [Google Scholar]
335. Nakshatri H, Anjanappa M et Bhat-Nakshatri P, **L'hétérogénéité dépendante et indépendante de l'origine ethnique dans la hiérarchie du sein normal et saine a un impact sur la caractérisation des tumeurs . Sci Rep , 2015. 5 : p. 13526.** [Article gratuit PMC] [PubMed] [Google Scholar]
336. Jagge E, et al., **Récepteur androgène et expression d'ALDH1 parmi des populations de patients diversifiées à l'échelle internationale . J Glob Oncol , 2018. 4 : p. 1 à 8.** [Article gratuit PMC] [PubMed] [Google Scholar]
337. TYPES DE CANCER

338. Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS. Histological types of breast cancer: how special are they? *Mol Oncol*. 2010 Jun;4(3):192-208. doi: 10.1016/j.molonc.2010.04.004. Epub 2010 Apr 18. PMID: 20452298; PMCID: PMC5527938.
339. Weigelt B, Reis-Filho JS. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nat Rev Clin Oncol*. 2009 Dec;6(12):718-30. doi: 10.1038/nrclinonc.2009.166. PMID: 19942925.
340. Horlings HM, Weigelt B, Anderson EM, Lambros MB, Mackay A, Natrajan R, Ng CK, Geyer FC, van de Vijver MJ, Reis-Filho JS. Genomic profiling of histological special types of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2013 Nov;142(2):257-69. doi: 10.1007/s10549-013-2740-6. Epub 2013 Oct 27. PMID: 24162157.
341. Sisti A, Huayllani MT, Restrepo DJ, Boczar D, Advani P, Lu X, Spaulding AC, Ball CT, McLaughlin SA, Forte AJ. Paget disease of the breast: A national retrospective analysis of the US population. *Breast Dis*. 2020;39(3-4):119-126. doi: 10.3233/BD-200439. PMID: 32390594.
342. Prat A, Pineda E, Adamo B, Galván P, Fernández A, Gaba L, Díez M, Viladot M, Arance A, Muñoz M. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast*. 2015 Nov;24 Suppl 2:S26-35. doi: 10.1016/j.breast.2015.07.008. Epub 2015 Aug 5. PMID: 26253814.
343. Roulot A, Héquet D, Guinebretière JM, Vincent-Salomon A, Lerebours F, Dubot C, Rouzier R. Tumoral heterogeneity of breast cancer. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2016 Dec 1;74(6):653-660. English. doi: 10.1684/abc.2016.1192. PMID: 27848916.
344. **Thennavan A, Garcia-Recio S, Liu S, He X, Perou CM.** Molecular signatures of in situ to invasive progression for basal-like breast cancers: An integrated mouse model and human DCIS study. *NPJ Breast Cancer*. 2022 Jul 18;8(1):83. doi: 10.1038/s41523-022-00450-w. PMID: 35851387; PMCID: PMC9293914.
345. **Baretta Z, Mocellin S, Goldin E, Olopade OI, Huo D.** Effect of BRCA germline mutations on breast cancer prognosis: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2016 Oct;95(40):e4975. doi: 10.1097/MD.0000000000004975. PMID: 27749552; PMCID: PMC5059054.

346. **Armes JE, Egan AJ, Southey MC, et al.** The histologic phenotypes of breast carcinoma occurring before age 40 years in women with and without BRCA1 or BRCA2 germline mutations: a population-based study. *Cancer* 1998; 83:2335–2345. [PubMed] [Google Scholar]
347. **Lakhani SR, Jacquemier J, Sloane JP, et al.** Multifactorial analysis of differences between sporadic breast cancers and cancers involving BRCA1 and BRCA2 mutations. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:1138–1145. [PubMed] [Google Scholar]
348. **Southey MC, Ramus SJ, Dowty JG, et al.** Morphological predictors of BRCA1 germline mutations in young women with breast cancer. *Br J Cancer* 2011; 104:903–909. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
349. **Devericks EN, Carson MS, McCullough LE, Coleman MF, Hursting SD.** The obesity-breast cancer link: a multidisciplinary perspective. *Cancer Metastasis Rev.* 2022 Sep;41(3):607-625. doi: 10.1007/s10555-022-10043-5. Epub 2022 Jun 25. PMID: 35752704; PMCID: PMC9470704.
350. **White AJ, et al.** Overall and central adiposity and breast cancer risk in the Sister Study. *Cancer.* 2015;121(20):3700–3708. doi: 10.1002/cncr.29552. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
351. **Neuhouser ML, et al.** Overweight, obesity, and postmenopausal invasive breast cancer risk. *JAMA Oncology.* 2015;1(5):611. doi: 10.1001/jamaoncol.2015.1546. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
352. **Modi, N.D., et al. (2021).** The obesity paradox in early and advanced HER2 positive breast cancer: Pooled analysis of clinical trial data. *NPJ Breast Cancer*, 7(1), 30. [PMC free article] [PubMed]
353. Widschwendter, P., et al. (2015). **The influence of obesity on survival in early, high-risk breast cancer: Results from the randomized SUCCESS A trial.** *Breast Cancer Research*, 17(1), 129. [PMC free article] [PubMed]
354. Dehesh T, Fadaghi S, Seyedi M, Abolhadi E, Ilaghi M, Shams P, Ajam F, Mosleh-Shirazi MA, Dehesh P. **The relation between obesity and breast cancer risk in women by considering menstruation status and geographical variations: a systematic review**

- and meta-analysis. BMC Womens Health.** 2023 Jul 26;23(1):392. doi: 10.1186/s12905-023-02543-5. PMID: 37496015; PMCID: PMC10373406.
355. Picon-Ruiz M, Morata-Tarifa C, Valle-Goffin JJ, Friedman ER, Slingerland JM. **Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention.** CA Cancer J Clin. 2017 Sep;67(5):378-397. doi: 10.3322/caac.21405. Epub 2017 Aug 1. PMID: 28763097; PMCID: PMC5591063.
356. McDonald JA, Goyal A, Terry MB. **Alcohol Intake and Breast Cancer Risk: Weighing the Ove-rall Evidence.** Curr Breast Cancer Rep. 2013 Sep;5(3):10.1007/s12609-013-0114-z. doi: 10.1007/s12609-013-0114-z. PMID: 24265860; PMCID: PMC3832299.
357. Gradishar WJ, O'Regan R, Rimawi MF, Nordstrom JL, Rosales MK, Rugo HS. **Margetuximab in HER2-positive metastatic breast cancer. Future Oncol.** 2023 May;19(16):1099-1112. doi: 10.2217/fon-2022-1040. Epub 2023 May 12. PMID: 37170847.
358. Wu Y, Sarkissyan M, Elshimali Y, Vadgama JV. **Triple negative breast tumors in African-American and Hispanic/Latina women are high in CD44+, low in CD24+, and have loss of PTEN.** PLoS One. 2013 Oct 22;8(10): e78259. doi: 10.1371/journal.pone.0078259. PMID: 24167614; PMCID: PMC3805609.
359. Amirikia KC, Mills P, Bush J, Newman LA (2011) **Higher population based incidence rates of triple-negative breast cancer among young. African-American women: Implications for breast cancer screening recommendations.** Cancer 117: 2747-2753. doi:10.1002/cncr.25862. PubMed: 21656753

360. Stead LA, Lash TL, Sobieraj JE, Chi DD, Westrup JL et al. (2009). **Triple-negative breast cancers are increased in black women regardless of age or body mass index.** *Breast Cancer Res* 11: R18. doi: 10.1186/bcr2279. PubMed: 19320967.
361. Lund MJ, Butler EN, Hair BY, Ward KC, Andrews JH et al. (2010) **Age/race differences in HER2 testing and in incidence rates for breast cancer triple subtypes: a population-based study and first report.** *Cancer* 116: 2549-2559. PubMed: 20336785.
362. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS et al. (2000) **Molecular portraits of human breast tumours.** *Nature* 406: 747-752. doi: 10.1038/35021093. PubMed: 10963602.
363. Ginestier, Christophe & Korkaya, Hasan & Dontu, Gabriela & Birnbaum, Daniel & Wicha, Max & Charafe-Jauffret, Emmanuelle. (2008). **The cancer stem cell: The breast cancer driver.** *Médecine sciences: M/S.* 23. 1133-9. 10.1051/medsci/200723121133.
364. Tot T. Metastasis of breast cancer prior to invasion. *Breast Cancer Res Treat.* 2018 Jul;170(1):197. doi: 10.1007/s10549-018-4721-2. Epub 2018 Feb 19. PMID: 29460032.
365. Ma R, Feng Y, Lin S, Chen J, Lin H, Liang X, Zheng H, Cai X. **Mechanisms involved in breast cancer liver metastasis.** *J Transl Med.* 2015 Feb 15; 13:64. doi: 10.1186/s12967-015-0425-0. PMID: 25885919; PMCID: PMC4440291.
366. Aleskandarany MA, Sonbul SN, Mukherjee A, Rakha EA. **Molecular Mechanisms Underlying Lymphovascular Invasion in Invasive Breast Cancer.** *Pathobiology.* 2015 Sep;82(3-4):113-23. doi: 10.1159/000433583. Epub 2015 Aug 31. PMID:
367. Huber M, Helgason CD, Damen JE, Scheid M, Duronio V, Liu L, Ware MD, Humphries RK, Krystal G. **The role of SHIP in growth factor induced signalling.** *Prog Biophys Mol Biol.* 1999;71(3-4):423-34. doi: 10.1016/s0079-6107(98)00049-2. PMID: 10354708.

