



24 janvier 2020

DOSSIER PARTICIPANT

# SÉMINAIRE DE RESTITUTION DES PROJETS FINANCÉS DANS LE CADRE DU PROGRAMME D' ACTIONS INTÉGRÉES DE RECHERCHE (PAIR) FORMES PRÉCOCES DU CANCER DU SEIN (2014)

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b> .....	3
<b>PROGRAMME</b> .....	6
SUZETTE DELALOGÉ .....	8
DAVID CAMERON .....	9
VÉRONIQUE MAGUER-SATTA.....	10
CHANN LAGADEC.....	15
UZMA HASAN .....	18
JEAN-JACQUES DIAZ .....	21
STÉPHANIE DAVID .....	26
ROMAN ROUZIER.....	30
FABRICE ANDRÉ.....	34

# INTRODUCTION

Depuis 2007, l'Institut national du cancer (INCa) a mis en œuvre un **Programme d'actions intégrées de recherche (PAIR)** consacré chaque année à un type de cancers. Le PAIR a été conduit en 2008 en partenariat entre l'INCa, l'ANRS et la Fondation ARC pour la recherche sur le cancer, et depuis 2009 en partenariat entre l'INCa, la Fondation ARC et La Ligue contre le cancer. L'Institut et ses partenaires contribuent de manière équivalente au financement des projets sélectionnés.

Les Programmes d'actions intégrées de recherche (PAIR) ont pour ambition de soutenir l'ensemble des dimensions et questions de recherche (biologie fondamentale, recherche clinique, épidémiologie, technologies innovantes, prévention, dépistage, diagnostic, traitement et sciences humaines et sociales) dans le cadre d'une pathologie. Les projets sélectionnés doivent permettre de fédérer les équipes de recherche françaises par une approche transversale sur des questions posées à l'interface de l'épidémiologie, des sciences humaines et sociales, de la biologie et de la clinique. Ces rapprochements entre différentes disciplines doivent permettre aux patients de bénéficier plus rapidement des avancées de la recherche.

Depuis 2007, 10 PAIR ont été initiés : le cancer colorectal en 2007, les lymphomes en 2008, le carcinome hépatocellulaire en 2009, le cancer de la prostate en 2010, les cancers des voies aérodigestives supérieures (VADS) en 2011, les cancers gynécologiques en 2012, le mélanome en 2013, les cancers du sein de formes précoces en 2014, les cancers pédiatriques en 2017 et le cancer du pancréas en 2018. Chaque PAIR comporte une phase de réflexion et d'élaboration multidisciplinaire, suivie d'un séminaire national de lancement puis d'un appel à projets. Depuis 2007, près de 45.5 millions d'euros ont été engagés dans ces 10 thématiques prioritaires et ont permis de financer 80 projets de recherche multidisciplinaires.

Le PAIR a ciblé en 2013-2014 les formes précoces du cancer du sein, les Docteurs Suzette Delalogue et Guy Launoy étant les Présidents du Comité de Pilotage de ce PAIR. Après un séminaire national de lancement organisé le 5 juillet 2013 à Boulogne qui a permis de présenter et de discuter des conclusions du groupe de travail multidisciplinaire, un appel à projets compétitif avait été lancé en octobre 2013. Les questions de ce PAIR, liées aux conséquences du dépistage organisé, étaient regroupées en 4 axes : 1) améliorer la connaissance de l'histoire naturelle de la maladie pour diminuer le surdiagnostic et le surtraitement, 2) mieux identifier et évaluer les niveaux de risque et le dépistage, 3) évaluer la désescalade thérapeutique raisonnée, coordonnée et encadrée dans les formes limitées de cancer du sein, 4) explorer les aspects sociologiques, psychologiques, médicaux, économiques du 4<sup>e</sup> axe « vivre après le traitement du cancer ».

Sept projets avaient été retenus et financés à hauteur de **3.76 millions d'euros**.

Ce séminaire de restitution est organisé le 24 janvier 2020 à l'Institut national d'histoire de l'art (INHA) à Paris dans le cadre de « *La journée de recherche sur le cancer du sein* » organisée en collaboration avec l'Intergroupe National de Recherche sur le Cancer du Sein-Unicancer (UCBG), afin de présenter à la communauté scientifique les résultats obtenus par les projets sélectionnés dans le cadre de ce PAIR dédié aux formes précoces du cancer du sein.

Nous remercions l'ensemble des orateurs qui ont contribué à la constitution de ce dossier participant qui présente un résumé des principaux résultats pour chaque projet financé dans le cadre de ce PAIR et une courte biographie de chaque intervenant.

## **L'Institut national du cancer (INCa)**

Créé par la loi de santé publique du 9 août 2004, l'Institut national du cancer est l'agence d'expertise sanitaire et scientifique chargée de coordonner la lutte contre les cancers en France. Groupement d'intérêt public, il rassemble en son sein l'État, les grandes associations de lutte contre le cancer, les caisses d'assurance maladie, les fédérations hospitalières et les organismes de recherche.

Ses missions :

- Assurer une approche globale des pathologies cancéreuses
- Stimuler l'innovation
- Produire des expertises et recommandations pour les décideurs et professionnels de santé
- Animer les organisations territoriales en cancérologie
- Analyser les données pour mieux orienter l'action
- Informer et diffuser les connaissances liées aux cancers

L'Institut national du cancer pilote la mise en œuvre du Plan cancer 2014-2019 pour le compte des ministères chargés de la santé et de la recherche. Le Plan cancer 2014-2019 a pour ambitions de donner à chacun, partout en France, les mêmes chances de guérir et de mettre plus rapidement les innovations au service des malades. Il comprend 17 objectifs regroupés autour de quatre grandes priorités de santé :

- Guérir plus de personnes malades
- Préserver la continuité et la qualité de vie
- Investir dans la prévention et la recherche
- Optimiser le pilotage et les organisations

## **La Fondation ARC pour la recherche sur le cancer**

Reconnue d'utilité publique, la Fondation ARC est 100 % dédiée à la recherche sur le cancer. Grâce à la générosité de ses donateurs et testateurs, elle alloue chaque année plus de 26 millions d'euros à des projets de recherche porteurs d'espoir pour les malades. Son objectif : contribuer à guérir 2 cancers sur 3 en 2025.

Forte d'une expertise nationale et internationale de très haut niveau, elle met en œuvre une action scientifique déterminée visant à accroître les connaissances sur tous les cancers, à favoriser l'innovation thérapeutique et à créer les conditions d'une recherche d'excellence.

Menée en toute indépendance et sur l'ensemble du territoire, son action est guidée par l'intérêt général et l'excellence scientifique : elle identifie, sélectionne, finance et accompagne des programmes de recherche prometteurs. La Fondation ARC est un véritable catalyseur de la recherche et fédère ainsi les acteurs de la lutte contre le cancer en France et à l'international.

## La Ligue contre le Cancer

Créée en 1918 par Justin Godart, la Ligue contre le cancer est une organisation non-gouvernementale indépendante reposant sur la générosité du public et sur l'engagement de ses militants. Organisée en une fédération de 103 Comités départementaux, forte de près de 640 000 adhérents et 13 800 bénévoles, la Ligue lutte contre le cancer à travers quatre missions complémentaires : chercher pour guérir, prévenir pour protéger, accompagner pour aider, mobiliser pour agir. Aujourd'hui, la Ligue, fait de la lutte contre le cancer un enjeu sociétal rassemblant le plus grand nombre possible d'acteurs sanitaires mais aussi économiques, sociaux ou politiques sur tous les territoires.

La Ligue est le premier financeur associatif indépendant de la recherche sur le cancer. Le financement global de la recherche par la Ligue s'est élevé en 2018 à près de 36,6 millions d'Euros. Cette position est maintenue grâce aux Comités départementaux qui attribuent une grande partie de leurs ressources provenant des dons et legs au soutien à la recherche.

La politique de recherche structurée de la Ligue se traduit, entre autres, par la mise en œuvre des programmes d'envergure nationale visant à progresser dans la connaissance de la maladie et améliorer la prise en charge des malades. Soutenir des équipes de recherche d'excellence, renforcer la recherche clinique et translationnelle, développer des collaborations interdisciplinaires, favoriser la réalisation d'études épidémiologiques importantes et permettre la formation des chercheurs de demain font partie des priorités de la Ligue.

Pour en savoir plus : [www.ligue-cancer.net](http://www.ligue-cancer.net)

# PROGRAMME

## JOURNÉE RECHERCHE CANCER DU SEIN DE LA RECHERCHE FONDAMENTALE À LA RECHERCHE CLINIQUE

**Vendredi 24 janvier 2020 de 09h00 à 17h00**  
**Institut national d'histoire de l'art (INHA)**  
**2 rue Vivienne 75002 Paris**

- 9h00** **Accueil des participants**
- 9h30 - 10h10** **Special session**  
**Cross talk between basic, translational and clinical research in the breast cancer field**  
Invited speaker: Nick TURNER, Institute of Cancer Research, London, UK
- 10h10 - 13h00** **De la recherche fondamentale vers la recherche clinique : retour sur le programme PAIR SEIN, une expérimentation à la française réussie**  
*Les temps incluent les questions/discussions.*  
Chair : David CAMERON, Edinburgh University Cancer Centre, UK
- 10h10 - 10h25** **Introduction**  
Suzette DELALOGUE, présidente du Comité de pilotage du PAIR SEIN
- 10h25 - 10h45** **Cellules souches et progénitrices mammaires et leur contribution dans la tumorigenèse**  
Véronique MAGUER-SATTA, U1052-UMR 5286, Centre Léon Bérard, Lyon
- 10h45 - 11h05** **Identification des mécanismes moléculaires impliqués dans l'enrichissement des cellules souches cancéreuses de sein après radiations ionisantes**  
Chann LAGADEC, Inserm U908, Université Lille 1, Villeneuve d'Ascq
- 11h05 - 11h25** **Explorer la contribution de TLR9 dans la surveillance cellulaire et immunitaire lors de l'initiation du cancer du sein**  
Uzma HASAN, Hôpital Lyon Sud, Pierre Bénite
- 11h25 - 11h45** **RiboTEM : rôle des altérations ribosomiques dans la transition épithélio-mésenchymateuse du cancer du sein**  
Jean-Jacques DIAZ, CNRS UMR 5286, Lyon
- 11h45 - 12h05** **Nanovecteurs magnétiques théranostiques de siRNA comme nouvelle approche dans le diagnostic et le traitement du cancer du sein**  
Stéphanie DAVID, Université F. Rabelais, Tours
- 12h05 - 12h25** **Hétérogénéité intratumorale des cancers du sein pT1N0**  
Roman ROUZIER, Université Versailles Saint Quentin et Institut Curie, Saint-Cloud

- 12h25 - 12h45**      **Quantification du risque résiduel de rechute (R3) métastatique après traitements adjuvants optimaux, grâce à une analyse de l'hétérogénéité intratumorale**  
Fabrice ANDRÉ, Gustave Roussy et Inserm U981, Villejuif
- 12h45 - 13h00**      **Conclusion de la restitution par David CAMERON**
- 13h00 - 14h00**      **Déjeuner**
- 14h00 - 17h00**      **Réunion scientifique UCBG – Gineco**  
*Les temps incluent les questions/discussions.*  
Chairs : Thomas BACHELOT, président de l'UCBG, et Anne-Claire HARDY
- 14h00 - 14h20**      **Stratégie et avancées de l'UCBG**  
Thomas BACHELOT, président de l'UCBG
- 14h20 - 15h05**      **CDK4/6 inhibition in HER2+ disease: a triple-hit therapy?**  
Otto METZGER, Dana Farber Institute, Boston
- 15h05 - 15h25**      **La médecine de précision : réalisations et prochaines étapes**  
Fabrice ANDRÉ, Gustave Roussy et Inserm U981, Villejuif
- 15h25 - 15h45**      **Biomarqueurs circulants**  
Jean-Yves PIERGA
- 15h45 - 16h05**      **Survivorship : premiers grands résultats de l'étude CANTO**  
Inès VAZ LUIS
- 16h05 - 16h25**      **Programmes de prévention de l'UCBG : actualités et perspectives**  
Suzette DELALOGUE et Anthony GONÇALVES
- 16h25 - 17h00**      **Discussion générale**

# Suzette DELALOGUE

**Oncologue médical, spécialiste du cancer du sein**

**Chef du comité de Sénologie**



Le Dr Suzette Delalogue exerce depuis 1999 à Gustave Roussy où elle dirige depuis 2004 le Comité de Pathologie Mammaire. Elle dirige une équipe multidisciplinaire de 70 médecins, soignants et chercheurs, coordonnant et gérant toutes les activités de recherche clinique et de soins dans le domaine de la sénologie.

Ses principaux domaines d'expertise et de recherche sont la prévention du cancer basée sur les risques individuels, le développement thérapeutique guidé par la biologie pronostique et prédictive et l'organisation des soins. Elle coordonne la grande étude européenne MyPeBS qui évalue le dépistage personnalisé du cancer du sein ([www.mypebs.eu](http://www.mypebs.eu)).

