

UNIVERSITE PARIS-SUD 11

ÉCOLE DOCTORALE : *Cancérologie - Biologie, Médecine, Santé*
Laboratoire de *Cancérologie Expérimentale, CEA, Fontenay-aux-Roses*
DISCIPLINE : Cancérologie

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue le 07/06/2013

par

Julie BENSIMON

Radiorésistance des cancers du sein : rôle majeur du marqueur
de cellules souches cancéreuses CD24

Composition du jury :

Dr Stéphane ANSIEAU

Pr Pierre VERRELLE

Dr François DAUTRY

Dr Paul-Henri ROMEO

Dr Jérôme LEBEAU

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, les rapporteurs Stéphane Ansieau et Pierre Verrelle ainsi que les examinateurs Paul-Henri Romeo et François Dautry pour l'intérêt porté à mon travail, pour le temps qu'ils ont consacré à la relecture de ce manuscrit ainsi que pour leurs remarques et conseils.

Merci à Sylvie Chevillard pour son accueil au sein du LCE durant ces 4 années, pour la confiance qu'elle m'a témoignée et pour ses conseils précieux tout au long de ces années.

Je remercie le programme IRTELIS ainsi que l'ARC et EDF pour le financement de ma thèse, et le programme L'Oréal-UNESCO « les femmes et la science » pour son soutien et les opportunités offertes par ce prix. Merci également aux membres de l'école doctorale, et en particulier à Muriel Nicoletti pour son accompagnement précieux durant la préparation de ma soutenance.

Un immense merci à Jérôme, tu as été un directeur de thèse exceptionnel et un excellent pédagogue, merci pour ta patience et ton soutien, ainsi que pour tous les bons moments. Je te souhaite beaucoup de succès dans tes futures recherches, j'aurais aimé pouvoir poursuivre ce travail avec toi. Merci également à Julie, ma « co-thésarde », je regrette que tu ne sois pas arrivée plus tôt au laboratoire, et je sais que toutes les conditions sont réunies pour que ta thèse se passe aussi bien que la mienne !

Merci aux personnes qui ont contribué directement à ce travail, et dont l'aide m'a été plus que précieuse : Sandrine, Maud, Denis, Lilas, Hinde, Pascal, Sylvain, François et Jordane, sans oublier les stagiaires Marine, Alexandra et Pierre. J'ai beaucoup appris en travaillant avec vous ! Merci aux membres de l'animalerie, et aux membres de la plate-forme de cytométrie pour leur soutien, et à toutes les personnes côtoyées au sein de l'institut!

Je remercie chaleureusement les membres du LCE que je n'ai pas encore cité, avec qui j'ai passé d'excellents moments : Kristel, Marie-No, Lina, Vincent, Romain, Jozo, Kathy, Guillaume, Caroline, Arnaud, Nicolas, Emilie, Katja, Ivana...

Un merci particulier à Caroline, ainsi qu'à Hinde, Lilas et Lina, pour leur amitié, aussi bien au labo qu'à l'extérieur. J'espère que nos soirées filles continueront à un bon rythme ! Et en parlant de soirée, j'en ai passé de très bonnes en compagnie de l'équipe des thésards, les « jeunes » et les « anciens » : Mathieu (le pro du montage photo !!), Emilie, Thierry, Benoît, Zhou, Laurent, Delphine, Sandrine... et j'en oublie sûrement...Bon courage à vous tous dans la poursuite de vos projets !

Merci à l'équipe des SIBAs, Samuel, Pierre, Raphael, Ludovic, Elodie et Christian, en compagnie de qui cette thèse a débuté et s'achève aujourd'hui...ainsi qu'à tous ceux dont l'amitié m'accompagne depuis des années, et qui se reconnaitront...

Mes dernières pensées vont à ma famille et à ma belle-famille. Maman, papa, Laura et Marion, vous avez toujours été là pour me soutenir et m'encourager, dans les bons moments comme dans les moments difficiles. Alexandre, toi qui me connais si bien, merci pour ton amour et surtout merci pour ta patience et ton soutien précieux au quotidien!

Je dédie ce travail à mes grands-parents, Jeanine et Jean-Pierre.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	4
LISTE DES ABREVIATIONS	6
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	9
I- CANCERS DU SEIN ET IRRADIATION	9
A- CLASSIFICATION DES CANCERS DU SEIN ET TRAITEMENT PAR RADIOTHERAPIE.....	9
1° <i>Vocabulaire et classification des cancers du sein.....</i>	9
Sein normal et pathologique : nomenclature	9
Diagnostic et classification histologique	10
Cancers du sein à prédisposition génétique.....	11
Signatures génétiques et classification moléculaire	11
Tumeurs du sein triple-négatives	13
2° <i>Traitements des cancers du sein.....</i>	14
Principaux modes de traitements.....	14
Radiothérapie mammaire	14
B- REPONSES CELLULAIRES AUX DOMMAGES RADIOINDUITS	16
1° <i>Effets des radiations ionisantes sur le vivant</i>	16
Effets directs des rayonnements ionisants sur la matière	16
Effets indirects : génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS).....	17
2° <i>Destin d'une cellule irradiée.....</i>	20
3° <i>Réponses précoces aux radiations ionisantes</i>	22
Activation par l'irradiation des points de contrôle du cycle cellulaire.....	22
Réparation des cassures doubles brin.....	24
Voies de signalisation activées par les ROS	26
4° <i>Senescence et morts cellulaires radioinduites.....</i>	27
Senescence	28
Mort programmée de type I : L'apoptose.....	29
Mort programmée de type II : L'autophagie	32
Mort programmée de type III : La nécrose	33
Catastrophe mitotique	33
C- EFFETS NON CIBLES DES RADIATIONS IONISANTES SUR LES CELLULES MAMMAIRES	37

1° Effet bystander.....	37
Mise en évidence et modèles expérimentaux	37
Mécanismes des effets de type bystander.....	38
2° Instabilité génétique transgénérationnelle.....	39
Définition et manifestations	39
Irradiation, effets non ciblés et mécanismes épigénétiques	43
II- LES CELLULES SOUCHES CANCEREUSES MAMMAIRES	45
A- LA THEORIE DES CELLULES SOUCHES CANCEREUSES	45
1° Définition et mise en évidence des CSC	45
Définition	45
Mise en évidence des CSC et propriétés	45
2° CSCs des tumeurs solides, controverse et cas du cancer du sein	48
Limites du modèle des CSC	48
Enjeu dans la prise en charge des tumeurs solides.....	49
4° Lien entre CSC et transition épithéliale-mésenchymateuse.....	51
Acteurs de la transition épithéliale-mésenchymateuse.....	51
La transition épithéliale-mésenchymateuse, génératrice de CSC ?.....	52
CSC, EMT et processus métastatique	54
B- MARQUEURS DES CSCS DU SEIN	56
1° SP : marqueur de cellules souches normales et cancéreuses	56
2° Marquage CD24 ⁻ /CD44 ⁺	59
Propriétés des cellules CD24 ⁻ /CD44 ⁺ dans les cancers du sein	59
Profils génétiques et moléculaires des cellules CD24 ⁻ /CD44 ⁺	60
Implication et rôle de CD24/CD44 dans les cancers du sein	62
CD24 : marqueur de cellules progénitrices ?	64
3° Activité ALDH	64
4° Autres marqueurs de CSC du sein et associations de marqueurs.....	66
CD133/prominin1.....	66
CD201/PROCR	66
Différents marqueurs, signatures de tumeurs hétérogènes ?.....	67
C- CSC DU SEIN : CONSEQUENCES THERAPEUTIQUES ET RESISTANCE AUX TRAITEMENTS...	69
1° Marqueurs de CSC et études cliniques.....	69
Etudes cliniques associant l'expression de CD24 à la progression tumorale.....	69