368. Fabi F, Asselin E. **Expression, activation, and role of AKT isoforms in the uterus.** *Reproduction.* 2014 Nov;148(5):R85-95. doi: 10.1530/REP-14-0270. Epub 2014 Aug 12. PMID: 25118299.
369. Hinz N, Jücker M. **Distinct functions of AKT isoforms in breast cancer: a comprehensive review.** *Cell Commun Signal.* 2019 Nov 21;17(1):154. doi: 10.1186/s12964-019-0450-3. PMID: 31752925; PMCID: PMC6873690.
370. Chin YR, Toker A. **The actin-bundling protein palladin is an AKT1-specific substrate that regulates breast cancer cell migration.** *Mol Cell.* 2010 May 14;38(3):333-44. doi: 10.1016/j.molcel.2010.02.031. PMID: 20471940; PMCID: PMC2872630.
371. Chin YR, Toker A. **AKT isoform-specific signaling in breast cancer: uncovering an anti-migratory role for palladin.** *Cell Adh Migr.* 2011 May-Jun;5(3):211-4. doi: 10.4161/cam.5.3.15790. Epub 2011 May 1. PMID: 21519185; PMCID: PMC3210203.
372. Khan F, Esnakula A, Ricks-Santi LJ, Zafar R, Kanaan Y, Naab T. **Loss of PTEN in high grade advanced stage triple negative breast ductal cancers in African American women.** *Pathol Res Pract.* 2018 May;214(5):673-678. doi: 10.1016/j.prp.2018.03.020. Epub 2018 Mar 27. PMID: 29653745; PMCID: PMC5963715).
373. Y, Sarkissyan M, Elshimali Y, Vadgama JV. **Les tumeurs du sein triple négatives chez les femmes afro-américaines et hispaniques/latines sont riches en CD44+, faibles en CD24+ et entraînent une perte de PTEN.** *PLoS Un.* 22 octobre 2013 ; 8 (10) :e78259. doi: 10.1371/journal.pone.0078259. eCollection 2013. [Article gratuit PMC] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

374. Li Shuting, Shen Yanwei, Wang Mengying, Yang Jiao, Lv Meng, Li Pan, Chen Zheling, Yang Jin. **Perte d'expression de PTEN dans le cancer du sein : association avec les caractéristiques clinicopathologiques et le pronostic. Sur la cible. 9 mai 2017 ; 8 (19) : 32043-32054. est ce que je: 10.18632/oncotarget.16761.** [Article gratuit PMC] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar].)
375. Kostaras E, Kaserer T, Lazaro G, Heuss SF, Hussain A, Casado P, Hayes A, Yandim C, Palaskas N, Yu Y, Schwartz B, Raynaud F, Chung YL, Cutillas PR, Vivanco I. **A systematic molecular and pharmacologic evaluation of AKT inhibitors reveals new insight into their biological activity. Br J Cancer. 2020 Aug;123(4):542-555. doi: 10.1038/s41416-020-0889-4. Epub 2020 May 22. PMID: 32439931; PMCID: PMC7435276.**
376. Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA. **Expression of a constitutively active AKT Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. J Biol Chem. 1996 Dec 6;271(49):31372-8. doi: 10.1074/jbc.271.49.31372. PMID: 8940145.**
377. Hutchinson J, Jin J, Cardiff RD, Woodgett JR, Muller WJ. **Activation of AKT (protein kinase B) in mammary epithelium provides a critical cell survival signal required for tumor progression. Mol Cell Biol. 2001;21(6):2203–2212. doi: 10.1128/MCB.21.6.2203-2212.2001. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]**
378. Ackler S, Ahmad S, Tobias C, Johnson MD, Glazer RI. **Delayed mammary gland involution in MMTV-AKT1 transgenic mice. Oncogene. 2002;21(2):198–206. doi: 10.1038/sj.onc.1205052. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]**
379. Blanco-Aparicio C, Pérez-Gallego L, Pequeño B, Leal JFM, Renner O, Carnero A. **Mice expressing myrAKT1 in the mammary gland develop carcinogen-induced ER-**

positive mammary tumors that mimic human breast cancer. *Carcinogenesis*. 2007;28(3):584–594. doi: 10.1093/carcin/bgl190. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

380. Charan, Manish. (2020). **Molecular and Cellular Factors Associated with Racial Disparity in Breast Cancer.** *International Journal of Molecular Sciences*. 21. 10.3390/ijms21165936.
381. Wu Y, Mohamed H, Chillar R, Ali I, Clayton S, Slamon D, Vadgama JV. **Clinical significance of AKT and HER2/neu overexpression in African-American and Latina women with breast cancer.** *Breast Cancer Res*. 2008;10(1):R3. doi: 10.1186/bcr1844. Epub 2008 Jan 10. PMID: 18184439; PMCID: PMC2374954.

Annexes

Les données supplémentaires du chapitre II et III

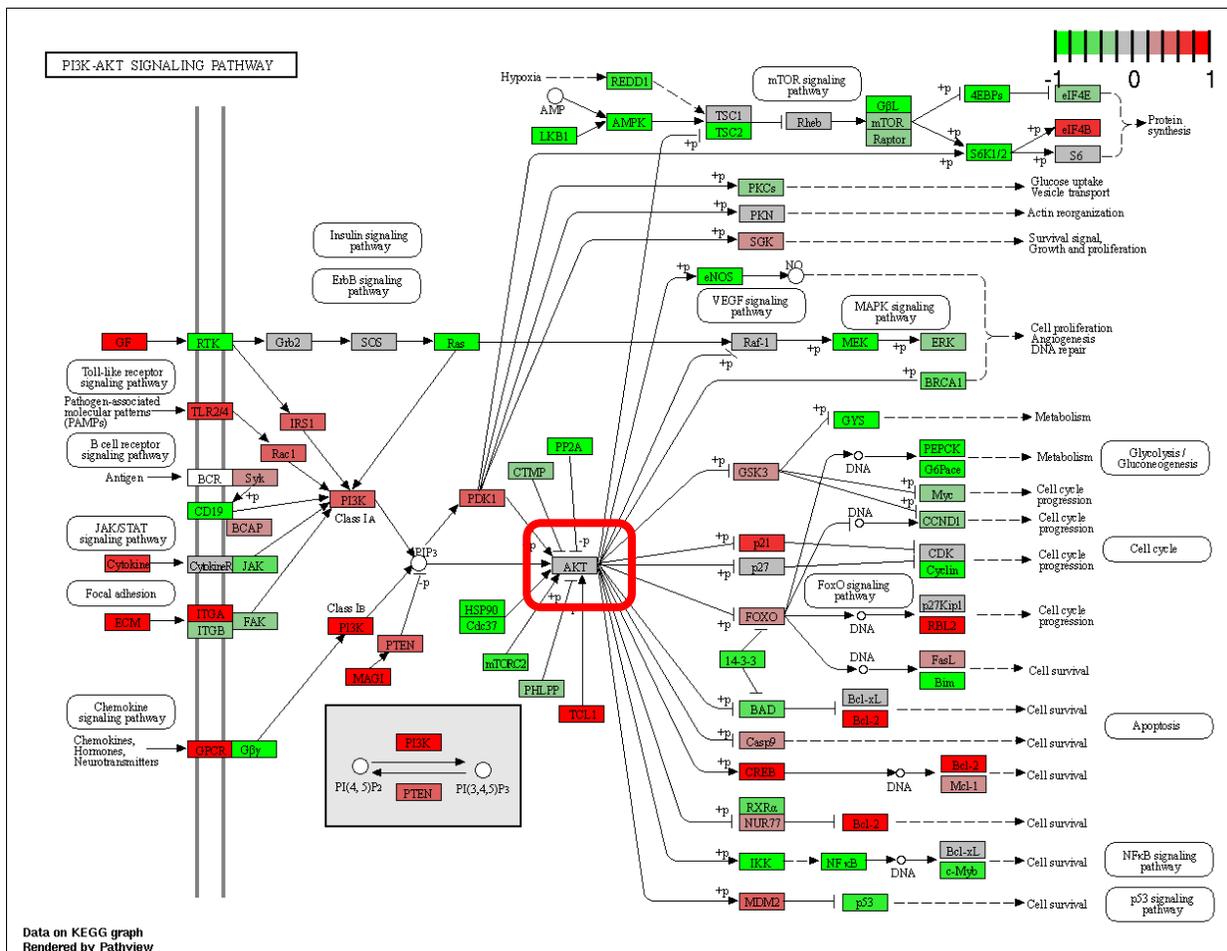


Figure supplementary 1 :

Expression of AKT at transcriptomic level: Adriblastine Edoxan pre/post chemotherapy. PI3K/AKT signaling pathway, KEGG pathway. KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Adriblastin-Endoxan don't surexpressed AKT at transcriptomic level. Genes shows green color for down regulation and red for up regulation.