Elle est l'auteur de plus de 240 publications internationales évaluées par des pairs et de plus de 500 présentations lors de conférences internationales (Scopus H-Index: 50). Elle a présidé l'Intergroupe Coopérateur National Français de recherche sur le Cancer du Sein-Unicancer (UCBG) de 2015 à 2019.

Le Dr Delalogue est co-éditeur de la section cancer du sein pour la revue internationale European Journal of Cancer et éditeur de la section génétique pour la revue The Breast ; elle est membre du comité consultatif international de The Lancet Oncology. Elle est membre de plusieurs commissions académiques nationales et internationales, de comités de pilotage et de conseils scientifiques ainsi que de nombreux groupes de recommandations pour la pratique, français et internationaux.

Enfin, elle a été la présidente du conseil scientifique du PAIR Sein de l'Institut national du cancer en 2014.

## David CAMERON



Prof. Cameron's first degree was in mathematics from the University of Cambridge, and he received his medical degree in 1986 from St. George's Hospital Medical School, London. After completing a fellowship and MSc in Clinical Oncology at the University of Edinburgh, he received a M.D. with distinction in 1997 and completed his training as a medical oncologist that same year.

He is currently director of cancer services in NHS Lothian, the CSO clinical cancer research champion, and the clinical director of the Edinburgh University Cancer Centre and CRUK cancer centres. These latter two roles he will step down from in September 2019 in order to take on the role of chair of the Breast International Group, a Brussels-based umbrella group of over 60 worldwide academic/not-for-profit breast cancer trials' groups, and to be vice chair of the steering group of the Oxford-based Early Breast Cancer Clinical Trialists' Group. He will remain as the joint lead for the Edinburgh Experimental Cancer Medicine Centre.

He is active in a number of current and past clinical trials in breast cancer. He is a member of the executive committee of the HERA adjuvant herceptin trial, and a member of the steering group for several UK adjuvant breast cancer trials, as well as the BIG APHINITY, ALTTO/NEO\_ALTTO, BRAVO and AURORA studies and other international breast cancer studies. He was chief investigator on the UK trial adjuvant breast cancer trial, TACT2, and of BEATRICE, a global trial that tested the possible benefit of adjuvant bevacizumab in triple negative breast cancer, and serves on the iDMC of a number of clinical trials in breast and other cancers.

Between November 2006 & June 2010, he was Director of the NIHR-funded National Cancer Research Networks, and at the end of 2009 took up a new post as Professor of Oncology at Edinburgh University and Director of Cancer Services in NHS Lothian. He is a present and past member of several cancer research funding committees including INCA PHRC, PAIR (Sein), Cancer Research UK Science committee, Cancer Research UK Clinical Research Committee, and from time to time various NIHR funding bodies including EME, clinical trials fellows committee. He is on the advisory board of the ICR and Glasgow Clinical Trials Units, and the Bordeaux Institute Bergonie SIRIC and the Cardiff Cancer Clinical and Translational Research programmes.

## Véronique MAGUER-SATTA



Le Dr Véronique Maguer-Satta est biologiste de formation.

Elle a obtenu un doctorat en biologie en 1994. Elle a été nommée CR1 CNRS à l'Inserm U453 en 2001 et a démarré son propre groupe de recherche en 2006 à l'Inserm U590. Elle a été promue le DR2 (directeur de recherche) au CNRS en 2012 et le DR1 en 2017. Depuis 2013, elle dirige une équipe de recherche travaillant sur les « BMP, niche tumorale et cellules souches cancéreuses » CRCL, Lyon, France. Elle possède une longue expérience dans le domaine des cellules souches, en particulier dans le système hématopoïétique, travaillant sur la caractérisation des cellules souches

normales et CML depuis son premier poste postdoctoral - Dr Connie Eaves (Vancouver, Canada).

Depuis 2013, ses activités de recherche ont développé des aspects innovants de la biologie des cellules souches cancéreuses (cancer du sein et leucémies myéloïdes adultes) dans la perspective de la compréhension de la modélisation biomécanique et mathématique. À ce titre, elle connaît très bien les activités de recherche pluridisciplinaires. Elle a déjà obtenu plusieurs programmes de financement académique en tant qu'IP pour des projets uniques ou multipartenaires. Elle est cofondatrice du réseau français Tumor Niche puis Micronit GDR (depuis 2011), du Network structurant Mécrobiologie et Cancer (depuis 2016).

Membre du conseil d'administration du COST BioBrillouin, elle a été une contributrice sélectionnée du « projet Halifax », un groupe de travail international sur « les mélanges environnementaux et le cancer » (2013). Elle est membre du conseil d'administration des institutions académiques nationales (CNRS, HCERES), membre du conseil d'administration et du conseil scientifique des différentes institutions [CHO, SFH, Fondation cancer de la France (coprésidente), Centre de cancérologie Oscar Lambret de Lille, Cancéropôle CLARA, SAB centre de recherche en cancérologie de Nantes].

Elle est impliquée dans l'enseignement, le jury HDR ou PhD (examineur ou président), la formation des étudiants et son expertise est souvent sollicitée au niveau national et international pour l'évaluation des subventions ou les activités éditoriales.

---

# RÉSUMÉ

## Cellules souches et progénitrices mammaires et leur contribution dans la tumorigenèse

- **Résumé**

Au détour de ce travail nous avons par une stratégie d'analyse du compartiment des cellules basales de la glande mammaire humaine identifié une signature moléculaire permettant de prédire le facteur de risque d'un très grand nombre de types tumoraux différents. Ceci nous a permis également d'éclairer le rôle de la molécule CD10 dans le contrôle du compartiment des cellules souches épithéliales mammaires humaines et leur transformation. Cette signature est en cours d'instruction pour brevet (dépôt par le cabinet LLR dans l'été 2018, mandaté par le CNRS). Une fois cette étape réalisée, nous soumettrons pour publication dans un journal à très haut impact facteur le manuscrit qui est d'ores et déjà prêt. Le concept associé à la découverte de cette signature est très novateur et en rupture par rapport aux approches classique de recherche de signature. Cela nous a conduits à un nouveau concept qui prend en compte l'hétérogénéité tumorale et la dynamique de son écosystème.

- **Résultats**

Nous avons analysé le rôle de la voie des molécules BMP dans la régulation des CS épithéliales mammaires normales. Nous avons clairement établi que, comme dans le système hématopoïétique, les molécules BMP2 et BMP4 ont des effets bien distincts sur la régulation des CS humaines. En effet, alors que BMP4 semble jouer sur le compartiment des CS et des progéniteurs myoépithéliaux, BMP2 permet l'engagement et la prolifération des progéniteurs luminaux. Ce résultat est très important dans le contexte du cancer du sein puisqu'il est cohérent avec une dérégulation spécifique des taux de BMP2 restreintes aux tumeurs du sous-type luminal mais pas basal. Au vu de l'augmentation de taux de BMP2 uniquement dans les tumeurs lumineuses, du rôle de BMP2 dans le déterminisme de ce lignage, de la dérégulation de son récepteur BMPR1B nous avons recherché quelle serait les conséquences d'une exposition chronique de CS mammaires à des taux élevés de BMP2 dans leur environnement. Seul BMP2 (mais ni BMP4, ni l'IL6) peut conduire une cellule prénéoplasique à une transformation complète en combinaison avec l'IL6 et aboutir au phénotype d'une tumeur luminale comme montré par des analyses multiparamétriques des clones transformés, des analyses transcriptomiques et des expériences de xénogreffes *in vivo*. Nos analyses permettent de proposer une séquence d'événements dans les étapes extrêmement précoces de la transformation des CS épithéliales mammaires vers un phénotype de tumeur luminale. BMP2 se fixe sur son récepteur BMPR1B et induit un signal permettant l'engagement des CS vers le lignage luminal en inversant la balance des facteurs de transcription FOXC1/FOXA1 en faveur de FOXA1. Simultanément BMP2 induit une expression du facteur de transcription luminal GATA3. De façon remarquable, les résultats des xénogreffes ont révélé un rôle majeur de l'expression de BMPR1B dans l'induction précoce de la neo-vascularisation tumorale. Cette étape semble primordiale à l'établissement et la progression des tumeurs lumineuses induites par BMP2. Enfin, nous avons impliqué le rôle des polluants de la famille des bisphénols dans l'initiation des dérégulations de la voie des BMP à la fois dans les CS épithéliales mammaires et dans leur micro-environnement.

*Nous avons ainsi démontré pour la première fois qu'une dérégulation locale des BMP dans la niche des CS mammaires est capable de promouvoir la transformation de CS épithéliales résidentes. (INCA PLBIO 2010-2013).*

- Chapellier C, ... and Maguer-Satta V. (2015) *Disequilibrium of BMP2 levels in the breast stem cell niche launches epithelial transformation by over-amplifying BMPR1B cell response.*

*Stem Cell Reports*, 4(2):239-254. PMID : 25601208

-Clément F, ... and Maguer-Satta V\*. *Long-term exposure to Bisphenol A or Benzo(a)pyrene alters the fate of human mammary epithelial stem cells in response to BMP2 and BMP4, by pre-activating BMP signaling.* *Cell Death Diff.* 2017 Jan;24(1):155-166. doi : 10.1038/cdd.2016.107. Epub 2016 Oct 14. PMID : 27740625

Différentes puces Affymetrix ont été réalisées dans le cadre de la caractérisation des modèles de transformations des tumeurs émergents de la transformation de cellules souches (MCF10A) par une exposition chronique à un excès de ligand BMP2. Ce travail a permis d'identifier une signature des états préneoplasiques. Nous avons ici analysé l'évolution de l'expression des gènes BRCA1 et BRCA2 dans ce nouveau modèle de progression de tumeurs. Nous observons une baisse importante de l'expression des deux gènes après transformation. De plus, l'amplitude de la baisse de l'expression de BRCA1 et BRCA2 accompagne la progression tumorale. Ces données indiquent bien l'existence d'une relation fonctionnelle entre la voie des BMP et celle des gènes BRCA lors du processus de transformation des cellules souches épithéliales mammaires.

Au cours du travail sur BMP2 nous avons généré des nouveaux modèles de transformation des CS épithéliales à partir de la lignée MCF10A. Nous observons un enrichissement en cellules épithéliales CD10+ lors du processus de transformations et avec le degré d'agressivité des différents modèles. Le CD10 est une endopeptidase zinc-dépendante capable d'inactiver un certain nombre de peptides impliqués dans certaines voies de signalisation. Dans un contexte tumoral, CD10 est parfois utilisé comme un marqueur diagnostique et pronostique. Il est impliqué dans la progression de certaines tumeurs à fort potentiel métastatique, mais le rôle du CD10 dans la régulation des CS mammaires n'avait encore jamais été décrit. Nous avons effectué une analyse transcriptomique (AFFYmetrix) à partir de cellules primaires et des modèles générés par exposition à BMP2 et comparé les profils des cellules CD10+ et CD10- de cellules normales ou transformées.

Nos résultats indiquent que le lien de l'expression de CD10 avec des propriétés de CS est conservé lors de la transformation des CS épithéliales. Cependant différentes approches de modulation de l'expression de CD10 n'ont pas pu mettre en évidence de lien direct avec le mécanisme de transformation. Par contre, nos données indiquent que la population de CS épithéliales identifiable par l'expression membranaire de CD10 est plus susceptible à la transformation par BMP2 que les cellules saines CD10-. Le lien avec l'expression membranaire de CD10 est ensuite perdu après transformation. En effet, les cellules épithéliales transformées conservent toutes la signature des cellules CD10+ saines indépendamment de l'expression membranaire de CD10. L'analyse de database de large ampleur (telle Metabric ou Pancancer) nous a permis d'identifier que cette population CD10+ « prone » à la transformation présente une signature moléculaire prédictive de l'agressivité d'un grand nombre de tumeurs solides (Guyot et al, soumis et brevet européen).

Nous avons également déterminé que BMP4 régule l'engagement des CS mammaires vers le phénotype basal/myoépithélial ainsi que l'absence de dérégulation des taux de BMP4 dans les cancers du sein, suggérant un rôle différent de celui de BMP2 dans la tumorigenèse. De plus, nous avons impliqué la voie des BMP dans un modèle de métastases osseuses lors d'un travail collaboratif (P. Cohen, CRCL).

Il est possible que des altérations des CS affectent la réponse à BMP4 conduisant à la dérégulation de l'expression et de la fonction de DNP63 et progressivement permettant la transformation de ces cellules vers un phénotype basal. Nous quantifions l'expression des éléments de la voie canonique des BMPs dans des prélèvements pré-tumoraux obtenus de patientes ayant des mutations BRCA1/2 décrites pour représenter des patients à haut risque de développement de tumeurs de type basales (Triple négatif). Nous évaluons ainsi si une dérégulation précoce de la voie de signalisation BMP existe dans les cellules mutées pour BRCA, avant même l'apparition formelle d'une tumeur. Contrairement à ce que nous avons décrit dans les cancers luminaux, il n'y a pas de différence dans les taux de BMP2 soluble entre les prélèvements de donneur sains et ceux de patientes portant une mutation BRCA ni des tumeurs basales. Les taux de BMP4 sont également similaires entre les tissus sains et mutés BRCA avec une légère augmentation dans les tumeurs basales.