Incohérences dans la littérature	70
2° Chimiorésistance des CSC	71
Etudes in vitro	72
Etudes cliniques.....	73
3° CSC et résistance à l'irradiation.....	74
Mise en évidence de la radiorésistance des CSC	75
CSC et traitements : sélection ou induction ?	78
4° Mécanismes moléculaires de la radiorésistance des CSC.....	79
CSC du sein et hypoxie	79
Détoxification des ROS dans les CSC	81
CSC, contrôle du cycle cellulaire et réparation des dommages à l'ADN	83
PROJET DE RECHERCHE ET RESULTATS.....	87
ARTICLE I.....	91
<i>LE MARQUEUR DE CELLULES SOUCHES CANCEREUSES CD24^{LOW} DEFINIT UNE POPULATION DE CELLULES RADIORESISTANTES, IMPLIQUEES DANS LA MEMORISATION ET LA TRANSMISSION DE L'INSTABILITE GENOMIQUE RADIOINDUITE</i>	91
PRESENTATION DE L'ARTICLE I.....	92
ARTICLE II.....	109
<i>L'EXTINCTION DU MARQUEUR DE CELLULES SOUCHES CANCEREUSES MAMMAIRES CD24 INDUIT LA RADIORESISTANCE GRACE AU CONTROLE DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE</i>	109
PRESENTATION DE L'ARTICLE II	110
<i>Figures</i>	141
<i>Supplementary figures and tables</i>	145
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	147
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	156
ANNEXE I	177

Table des illustrations

Figure 1 : Anatomie du sein normal.....	10
Figure 2 : Classification moléculaire des cancers du sein.....	12
Figure 3 : Survie globale en fonction des sous-types moléculaires de cancers du sein	13
Figure 4 : Rupture de la balance oxydative et conséquences cellulaires.....	18
Figure 5 : Principales voies de biosynthèse et de détoxification des ROS.....	18
Figure 6 : Rôle central des kinases « transductrices » dans la réponse à l'irradiation.....	21
Figure 7 : Réponses des cellules de mammifères à l'irradiation.....	22
Figure 8 : Organisation moléculaire des points de contrôle en phases G1 et G2.....	23
Figure 9 : Principaux mécanismes de réparation des cassures doubles brins	25
Figure 10 : Voies de signalisation MAPK et PI3K dans les cellules de carcinomes humains.	27
Figure 11 : Initiation et médiateurs moléculaires de la sénescence	28
Figure 12 : Représentation simplifiée des voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèque	30
Figure 13 : Illustration de la catastrophe mitotique <i>in vitro</i>	34
Figure 14 : Mort cellulaire par apoptose dans un contexte de catastrophe mitotique	35
Figure 15 : Contribution du stress oxydant et des dommages à l'ADN dans l'établissement de l'instabilité génétique transgénérationnelle	41
Figure 16 : Modélisation du rôle de la mitochondrie et de la perpétuation des ROS dans l'instabilité génétique transgénérationnelle	42
Figure 17 : Modèles stochastique et hiérarchique de prolifération tumorale.....	46
Figure 18 : Intégration de la théorie des CSC dans le traitement des tumeurs solides	50
Figure 19 : Représentation simplifiée des voies moléculaires régulant la transition épithéliale-mésenchymateuse.....	52
Figure 20 : Principaux marqueurs de CSC identifiés, en fonction de l'organe considéré.....	56
Figure 21 : Caractérisation de la population SP dans la moelle osseuse murine	57
Figure 22 : Ciblage thérapeutique des voies de signalisation des CSC	62
Figure 23 : Association entre les sous-types moléculaires de cancers du sein, la transition épithéliale-mésenchymateuse et l'expression des marqueurs de CSC	68
Figure 24 : Intégration de la théorie des CSC à l'évaluation des traitements par radiothérapie	74
Figure 25 : Effets des rayonnements ionisants sur les CSC du sein	76
Figure 26 : Identification et localisation <i>in vivo</i> des CSC du sein	80

Figure 27 : Mécanismes de défense et de réponse au stress des CSC.....	81
Figure 28 : rôle de CD24 dans la réponse à l'irradiation des cellules de cancer du sein : radiatorésistance, instabilité génétique radioinduite et implication des ROS	150
Figure 29 : Effet de la sous-expression de NME5 sur la mortalité radioinduite des cellules MCF-7	152

Liste des abréviations

ABC	ATP-binding cassette
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNmt	ADN mitochondrial
ALDH	Aldehyde dehydrogenase
AML	Acute myeloid leukemia
ARN	Acide ribonucléique
Atg	Autophagy related genes
ATM	Ataxia telangectasia mutated
ATP	Adenosine triphosphate
ATR	Ataxia telangectasia and Rad3 related
ATRIP	ATR interacting protein
Bax	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	B-Cell CLL/Lymphoma 2
BRCA1/2	Breast cancer 1/2
Caspase	Cysteinylnl aspartate-specific proteinase
CAT	Catalase
CCIS	Cancer canalaire <i>in situ</i>
CD	Cluster of differentiation
CDB	Cassure double brin
CDC	Cell division cycle
CDH1	Cadhérine 1, E-cadhérine
CDK	Cyclin-dependant kinase
Chk1/2	Cell cycle checkpoint kinase 1/2
CHO	Chinese hamster ovary
CLIS	Cancer lobulaire <i>in situ</i>
CSB	Cassure simple brin
CSC	Cellule souche cancéreuse
CSCi	Cellule souche cancéreuse induite
CSN	Cellule souche normale
DCF-DA	Dichlorofluorescein diacetate
DNA-PK	DNA-protein kinase

DNMT	DNA-methyltransferase
DRAM	DNA-damage regulated autophagy modulator
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMT	Epithelial to mesenchymal transistion
EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule (ESA)
ER	Estrogen receptor
ErbB	Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog (Her)
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FADD	FAS-associated death domain
FASL	FAS ligand
FOXO1	Forkhead box O1
GLUD1	Glutamate dehydrogenase 1
GLUL	Glutamate-ammonia ligase
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GPx	Gluthatione peroxidase
GSH	Gluthatione
GSS	Gluthatione synthetase
Gy	Gray
Her2	Human epidermal growth factor receptor 2 (ErbB2)
HMLE	Human mammary epithelial cells
Hprt	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
HR	Homologous recombination
IGT	Instabilité trans-générationnelle
Il	Interleukine
JAK	Janus kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
kDA	kilo-dalton
Klf4	Kruppel-like factor 4
LHRH	Luteinizing hormone releasing hormone
Lin	Lineage
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MDR	Multidrug resistance protein
MET	Mesenchymal to epithelial transistion
miRNA	micro-ARN
MMP	Matrix metalloproteinase

MRN	Complexe Mre11-Rad51-Nsb1
MUC1	Mucin 1, cell surface associated
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NF- κ B	Nuclear-factor kappa B
NHEJ	Non homologous end-joining
NOX	NADPH-oxydase
OCDL	Oxidative clusterized DNA lesions
PARP	PolyADP-ribose polymerase
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PR	Progesterone receptor
PROCR	Protein C receptor, endothelial (CD201)
PTEN	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate 3-phosphatase
PTPase	Phosphotyrosine phosphatase
PYGL	Phosphorylase, glycogen, liver
Rb	Retinoblastome
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
RIP	Receptor interacting protein
ROS	Reactive oxygen species
RPA	Replication protein A
SAT2	pericentromeric spermidine N1-acétyltransferase 2
SBR	Scarff Bloom et Richardson
siRNA	small interfering RNA
SOD	Superoxide dismutase
Sox	Sex determining region Y-box
SP	Side population
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TGF	Transforming growth factor
TGF β -R	Transforming growth factor β receptor
TNF	Tumor necrosis factor
TNF-R	Tumor necrosis factor receptor
TNM	Taille-Nodules-Métastases
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
TRAIL-R	TNF-related apoptosis inducing ligand receptor
Zeb	Zinc finger E-box binding
8-oxodG	8-oxo-2'-deoxyguanosine

Introduction bibliographique

I- Cancers du sein et irradiation

A- Classification des cancers du sein et traitement par radiothérapie

Le cancer du sein est le plus fréquent des cancers féminins. Le nombre de nouveaux cas chaque année en France est estimé à 53 000, ce qui représente environ un tiers des cas de cancer dépistés chez la femme. En 2011, le nombre de décès par cancer du sein en France s'élevait à 11 500, soit environ 20% des décès par cancer chez la femme. Les cancers du sein chez l'homme représentent moins de 1% des cas de cancer du sein. Aujourd'hui, grâce entre autres à la progression de la recherche médicale et à la généralisation du dépistage par mammographie, le taux global de survie atteint 97% après 1 an, et 85% après 5 ans. Ces taux de survie sont en constante augmentation depuis le milieu des années 1980. Près de 50% des cancers du sein surviennent après 65 ans, contre 10% avant 35 ans, et l'âge moyen au diagnostic est de 61 ans (INCA, 2012).