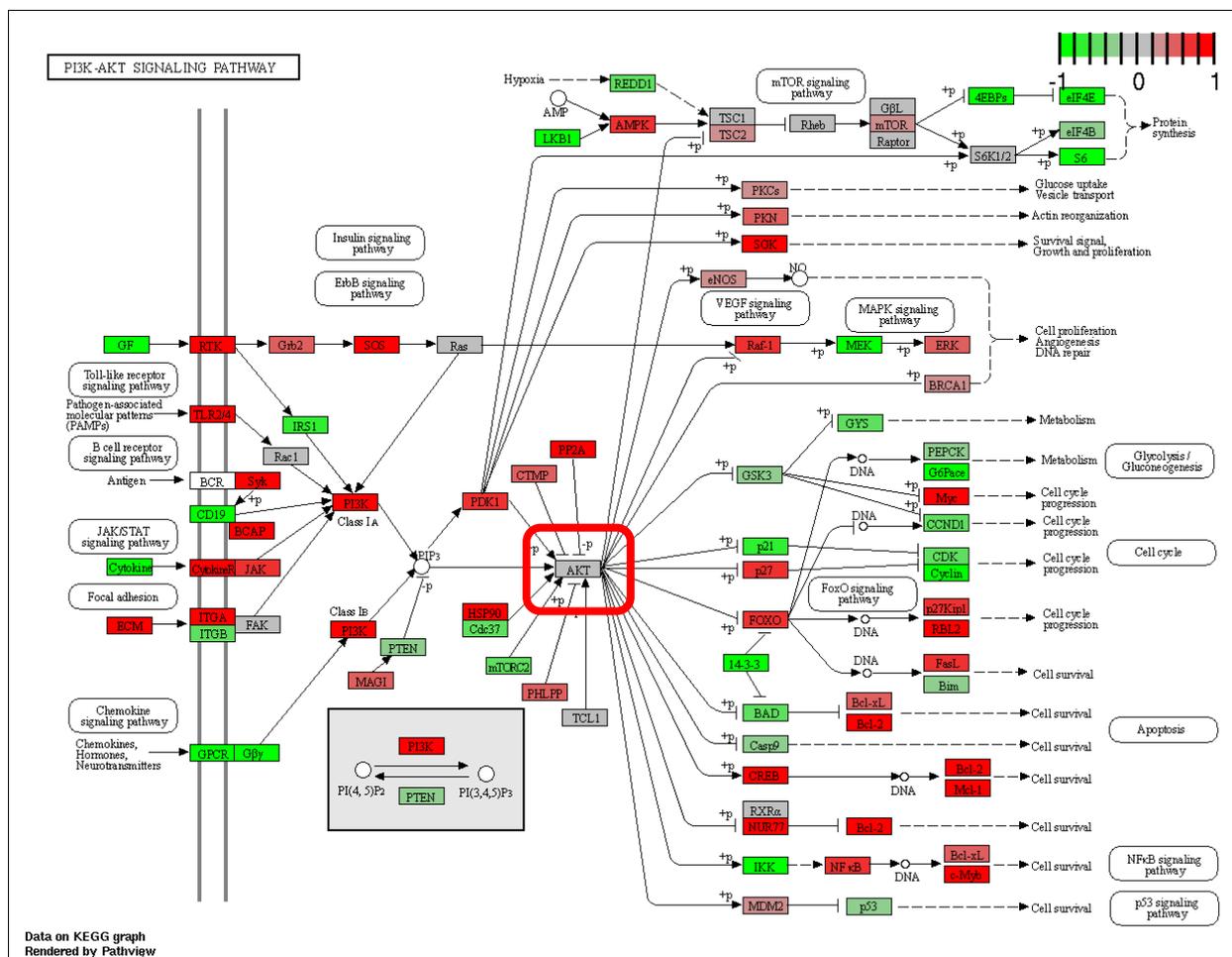


Figure supplementary 2:

Expression of AKT at transcriptomic level: Adriblastine-Edoxan post chemotherapy versus controls. PI3K/AKT signaling pathway, KEGG pathway. KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Adriblastin-Edoxan post chemotherapy don't surexpressed AKT at transcriptomic level. Genes shows green color for down regulation and red for up regulation.

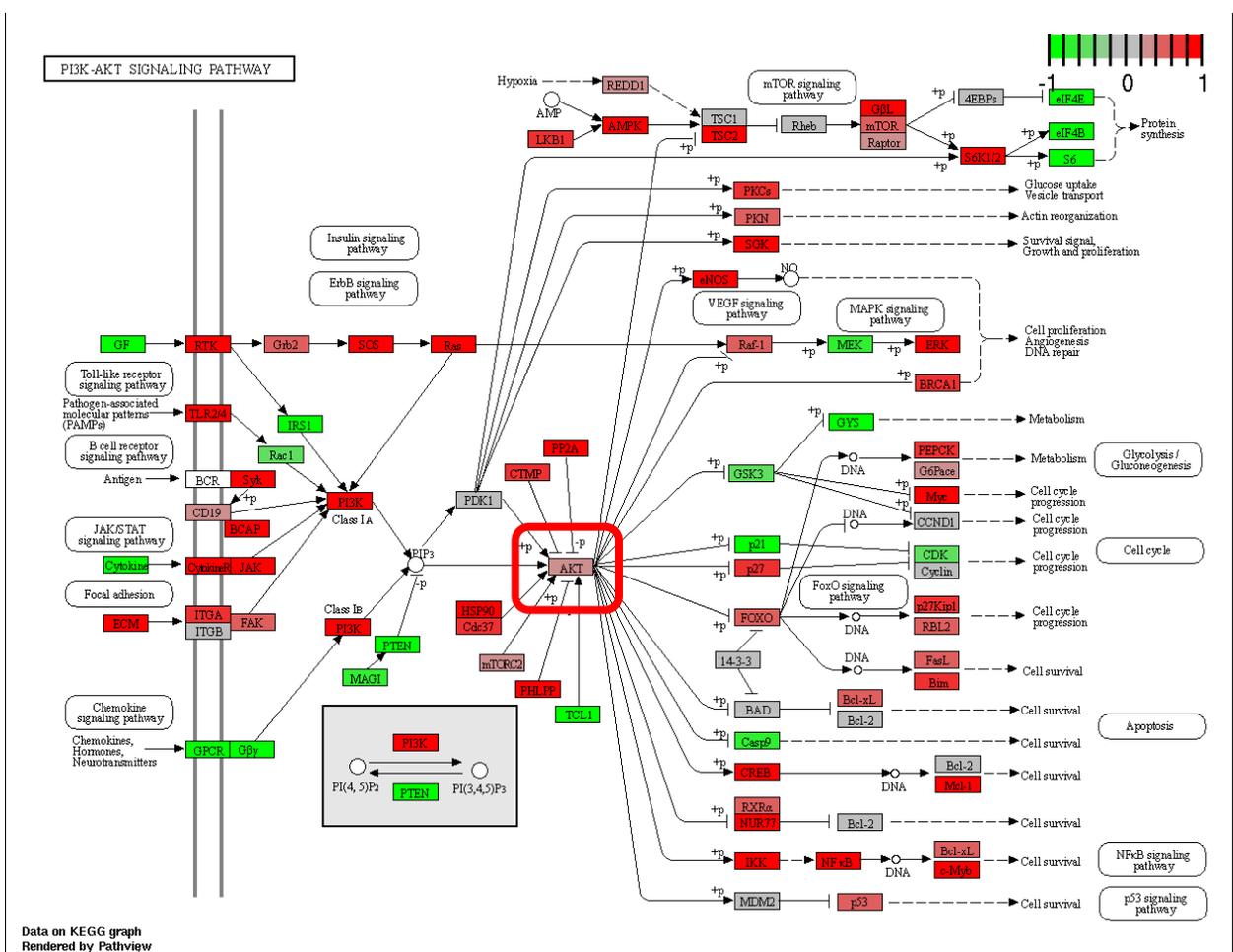


Figure supplementary 3:

Expression of AKT at transcriptomic level: Adriblastine-Edoxan pre chemotherapy versus controls. PI3K/AKT signaling pathway, KEGG pathway. KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Adriblastin-Edoxan before chemotherapy shows light expressed AKT at transcriptomic level. Genes shows green color for down regulation and red for up regulation.