Une dérégulation de nombreux transcrits d'éléments de la voie des BMP est observée dans les cellules épithéliales isolées de patientes BRCA comparativement aux cellules de donneur sain. Les cellules BRCA présentent des taux plus élevés pour BMP2 et BMP4 et le récepteur de type Ia, SMAD1 et 5 et une diminution de l'expression de régulateurs négatifs du signal BMP. Contrairement aux tumeurs lumineuses, nous n'observons pas d'augmentation du récepteur de type Ib mais au contraire une diminution de ce récepteur et inversement une augmentation significative de l'autre récepteur de type I le BMPRIa.

Ces résultats indiquent que l'apparition de mutations BRCA se traduit par une dérégulation profonde de la voie des BMP dans les cellules épithéliales mammaires et ce bien avant l'apparition de tumeurs. L'analyse à large échelle de l'expression transcriptionnelle d'un grand nombre de gènes de puce affymetrix a également été réalisée sur des cellules primaires isolées d'échantillons de tissu mammaire muté BRCA1 et BRCA2 (mais non transformé) enrichies ou pas en cellules immatures (CD10+ ou CD10-) en comparaison d'échantillons sains. Nous n'avons cependant pas encore identifié dans une analyse préliminaire, en plus de la voie des BMP, des voies de signalisations qui pourraient signer une interaction particulière entre BMP et BRCA dans les étapes précoces de la transformation et établir l'existence (ou pas) d'une dérégulation spécifique du compartiment des cellules immatures. Projet (INCA-PAIR SEIN 2014-17 Dr M. Glukhova de l'institut Curie). Ce travail est toujours en cours.

-Flora Clément \*, Élodie Grockowiak \*, Florence Zylbersztejn, Gaëlle Fossard, Stéphanie Gobert and Véronique Maguer-Satta. *Stem cell manipulation, gene therapy and the risk of cancer stem cell emergence, Stem Cell Investigation, 2017. 10.21037/sci.2017.07.03*

- Bellanger A, Donini C, Vendrell J, Lavaud J, Machuca-Gayet I, Ruel M, Vollaire J, Grisard E, Györfy B, Bièche I, Peyruchaud O, Coll JL, Treilleux I Maguer-Satta V, Josserand V and . Cohen P. *The critical role of the ZNF217 oncogene in promoting breast cancer metastasis to the bone. 2017. Journal of pathology. May;242(1):73-89. doi : 10.1002/path.4882. PMID : 28207159*

- Jung N, Maguer-Satta V\* and Guyot B\*. *Early Steps of Mammary Stem Cell Transformation 2 by Exogenous Signals; Effects of Bisphenol Endocrine 3 Disrupting Chemicals and Bone Morphogenetic 4 Proteins. Cancers. 2019, 11(9), 1351; <https://doi.org/10.3390/cancers11091351> - 12 Sep 2019*

- Guyot B and Maguer-Satta V\*. *A Potential New Mechanism for Bisphenol Molecules to Initiate Breast Cancer through Alteration of Bone Morphogenetic Protein Signaling in Stem Cells and Their Microenvironment. IntechOpen Book. Bisphenol A. 2019. In press*

- Guyot B§\*, Drouet Y§, Clément F§, Foy JP, Schmidt X, Delay E, Thomas E, Kielbassa J, Jeanpierre J, Treilleux I, Zhang KQ, Blay JY, He Zhu H, Viari A, Saintigny P, Gao WQ and Maguer-SattaV\*. *Uncovering a unique pre-*

*malignant stem-cell signature to identify high-risk patients in a broad range of solid cancers. Nature Cancer, Submitted*

- **Brevet CNRS** : “CD10 molecular signature, relative to the presence of cancer stem cells, as a clinical marker to monitor residual disease and progression marker in solid tumors.” Maguer-Satta V, Guyot B, Clément F, Delay E, Schmidt X, Saintiny P, Foy J-P. European patent n° EP19305423.6 (CNRS, LLR patent office).

Il est également à noter que les discussions pour des brevets pour CD10 ont retardé également la valorisation et communication autour de ce travail et de celui décrit ici. Enfin, les aléas technologiques rencontrés dans le développement des modèles BRCA1 et BRCA2 ont également impacté la réalisation de nos objectifs initiaux.

- **Résumé grand public**

Dans différents cancers, certains patients résistent aux traitements. Ceci est lié à l’existence d’une petite population de cellules cancéreuses ressemblant aux cellules souches (CS) permettant normalement le renouvellement des tissus. Pour guérir, il faut éliminer ces CS cancéreuses et donc comprendre comment elles apparaissent et survivent aux traitements. Nous avons recherché l’origine et l’importance d’anomalies de la voie des Bone Morphogenetic Protéin-BMP dans ce contexte. Nous avons découvert que les molécules BMP sont importantes pour les CS cancéreuses et leur permettent d’échapper à la mort par les traitements anticancéreux. Les cellules entourant les CS cancéreuses (stroma) fournissent des quantités anormalement élevées de BMP (qui peuvent être induites par des polluants de l’environnement comme les bisphénols). Ces BMP font pousser les CS cancéreuses qui y sont hypersensibles à cause de l’expression trop forte de capteurs à leur surface (BMP-récepteur). Nous avons également découvert une « signature » des cellules souches anormales qui permet de prédire l’évolution du cancer du sein et d’identifier des médicaments efficaces.

## Chann LAGADEC



Après son doctorat, le Dr Lagadec a passé 5 ans comme postdoc puis « assistant research biologist » au sein du laboratoire du Dr Frank Pajonk, un pionnier de la recherche sur les cellules souches cancéreuses. Durant cette période à l'université de Californie – Los Angeles, UCLA, dans le département de « radiation oncologie », le Dr Lagadec a acquis l'ensemble des compétences nécessaires à l'étude des cellules souches cancéreuses (CSC) et a été le premier à démontrer la plasticité phénotypique des CSC induite par les traitements de radiothérapie.

Depuis 2013, le Dr Lagadec a construit sa propre équipe au sein du laboratoire INSERM U908 à Lille. C'est ainsi grâce à un premier financement de l'INCa - PAIR SEIN que le Dr Lagadec a pu véritablement initier ces travaux de recherche sur les mécanismes

moléculaires impliqués dans le processus de reprogrammation. Le Dr Lagadec et son équipe ont de plus développé des outils de tracking et de caractérisation des CSC et CSC induites. Plus récemment, son domaine d'intérêt s'est agrandi pour comprendre le rôle potentiel de la reprogrammation dans la dormance tumorale et le développement métastatique.

---

## RÉSUMÉ

### **Identification des mécanismes moléculaires impliqués dans l'enrichissement des cellules souches cancéreuses de sein après radiations ionisantes**

Selon le modèle hiérarchique d'organisation tumorale, seule une sous-population tumorale, les CSC (cellules souches cancéreuses), est capable de régénérer une tumeur. Ces CSC possèdent des caractéristiques communes aux cellules souches normales comme la capacité d'auto-renouvellement illimité et de différenciation. L'identification des CSC dans les tumeurs hématologiques et solides a donné naissance à de nombreuses études fondamentales et translationnelles. Cependant, des études récentes démontrent l'existence d'une plasticité des cellules cancéreuses. En effet, les cellules cancéreuses non-souches (non-CSC), différenciées, peuvent générer des CSC en réponse à divers stimuli (chimiothérapie, radiothérapie, hypoxie...). Ainsi, la radiothérapie entraîne l'induction de CSC (iCSC) à partir de non-CSC, *in vitro*, similaires aux CSC initiales. Cette reprogrammation pourrait participer à la résistance aux traitements, accroître le risque de récives et intervenir dans le développement métastatique. Malgré tout, les mécanismes à l'origine de la reprogrammation demeurent méconnus, et il apparaît essentiel d'identifier des cibles thérapeutiques pour prévenir l'apparition des CSC.

Dans le cadre de ce projet de recherche, nous avons mis en évidence que le milieu conditionné de non-CSC irradiées induit la reprogrammation en CSC de cancer du sein. Nous avons pu observer par puce à protéine et test ELISA que l'irradiation entraîne la sécrétion spécifique de chimiokines, dont CXCL1 et CCL5. Le rôle de ces chimiokines dans la reprogrammation a été étudié par traitement à l'aide de protéines recombinantes et d'anticorps neutralisants, ainsi que par des inhibiteurs pharmacologiques ciblant les

récepteurs. Ces expériences ont permis de montrer l'implication de CXCL1, CCL5 et leurs récepteurs dans la reprogrammation *in vitro*. De plus, l'inhibition *in vivo* de CXCL1 et CCL5 combinée à un traitement de radiothérapie dans un modèle murin de xénogreffes induit une augmentation de la survie. Pour finir, l'analyse transcriptomique de l'expression des chimiokines et de leurs récepteurs des bases de données cliniques, a démontré une corrélation avec des signatures tumorales de CSC ainsi que les sous-types plus agressifs dans le cancer du sein, et une survie sans métastases significativement diminuée.

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

D'autre part, il était impossible de différencier les CSC préexistantes des CSC induites (iCSC) suite à la reprogrammation. En effet, ces populations possèdent toutes deux les mêmes propriétés « souches » et sont identifiées par les mêmes marquages conventionnels. De plus, faute de marqueurs de reprogrammation, les études ne permettent pas un suivi dynamique de la plasticité cellulaire. Il était donc impératif de disposer de moyens spécifiques permettant l'identification de manière différentielle des CSC préexistantes et des iCSC pour l'étude de l'implication de la reprogrammation suite aux traitements.

Au cours de ce projet, nous avons mis en évidence que le promoteur de l'ALDH1A1 pouvait être un marqueur de l'activité des CSC. Les cellules identifiées par ce marqueur présentent des propriétés d'auto-renouvellement, de différenciation, de résistance aux thérapies et de tumorigenèse *in vivo*. Le suivi de ces cellules par fluorescence a également permis de visualiser le phénomène de reprogrammation en temps réel suite à l'irradiation. Tout comme il a permis de mettre en évidence le plus fort potentiel d'extravasation de ces cellules dans un modèle de puces mimant un microvaisseau. Nous avons par la suite construit un vecteur d'expression inductible basé sur l'activité de ce promoteur afin de suivre de manière dynamique les différentes populations cellulaires : non CSC, CSC préexistantes et iCSC. Ce vecteur se compose de plusieurs systèmes, notamment le système inductible TetON, le système CRE-loxP et le système de recombinaison Flp/FRT permettant le suivi des populations cellulaires par fluorescence.

Ce projet a ainsi permis la mise en évidence d'une partie des mécanismes moléculaires impliqués lors des traitements de radiothérapie et la génération d'outils utilisables pour le suivi dynamique des CSC et des CSC induites par les thérapies. Nous poursuivons actuellement l'étude des mécanismes et le développement de *in vivo* afin de parfaire notre connaissance de la plasticité phénotypique des CSCs et d'envisager son ciblage afin d'augmenter l'efficacité des traitements.

- **Communications Orales**

1. Re-born from fire. 1st ONCOLille Symposium on 'Tumor Dormancy' June 2014, Lille.
2. CXCL1 and CCL5, induced by ionizing radiation, reprogram non-tumorigenic cancer cells into cancer stem cells in breast cancer. 2<sup>nd</sup> SUNRiSE symposium, June 2017, Montpellier.
3. Bidan N., Bailleul J., Duval J., Le Bourhis X., Lagadec C., **Study of cell reprogramming in a murin model : Follow-up of radio-induced cancerous stem cells and validation of cytokines involved.** 11<sup>th</sup> International Conference on Cancer Stem Cells and Oncology Research – Dublin, June 2018.

- **Communications posters**

1. Bidan N., Bailleul J., Duval J., Le Bourhis X., Lagadec C., **Study of cell reprogramming in a murin model : Follow-up of radio-induced cancerous stem cells and validation of cytokines involved.** 11<sup>th</sup> International Conference on Cancer Stem Cells and Oncology Research – Dublin, June 2018.
2. Bailleul J., Bidan N., Mouttet-Audouard R., Arcicasa M., Hannebicque K., Takayama Y., Meignan S., Le Bourhis X., Lagadec C. **CXCL1 and CCL5, induced by ionizing radiation, reprogram non-tumorigenic cancer cells into cancer stem cells in breast cancer.** Annual Meeting of American Association of Cancer Research – Washington DC, April 2017, Abstract 2881.
3. Bailleul J., Le Bourhis X., Lagadec C., **Identification des facteurs solubles impliqués dans la reprogrammation en cellules souches cancéreuses mammaires, après radiations ionisantes.** 8<sup>e</sup> journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, June 2015, CID de Deauville.
4. Bailleul J., Mouttet-Edouard R., Meignan S., Lartigau E., Le Bourhis X., Lagadec C., **Identification of diffusible factors involved in radiation reprogramming process of non-CSCs into Breast CSCs.** 1st ONCOLille Symposium on Tumor Dormancy, June 2014, Lille.