1° Vocabulaire et classification des cancers du sein

Sein normal et pathologique : nomenclature

Le sein est une glande constituée de tissu graisseux et, chez la femme, d'une vingtaine de compartiments contenant les lobules, qui produisent le lait en période d'allaitement. Le lait est transporté vers le mamelon par les canaux galactophores (figure 1). L'adénocarcinome mammaire provient de la cancérisation des cellules épithéliales du sein. La progression tumorale du carcinome mammaire à lieu en plusieurs étapes. Dans un premier temps, une prolifération excessive de cellules normales crée une hyperplasie. Une prolifération excessive de cellules phénotypiquement anormales est à l'origine d'une dysplasie légère, qui évolue en dysplasie sévère, désignant le carcinome *in situ*. En envahissant la membrane basale, ce carcinome devient infiltrant avec éventuellement envahissement des ganglions axillaires situés sous les bras. Le dernier stade de la progression tumorale est la dissémination métastatique, responsable de la mortalité dans 9 cas sur 10. Les principaux sites métastatiques sont les os, le foie, le poumon et le cerveau.

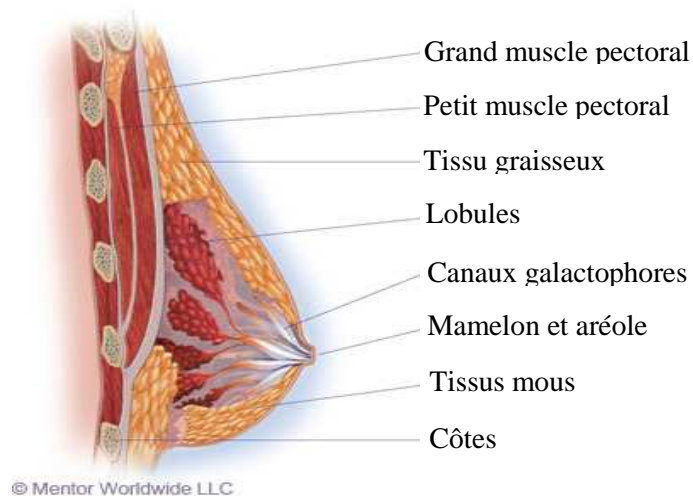


Figure 1 : Anatomie du sein normal

Les adénocarcinomes représentent 95 à 98% des cancers du sein et se développent à partir des canaux (cancers canauxiaux) ou des lobules (cancers lobulaires). Ces cancers sont *in situ* lorsqu'ils sont confinés aux canaux (CCIS, 15-20% des cancers) et aux lobules (CLIS, 2-3% des cancers), et infiltrants lorsqu'ils traversent la membrane basale des canaux (70% des cancers) ou des lobules (10% des cancers) pour se propager dans les tissus environnants. Un cancer *in situ* est généralement de meilleur pronostic qu'un cancer infiltrant. Il existe également d'autres types de carcinomes mammaires comme le carcinome infiltrant mucineux, caractérisé par sa richesse en mucus extracellulaire, ou encore les carcinomes médullaires, papillaires et tubuleux. Ces autres types de carcinomes sont rares.

Certains cancers du sein ne sont pas des carcinomes, comme par exemple le sarcome qui est une tumeur du tissu conjonctif. Enfin, la maladie de Paget est caractérisée par l'extension intra-épidermique mamelonnaire d'un adénocarcinome canauxial (Espié & Gorins, 2002).

Diagnostic et classification histologique

Lorsqu'un cancer du sein est suspecté lors d'une palpation ou d'une mammographie, le diagnostic est posé sur la base d'une biopsie et d'un examen anatomopathologique ainsi que par le bilan d'extension qui recherche d'éventuels foyers métastatiques.

La classification du cancer en stades 0 à IV, qui décrivent l'expansion des cellules cancéreuses dans l'organisme, dépend de la classification TNM. La classification TNM des cancers du sein prend en compte 3 critères : la taille de la tumeur (T0 à T4), l'envahissement

ganglionnaire (N0 à N3) et la présence ou non de métastases à distance (M0 : pas de métastases ou M1 : présence de métastases).

La classification du cancer en grades I à III dépend quant à elle de l'examen anatomopathologique qui classe les cancers selon l'architecture des cellules, la forme des noyaux et l'activité mitotique. On parle également de grade histopronostique de Scarff Bloom et Richardson (grade SBR). Enfin, différents marqueurs sont recherchés : surexpression de Her2, ki67 qui est un marqueur de la prolifération cellulaire, récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone. A l'issue de ces examens, la réunion de concertation pluridisciplinaire permet de choisir le traitement le mieux adapté à la patiente.

Cancers du sein à prédisposition génétique

Certains cancers sont favorisés par des prédispositions génétiques, c'est par exemple le cas des cancers BRCA-dépendants caractérisés par une mutation héréditaire sur les gènes BRCA1 ou BRCA2. D'autres mutations peuvent prédisposer au cancer du sein : mutation de p53 (syndrome de Li-Fraumeni), de PTEN (maladie de Cowden), de CDH1 etc... Les mutations BRCA-dépendantes sont présentes dans environ 5% des cas de cancer du sein. Le risque cumulatif de cancer du sein est estimé entre 60% à 90% sur la vie entière pour les femmes possédant une mutation BRCA1 et/ou BRCA2. La présence de mutations BRCA1/2 n'est pas recherchée de manière routinière chez les femmes, à cause d'un coût important. En effet, pour déterminer le statut BRCA d'une patiente, 52 fragments de gènes (*hot spots*) ainsi que la présence de grandes délétions doivent être recherchés. Ces mutations peuvent être analysées en prévention et à la demande de la patiente à la suite d'une consultation oncogénétique, dans le cas de prédispositions familiales avérées (Courtilot, 2008; Vennin & Adenis, 2008).

Signatures génétiques et classification moléculaire

La recherche de signatures génétiques des tumeurs a été motivée par le besoin de mieux classer les différents cancers du sein, afin d'améliorer le diagnostic et la prise en charge thérapeutique. En 2000, Perou et al. ont déterminé le profil d'expression de 8102 gènes dans 65 prélèvements, chez 42 individus atteints ou non de cancer du sein. Ce travail a permis de sélectionner un panel de 496 gènes permettant de classer les tumeurs en quatre sous-classes. Une seconde publication des mêmes auteurs a mis en évidence l'année suivante une cinquième catégorie. Ces catégories, représentées sur la figure 2, sont déterminées par une

signature moléculaire et par les caractéristiques suivantes (Perou et al, 2000; Sorlie et al, 2001) :

- Sous-type basal-like (10-25% des tumeurs) : faible expression de ER- α , PR et HER2, forte expression des cytokératines 5/6 et/ou 17, généralement p53 mutées, fortement proliférantes
- Sous-type HER2+ (15-20% des tumeurs) : surexpression de HER2 et de gènes associés, faible expression de ER- α
- Sous-types luminaux A, B et C : surexpression de ER- α associée dans chaque cas à un groupe de gènes particuliers, avec ou sans surexpression de HER2

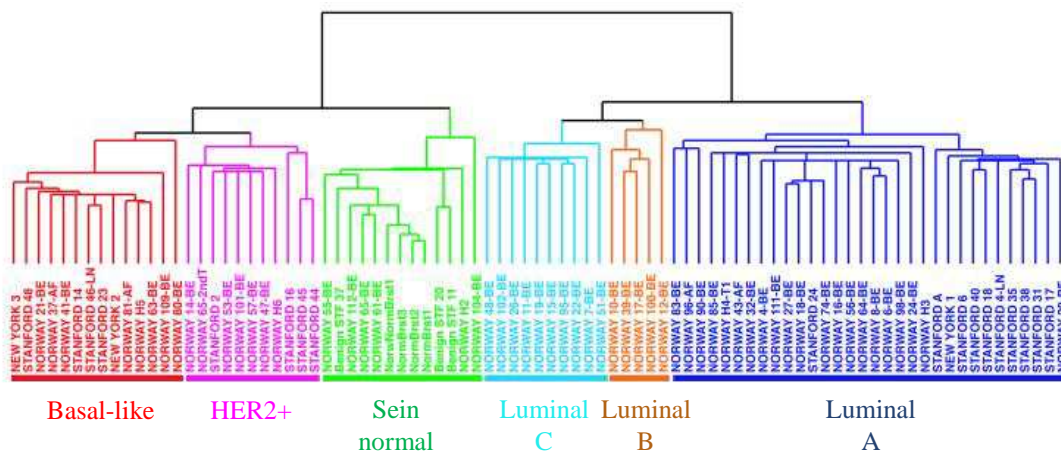


Figure 2 : Classification moléculaire des cancers du sein

Analyse des profils d'expression de 427 gènes sur un échantillon constitué de 78 carcinomes, 3 tumeurs bénignes et 4 tissus normaux. Les tumeurs se répartissent en 5 groupes, basés sur leurs différences d'expression géniques : Luminal A (bleu foncé), Luminal B (orange), Luminal C (bleu clair), basal-like (rouge) et HER2-positif (rose) (Adapté de Sorlie et al, 2001)