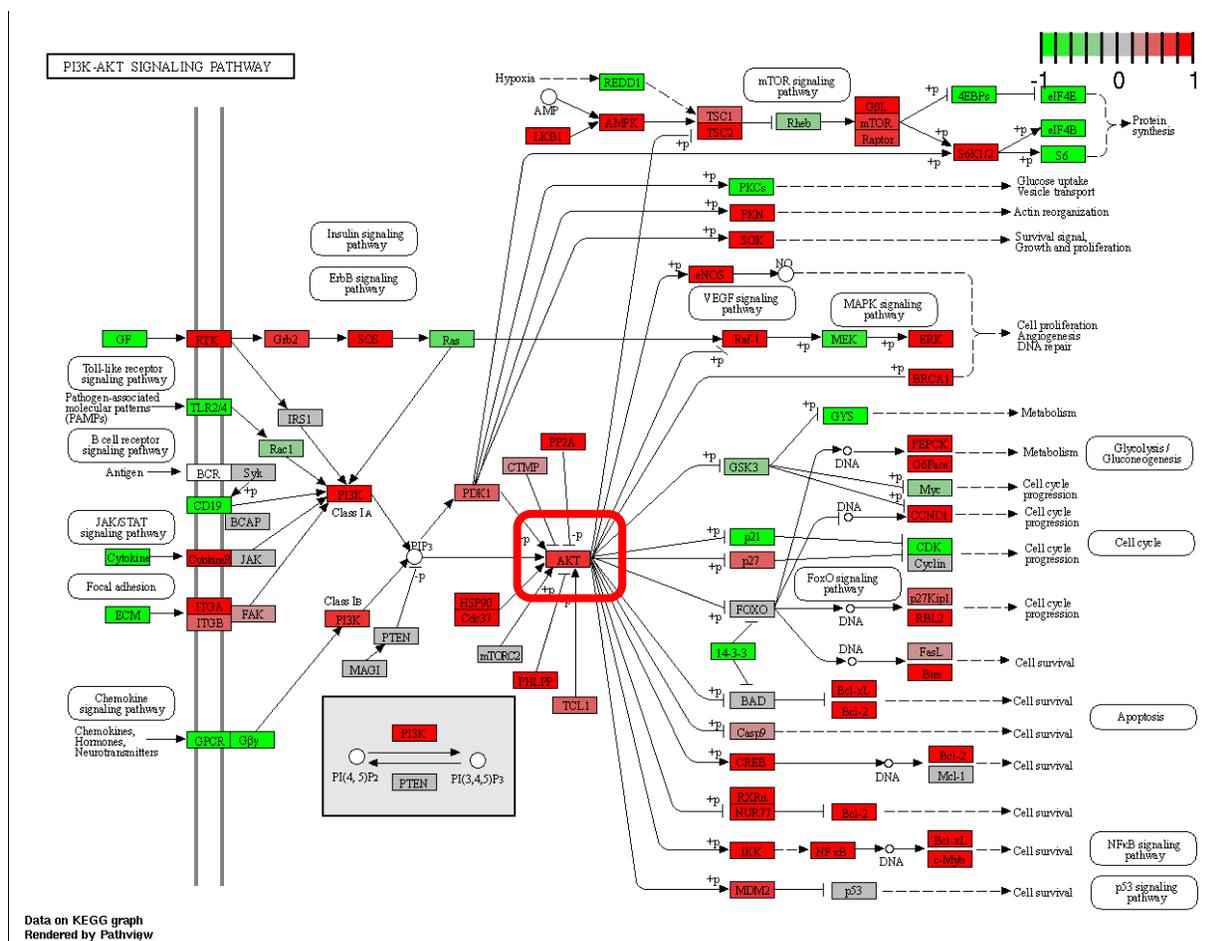


Figure supplementary 6:

Expression of AKT at transcriptomic level: FAC pre chemotherapy versus Controls. PI3K/AKT signaling pathway, KEGG pathway. KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. FAC before chemotherapy surexpressed AKT at transcriptomic level. Genes shows green color for down regulation and red for up regulation

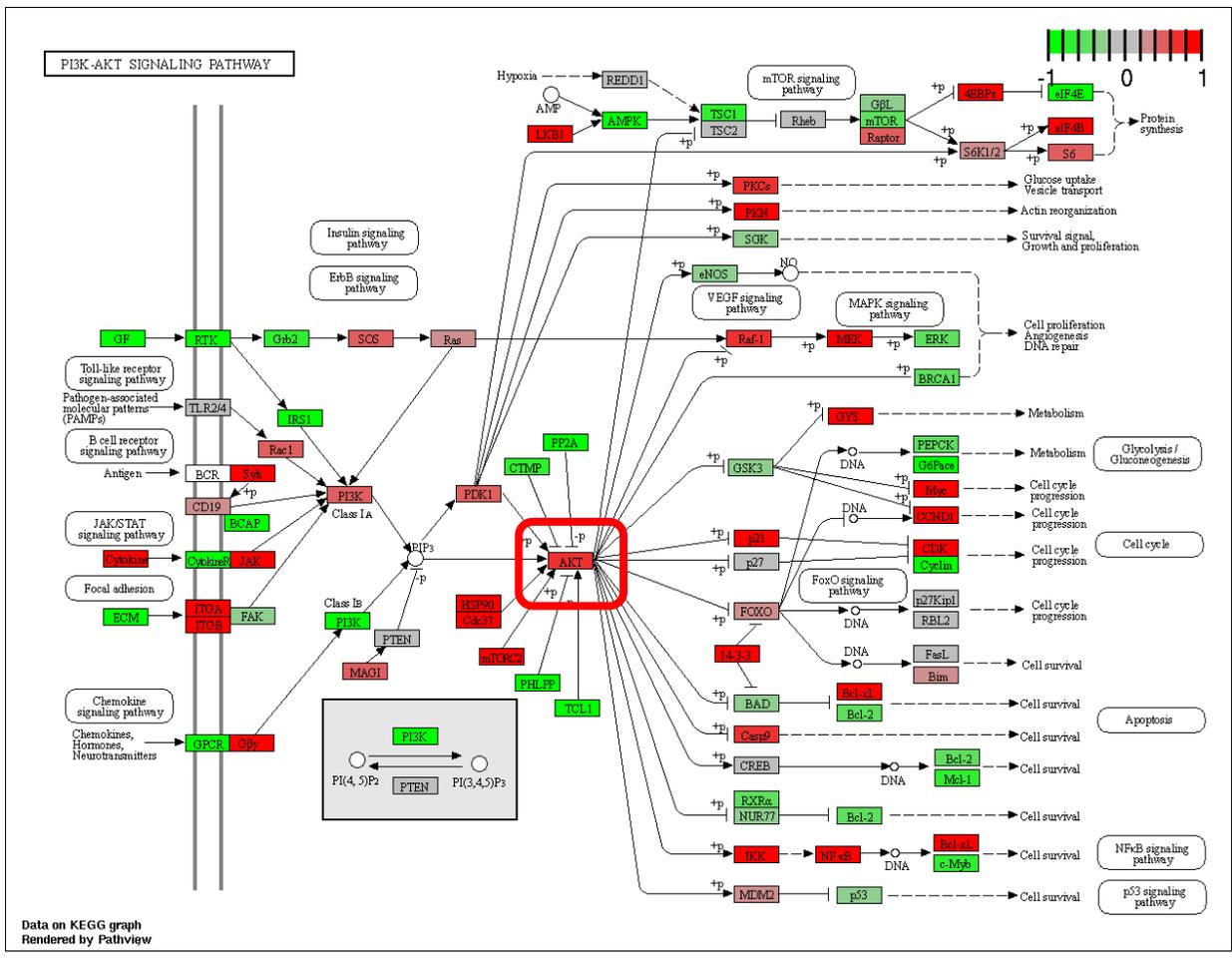


Figure supplementary 7: Expression of AKT at transcriptomic level: Adriablastine-Navelbine pre/post chemotherapy. PI3K/AKT signaling pathway, KEGG pathway. KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Adriablastin-Navelbine chemotherapy surexpressed AKT at transcriptomic level. Genes shows green color for down regulation afor up regulation