- **Publications**

1. Bailleul-Dubois J, Bidan N, Denoulet M, Brulé M, Mouttet-Edouard R, Cousin S, Bouchaert E, Benoit J, Toillon RA, Finetti P, Birnbaum D, Bertucci F, Adrianenssens E, Le Bourhis X, Le Bourhis X, Lagadec C, CXCL1/CXCR2 and CCL5/CCR1/CCR5 promote radiation-induced reprogramming of non-cancer stem cells into resistant cancer stem cells and predict patient clinical outcome, Submitted in J. of Exp and Clin. Cancer Research.
2. Bidan N, Bailleul-Dubois J, Duval J, Winter M, Denoulet M, Hannebicque K, El-Sayed IY, Ginestier C, Forissier V, Matsunaga Y, Meignan S, Anquez F, Julien S, Bonnefond A, Derhourhi M, Bourhis XL, Lagadec C. Transcriptomic Analysis of Breast Cancer Stem Cells and Development of a pALDH1A1 :mNeptune Reporter System for Live Tracking. **Proteomics**. 2019 Aug 20 :e1800454.
3. Tian L, Truong MJ, Lagadec C, Adriaenssens E, Bouchaert E, Bauderlique-Le Roy H, Figeac M, Le Bourhis X, Bourette RP. s-SHIP Promoter Expression Identifies Mouse Mammary Cancer Stem Cells. **Stem Cell Reports**. 2019 Jul 9;13(1):10-20.
4. Lagadec C, Toillon RA, Le Bourhis X. WhatsApp com between glioma stem cells and differentiated cells to sustain tumor growth. **Stem Cell Investig**. 2018 Sep 7;5:28
5. Bailleul-Dubois J., Bidan N., Le Bourhis X., Lagadec C. Effet de la radiothérapie sur les cellules souches cancéreuses de cancer de sein : résistance, reprogrammation et traitements. **Oncologie**. 2017, April 19(3-4)77-80

- **Résumé patients/grand public**

Depuis plusieurs années, nous savons que les tumeurs solides sont organisées de manière hiérarchique. Néanmoins, certaines cellules cancéreuses non-tumorigéniques peuvent réacquérir un phénotype souche, et enrichir d'autant la tumeur en cellules résistantes et tumorigéniques. Le projet que nous avons développé consistait à mettre en évidence des mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus de reprogrammation afin de les prévenir et d'améliorer la réponse aux traitements, et d'identifier l'impact sur les patientes.

# Uzma HASAN



For the last ten years, Uzma Hasan has been a Principle Investigator at the International Center for Infectiology Research (CIRI), Lyon, France.

Her career path started at Kings College then at St Bart's and Royal London Medical School, UK where she obtained her PhD in Immunology. Uzmas' post-doctoral training was based at Schering Plough working in the field of Toll Like Receptors.

She worked on HPV, EBV and HBV immune escape from innate receptor sensing at IARC, WHO, Lyon France. This led to forming a theme within the CIRI in which she continues to understand how chronic diseases can prevent innate immune responses.

---

## RÉSUMÉ

### Explorer la contribution de TLR9 dans la surveillance cellulaire et immunitaire lors de l'initiation du cancer du sein

*Collaboration entre Pls Bendriss, N CRCL Lyon France, Hasan , U CIRI, Lyon France. Tredan, Oliver CLB, Lyon France, Ng Tony KCL, London UK.*

- **Contexte, objectifs**

Breast cancer (BC) is the leading form of cancer found in females worldwide; of which 500,000 women die each year. Evading the immune system and cell cycle control are two key events associated to cancer development. Toll Like Receptor 9 (TLR9) is an innate immune sensor specialised in sensing double stranded DNA (dsDNA) motifs expressed by pathogens or released from damaged host cells. In humans, TLR9 is highly expressed on plasmacytoid dendritic cells (pDCs) and activation of which leads to the huge production of type I interferon (type I IFN); a critical mediator involved in tumor immunosurveillance and rejection. However, **Bendriss, N** et al ., and others showed that within the tumor microenvironment (TME) of breast, ovary, cervical, and head and neck carcinomas TLR9 responses from Tumour-Associated pDCs (TApDCs) are impaired in cancer. Besides pDCs, TLR9 has been shown to be differentially expressed in normal and tumor epithelial cells. **Hasan, U** et al., has also observed that TLR9 was downregulated in head and neck cancer patient derived cell lines and in cervical cancer biopsies. Preliminary data from our groups also showed a reduced expression of TLR9 in BC compared to non-tumoral mammary tissue. Based on these results *our main objective was to determine if TLR9 contributes to both cellular and immunosurveillance within the TME in the early stages of BC.* In this context, there may exist endogenous dsDNA sequences released by tumor cells that may activate TLR9 in order to suppress cell growth and activate TApDCs.

- **Méthodes**

The techniques employed for this project included immunohistochemistry, immunofluorescence, proximity ligation assays, ELISAs, Flow cytometry, western blotting and Transcriptome analysis. Material for this study

included BC cell lines, peripheral blood mononuclear cells, breast biopsies from BC patients and murine models.

- **Résumé de résultats, conclusions et perspectives**

#### **Hasan, U**

Here, we were able to complete a study to examine the level of TLR9 expression in BC tissues. Hasan, U, and the group of Ng, T performed and analyzed the IHC tissue staining in epithelial cells and concluded so far that TLR9 expression is lost during disease progression. Furthermore, we will analyze the number of TLR9 positive cells in the immune infiltrate in the same cohort. We have also observed that cell lines derived from BC patients express varied levels of TLR9. Our data strongly suggest that TLR9 alters cell growth in BC cell lines. Over expression of TLR9 but not TLR7 led to a decrease in colony formation, induction of cell senescence and an increase in tumor suppressor molecules such as p53, p21 and p16 in BC cells. These data need to be confirmed. Although an ER $\alpha$ /NF $\kappa$ B complex has been shown to inhibit TLR9 expression in cervical cancer tissue (Hasan et al, JEM 2013), we cannot conclude that the same complex is required for TLR9 suppression in BC epithelial. We still have to elucidate the mechanism/s that lead to 1. The loss of TLR9 in BC cells 2. Alteration of cell growth. We have transcriptome data from TLR9 vs TLR7 over expressing BC cells, these data need to be analyzed and exploited to determine the molecules that are altered by TLR9 and not TLR7. We have also determined that a SNP in the TLR9 TIR domain may render TLR9 function.

#### **Bendriss, N**

We previously reported that TApDC are deficient for type I IFN production in advanced BT. Here we identified BAD-LAMP as a novel inhibitory mechanism preventing IFN-I production in TApDC, indirectly, by promoting TLR9 sorting to late endosome compartments. Furthermore, we show for the first time in mice that i) host type I IFN is required for mammary tumor rejection and ii) a type I IFN transcriptional profile concomitantly to an influx of pDC and neutrophils are rapidly induced in tumor tissue after tumor challenge. We still need to demonstrate that pDC, neutrophils, and LL-37 are involved in type I IFN signature *in vivo* by performing depleting experiments. In human BT, we described for the first time a strong infiltrate of pDC and neutrophils and the expression of type I IFN-related molecules in DCIS. Ongoing multi-IF stainings on 150 invasive TNBC and 15 DCIS will help to correlate these immunological parameters with clinical parameters, including patients' survival. We further show that hCAP18/LL37 is specifically produced by neutrophils that colocalize with TApDC in BT. Importantly, [self-nucleic acids-LL37] complexes purified from breast TME induce or strongly potentiate IFN- $\alpha$  production in healthy pDC *in vitro* demonstrating their functional relevance in BT. Thus, our work suggests a key role of pDC/neutrophil cooperation in tumor immunosurveillance leading to type I IFN production and that restoring pDCs' immunosurveillance function represents an attractive therapeutic strategy for localized BT.

- **Valorisations scientifiques (publications, communications)**

#### **Articles**

-BAD-LAMP controls TLR9 trafficking and signalling in human plasmacytoid dendritic cells. Combes A, Camosseto V, N'Guessan P, Argüello RJ, Mussard J, Caux C, **Bendriss-Vermare N**, Pierre P\*, Gatti E\*. Nat Commun. 2017 Oct 13;8(1):913 (\* equal contribution).

-The antimicrobial peptide LL37 activates plasmacytoid dendritic cells in breast cancer. Vey N, Mussard J, ..., Caux C, and **Bendriss-Vermare N**, in preparation.

-TLR9 re-expression in cancer cells extends the S-phase and stabilizes p16(INK4a) protein expression. Parroche P, Roblot G, Le Calvez-Kelm F, Tout I, Marotel M, Malfroy M, Durand G, McKay J, Ainouze M, Carreira C, Allatif O, Traverse-Glehen A, Mendiola M, Pozo-Kreilinger JJ, Caux C, Tommasino M, Goutagny N, **Hasan UA**. TLR9 re-expression in cancer cells extends the S-phase and stabilizes p16(INK4a) protein expression. *Oncogenesis*. 2016 Jul 25;5(7):e244.

### Oral communications

-2014 13th International Symposium on Dendritic Cells DC2014 Tours, France - Vey N. The antimicrobial peptide LL37 activates plasmacytoid dendritic cells in breast cancers. Vey N, Blanc E, Sisirak V, Thys S, Le Beux C, Goutagny N, Malfroy M, Treilleux I, Léon S, Faget J, Blay JY, Caux C, and **Bendriss-Vermare N**.

-2014 Keystone symposium, Whistler (Canada) - Vey N. The antimicrobial peptide LL37 activates plasmacytoid dendritic cells in breast cancers. Vey N, Blanc E, Sisirak V, Thys S, Le Beux C, Goutagny N, Malfroy M, Treilleux I, Léon S, Faget J, Blay JY, Caux C, and **Bendriss-Vermare N**.

2019-Innate immunity in chronic infections and cancers : Invited Lecture at King

College London, UK. **Hasan UA**

#### -Posters :

-CLARA Meeting Lyon 2017

-1st International Symposium on Immune Responses in Cancer and Infection (IRCI), Lyon, Feb. 2017, Lyon

-“The antimicrobial peptide LL37 activates plasmacytoid dendritic cells in breast cancer”. N Vey, E Blanc, J Mussard, V Sisirak, S Thys, C Le Beux, N Goutagny, M Malfroy, I Treilleux, S Léon, J Faget, J-Y Blay, C Caux, and **N Bendriss-Vermare**.

Présenté lors de :

-2nd edition of international symposium CRCL, Sept. 2015, Lyon (poster teaser)

-CFCD annual meeting, Dec. 2015, Paris

-1st International Symposium on Immune Responses in Cancer and Infection (IRCI), Lyon, Feb. 2017, Lyon

-4<sup>th</sup> scientific day CRCL, May 2016, Lyon

“TLR9 in breast cancer” Roblot G, Ainouze M, Marotel M, Tredan O, Caux C, **Bendriss-Vermare N**, **Hasan U**. IARC international conference June 2015

-2016 ISREC-SCCL inaugural symposium, Sept. 2016, Lausanne, Suisse

#### • **Résumé grand public**

Toll like receptor 9 (TLR9) est une molécule essentielle à la réponse immunitaire de l'hôte ainsi qu'à la mort des cellules tumorales. Pourtant, dans plusieurs cancers, la fonction de TLR9 est inhibée. Notre objectif était de déterminer le rôle de TLR9 humain dans le cancer du sein. Nous avons constaté que chez les patientes avec un cancer du sein, l'expression de TLR9 était diminuée dans les cellules tumorales et que des cellules immunitaires exprimant TLR9 étaient recrutées dans la tumeur, mais ne pouvaient pas fonctionner. Grâce au soutien de l'INCa, nous pouvons conclure que les fonctions de TLR9 dans l'activation des cellules immunitaires et dans la mort des cellules tumorales sont perturbées et que des thérapies visant à restaurer sa fonction pourraient être mises en œuvre dans la lutte contre le cancer du sein.

# Jean-Jacques DIAZ



Après avoir effectué son doctorat en 1988 à l'Université de Lyon, Jean-Jacques Diaz a ensuite réalisé un stage post-doctoral à l'Université du Kansas aux Etats-Unis. En 1991, il a rejoint l'Université de médecine de Lyon où il a initié un programme de recherche qu'il poursuit actuellement en tant que responsable d'équipe depuis 1999 au Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon ([http://www.crcl.fr /](http://www.crcl.fr/)).