A partir de 2007, le sous-type claudin-low/basal B a été ajouté à cette classification. Ce groupe est caractérisé par une faible expression des protéines de jonctions serrées E-cadhérine, claudines 3, 4 et 7, et se rapproche du sous-groupe basal-like, notamment par une faible expression de ER, PR et Her2. De manière intéressante, les tumeurs claudin-low/basal B sont enrichies en cellules CD49⁺/EpCAM^{-low}, qui est un phénotype de cellules souches mammaires normales, ainsi qu'en cellules souches cancéreuses CD24⁺/CD44⁺ et ALDH⁺

(Voir partie II), et sont faiblement proliférantes. Ces cellules présentent également des caractéristiques mésenchymateuses (Voir partie II). Enfin, la plupart des tumeurs classées dans ce groupe présentent une sensibilité aux traitements chimiothérapeutiques, mais sont globalement de mauvais pronostic (Prat et al, 2010). La survie globale en fonction des différents sous-types est présentée sur la figure 3.

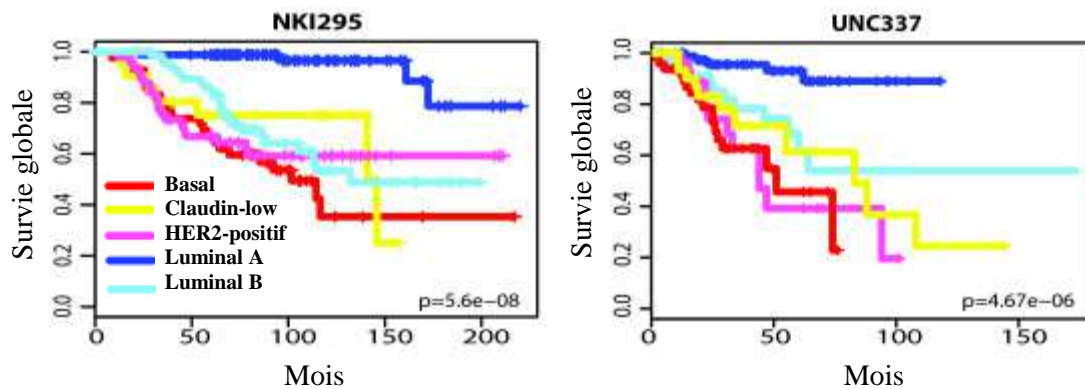


Figure 3 : Survie globale en fonction des sous-types moléculaires de cancers du sein

Survie globale en fonction du sous-type moléculaire considéré, pour deux bases de données indépendantes : NKI295 (thérapie locale uniquement) et UNC337 (tous types de traitements) (Adapté de Prat et al., 2010)

Tumeurs du sein triple-négatives

Certaines tumeurs sont décrites comme triple-négatives dans la littérature. Cette nomenclature ne désigne pas un sous-type en particulier, mais regroupe toutes les tumeurs présentant un phénotype ER⁻/PR⁻/HER2⁻. En réalité, 50 à 75% des tumeurs triple-négatives sont comprises dans le sous-type basal-like. Toutefois, des travaux ont mis en évidence la présence de tumeurs triple-négatives dans d'autres sous-types. Par exemple, bien que cela semble paradoxal, certaines tumeurs triples négatives possèdent un profil d'expression génique qui les classe dans le sous-type HER2⁺, ce qui a conduit à renommer ce groupe en « HER2^{enrichi} » (Perou, 2011). De même, certaines tumeurs triples négatives peuvent être classées dans les sous-types luminaux A/B et claudin-low/basal B.

2° Traitements des cancers du sein

Principaux modes de traitements

Classiquement, le traitement est choisi à l'issue de la réunion de concertation pluridisciplinaire et dépend du type de tumeur, de son grade, des différentes données d'anatomopathologie et des statuts des marqueurs. Lorsque cela est possible, les carcinomes mammaires et éventuellement les métastases sont traités par exérèse, éventuellement accompagnée d'un curetage des ganglions axillaires si ceux-ci sont atteints. Des séances de radiothérapie sont pratiquées presque systématiquement. La chimiothérapie est un traitement systémique indiqué dans le cas de cancers infiltrants et métastatiques, et est administrée avant ou après chirurgie (chimiothérapies néoadjuvante/adjuvante). Lorsque HER2 est surexprimé, la patiente peut bénéficier d'un traitement ciblé. Ainsi, les anticorps trastuzumab (Herceptin®) ou le lapatinib (Tyverb®) sont des traitements qui ciblent la protéine HER2. Enfin, lorsque les récepteurs hormonaux sont exprimés, la patiente peut être traitée par hormonothérapie : anti-œstrogène (tamoxifène), inhibiteur d'aromatase ou agonistes de la LHRH (INCA, 2012).

Radiothérapie mammaire

Une radiothérapie post-opératoire est pratiquée dans la plupart des cas de cancers du sein, même si certaines études ont cherché à identifier des groupes de patientes à bas risque de récurrence pouvant se passer de ce type de traitement. Pour les cancers *in situ* et infiltrants, la radiothérapie réduit significativement le risque de récurrence locale et augmente la survie, tous facteurs confondus, comme cela a été montré dans une méta-analyse de l'EBCTCG (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group) publiée en 2000 et réalisée sur 20 000 patientes. Les bénéfices de la radiothérapie ne sont donc plus à démontrer, même si la médecine s'intéresse aujourd'hui aux différents protocoles pouvant être appliqués. Généralement, une dose totale d'au moins 50 Gy est appliquée en 25 fractions de 1,8 à 2 Gy, à raison de 5 fractions par semaine. Le fractionnement des doses permet d'épargner autant que possible les tissus sains environnant la tumeur. Dans certains cas, et notamment chez les femmes jeunes à haut risque de récurrence, une irradiation complémentaire du lit tumoral est appliquée. Ce complément, appelée *boost*, varie de 10 à 25 Gy et peut être administré par photons, faisceau direct d'électrons ou encore par curiethérapie, cette dernière technique étant réalisée par placement de la source d'irradiation à proximité directe de l'organe à traiter. Les nouvelles

orientations de la radiothérapie concernent notamment les protocoles « concentrés » ou « hypo-fractionnés », qui consistent à augmenter les doses de chaque fraction et à réduire la durée du traitement. D'autre part, des méthodes dites « d'irradiation partielle » chez des patientes à faible risque de récurrence ont pour but de remplacer la radiothérapie classique par d'autres protocoles: curiethérapie, irradiation préopératoire en séance unique, radiothérapie externe conformationnelle tridimensionnelle (Cutuli, 2012; Hannoun-Levi & Marsiglia, 2004; Maingon et al, 2004).

B- Réponses cellulaires aux dommages radioinduits

1° Effets des radiations ionisantes sur le vivant

Les rayonnements ionisants ont des conséquences sur les cellules directement irradiées. D'une part ces rayons, hautement énergétiques, peuvent endommager directement les macromolécules biologiques en leur arrachant des électrons. D'autre part, les réactions d'ionisation de l'eau génèrent des radicaux libres instables, qui altèrent les matériaux biologiques (ADN, lipides, protéines). Ces effets sur les cellules « cibles » de l'irradiation sont à distinguer des effets « non ciblés », sur les cellules voisines des cellules irradiées (effets bystander) et sur leurs descendantes (effets transgénérationnels), qui seront détaillés dans un autre chapitre.