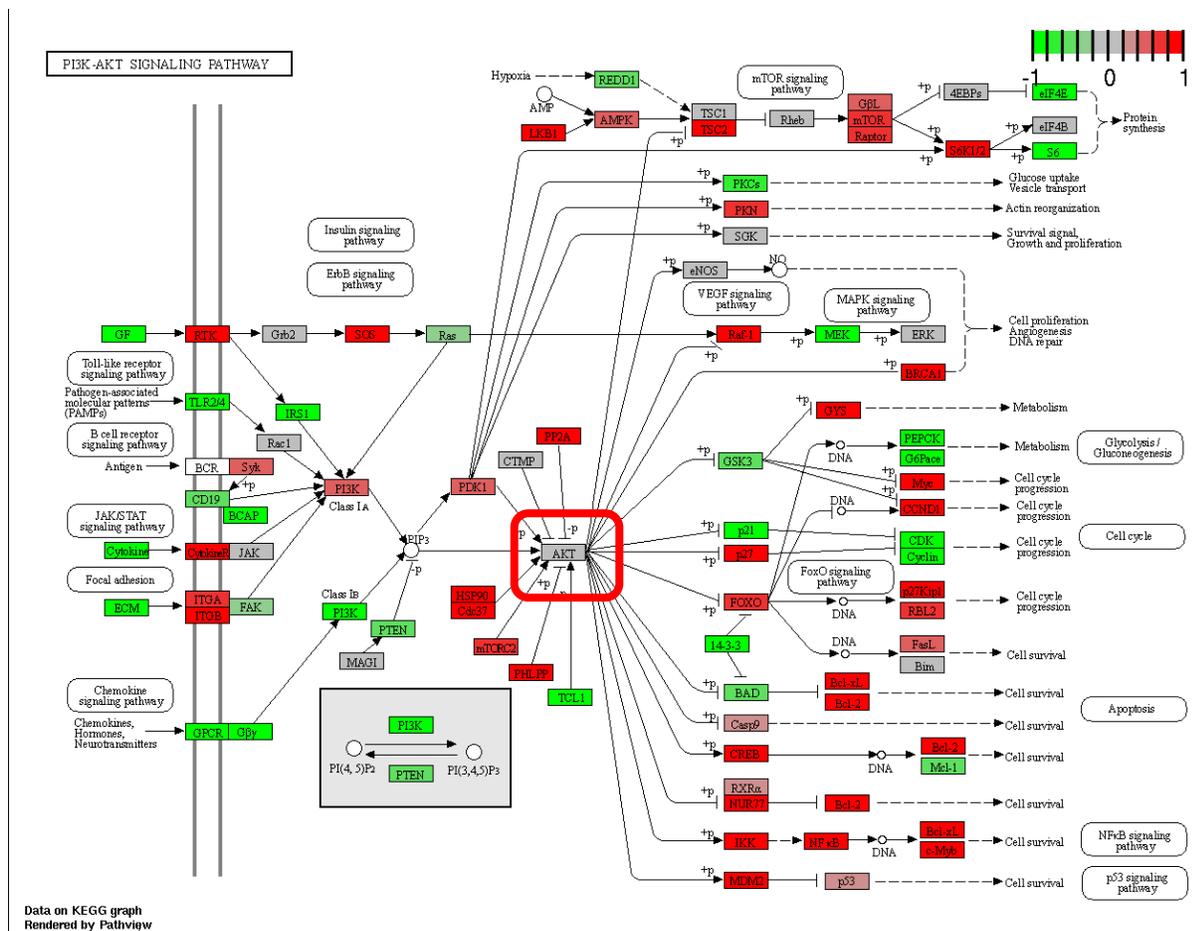


Figure supplémentaire 8 :

Expression of AKT at transcriptomic level: Adriblastine-Navelbine post chemotherapy versus controls. PI3K/AKT signaling pathway, KEGG pathway. KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

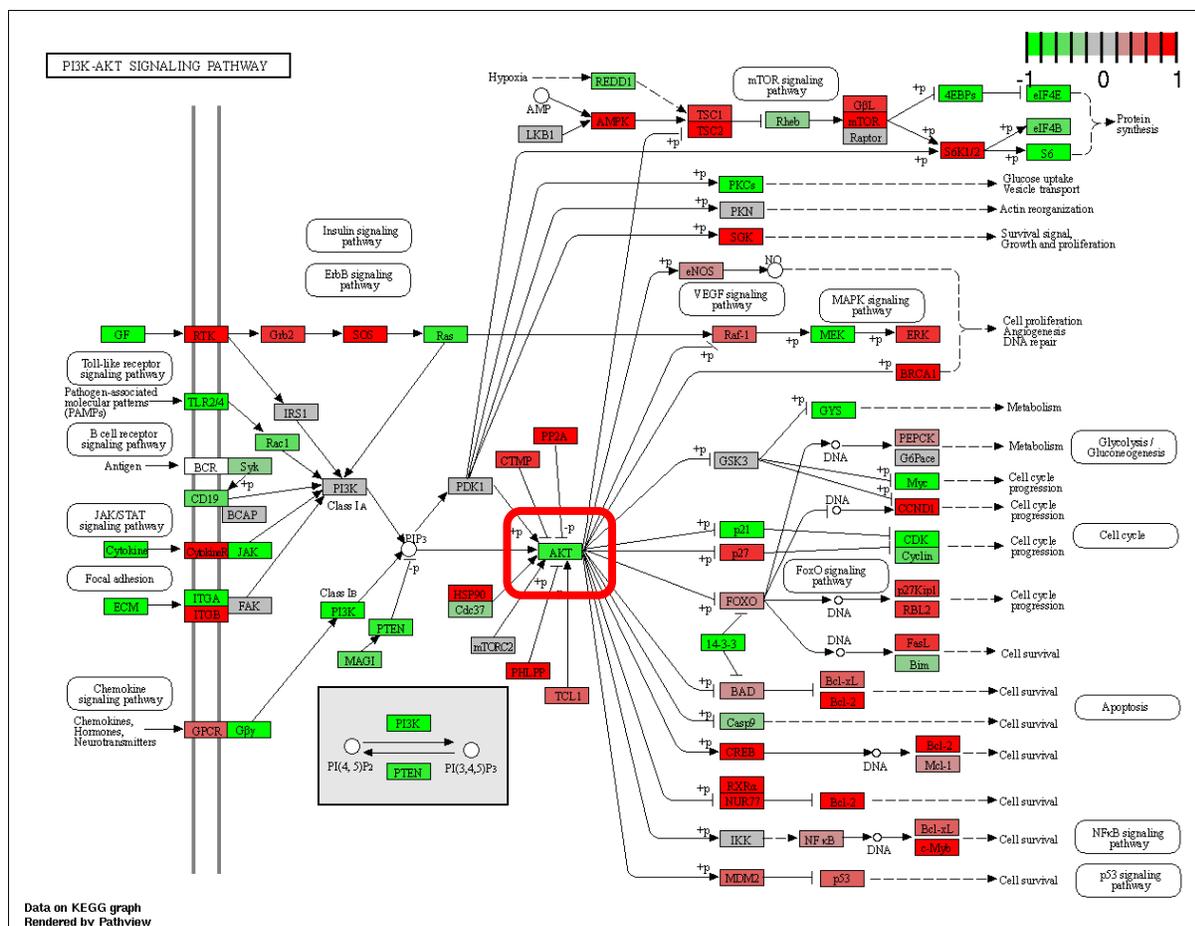


Figure supplémentaire 9 :

Expression of AKT at transcriptomic level: Adriblastine-Navelbine pre chemotherapy versus controls. PI3K/AKT signaling pathway, KEGG pathway. KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