Jean-Jacques Diaz est un spécialiste de l'étude du nucléole, des fonctions des ribosomes et de la régulation de la synthèse protéique dans des conditions physiologiques et pathologiques, et est également un expert en analyse protéomique de renommée internationale. Il est impliqué dans de nombreuses activités liées au développement de la protéomique et met son expérience et ses compétences au service de la communauté scientifique en tant qu'éditeur exécutif de la revue

« Journal of Proteomics ». Il a ainsi développé plusieurs outils d'analyse des protéines uniques qui sont publiés en tant que protocoles de référence internationaux.

En 2013, il a publié un article « phare » dans la revue « Cancer Cell » qui a représenté une percée notable dans la biologie du cancer et une contribution majeure dans le domaine des ribosomes. En effet, il a démontré pour la première fois que l'altération de la méthylation de l'ARN ribosomique est un élément clé de la pathologie cancéreuse. En 2017, dans une étude publiée dans PNAS, il a apporté les preuves de la plasticité de l'ARN ribosomique à travers la méthylation en 2' de ses riboses, et démontré son rôle dans le contrôle des capacités intrinsèques de traduction des ribosomes humains. Il a publié de nombreuses revues synthétisant ce changement de paradigme. Il a par ailleurs une solide expérience en recherche translationnelle qui l'a conduit à déposer plusieurs brevets internationaux et à participer à des essais cliniques visant à évaluer des molécules antivirales et anticancéreuses.

---

## RÉSUMÉ

### **RiboTEM : rôle des altérations ribosomiques dans la transition épithélio-mésenchymateuse du cancer du sein**

- **Contexte**

L'amélioration de la prise en charge des patientes atteintes d'un cancer du sein repose en partie sur la compréhension des étapes d'initiation de la tumorigenèse mammaire et l'identification de marqueurs tumoraux aux stades précoces. En effet, bien que l'amélioration des techniques et la mise en place de dépistage permettent de diagnostiquer les cancers du sein à des phases précoces, il est aujourd'hui nécessaire d'identifier des marqueurs pronostiques fiables qui permettent de distinguer les tumeurs les plus agressives pour permettre à long terme une optimisation des décisions thérapeutiques et ainsi une désescalade thérapeutique.

Les patientes pourraient bénéficier des récentes avancées réalisées dans le domaine du ribosome, la micro-machinerie cellulaire qui traduit les ARNm en protéines. La régulation de la traduction joue un rôle central dans la progression tumorale. Notre équipe s'intéresse au ribosome dont le rôle en tant que régulateur est encore peu étudié. Il s'avère que le ribosome peut présenter différentes compositions capables d'induire des fonctions traductionnelles distinctes. Notre équipe a montré pour la première fois que des altérations de la méthylation en 2'-O des riboses (2'-OMe) des ARN ribosomiques (ARNr) surviennent au cours de l'initiation tumorale mammaire et favorisent la traduction d'un sous-groupe d'ARNm contenant des IRES (« Internal Ribosome Entry Site ») et qui codent des protéines oncogéniques ou des protéines de survie.

- **Objectifs**

Notre hypothèse est que des **altérations de composition du ribosome pourraient favoriser la tumorigenèse mammaire à des stades précoces**. Nous nous sommes intéressés à la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) qui survient dans les lésions primaires et stimule la transformation des cellules mammaires. Il émerge que le contrôle traductionnel est un mécanisme induisant l'EMT, régulant l'expression de ses inducteurs et de ses effecteurs.

Les objectifs de RiboTEM étaient de (1) déterminer les valeurs pronostiques et prédictives des facteurs associés à la biogenèse des ribosomes pour améliorer la prise en charge individuelle des patientes diagnostiquées précocement ; et (2) d'identifier les altérations des ribosomes et caractériser les variations du contrôle traductionnel survenant au cours de l'EMT.

- **Résultats majeurs**

- 1) Valeur pronostique des facteurs de la biogenèse des ribosomes

En analysant 3500 échantillons tumoraux par RT-qPCR et immunohistochimie, nous avons identifié deux facteurs de la biogenèse des ribosomes comme étant des marqueurs indépendant de mauvais pronostique dans les cancers du sein non-métastatiques d'emblée : NCL (Nucléoline) un régulateur de la synthèse des ARNr et FBL (Fibrillarine) la méthyl-transférase des ARNr. Contrairement à ce qui était attendu, la sur-expression mais aussi la sous-expression de *FBL* s'est avéré être un marqueur indépendant de mauvais pronostique après ajustement sur des marqueurs cliniques majeurs. Ces tumeurs présentent des caractéristiques moléculaires et cliniques différentes, suggérant des tumeurs dont l'histoire naturelle est différente. Dans un modèle de poisson-zèbre, nous avons montré que la réduction d'expression de *FBL* accélère la tumorigenèse spontanée.

Sur la base de l'ensemble des travaux effectués au cour du projet RiboTEM, il ressort que la sur-expression de *FBL* dans les tumeurs mammaires à forte instabilité génomique favoriserait la résistance et la progression tumorale en modulant la traduction d'ARNm codant des oncogènes alors que la sous-expression de *FBL*, reflétant une diminution de la quantité des ribosomes, contribuerait directement à l'enrichissement en cellules souches qui favoriseraient alors la résistance aux traitements et la progression à distance. Les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'impact de la modulation de *FBL* sur le devenir des tumeurs restent à élucider.

- 2) Contrôle traductionnel, Ribosome et EMT

Grâce à l'approche de « Ribosome Profiling », nous avons mis en évidence pour la première fois que l'EMT est associée à une reprogrammation traductionnelle profonde qui touche un nombre de gènes au moins aussi important que celui des gènes affectés par la reprogrammation transcriptionnelle.

En plus de ces effets quantitatifs, nous avons pu démontrer que les aspects qualitatifs de la traduction (i.e. fidélité de décodage) était elle-aussi modifiée durant l'EMT. En parallèle, nous avons montré pour la première fois qu'au cours des phases précoces de la tumorigenèse induite dans le contexte de l'EMT, la composition du ribosome varie. Cette variation intervient tant au niveau protéique (protéines ribosomiques, facteurs d'initiation de la traduction) qu'au niveau des ARNr (2'-OMe), suggérant l'existence de ribosomes spécifiques de l'état épithélial et mésenchymateux.

Notre modèle, que nous sommes en train de valider, est que la plasticité du ribosome observée au cours de l'EMT permettrait de produire des ribosomes spécialisés dans l'utilisation d'éléments cis-régulateurs spécifiques à certains ARNm à l'origine de la reprogrammation traductionnelle contribuant à l'EMT.

- **Conclusions et perspectives**

Les résultats issus du programme de recherche PAIR Sein RiboTEM ont démontré pour la première fois que la composition du ribosome varie au cours des phases précoces de la tumorigenèse mammaire induite par l'EMT et est associée à une reprogrammation traductionnelle profonde au moins aussi importante que la reprogrammation transcriptionnelle usuellement considéré comme l'élément « driver » de l'EMT. De plus, nous avons identifié deux facteurs de la biogenèse des ribosomes qui se sont avérés être des marqueurs indépendant de mauvais pronostic dans les cancers du sein. Ces découvertes, inattendues et contre-intuitives par rapport aux connaissances actuelles, ont permis de démontrer pour la première fois le rôle fondamental et la pertinence clinique du ribosome, et en particulier de la méthylation des ARNr, dans les phases précoces des cancers du sein. Ce projet a contribué à faire entrer le ribosome dans le domaine de la cancérologie, en plaçant l'épigénétique de l'ARNr au cœur d'une problématique clinique d'actualité. Les travaux et les collaborations initiés dans le cadre de ce programme sont actuellement poursuivis grâce à l'obtention de divers financements.

- **Valorisation scientifique**

Les résultats issus du programme de recherche PAIR sein RiboTEM ont été diffusés au cours de 22 présentations orales, dont une dans le cadre d'un Prix EACR (Proffered Paper 2016, 24EACR), une dizaine de présentations affichées, la mise à disposition d'outil bioinformatique dédié à l'analyse de la reprogrammation traductionnelle (plateforme RiboGalaxy, <http://ribogalaxy.ucc.ie>), 9 articles scientifiques publiés, 2 soumis et 2 en préparation.

#### **Liste des articles scientifiques publiés**

1. Marcel V, Catez F and Diaz JJ. p53, a translational regulator : contribution to its tumour suppressor activity. **Oncogene** (2015) 34(44) :5513-5523.
2. Erales J, Marchand V, Panthu B, Gillot S, Belin S, Ghayad SE, Garcia M, Laforêts F, Marcel V, Baudin-Baillieu A, Bertin P, Coute Y, Adrait A, Meyer M, Therizols G, Yusupov M, Namy O, Ohlmann T, Motorin I, Catez F and Diaz JJ. Evidence for rRNA 2'-O-methylation plasticity : control of intrinsic translational capabilities of human ribosomes. **PNAS** (2017) vol 114(49):12934-12939. *Ce manuscrit démontre pour la première fois le lien direct entre méthylation des ARNr et régulation de la traduction par une approche de traduction in vitro.*
3. Nguyen Van Long F, Lardy-Cleaud A, Bray S, Chabaud S, Dubois T, Diot A, Thompson AM, Bourdon JC, Perol D, Bouvet P, Diaz JJ\*,# and Marcel V\*,#. The druggable nucleolin identifies breast tumours associated with poor prognosis that exhibit different biological processes. **Cancers** (2018) 10 :390. *Ce manuscrit démontre pour la première fois que l'expression de la nucléoline (NCL), un facteur régulant la synthèse des ARNr, est un marqueur indépendant de mauvais pronostic dans les cancers du sein. Ces données suggèrent que les molécules anti-NCL ayant passé les essais.*

4. *cliniques de phase I pourraient bénéficier à certaines patientes atteintes d'un cancer du sein, notamment les patientes atteintes d'un cancer de type TNBC.*
5. Planchard N, Bertin P, Quadrado M, Dargel-Graffin C, Hatin I, Namy O and Mireau H. The translational landscape of Arabidopsis mitochondria. **Nucleic Acids Res** (2018) 46(12):6218-6228.
6. Marcel V, Nguyen Van Long F and Diaz JJ. 40 years of research put p53 in translation. **Cancers** (2018) 10(5), 152.
7. Monaco P, Marcel V, Diaz JJ and Catez F. 2'-O-Methylation of Ribosomal RNA : Towards an Epitranscriptomic Control of Translation? **Biomolécules** (2018) 8 :106.
8. Catez F, Venezia ND, Marcel V, Zorbas C, Lafontaine DLJ and Diaz JJ. Ribosome biogenesis : an emerging druggable pathway for cancer therapeutics. **Biochemical Pharmacology** (2019) 159 :74–81.
9. Dalla Venezia N, Vincent A, Marcel V, Catez F and Diaz JJ. Emerging role of eukaryote ribosomes in translational control. **International Journal of Molecular Sciences** (2019) 20, 1226.

*Ces trois revues présentent l'ensemble des données obtenues par notre laboratoire et par d'autres laboratoires qui soutiennent le rôle des ribosomes dans la dérégulation de l'expression génique que l'on observe dans les cancers, notamment les cancers du sein, et qui contribue directement à l'établissement, à l'évolution et aux réponses au traitement de ces cancers.*

10. Wei J, Kishton RJ, Angel M, Conn CS, Dalla-Venezia N, Marcel V, Vincent A, Catez F, Ferré S, Ayadi L, Marchand V, Dersh D, Gibbs JS, Ivanov IP, Fridlyand N, Couté Y, Diaz JJ, Qian SB, Staudt LM, Restifo NP, Yewdell JW. Ribosomal Proteins Regulate MHC Class I Peptide Generation for Immunosurveillance. **Mol Cell** (2019), 73(6):1162-1173.e5.

#### **Liste des communications orales sur invitation**

- Diaz JJ. Ribosome alterations in cancer : impact on translational control and tumorigenesis. Mini-symposium on translation – Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure (IBENS), rue d'ULM, Paris, France (16 octobre 2019).
- V. Marcel. Role of ribosome heterogeneity in tumorigenesis : the rRNA epigenetic hypothesis. Séminaire invité au Centre International de Recherche en Cancérologie (IARC-OMS), Lyon, France (15 Octobre 2019).
- Diaz JJ. Ribosome alterations in cancer : impact on translational control and tumorigenesis. – 4th International Cancer Symposium – Cancer Research Center of Lyon Convention Center, Lyon, France (2-4 Octobre 2019).
- V. Marcel. Epitranscriptomic of rRNA : a novel opportunity in oncology. Séminaire Clinique invité au Centre Léon Bérard, Lyon, France (4 Juillet 2019).
- Diaz JJ. Ribosome alterations in cancer : impact on translational control and tumorigenesis. Institut Curie, Paris, France (16 Mai 2019).
- V. Marcel. Role of ribosome heterogeneity in tumorigenesis : the rRNA epigenetic hypothesis. Séminaire invité à l'Institut du Thorax, Nantes, France (8 février 2019).
- Diaz JJ. Impact of ribosomal RNA chemical modifications on translational control and tumorigenesis. Epigenomic meeting – Tokyo, Japan (3-4 Février 2019).
- Diaz JJ – VI International Caparica Conference on Analytical Proteomics, « A proteomic view of ribosome diversity », Caparica, Portugal (8th – 11th July 2019).
- V. Marcel. The rRNA epigenetic hypothesis : role of ribosome heterogeneity in tumorigenesis. 29<sup>e</sup> Journées Scientifiques de l'ANEBC, Lyon, France (invitation, Congrès national, 6-8 Septembre 2018).
- Diaz JJ. Ribosome alterations in cancer : impact on translational control and tumorigenesis. Université Libre de Bruxelles BIOPARK Charleroi Brussels-South CAMPUS. Charleroi – Gosselies, Belgique. 19 Janvier 2018.