Effets directs des rayonnements ionisants sur la matière

Un rayonnement particulaire ou électromagnétique est ionisant lorsqu'il est capable d'arracher des électrons à la matière. Les rayonnements ionisants proviennent de l'expulsion de particules par les noyaux instables, c'est-à-dire possédant trop de neutrons ou de protons. Les rayonnements α et β sont des rayonnements ionisants particuliers, et sont accompagnés de l'émission d'un noyau d'hélium (particule α) ou d'électrons et antiélectrons (particules β^- et β^+). Les rayonnements ionisants électromagnétiques comprennent les rayons X et les rayons γ , et sont utilisés en radiothérapie.

Lorsque le noyau fils engendré par la désintégration du noyau père radioactif se trouve dans un état excité, il peut se désexciter en émettant un rayonnement photonique γ . Les éléments radioactifs $^{60}\text{Cobalt}$ et $^{137}\text{Cesium}$ sont par exemple des noyaux dont la désintégration émet des rayons γ . L'énergie portée par ces rayons γ est exprimée en électronvolts (eV). Les rayons γ possèdent généralement une énergie comprise entre quelques kilo-eV et plusieurs centaines de Giga-eV, et interagissent directement avec la matière lorsqu'ils la traversent. Les rayons γ agissent sur la matière vivante majoritairement grâce à l'effet Compton : le rayon photonique arrache des électrons aux atomes rencontrés, et l'énergie restant est réémise sous forme d'un nouveau rayon γ . Lorsque le rayon γ traverse les cellules, il arrache des électrons aux molécules biologiques comme les lipides, les protéines et l'ADN, et induit ainsi des lésions directes des composants cellulaires. La quantité d'Énergie absorbée par unité de masse de matière est définie par la dose exprimée en Gray (1 Gray = 1 Joule/kg de matière traversée).

Effets indirects : génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les radicaux libres sont des espèces chimiques contenant un ou plusieurs électrons non appariés. Ces espèces ne respectent pas la règle de l'octet, qui énonce que les atomes avec un numéro atomique supérieur à 4 se combinent de manière à posséder 8 électrons dans leur couche électronique externe. Du fait de ces électrons non appariés, les radicaux libres présentent une grande instabilité, une durée de vie très courte et tendent à réagir avec d'autres atomes en modifiant leur structure et leur fonction, et peuvent ainsi interférer avec les molécules biologiques. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des bioproduits du métabolisme aérobie, qui génère des radicaux libres hautement réactifs. Les principaux ROS sont l'anion superoxide O_2^- , l'oxygène singulet O_2^* , le radical hydroxyle HO^* , ainsi que le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et l'ozone O_3 qui sont eux-mêmes des sources de radicaux libres. Plus généralement, la famille des ROS comprend également l'oxyde nitrique NO (Kobayashi & Suda, 2012).

En conditions physiologiques, la principale source de ROS endogènes est le métabolisme mitochondrial, qui produit des radicaux oxygénés au cours de la respiration. D'autres systèmes enzymatiques cytosoliques ainsi que le peroxysome peuvent générer des ROS. Ces ROS endogènes ont un rôle physiologique important, car ils régulent certaines fonctions de l'organisme comme l'inflammation ou la réponse immunitaire, et certaines fonctions cellulaires comme la croissance, la survie, la prolifération ou encore la migration cellulaire. A plus fortes concentrations, les ROS ont un effet délétère sur les composants cellulaires en infligeant des dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides. Les organismes aérobies possèdent un arsenal de défenses anti-oxydantes, mais également un système de production d'espèces oxydantes, afin de maintenir le niveau de ROS à un point d'équilibre, appelé balance oxydative (Vera-Ramirez et al, 2011). L'équilibre des ROS correspond donc à un fonctionnement cellulaire normal (figure 4).

Les défenses anti-oxydantes comprennent d'une part des molécules non enzymatiques comme les vitamines C et E, le glutathion et le β -carotène, et d'autre part des enzymes de détoxification des ROS comme les superoxide dismutases (SOD), les catalases (CAT) et différentes peroxydases. Ces défenses possèdent la capacité de réduire les ROS en molécules peu réactives, principalement en eau et en dioxygène. La production de ROS par les cellules implique les complexes NADPH-oxydases (NOX) (Scandalios, 2005). Les principales voies de biosynthèse et de détoxification des ROS sont résumées sur la figure 5.

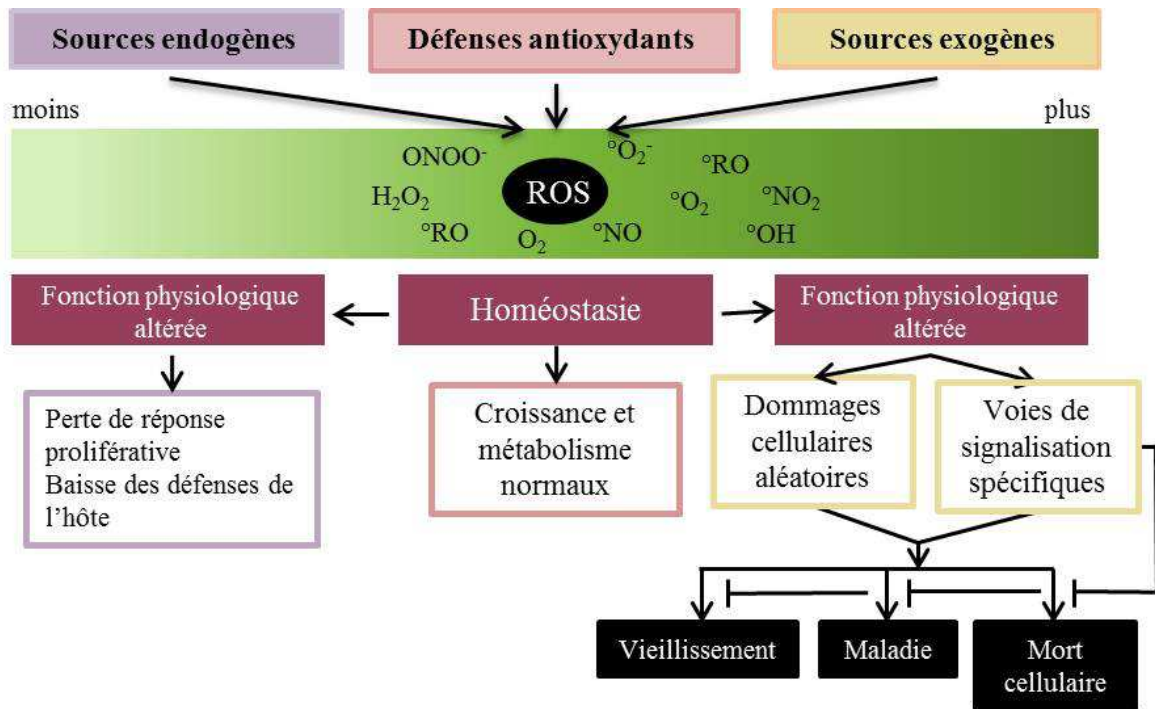


Figure 4 : Rupture de la balance oxydative et conséquences cellulaires

(Adapté de Finkel et Holbrook, 2000)

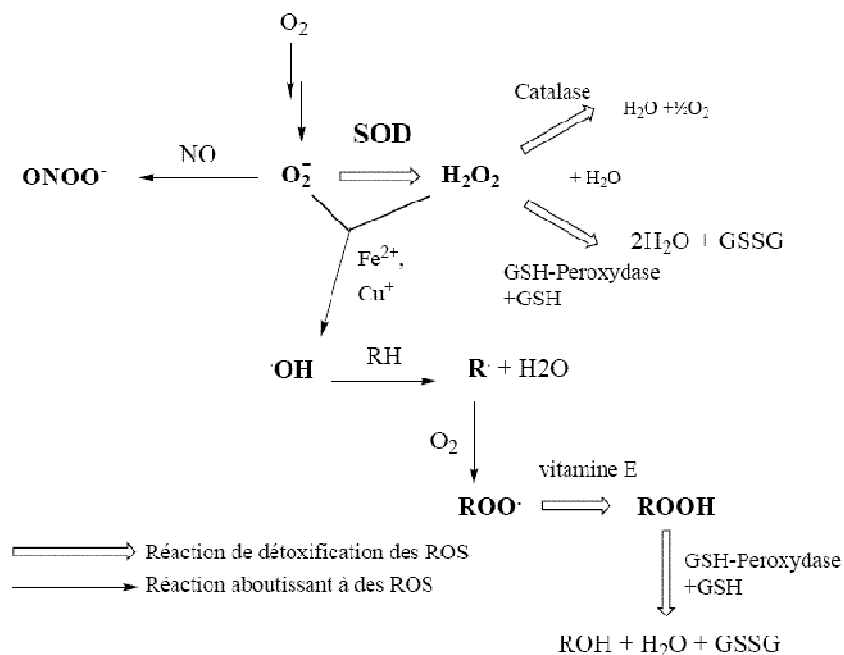


Figure 5 : Principales voies de biosynthèse et de détoxification des ROS

(Source : Frederico Cisnetti)