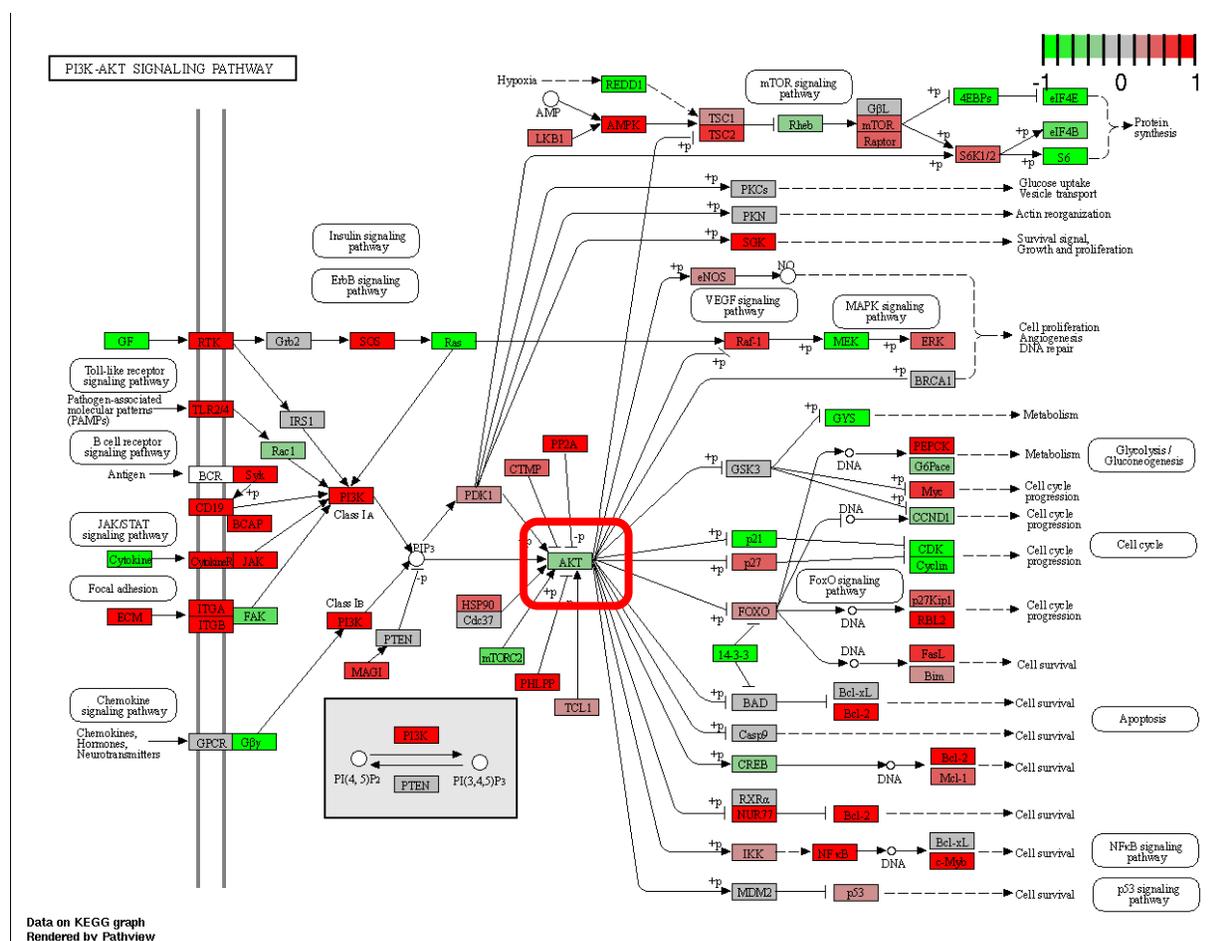


Figure supplémentaire 10 :

Expression of AKT at transcriptomic level: Triple negative patientes versus controls. PI3K/AKT signaling pathway, KEGG pathway. KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

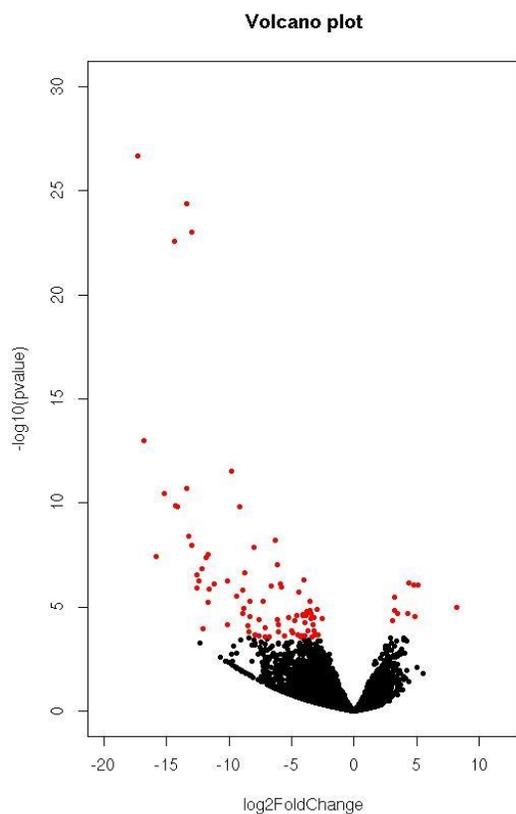


Figure supplementary SEQ ARABIC 11: Volcano plot showing differentially expressed gene in Adriblastine-Endoxan post chemotherapy patients in red, the genes expressed significantly. On the right the overexpressed and on the left the under expressed.

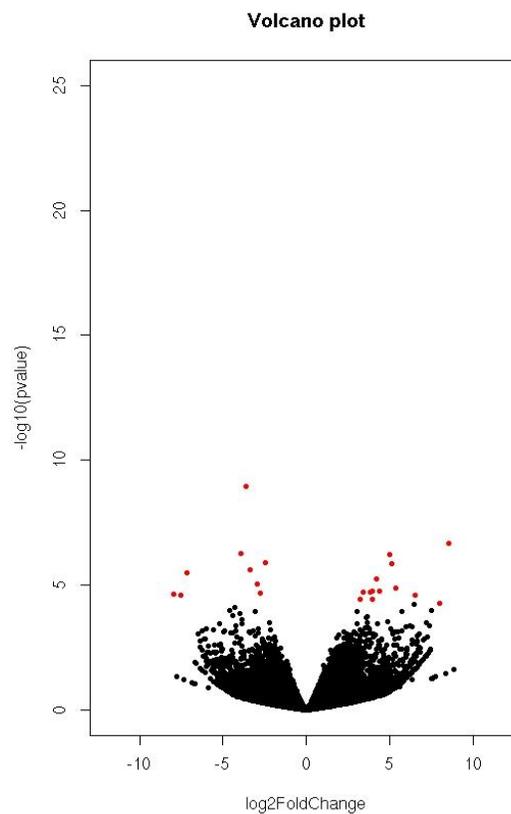


Figure supplementary SEQ ARABIC 12 : Volcano plot showing differentially expressed gene in Adriblastine-Endoxan pre/post chemotherapy patients. red genes are differentially expressed

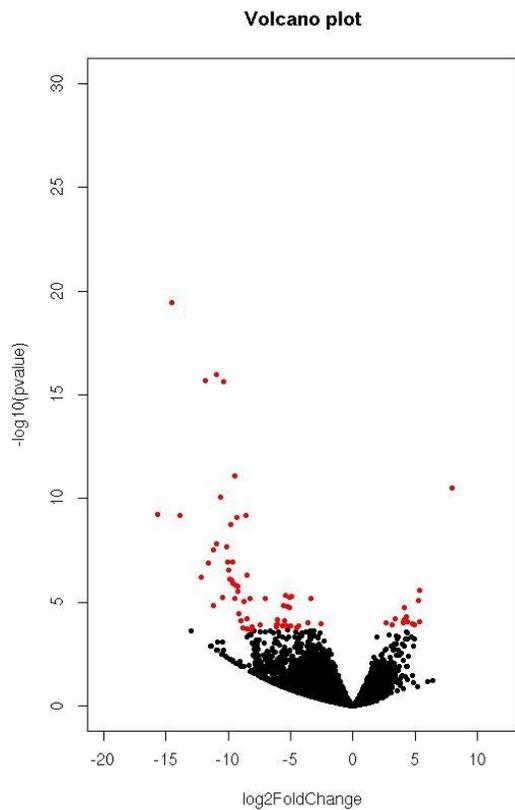


Figure supplementary 2 : Volcano plot showing differentially expressed gene in Adriblastine-Endoxan pre chemotherapy patient. In red, the genes expressed significantly. On the right the overexpressed and on the left the under expressed

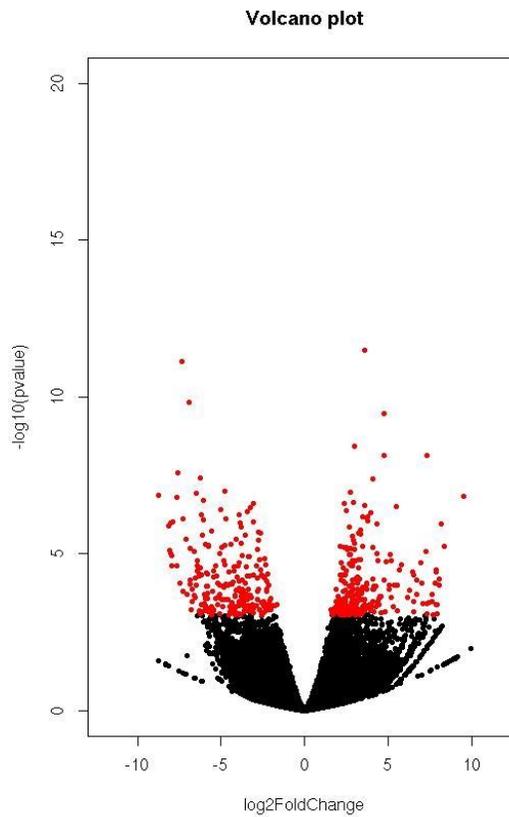


Figure supplementary 1 : Volcano plot showing differentially expressed gene in FAC pre/post chemotherapy patient. In red, the genes expressed significantly. On the right the overexpressed and on the left the under expressed.