- Marcel V. Ribosomal RNA epigenetics : role of ribosome in translational control and tumorigenesis. IARI Symposium, Lyon, France (Congrès international, 28 Février 2018).
- Diaz JJ. Ribosome alterations in cancer : impact on translational control and tumorigenesis. Sorbonne Universités, UPMC Université Paris, France. 26 Mars 2018.
- Diaz JJ. Ribosome alterations in cancer : impact on translational control and tumorigenesis. Institut for Advanced Biosciences, Grenoble, France. 22 Mai 2018.
- Diaz JJ. Ribosomes : the future of targeted therapies ? Impact of ribosome alterations on translational control and tumorigenesis. INSERM U1033 "Pathophysiology, Diagnosis & Treatments of Bone Diseases", Lyon, France. 6 novembre 2018.
- Diaz JJ. Ribosome alterations in cancer : impact on translational control and tumorigenesis. University of Rennes - CLCC Eugene Marquis INSERM U1242, Rennes, France. 6 décembre 2018.
- Diaz JJ. Ribosomes : the future of targeted therapies ?. Hôpital Saint-Louis et Université Paris Diderot, Paris, France. 31 octobre 2017.
- Diaz JJ. Ribosome heterogeneity in tumorigenesis : the rRNA point of view. International course on Non-coding RNA (Organizers : A Lund, S Häfner, A Louw, M Lubas). University of Copenhagen, Danemark. 4 au 7 avril 2016.
- Marcel V. Role of ribosome in epithelial to mesenchymal transition in breast cancer. 4° Journée du CRCL, Lyon, France. 2 mai 2016.
- Marcel V. The rRNA epigenetic hypothesis : role of ribosome heterogeneity in tumorigenesis. 24° Congrès International de l'European Association for Cancer Research, Manchester, UK (Congrès international, 9 au 12 juillet 2016). Prix EACR (Proffered Paper 2016)
- Diaz JJ. Ribosome alterations in cancer : impact on translational control and tumorigenesis. Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, Toulouse, France. 16 juin 2015.
- Diaz JJ. Proteomic approaches for anti-cancer drug development. Institut de recherche en Cancérologie de Montpellier (Campus Val d'Aurelle), Montpellier, France. 12 novembre 2015.
- Diaz JJ. Ribosome heterogeneity in tumorigenesis : the rRNA point of view. Cancer Research Center of Toulouse (Oncopole), Toulouse, France. 8 décembre 2015.

- **Résumé Grand public**

Le cancer du sein reste un problème de santé publique majeur en France. Aujourd'hui, le point critique reste l'amélioration de la prise en charge des patientes. Ceci nécessite une meilleure compréhension des mécanismes induisant la tumorigenèse et par le développement de biomarqueurs et de thérapies anti-cancers personnalisées. Notre équipe a démontré au cours du programme de Recherche PAIR Sein – RiboTEM, que la diversité de composition du ribosome, une micro-machinerie cellulaire indispensable à la vie, est une source originale pour appréhender ces questions d'actualité.

## Stéphanie DAVID



Stéphanie David est pharmacien, diplômée de l'Université Friedrich-Alexander d'Erlangen (Allemagne) en 2007. Après un master 2 de recherche à l'École Pratique des Hautes Etudes à Paris dans la spécialité « Signalisation et Systèmes Intégrés en Biologie » (2007 – 2008), elle a effectué une thèse de doctorat en codirection entre Angers (Inserm U646, Ingénierie de la Vectorisation Particulaire) et Nantes (Inserm U915, Institut du Thorax). Le sujet de sa thèse était le développement de nanovecteurs lipidiques pour l'administration d'acides nucléiques (pDNA et siRNA) par voie systémique. Elle a obtenu son diplôme de doctorat de l'Université d'Angers en décembre 2011. En parallèle de sa thèse, elle a fait 2 ans de monitorat en pharmacie galénique à l'université d'Angers.

En novembre 2011, elle a été recrutée en tant qu'ATER en pharmacie galénique au sein de l'équipe d'accueil EA6295 « Nanomédicaments et Nanosondes » à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Tours, puis elle a été recrutée sur un poste de maître de conférences en pharmacie galénique à l'Université de Tours, au sein de la même équipe, en septembre 2013 et obtenu son diplôme d'HDR en octobre 2019.

En recherche, elle a transposé et combiné son savoir-faire acquis en thèse avec le savoir-faire de l'équipe : la synthèse et la biofonctionnalisation de nanoparticules superparamagnétiques d'oxydes de fer (SPION) pour développer des nanovecteurs magnétiques permettant la délivrance de petits ARN interférents (siRNA, short interfering RNA) par voie systémique. Son expertise scientifique est la formulation et la caractérisation de systèmes de délivrance de siRNA non-viraux et leur évaluation biologique sur des modèles de cancer du sein *in vitro* et *in vivo*. Elle est auteur de 18 publications internationales et de 14 communications orales et 22 affiches dans des congrès nationaux et internationaux.

---

## RÉSUMÉ

### **Nanovecteurs magnétiques théranostiques de siRNA comme nouvelle approche dans le diagnostic et le traitement du cancer du sein**

- **Contexte**

Le cancer du sein est le cancer le plus répandu chez la femme et le cancer du sein HER2+, exprimant la protéine « human epidermal growth factor receptor 2 », est une forme agressive avec une croissance rapide. Un diagnostic et un traitement précoces sont indispensables pour améliorer le pronostic. La possibilité d'utiliser les petits ARN interférents (short interfering RNA, siRNA) ouvre une perspective de développer des nouveaux traitements, spécifiques pour ce type de cancer du sein. Les siRNA utilisent le mécanisme d'ARN interférence (ARNi) pour inhiber la synthèse de protéines spécifiques. Comme l'administration systémique de siRNA est limitée par leur capacité d'atteindre le lieu d'action (cytoplasme des cellules cancéreuses), des nouveaux systèmes de délivrance sont nécessaires.

- **Objectifs**

Ce projet avait pour objectif de développer de nouveaux nanovecteurs magnétiques ciblés de siRNA (appelés TS-MSN pour « Targeted Stealth Magnetic siRNA Nanovectors »). Ces TS-MSN sont composés de nanoparticules d'oxydes de fer (SPION pour superparamagnetic iron oxide nanoparticles), permettant de faire de l'imagerie par résonance magnétique (IRM), recouverts de polyéthylène glycol (PEG), pour la furtivité immunologique et conjugués à des fragments d'anticorps (scFv) ciblant HER2, surexprimé sur les cellules cancéreuses. Ces vecteurs ont été chargés avec des siRNA avec des polymères cationiques (chitosan et poly-L-arginine) sous forme de complexes pour les protéger et améliorer leur transfection. Ces TS-MSN sont conçus comme étant des agents théranostiques, par combinaison de propriétés thérapeutiques (action des siRNA) et diagnostiques (utilisation des SPION comme agent de contraste pour l'IRM). Pour développer les TSM et leur évaluation biologique, un consortium de trois partenaires a été mis en place :

- Équipe 1 : « **Nanomédicaments et Nanosondes** » (**EA6295**) de la Faculté de pharmacie de l'Université de Tours possédant une expertise dans la formulation et la caractérisation de nanovecteurs ;
- Équipe 2 : « **Immunologie Parasitaire, Vaccinologie et Biothérapie anti-infectieuse** » (**UMR INRA 1282**), avec son savoir-faire dans la conception et le développement de fragments d'anticorps ;
- Équipe 3 : « **Centre de Biophysique moléculaire** "group "complexes métalliques et IRM pour les applications biomédicales » (**UPR CNRS 4301**), expert en IRM sur le petit animal.

- **Méthodes**

Ce projet s'est déroulé en 3 étapes :

- 1) Le **développement de TS-MSN** à partir de la formulation de nanovecteurs magnétiques de siRNA (magnetic siRNA nanovectors ou MSN, composés de SPION, siRNA et chitosan assemblés par interactions électrostatiques) développés précédemment par l'équipe 1 et l'optimisation de la formulation de TS-MSN pour une administration par voie systémique.
- 2) L'évaluation du **ciblage des cellules cancéreuses** et de l'**effet thérapeutique *in vitro*** des TS-MSN sur des lignées de cancer du sein HER2+. Plusieurs séquences ciblant la régulation du cycle cellulaire (Cyclin B1 et PLK1) ou la survie cellulaire (Bcl-2 et survivin) ont été évaluées et la séquence de siRNA la plus efficace a été sélectionnée pour l'évaluation *in vivo*.
- 3) L'évaluation de l'**action « théranostique » *in vivo***. Pour cela, les TS-MSN ont été injectés dans la veine de la queue de souris tumorisées avec des cellules de cancer du sein HER2+, la taille des tumeurs et les TS-MSN ont été suivis par imagerie IRM *in vivo* après l'injection à l'aide du partenaire 3.

- **Résultats majeurs obtenus**

La **formulation des TS-MSN** s'est faite en 3 étapes avec une publication à l'issue de chaque étape :

1. Caractérisation et purification de nanovecteurs magnétiques de siRNA (MSN) :

Une étape de centrifugation a été ajoutée dans le protocole de formulation des MSN pour purifier les MSN. Les MSN purifiés ont été caractérisés et leur stabilité a été évaluée à différents pH (4,5 à 8,5) en vue d'une application biologique. Cette méthode de purification permet l'élimination de nano objets riches en SPIONS et pauvres en siRNA. Les tailles des MSN purifiés restent stables de pH 4,5 à 7,4 et les siRNA sont bien retenus.<sup>1</sup>

## 2. Formulation et caractérisation de nanovecteurs magnétiques furtifs de siRNA (S-MSN)

Les S-MSN (stealth magnetic siRNA nanovectors) ont été formulés en remplaçant les SPION par des SPION ayant été préalablement couplées de manière covalente avec du PEG<sub>5kDa</sub> et un fluorochrome émettant dans le rouge (PIR). La stabilité colloïdale des complexes dans les milieux biologiques a été fortement améliorée (> 4 heures d'incubation à 37°C). De plus un deuxième polymère cationique a été rajouté et le protocole de formulation a été optimisé pour permettre une diminution de 70 % de l'expression de la GFP sur des cellules MDA-MB-231-GFP, ce qui est comparable à celle observée en utilisant un agent de transfection commercial (Oligofectamine®).<sup>2</sup>

## 3. Formulation et caractérisation de nanovecteurs magnétiques furtifs ciblées de siRNA (TS-MSN)

Les TS-MSN sont formulés en remplaçant les SPION-PEG fluorescents par des SPION-PEG-scFv fluorescents (des SPION-PEG fonctionnalisés en surface de manière covalente avec du scFv 4D5). Le scFv 4D5 est produit et purifié par le partenaire 2. Les SPION-PEG-scFv sont ensuite chargés en siRNA et en polymères cationiques (chitosan + poly-L-arginine).

Les TS-MSN **ciblent spécifiquement le récepteur HER2**. L'internalisation des TS-MSN est augmentée par rapport aux S-MSN sur des lignées surexprimant le récepteur HER2. Les TS-MSN formulés avec un siRNA anti-survivine permettent **d'inhiber l'expression de la protéine de 88 %** avec les cellules surexprimant le récepteur HER2+ alors que l'agent de transfection commercial diminuait l'expression de seulement 17 %.<sup>3</sup>

Des TS-MSN contenant un siRNA ciblant la survivine ont également été administrés par voie IV à des souris tumorisées avec des cellules BT474 (HER2+) pour vérifier **l'action théranostique *in vivo***. Toutes les souris ont bien toléré les vecteurs, même les souris qui ont reçu 2 injections consécutives (intervalle de 24h) de TS-MSN. On observe en IRM une accumulation de TS-MSN par IRM dans les tumeurs mais le pourcentage est assez faible. Le nombre de souris par groupe n'étant pas assez important, il est nécessaire de compléter cette étude avant de publier des résultats.