La rupture de la balance oxydative, par excès de ROS ou par manque de défenses anti-oxydantes, est une situation nommée stress oxydant (ou stress oxydatif). Le nombre de lésions dues au stress oxydant endogène est estimé à $1,5 \cdot 10^5$ par jour pour une cellule humaine. L'accumulation de dommages induits par le stress oxydant serait un des facteurs à l'origine du vieillissement cellulaire et de l'induction de la senescence. Les ROS jouent également un rôle important dans l'initiation et dans la progression tumorale. Ainsi, les radicaux libres favorisent l'accumulation de mutations génétiques dont certaines peuvent concerner des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs. D'autre part, les radicaux libres agissant comme messagers secondaires dans différentes cascades de signalisation, une rupture de la balance oxydative a des conséquences sur l'équilibre entre prolifération et mort cellulaire. Enfin, les ROS peuvent induire des altérations épigénétiques qui jouent un rôle clé dans le développement tumoral. Ainsi, l'altération par le stress oxydant des bases azotées interfère avec la liaison entre l'ADN et les DNA-méthyltransférases (DNMTs), ce qui a pour conséquences une hypométhylation globale du génome et la perturbation du fonctionnement cellulaire (Ziech et al, 2011).

Les ROS sont produits de manière endogène par la cellule lors de son fonctionnement normal, mais peuvent également avoir une origine exogène. Ainsi, les rayonnements ionisants, les rayons ultra-violets et le stress chimiothérapeutique sont par exemple des sources importantes de ROS exogènes. En particulier, les rayonnements ionisants très énergétiques génèrent des radicaux libres par radiolyse de l'eau, principal composant du volume cellulaire. Le déferlement brutal de ROS sur la cellule, proportionnel à la dose d'irradiation, cause une rupture de la balance oxydative et de nombreux dommages cellulaires. D'une part, le stress oxydant peut endommager les lipides, ainsi la peroxydation lipidique induit la formation d'époxydes et d'aldéhydes dont certains sont des carcinogènes. D'autre part, les ROS endommagent les protéines, ayant pour résultat des altérations structurales et une perte de fonction. Enfin, les ROS exogènes peuvent induire des lésions sévères du génome (Finkel & Holbrook, 2000). Ces lésions sont de plusieurs types : formation de sites abasiques, modifications des sucres, bases adduites et désaminées, cassures simples brin. Deux lésions oxydatives éloignées de moins de 10 paires de bases forment une lésion oxydative de l'ADN clusterisée (OCDL), qui peut évoluer dans certains cas en cassure double brin. La lésion oxydative génomique la plus courante est la 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxodG), qui sert de biomarqueur du stress oxydant et des dommages à l'ADN. D'une manière générale, l'évaluation des dommages de l'ADN permet d'obtenir des indications sur le stress oxydant subit par la cellule (Sedelnikova et al, 2010).

2° Destin d'une cellule irradiée

Les rayonnements ionisants et les espèces radicalaires de l'oxygène (ROS) induisent des cassures doubles brins (CDB) et simple brin (CSB) de l'ADN. L'induction des CDB par les ROS est indirecte, car elle apparaît comme la conséquence de la non-réparation d'un nombre trop important de CSB. En réponse à ces dommages, la cellule active différents points de contrôle (*Checkpoints*).

Immédiatement après irradiation, les CDB et CSB sont détectées par des protéines « senseurs », formant des complexes protéiques. Ces protéines sont certainement nombreuses et encore mal connues. Les premières à avoir été décrites sont Mre11, Rad51 et Nsb1, qui forment ensemble le complexe « MRN », et BRCA1 connue pour son implication dans la prédisposition génétique aux cancers du sein. Les complexes senseurs activent en aval des cassures d'une part des kinases dites « transductrices » de signal, et d'autre part des mécanismes de réparation de l'ADN. Les kinases sont dans un premier temps les protéines ATM, ATR et DNA-PKcs. ATM est en particulier recrutée par le complexe MRN sur les sites de cassures doubles brin, et activée entre autres par autophosphorylation. ATR est majoritairement recrutée au niveau des cassures simple brin par les complexes de réplication-protéine A (RPA), et activée par association avec son cofacteur ATRIP. DNA-PKcs est activée par l'hétérodimère Ku70/Ku80 pour former le complexe DNA-PK. ATM et ATR ont de nombreux substrats, dont certains en commun, qui interviennent dans la réponse cellulaire aux cassures de l'ADN et dans la réparation de ces cassures (figure 6). Parmi ces substrats, les protéines Chk1 (phosphorylée par ATR) et Chk2 (phosphorylée par ATM) sont essentielles au déclenchement des points de contrôle du cycle cellulaire en agissant sur les protéines de cycle dites « effectrices » (Christmann et al, 2003).

Dans les tissus normaux, le destin de la cellule irradiée est déterminé en grande partie par la protéine p53, activée notamment par les kinases effectrices ATM, ATR, Chk1 et Chk2. Dans ces tissus, la stabilisation de p53 permet d'engager les cellules trop endommagées dans la sénescence et/ou l'apoptose immédiate p53-dépendante. Toutefois, p53 est inactivée dans plus de la moitié des tumeurs qui perdent alors leur susceptibilité à l'apoptose immédiate. Dans ces cellules p53-mutées, les cellules irradiées incapables de réparer leurs cassures meurent d'apoptose p53-indépendante ou de catastrophe mitotique, série d'évènements résultant d'une mitose aberrante, sur lesquels je reviendrai par la suite (Brady & Attardi, 2010; Gudkov & Komarova, 2003).

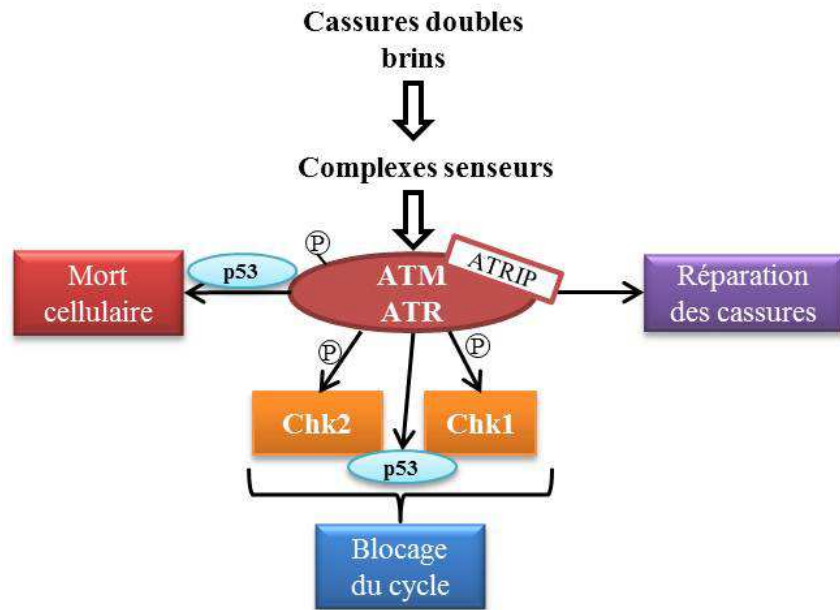


Figure 6 : Rôle central des kinases « transductrices » dans la réponse à l'irradiation

Lorsque les dommages de l'ADN sont réparables, le blocage de cycle cellulaire permet le bon déroulement des mécanismes de réparation. Une fois la réparation terminée, la cellule s'engage dans la reprise de prolifération. Si le dommage est mal réparé, la cellule devient alors sénescence ou apoptotique. Des défauts dans les points de contrôle peuvent conduire à une instabilité génétique, les cellules défectueuses pouvant s'engager dans des divisions cellulaires alors que des dommages de l'ADN subsistent, tels que des mutations, des délétions ou encore des gains de matériel génétique. Roschke et al. ont ainsi montré l'existence d'une corrélation négative entre l'instabilité chromosomique et l'activité des voies de réponse aux dommages de l'ADN, dans un panel de lignées cancéreuses (Roschke et al, 2008). Cette instabilité a pour conséquences d'une part une mutagenèse importante, et l'acquisition de nouvelles propriétés par les cellules instables, ou d'autre part le déclenchement d'une catastrophe mitotique. Les différents points de décision mis en œuvre dans la réponse cellulaire à l'irradiation sont résumés sur la figure 7.