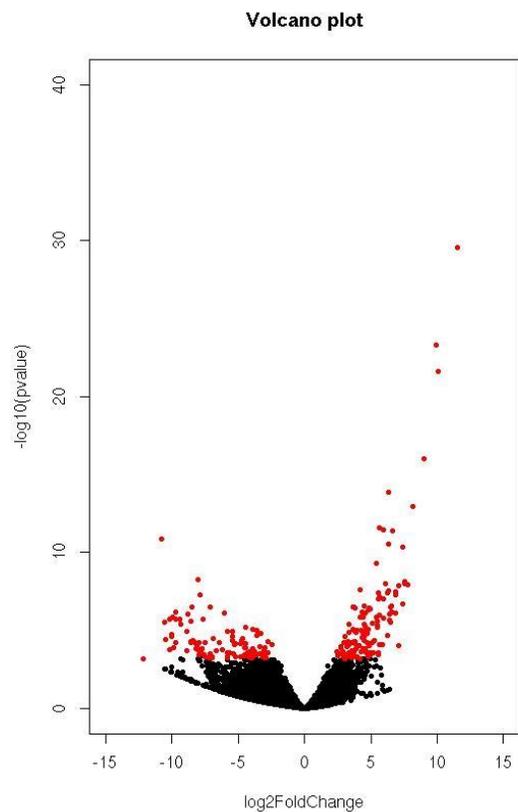


Figure supplementary 4 : Volcano plot showing differentially expressed gene in FAC pre chemotherapy versus Controls patiente. In red, the genes expressed significantly. On the right the overexpressed and on the left the under expressed

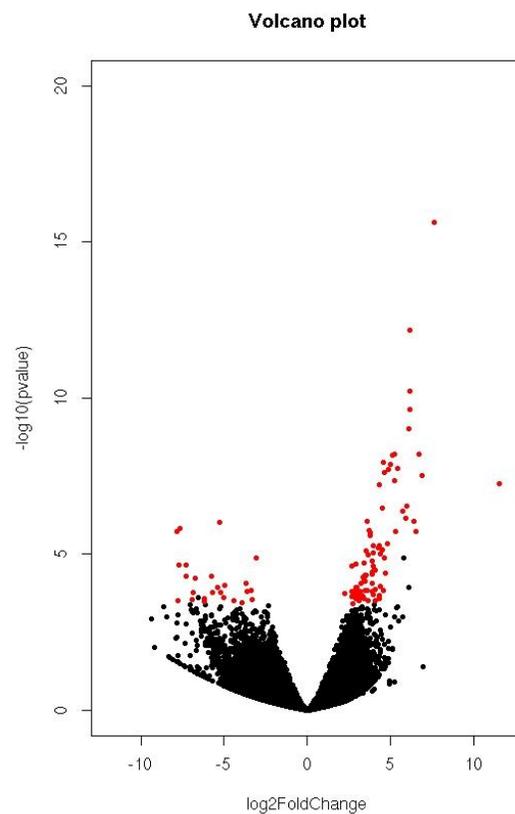


Figure supplementary 3 : Volcano plot showing differentially expressed gene in FAC and Controls post chemotherapy versus Controls patiente. In red, the genes expressed significantly. On the right the overexpressed and on the left the under expressed

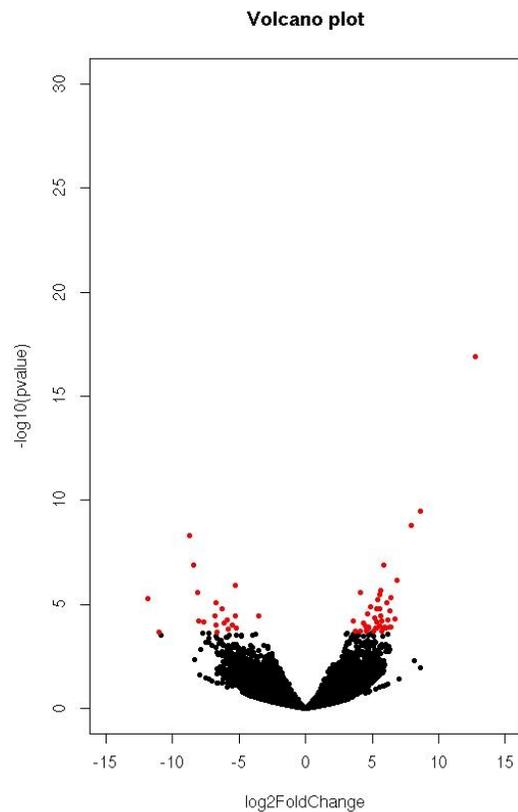


Figure supplementary 6 : Volcano plot showing differentially expressed gene in Adriblastine-Navelbine post chemotherapy versus controls patient. In red, the genes expressed significantly. On the right the overexpressed and on the left the under expressed

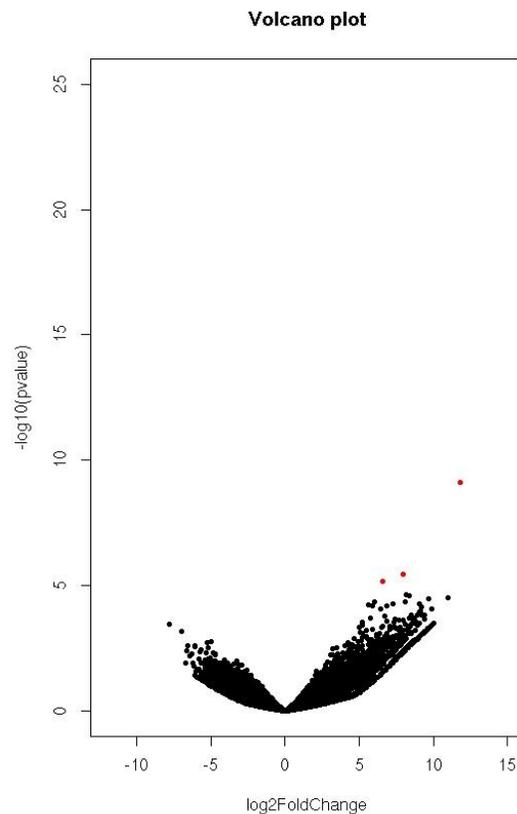


Figure supplementary 5 : Volcano plot showing differentially expressed gene in Adriblastine-Navelbine pre/post chemotherapy patient. In red, the genes expressed significantly. On the right the overexpressed and on the left the under expressed

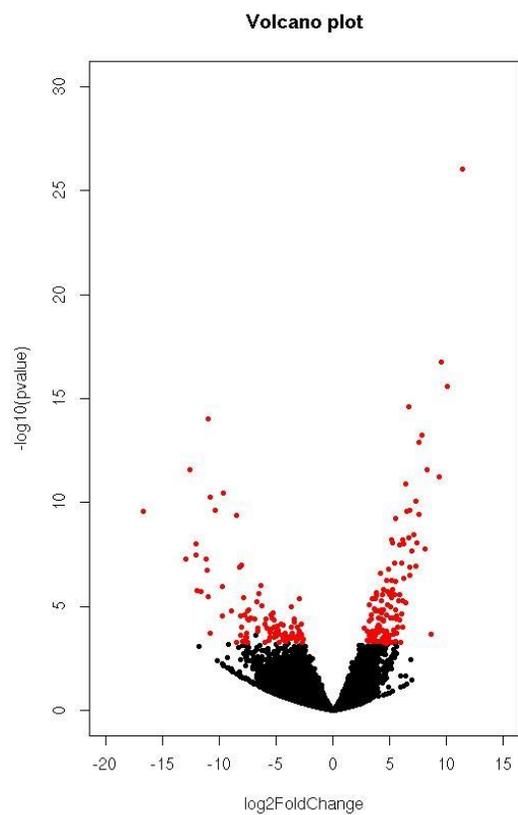


Figure supplementary 19: Volcano plot showing differentially expressed gene in Adriblastine-Navelbine pre chemotherapy versus controls patient. NVB-PRE hemotherapy patiente. In red, the genes expressed significantly. On the right the overexpressed and on the left the under expressed