### • **Conclusions**

En conclusion, un travail important de formulation et de caractérisation des S-MSN, a été réalisé dans la première partie de ce projet. Dans la seconde partie du projet, un fragment d'anticorps (scFv) a été ajouté à la formulation pour obtenir des TS-MSN et ceux-ci ont été étudiés biologiquement. Les TS-MSN permettent d'inhiber efficacement la synthèse de protéines spécifiques et à cibler des cellules HER2+ *in vitro*, sont injectables *in vivo*, donnent un contraste négatif en IRM et s'accumulent dans les tumeurs.

### • **Perspectives**

Par la suite il sera nécessaire de déterminer si la quantité est suffisante pour obtenir un effet thérapeutique *in vivo*. L'efficacité des TS-MSN pourra sûrement être améliorée en optimisant le protocole d'administration et/ou en administrant une chimiothérapie en parallèle. Il sera également intéressant d'analyser plus en détail la composition des TS-MSN ainsi que le trafic intracellulaire.

### • **Valorisations scientifiques**

Les résultats ont été valorisés par nombreuses communications orales et affichées ainsi que par 3 publications dans des journaux internationaux (voir liste ci-dessous).

## **Références**

1. Abdelrahman, M. *et al.* siRNA delivery system based on magnetic nanovectors: Characterization and stability evaluation. *Eur J Pharm Sci* **106**, 287–293 (2017).
2. Bruniaux, J. *et al.* Stealth magnetic nanocarriers of siRNA as platform for breast cancer theranostics. *Int J Pharm* (2017) doi:10.1016/j.ijpharm.2017.05.022.
3. Bruniaux, J. *et al.* Magnetic nanocarriers for the specific delivery of siRNA: Contribution of breast cancer cells active targeting for down-regulation efficiency. *Int J Pharm* **569**, 118572 (2019).

### **• Résumé grand public**

Le cancer du sein HER2+ est une forme agressive de cancer du sein avec une croissance rapide. Un diagnostic et un traitement précoces sont indispensables pour améliorer le pronostic. Une possibilité est l'utilisation de siRNA permettant d'inhiber la synthèse de protéines spécifiques pour induire la mort des cellules cancéreuses. Dans ce projet, des nanovecteurs magnétiques furtifs ont été développés pour (1) cibler les cellules tumorales HER2+ permettant une détection de ces cellules par imagerie IRM et (2) délivrer ces siRNA dans les cellules tumorales HER2+ permettant une thérapie ciblée.

## Roman ROUZIER



Le Pr Rouzier est docteur en médecine (Université Paris VII), chirurgien oncologue, et titulaire d'un doctorat en oncologie moléculaire. Il a obtenu une maîtrise en oncologie chirurgicale dans le laboratoire de morphogenèse et de signalisation cellulaire (UMR 44, Institut Curie, Paris) où il a appris à maîtriser les outils de biologie moléculaire.

Après avoir été chef de clinique à l'Institut Gustave Roussy, il a rejoint le département d'oncologie médicale du MD Anderson

Cancer Center, à Houston, en qualité de Professeur Assistant invité. Il a appris la bioinformatique à haut débit, développé des outils de prédiction et obtenu son Doctorat en biologie moléculaire. Après avoir été praticien hospitalier chargé de recherche à l'Université Paris 12, Professeur des Universités à Paris 6, spécialiste des cancers gynécologiques et mammaires à l'hôpital Tenon, il est ensuite devenu Professeur des Universités à l'Université Versailles Saint-Quentin.

Il est actuellement Directeur Délégué de l'Institut Curie - Saint-Cloud. À l'Institut Curie, 3 800 nouveaux cancers du sein et 500 cancers gynécologiques sont pris en charge par an, en utilisant les techniques les plus innovantes. Chercheur universitaire, il est affilié à l'unité de recherche INSERM U900 : (Bioinformatique, biostatistique, épidémiologie et systèmes informatiques. Biologie du cancer) et est l'auteur de plus de 350 publications.

---

## RÉSUMÉ

### **Hétérogénéité intratumorale des cancers du sein pT1N0**

Les cancers du sein de stade précoce et de sous-type luminal ont un excellent pronostic. Néanmoins, à l'issue des traitements, des récives métastatiques peuvent survenir (moins de 5 % de ces patientes à 10 ans). L'objectif principal de cette étude était d'étudier l'hétérogénéité intratumorale de ces cancers du sein de bon pronostic et son impact pronostic potentiel.

Il s'agit d'une étude de cohorte rétrospective de type « cas-témoin », ayant une approche multidisciplinaire, de la clinique à la biologie et de la biologie à la clinique, dans le cadre de l'appel à projet « PAIR » (Programme d'Actions Intégrées de Recherche) des cancers du sein précoces. Il s'agit d'une étude multidisciplinaire puisque pas moins de 6 équipes différentes ont travaillé sur le projet.

L'originalité de ce projet repose sur la sélection exclusive d'une population rarement étudiée du fait de sa rareté et du très faible risque supposé de récive métastatique lors de la prise en charge initiale. Par ailleurs, il s'agit de la première étude de type « cas-témoin » pour aborder cette problématique.

Afin d'étudier l'hétérogénéité intratumorale, des analyses anatomopathologiques, transcriptomiques et génomiques ont été réalisées dans deux régions différentes pour chaque tumeur chez des patientes n'ayant pas récidivé de leur cancer du sein (témoins) et chez des patientes ayant récidivé sous la forme de métastases (cas).

Entre 2003 et 2010, 77 patientes pT1b-cN0, ER+, HER2- ont récidivé (sur 3733 patientes répondant aux critères d'inclusion, prises en charge à l'Institut Curie). Après appariement 1 :1, nous avons sélectionné 52 cas et 52 témoins. Les deux populations étaient comparables sur les critères cliniques et histopathologiques classiques et sur les thérapeutiques reçues initialement. Afin d'étudier l'hétérogénéité intratumorale, des analyses anatomopathologiques, transcriptomiques et génomiques ont été réalisées dans deux régions différentes des tumeurs. Les différentes analyses (immunohistochimie, extraction ARN, analyse Prosigna™, NGS et du micro-environnement) ont débuté en juillet 2015. Le taux de récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone était discordant entre les deux échantillons tumoraux dans la majorité des cas, mais la différence excédait 30 % seulement dans 8 % des tumeurs pour les RE et 15 % pour les RP. Pour le statut HER2, 6 % des tumeurs avaient un statut HER2 différent entre les 2 sites analysés. Le niveau d'hétérogénéité intratumorale pour les statuts RH et HER2 ainsi observés était similaire entre les cas et les témoins.

Des analyses transcriptomiques utilisant le test Prosigna™ ont également été réalisées. Certains échantillons ayant été fixés en AFA et d'autres dans du Formol, une étape préliminaire non programmée de comparaison du test Prosigna™ selon le type de fixation (AFA ou Formol) s'est révélée indispensable. Nous avons montré que la qualité des ARN extraits était bonne quelle que soit la méthode de fixation utilisée. De même le type de fixation d'échantillons-tests ne modifiait pas le classement en sous-groupes moléculaires, modifiait peu le score ROR (Risk of Recurrence, coefficient de corrélation de 0,91) sans modification du groupe de risque de récurrence. La comparabilité des échantillons de notre cohorte PAIR étant établie, nous avons pu obtenir un résultat pour le test Prosigna™ pour 99 patientes (échec de la technique pour 5 patientes). Il apparaissait une discordance entre le sous-type moléculaire estimé par l'IHC et par le Prosigna™ pour 5 patientes puisque le test reclassait 1 patiente en basal-like (cas) et 4 patientes en HER2 (2 cas et 2 témoins) au lieu du sous-type luminal estimé par l'IHC. Il y avait des discordances intratumorales en termes de classification moléculaire : 18 tumeurs étaient classées Luminal A sur un bloc et Luminal B sur l'autre bloc et 1 tumeur était classée HER2 sur un bloc et Luminal B sur l'autre bloc. De même, le résultat du test Prosigna™ était discordant pour 27 patientes au sein d'une même tumeur avec 2 tumeurs passant du bas au haut risque selon le site analysé et 17 tumeurs passant du bas risque au risque intermédiaire. Malgré une hétérogénéité intratumorale notable, cette hétérogénéité avait peu d'impact sur le pronostic et le risque global était bien capté par le test Prosigna™.

Une étude par NGS ciblé a été réalisée au laboratoire d'oncogénétique de l'Institut Curie afin d'appréhender les architectures sous-clonales des cancers du sein, distinguer des drivers tardifs et déchiffrer les spectres mutationnels. Sur la base de plusieurs publications décrivant l'oncogénèse de plus de 800 cancers du sein, il a été réalisé un séquençage à haut débit en utilisant le panel Ion Ampliseq® comprenant les gènes les plus fréquemment mutés dans la tumorigenèse mammaire (fréquence > 1%). Nous avons inclus également une sélection de gènes potentiellement utilisés comme biomarqueurs pour des traitements ciblés comme les gènes impliqués dans les voies PI3K / AKT et MAPkinase, les récepteurs codant la tyrosine kinase ou les gènes récemment impliqués dans la résistance hormonale (LDLRAP1, MYH9, AGTR2, STMN2...). Ce NGS dédié a été réalisé à l'aide du séquenceur Ion Proton (Life technologies). Nous avons tenté de déterminer l'hétérogénéité génétique des mutations non-synonymes sur la base des données de séquençage d'amplicon ultra-profond (profondeur moyenne > 1000x) dans notre série.

Une mutation était définie comme étant présente dans une tumeur si une substitution nucléotidique était détectée dans  $\geq 0,5$  % des lectures ou si un indel était détecté dans  $\geq 1$  % des lectures. Malheureusement, seules 39 tumeurs étaient analysables (20 cas/19 témoins) permettant d'identifier 24 gènes mutés dont PI3KCA, TP53, CDH1, POLE...

Nous avons de ce fait décidé d'avoir une approche transcriptomique par hybridation sur des puces HTA2 (human transcriptome array 2.0 – Affymetrix®). En analyse en composante principale ainsi qu'en analyse de clustering hiérarchique, les échantillons se distinguaient principalement sur leur mode de fixation (formol ou AFA), rendant non interprétable toute autre analyse globale. Nous avons alors sélectionné uniquement les échantillons fixés en Formol. Cependant, la répartition entre les cas et les témoins n'était pas dans les facteurs principaux d'explications de la variance. Ainsi, que ce soit en ADN/NGS ou en transcriptome/Affymetrix, les problèmes techniques rendent ce package difficilement exploitable avec les techniques actuelles de bioinformatique.

Nous avons souhaité dans un second temps évaluer si la récurrence pouvait également être associée à des caractéristiques propres au stroma tumoral. Globalement, la quantité de stroma tumoral et sa qualité en termes de ratio de stroma fibroblastique / adipeux / cellules tumorales ne diffèrent pas entre les cas et les témoins. Les différents sous-types des fibroblastes associés au cancer (CAF) ont été étudiés à l'aide de plusieurs marqueurs en IHC (CD29, FAP, FSP1,  $\alpha$ SMA, PDGFR $\beta$ ). Nous avons mis en évidence qu'un sous-type de fibroblastes activés s'accumule préférentiellement dans le stroma des cas et ceci indépendamment des autres caractéristiques des cellules tumorales et de l'infiltrat immunitaire. Ceci suggère un rôle majeur du micro-environnement dans la récurrence métastatique dans les cancers du sein luminaux de stade précoce.

Des analyses par IHC ont également été réalisées pour quantifier et qualifier l'infiltrat immunitaire de ces petites tumeurs, jusque-là peu étudié. Sur tous les échantillons examinés, seuls 11 possédaient un infiltrat immunitaire estimé à plus de 20 % de la surface analysée (confirmant ainsi que les tumeurs luminales sont en général assez faiblement infiltrées par des TILs). Des colorations en IHC ont été réalisées pour estimer les taux de CD8, CD4, CD20, DC-Lamp, Tbet, FoxP3, IL17 et le taux de cellules exprimant PD-1 et/ou PD-L1. Les lymphocytes B représentaient 15 % et les lymphocytes T 85 % de l'infiltrat lymphocytaire avec une majorité de CD4 (54 %). Le taux de CD4 était significativement plus bas chez les cas que chez les témoins, indépendamment des observations faites sur les CAF. Il n'y avait pas d'association entre le statut métastatique et l'infiltrat immun pour les autres analyses réalisées.

Les techniques de biologie moléculaire (NGS et transcriptome) n'ayant pas permis de déterminer une hétérogénéité significative, nous avons réalisé l'étude d'impact décisionnel avec les tests Prosigna™. Pour évaluer dans quelle mesure la connaissance de l'hétérogénéité intratumorale modifierait le choix des traitements adjuvants, nous avons soumis lors des réunions de concertation pluri-disciplinaire (RCP) les 104 dossiers à deux reprises. Les équipes pluridisciplinaires présentes lors de ces RCP variaient, garantissant ainsi le caractère « vie réelle » des décisions. L'hétérogénéité telle qu'elle est mesurée par le Prosigna™ avait un impact sur la prise en charge thérapeutique chez 7,6 % des patientes, en situation de vie réelle. Nous avons réalisé, une analyse économique et financière d'une meilleure évaluation de l'hétérogénéité des patients atteints d'un cancer du sein précoce. Cette étude est basée sur les résultats de la cohorte Optisoins01 (PHRC 2013). Les coûts à l'échelle de la population hétérogène (8 patientes) varient ainsi entre 102 032 € (aucune zone analysée aboutissant à une prescription de chimiothérapie = 8\*moynne du coût sans chimiothérapie) et 204 472 € (toutes les zones analysées aboutissant à une prescription de chimiothérapie = 8\*moynne du coût avec chimiothérapie).