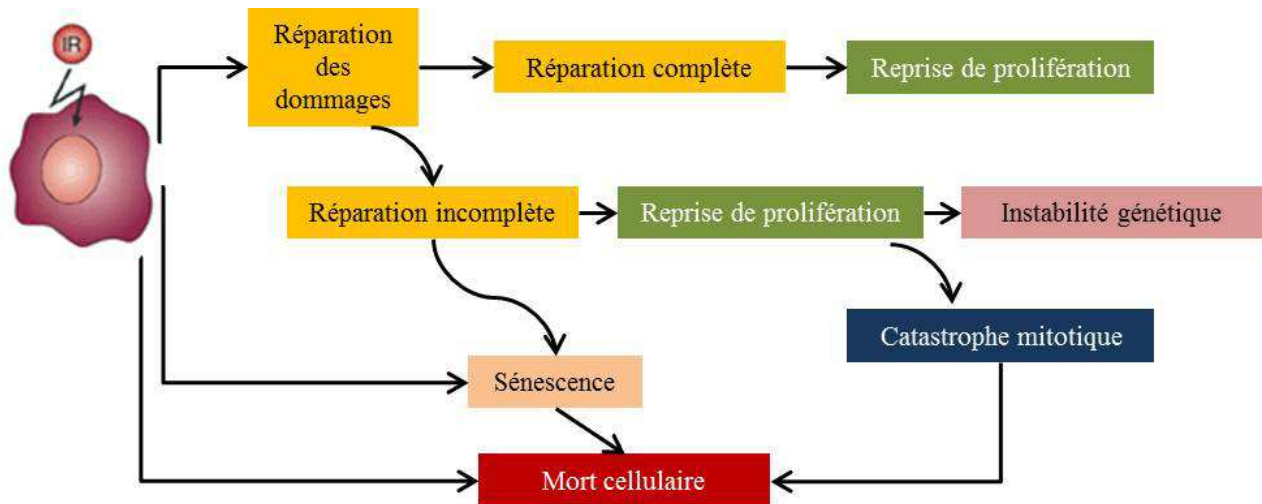


Figure 7 : Réponses des cellules de mammifères à l'irradiation

(Adapté de Gudkov et Komarova, 2003)

3° Réponses précoces aux radiations ionisantes

Activation par l'irradiation des points de contrôle du cycle cellulaire

Comme vu précédemment, lorsque les cellules n'entrent pas en sénescence/apoptose, les dommages réparables de l'ADN conduisent à l'activation des kinases effectrices ATM, ATR, DNA-PKcs, Chk1 et Chk2 et à un blocage du cycle cellulaire (Iliakis et al, 2003). Les cellules effectuent un cycle cellulaire en passant par les phases G1/S/G2/M. La progression dans le cycle se fait grâce à la dynamique des cyclines et cyclines kinase-dépendantes, dont l'activité dépend de l'état de phosphorylation (protéines Wee1, Myt1). En cas de dommages, les points de contrôle sont activés de plusieurs manières. Les blocages en G1 ou G2 ont lieu notamment grâce à l'inhibition des phosphatases Cdc25. Cette inhibition est amorcée par les phosphokinases Chk1 et Chk2. Les phosphatases Cdc25 activent en temps normal les ensembles cycline/cycline kinase-dépendantes. La destruction des phosphatases Cdc25, et en particulier de Cdc25-A, induit un blocage du cycle cellulaire en phases G1 ou G2. Un second mécanisme p53-dépendant implique la dégradation de l'ensemble Cdk2/Cycline E par p21, ce qui inhibe la transition G1/S et induit un blocage en phase G1. Enfin, p38 et son effecteur MAPKAP kinase-2 (MK2), activés par ATM et ATR, sont impliqués dans le blocage en G2, par destruction des Cdc25. Ce dernier phénomène reste toutefois partiellement compris. Les principales voies de blocage du cycle en phases G1 et G2 sont représentées sur la figure 8.

La maintenance du blocage de cycle à long terme implique entre autres la protéine p53, stabilisée notamment par phosphorylation sur les serines 15 et 20, par ATM, ATR, Chk1 et Chk2. P53 stabilisée se lie au promoteur de différents gènes. P53 maintient également le blocage de cycle en G1 au travers de p21, ce qui lui confère un rôle dans la réponse à l'irradiation autre que celui d'inducteur de l'apoptose. Il est intéressant de noter que les cellules mutées pour p53, comme les cellules cancéreuses, ne se bloquent pas en phase G1 en réponse aux cassures de l'ADN, mais sont capables de se bloquer en phase G2. Il existe donc des mécanismes p53-indépendants pour maintenir le blocage, notamment la cascade des MAPK impliquant p38/MK2.

Après réparation des cassures, des protéines agissent à différents niveaux pour mettre un terme au blocage de cycle. Citons parmi ces acteurs la protéine Plk1, essentielle mais non suffisante pour la reprise des divisions cellulaires, ainsi que les phosphatases PP2A et PP1. Enfin, la phosphatase PP2C δ aussi appelée Wip1 agit sur le point de contrôle notamment en régulant négativement p53.

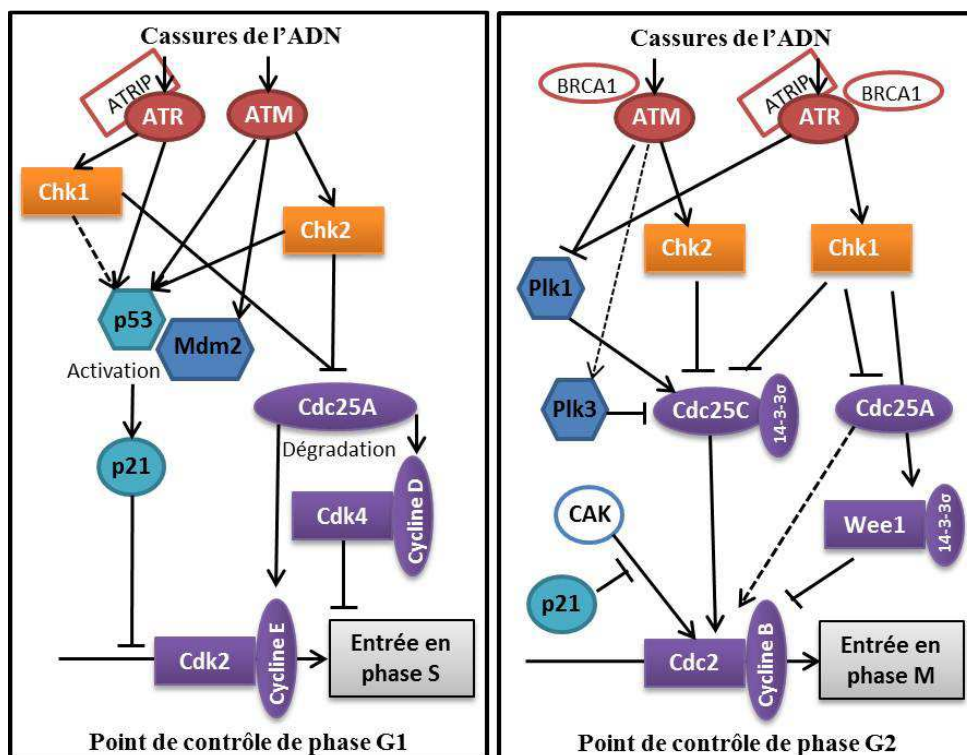


Figure 8 : Organisation moléculaire des points de contrôle en phases G1 et G2

(Adapté de Iliakis et al., 2003)

La survie des cellules après un stress génotoxique dépend de l'activation des points de contrôle ATR/Chk1, ATM/Chk2 ou p38/MK2. Des défauts dans ces points de contrôle peuvent avoir pour conséquence une reprise du cycle cellulaire alors que la cellule n'a pas réparé tous les dommages, ce qui peut entraîner des mutations et une instabilité du génome (Nakanishi et al, 2006). Il est de plus intéressant de noter que les dysfonctionnements des points de contrôle du cycle, par exemple à cause de mutations héréditaires, sont très souvent associés à des désordres sévères, et en particulier à une prédisposition au cancer (Iliakis et al, 2003; Medema & Macurek, 2012).