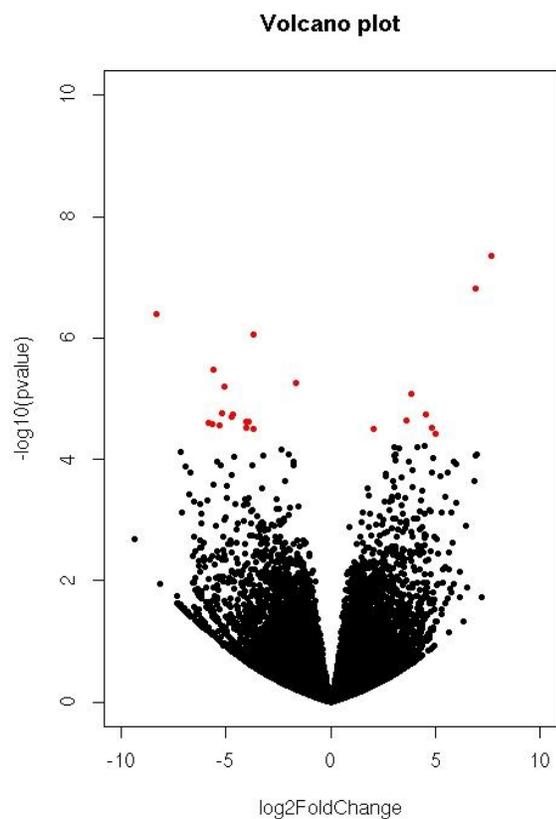


Figure supplementary 20: Volcano plot showing differentially expressed gene in chemo resistant patient. In red, the genes expressed significantly. On the right the overexpressed and on the left the under expressed

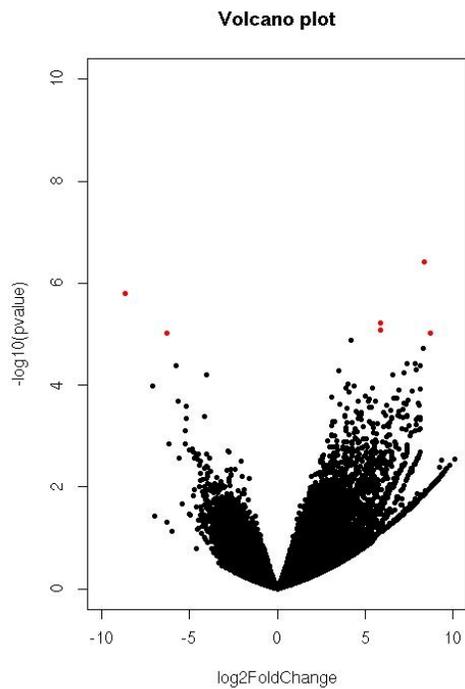


Figure supplementary 7 : Volcano plot showing differentially expressed gene in chemo resistant 1 patient. In red, the genes expressed significantly. On the right the overexpressed and on the left the under expressed

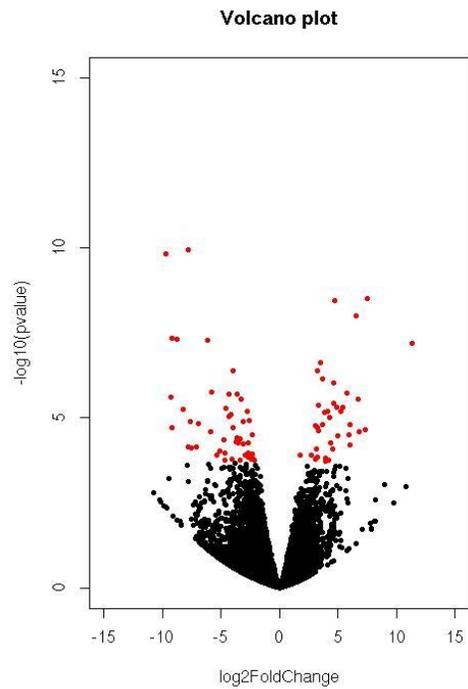


Figure supplementary 22 : Volcano plot showing differentially expressed gene in chemo resistant 1 patient. In red, the genes expressed significantly. On the right the overexpressed and on the left the under expressed

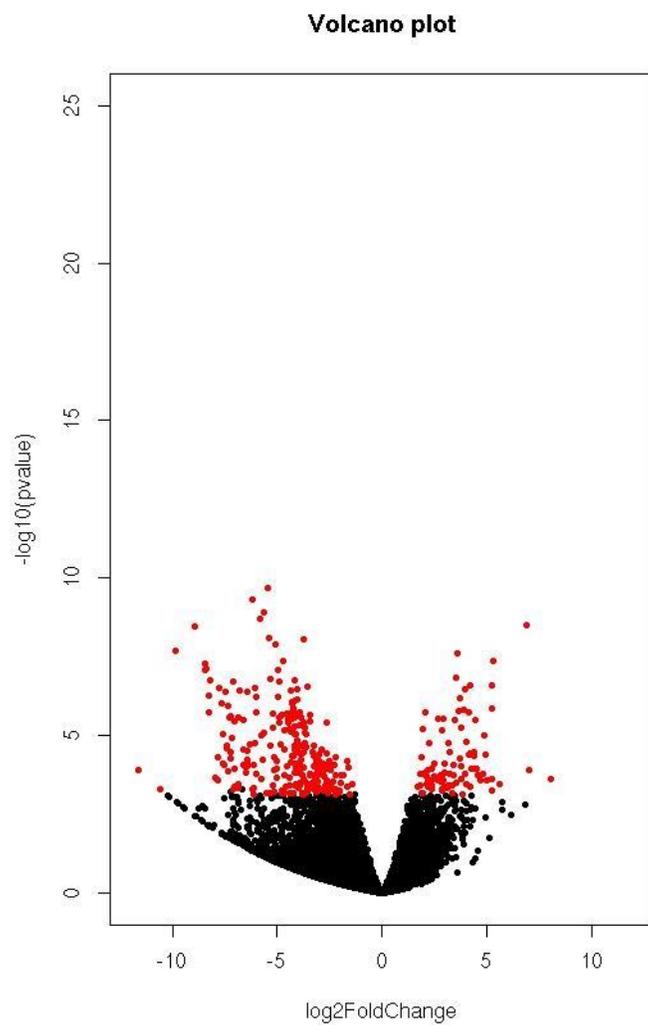


Figure supplementary 8 : Volcano plot showing differentially expressed gene in TNBC patients. In red, the genes expressed significantly. On the right the overexpressed and on the left the under expressed

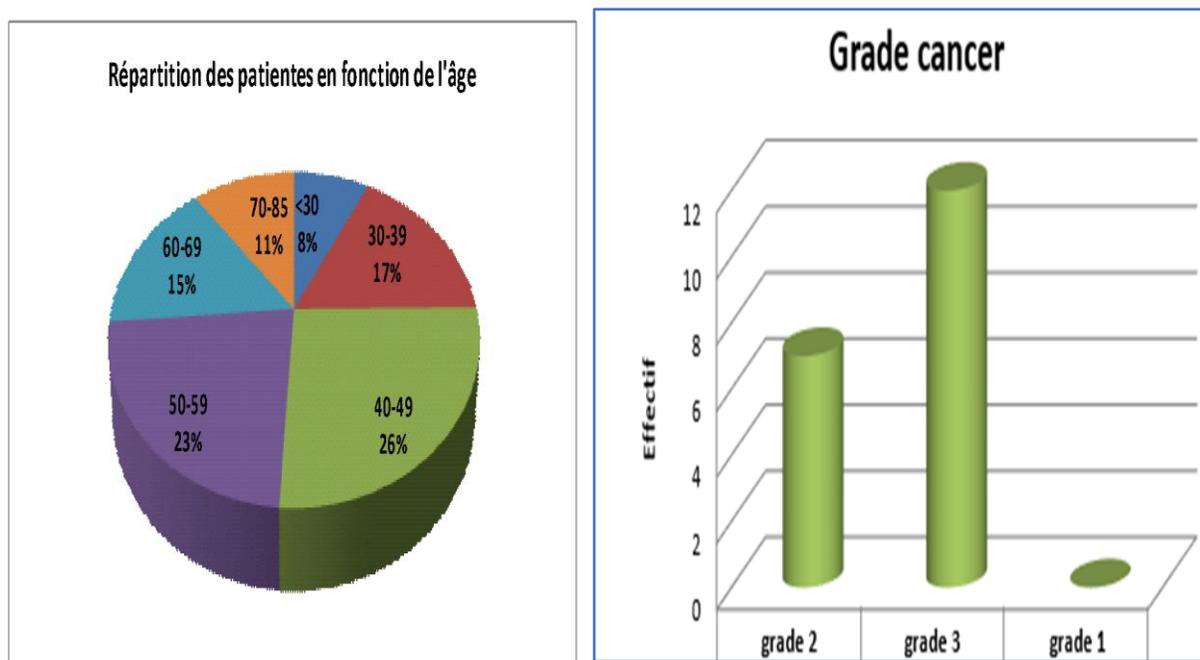


Figure supplémentaire 9 : Épidémiologie des patientes ayant un cancer du sein au Gabon. Plus de 50% des cancers sont de jeune âge et de haut grade