En conclusion, l'étude PAIR hétérogénéité a rempli ses objectifs : nous ne démontrons pas que l'hétérogénéité intratumorale est un facteur de récurrence dans les cancers du sein Luminaux T1N0.

Nous démontrons que :

- la robustesse des technologies de biologie moléculaire est primordiale : nous avons démontré cette robustesse pour la plateforme Nanostring mais pas pour la plateforme NGS ou Affymétrie ;
- une certaine hétérogénéité intratumorale existe sans pour autant être associée au pronostic ;
- l'impact décisionnel, à la fois en termes d'indications et en termes médico-économiques, est limité (variation de coût aux alentours de 50 000 € pour 100 patientes) ;
- la qualité du micro-environnement tumoral (CAF et lymphocytes CD4) de ces tumeurs Luminales de stade précoce est associée à la récurrence métastatique ;
- ainsi, nous ne pouvons recommander l'évaluation de l'hétérogénéité intratumorale pour les cancers du sein pT1 N0. En revanche pour des cas définis, les signatures génomiques captent une information pronostique qui peut modifier la prise en charge et donc l'issue pour certaines patientes.

Ces travaux ont donné lieu à trois publications et deux communications orales.

- **Résumé grand public**

Les cancers du sein de stade précoce ont un excellent pronostic, néanmoins, à l'issue des traitements, des récurrences métastatiques peuvent survenir. Nous avons exploré si l'hétérogénéité intratumorale, mal captée par les techniques d'analyse classiques, pouvait expliquer ces récurrences inattendues. Afin d'étudier l'hétérogénéité, des analyses de biologie moléculaire moderne ont été réalisées dans deux régions différentes pour chaque tumeur chez des patientes ayant ou n'ayant pas récidivé de leur cancer du sein sous la forme de métastases. Nous avons démontré que la robustesse des technologies de biologie moléculaire est primordiale, qu'il existe une certaine hétérogénéité intratumorale sans pour autant être associée au pronostic, et que l'impact décisionnel et médico-économique est limité.

# Fabrice ANDRÉ

**Professor in the Department of Medical Oncology, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France**



Fabrice André, MD, PhD, received his MD in Grenoble in 2002, and a PhD in Biotechnology from Paris University in 2005.

He is a past recipient of Young Investigator and Career Development awards from the American Society of Clinical Oncology (ASCO) and is currently Professor in the Department of Medical Oncology, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France.

His research work in the field of biomarkers and personalised therapies focuses on biomarker discovery, development of targeted agents and implementation of personalised medicine.

His team includes 70 people working on basic sciences, bioinformatics, biotechnologies and clinical research. He is also leading phase I-III trials testing targeted agents in the field of breast cancer and large national trials testing implementation of high throughput technologies in the health care system.

Professor André has published more than 200 peer reviewed papers, including papers in the New England Journal of Medicine, Lancet, Nature Medicine, Science, Lancet Oncology and Journal of Clinical Oncology, either as main or co-author.

Professor André is chairman of the biomarker group at UNICANCER (French cooperative group) and was a member of several scientific committees for international meetings, including SABCS, AACR, ECCO, ESMO, and IMPAKT.

Professor André has been a member of the Annals of Oncology Editorial Board (2010-2013), Associate Editor since 2014 and in September 2017 became Editor-in-Chief.

He has been a member of the ESMO Educational Committee since 2009, he was coordinator (2012-2014) and member (since 2015) of the ESMO Breast Cancer Faculty. Professor André was also a member of the ESMO Cancer Research Faculty, 2012-2014; and is currently chair of the ESMO Translational Research and Precision Medicine Working Group.

---

# RÉSUMÉ

## Quantification du risque résiduel de rechute (R3) métastatique après traitements adjuvants optimaux, grâce à une analyse de l'hétérogénéité intratumorale

- **Contexte**

Les cancers du sein hormonosensibles ER+ (estrogen receptor-positive) représentent plus de 70 % des cancers du sein. L'optimisation des thérapies endocrines et le développement des chimiothérapies adjuvantes de 3<sup>e</sup> génération ont nettement amélioré la survie. Bien que le risque résiduel de rechute soit actuellement inférieur à 20 % (Dieci, Breast 2013 ; Roché, JCO 2009), en considérant l'incidence élevée du cancer du sein, cela représente toutefois un grand nombre de patients pour lesquels le développement de nouvelles thérapies reste essentiel afin de réduire la mortalité due au cancer du sein.

Il est donc important de développer un outil moléculaire permettant de prédire, parmi les patientes ayant un cancer du sein ER+/Her2-, lesquelles présentent toujours un risque de rechute bien qu'elles aient reçu un traitement adjuvant optimal et nécessiteraient des traitements complémentaires. Cet outil permettrait donc de limiter l'utilisation de nouveaux traitements non pas à une large population mais seulement aux patientes qui en auraient vraiment besoin. Cela permettra d'éviter des toxicités à des patientes qui ne rechuteraient pas et des dépenses inutiles. Pour développer notre outil, nous avons fait l'hypothèse que la détection de clones minoritaires par un séquençage pourrait prédire le risque de récurrence des patientes. En plus de l'hétérogénéité intratumorale, le système immunitaire pourrait être lié au risque résiduel de rechute selon 3 mécanismes différents : 1/ protection immunitaire, 2/ réseau immunosuppresseur, 3/ capacité de générer une réponse immune après thérapie conventionnelle. Nous avons donc étudié les protéines impliquées dans ces 3 mécanismes. D'autre part, différentes équipes (Denkert, Lancet Oncol, 2018) ont montré que l'infiltration lymphocytaire pouvait également être considérée comme marqueur de risque de récurrence (leur présence pouvant être associée à un meilleur pronostic).

Notre projet avait donc pour but de développer et de valider un algorithme basé sur l'analyse de l'hétérogénéité intratumorale, des interactions 'hôte-tumeur' et de l'infiltration lymphocytaire afin de pouvoir quantifier le risque résiduel de rechute chez des patientes ayant eu un cancer du sein ER+/Her2- traitées de façon optimale par une thérapie adjuvante.

- **Objectifs initiaux et méthode**

Les différents objectifs de notre projet étaient de :

1/ séquencer en profondeur 500 échantillons tumoraux pour des gènes d'intérêts retrouvés dans les cancers du sein métastatiques. L'hypothèse est que la présence d'un sous-clone est associée à un mauvais pronostic.

2/ évaluer si la présence de compartiments cellulaires spécifiques (cellules immunitaires et cancéreuses) peuvent prédire le risque de rechute. Cette analyse inclut les marqueurs immunologiques (BDCA2, FOXP3, CD3, CD8, NKp46, DC-LAMP, CD1a, CD163, CD68, MPO, RoR $\alpha$ t, IL-17, pSTAT6, Calreticuline, LC3, HMGB1) Les marqueurs des cellules souches cancéreuses et de la transition épithélio-mésenchymateuse seront également évalués.

3/ tester chaque candidat biomarqueur afin de les intégrer dans un outil moléculaire. Objectif mené par l'équipe 6 (S. Michiels).

#### 4/ valider l'algorithme moléculaire

Au total, 6 équipes ont été impliquées dans ce projet qui a duré 3 ans :

- laboratoire de biomarqueurs prédictifs et nouvelles stratégies moléculaires en thérapeutique anticancéreuse, Gustave Roussy, Villejuif. Responsable d'équipe : Fabrice André ;
- R&D UNICANCER, Paris. Responsable d'équipe : Jérôme Lemonnier ;
- Institut Claudius Regaud, Toulouse. Responsable d'équipe : Magali Lacroix-Triki ;
- Centre Léon Bérard, Lyon. Responsable d'équipe Christophe Caux.
- Institut Paoli Calmettes, Marseille. Responsable d'équipe Emmanuelle Charafe-Jauffret.
- Centre de recherche en épidémiologie et santé des populations, Gustave Roussy, Villejuif. Responsable d'équipe Stefan Michiels.

#### • Résultats

**Analyse immunohistochimique** : au total plus de 20 marqueurs liés à l'immunité ont été testés dans la population ER+/Her2- de l'étude clinique PACS04. Cela représente la plus grande étude de biomarqueurs immunitaires réalisée à ce jour. L'analyse, selon différents modèles, de l'expression de ces biomarqueurs indique que MECA79, CD8, CD20 et FoxP3 ont été retenus en fonction de leur p value < 0.05 en DDFS selon une analyse intégrant le modèle préclinique et le biomarqueur (vs modèle préclinique seul) ou p value < 0.05 en DDFS selon une analyse intégrant le modèle préclinique, l'index de prolifération Ki67 et le biomarqueur (vs modèle préclinique seul + Ki67).

**Analyse génomique** : des aberrations du nombre de copies et des mutations de pilotes somatiques ont été obtenues CGH array (OncoScan) et séquençage de 36 gènes à partir des tumeurs de patientes avec cancer du sein ER-positifs/HER2-, avec envahissement ganglionnaire, traités par chimiothérapie dans le cadre de l'essai PACS04.

Nous avons établi un modèle de Cox en incluant les facteurs clinicopathologiques (CP) et les facteurs génomiques (G) et avons observé qu'au niveau clinique que la taille de la tumeur et le statut ganglionnaire sont des facteurs associés de manière significative à la survie (OS et DDFS), qu'une amplification du gène FGFR1 et que les mutations MAP3K1 étaient associées à la survie sans maladie à distance (DDFS). Nous avons ensuite construit un score génomique à deux gènes (GS) associé à la DDFS, dont la valeur pronostique a été évaluée sur les données indépendantes METABRIC (n = 1413) en utilisant la survie globale (OS) et la survie spécifique au cancer du sein (BCSS).

Nos données indiquent que, dans les cancers du sein ER+ et HER2- avec envahissement ganglionnaire, les amplifications du gène FGFR1 sont fortement associées à un risque accru de maladie à distance, tandis que les mutations du gène MAP3K1 sont significativement associées à une diminution du risque.

- **Conclusion**

Un algorithme moléculaire de prédiction du risque de rechute des patientes ayant un cancer du sein RE+/Her2- traitées après traitement adjuvant (par anthracyclines, taxanes et hormonothérapie) a été mis au point. L'utilisation de cet outil devrait permettre d'aider à l'accélérer du développement de médicaments en situation adjuvante, et également de réduire les coûts et les toxicités liés aux nouveaux médicaments développés dans les cancers du sein localisés.

- **Communications**

Un poster discussion a été présenté au congrès international spécialisé sur la recherche en cancers du sein (SABCS) en décembre 2017.

*André F, Penault Llorca F, Carene D, Roche H, Delaloge S, Lacroix L, Scott V, Richon C, Lacroix-Triki M, Lemonnier J, Michiels S. FGFR1 / ZNF217 copy numbers and outcome in patients with node positive, HR+/Her2- early breast cancer : A genomic analysis of PACS04 trial. SABCS 2017, PD4-10.*

Ce travail a également fait l'objet d'une publication en 2019 :

*Carene D, Tran-Dien A, Lemonnier J, Dalenc F, Levy C, Pierga JY, Jacot W, Canon JL, Richon C, Lacroix M, Caux C, André F, Michiels S. Association between FGFR1 copy numbers, MAP3K1 mutations, and survival in axillary node-positive, hormone receptor-positive, and HER2-negative early breast cancer in the PACS04 and METABRIC studies. Breast Cancer Res Treat. 2019 Oct 16.*

- **Résumé grand public**

Les traitements adjuvants du cancer du sein ont largement amélioré les survies des patientes. Toutefois, il est estimé qu'environ 10 000 cas de rechute par an surviennent en France malgré un traitement adjuvant adéquat. Il est donc nécessaire de développer des prédicteurs moléculaires permettant de quantifier le risque de rechute résiduel. Notre objectif était de développer et valider un algorithme moléculaire qui permettrait de quantifier le risque de rechute résiduel chez les patientes, présentant un cancer du sein localisé hormonosensible, traitées par chimiothérapie et hormonothérapie optimales. Notre travail a permis d'identifier que l'amplification du gène FGFR1 est associée à un risque élevé de rechute métastatique alors que le gène MAP3K1 est associé à un meilleur pronostic. Ces données peuvent permettre aux cliniciens d'identifier les patientes à haut risque de rechute métastatique malgré un traitement adjuvant adéquat et d'adapter leur prise en charge.







Plus d'informations sur

[e-cancer.fr](https://e-cancer.fr)