Réparation des cassures doubles brin

L'irradiation induit des cassures doubles brin et simple brin. Ces dommages, et notamment les cassures doubles brin (DSB) sont particulièrement toxiques pour la cellule et doivent donc être réparés. La voie de réparation utilisée dépend de plusieurs facteurs, et en particulier de la phase du cycle cellulaire au moment de l'irradiation. Afin de permettre un bon déroulement de la réparation, ces voies sont étroitement liées aux mécanismes d'activation des points de contrôle du cycle décrits précédemment. Ainsi, les complexes senseurs, outre l'activation des points de contrôle par la voie ATM/ATR, permettent le recrutement des protéines de réparation des cassures (Langerak & Russell, 2011). Les principales voies de réparation des DSB sont la ligature d'extrémités non homologues (NHEJ canonique) et la recombinaison homologue (HR) (Kass & Jasin, 2010) (figure 9). D'autres mécanismes de réparation ont été proposés, comme par exemple l'hybridation simple brin ou le NHEJ alternatif (Rass et al, 2012), mais ils ne seront pas développés ici.

La réparation de type HR (figure 9A) est induite dans les cellules en phase S-tardive/G2. Son activation dépend notamment de la protéine BRCA1 (Chapman et al, 2012). La recombinaison homologue débute par la résection des extrémités lésées grâce à des nucléases et des hélicases, ces extrémités sont protégées par les protéines RPA, puis un complexe de réparation composé entre autres de BRCA2 et RAD51 permet la reconstitution du brin abimé à partir d'un brin homologue fourni par la chromatide sœur. Ce mode de réparation est fidèle et n'induit normalement pas de mutations du génome. Rappelons que les mutations héréditaires de BRCA1 et BRCA2 constituent un facteur de risque important dans les cancers du sein, par l'altération des mécanismes de réparation de l'ADN et l'instabilité génétique qui en découle.

Le NHEJ (figure 9B) est un processus indépendant des étapes du cycle cellulaire, mais particulièrement utilisé lorsque la cellule irradiée est en phase G0/G1/S-précoce. Il débute par le recrutement de protéines senseurs comme vu précédemment. Chez les mammifères, l'engagement dans la voie du NHEJ est régulé par la protéine 53-BP1, compétitrice de BRCA1, puis les premières protéines formant le complexe de réparation sont Ku70-Ku80 et DNA-PKcs, suivies par l'engagement de l'hélicase Artemis et du complexe XRCC4-LIG4-XLS. Ces protéines contribuent à protéger les extrémités lésées de l'ADN, et à rapprocher ces deux extrémités en vue d'une ligature directe. En autorisant les erreurs de réparation, les mutations, les délétions et les gains nucléotidiques, ce mode de réparation peut potentiellement contribuer à l'instabilité du génome.

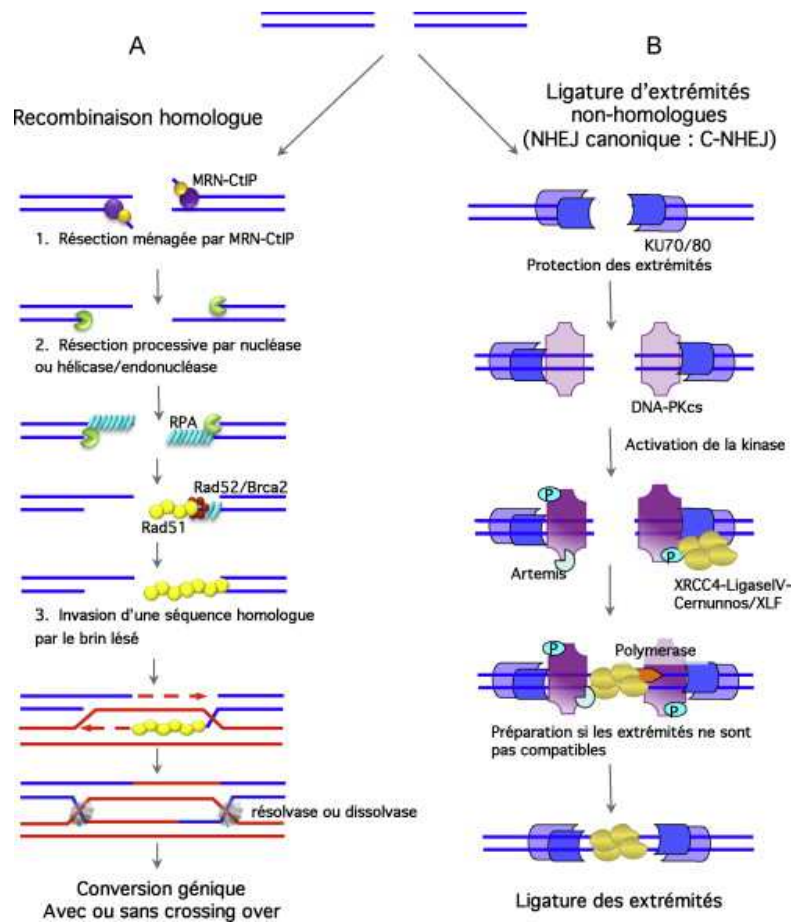


Figure 9 : Principaux mécanismes de réparation des cassures doubles brins

(Rass et al., 2012)

Voies de signalisation activées par les ROS

Les effets des ROS endogènes et exogènes ne se limitent pas aux dommages mécaniques subits par les composants cellulaires, et principalement par les protéines et l'ADN. Ainsi, les espèces radicalaires jouent un rôle de messagers cellulaires, en agissant sur la régulation de différents gènes et voies de transduction des signaux. Une grande partie de cette action concerne d'une part les voies des MAPK qui régulent différents facteurs de transcription, et d'autre part la protéine NF- κ B qui est elle-même un facteur de transcription. L'activation de la protéine p53 quant à elle serait plutôt liée aux dommages de l'ADN directement induits par les espèces radicalaires.

La voie RAS/MAPK comporte une série de serine/thréonine-kinases qui, par régulations positives ou négatives, contrôlent entre autres un éventail de processus impliqués dans la carcinogénèse, tels que la prolifération, la différenciation, l'apoptose, la motilité cellulaire ou encore le métabolisme. Les MAPK sont généralement divisées en trois sous-familles : la famille ERK (composée de ERK1 et ERK2), la famille JNK1/2 et la famille des p38 MAPK. Ces trois familles, détaillées sur la figure 10, fonctionnent sur le même modèle. Par exemple, en ce qui concerne la famille ERK bien décrite dans la littérature, dans un premier temps un récepteur aux tyrosines kinases (ErbB-1/2/3) active une protéine RAS (K-RAS, N-RAS, H-RAS). Cette protéine RAS permet la translocation d'une protéine RAF (RAF-1, B-RAF, A-RAF) à la membrane plasmique. La protéine RAF active alors par phosphorylation la kinase MEK-1/2, qui elle-même active ERK-1/2. L'activation des trois familles MAPK a été observée en réponse à une modification de la balance oxydative de la cellule, et en particulier en réponse à l'irradiation. Les ROS-radioinduits agiraient sur la voie des MAPK en inhibant les protéines tyrosine phosphatases (PTPases), qui elles-mêmes inhibent les récepteurs aux tyrosines kinases de type ErbB. L'irradiation aurait pour conséquence d'empêcher la répression de ERBB1, et donc d'activer les voies MAPK. Les effets de ces activations sont différents selon la famille MAPK considérée. Ainsi, les familles RAF1-ERK-1/2 ont une action anti-apoptotique et proliférative tandis que les familles JNK1/2 et p38 ont une action pro-apoptotique. Le stress oxydatif, en activant ces différentes familles moléculaires, est à l'origine de l'établissement d'une balance entre survie et mort cellulaire. Un mécanisme similaire est à l'origine de l'activation des voies PI3K/AKT anti-apoptotiques par l'irradiation (Valerie et al, 2007; Waris & Ahsan, 2006).

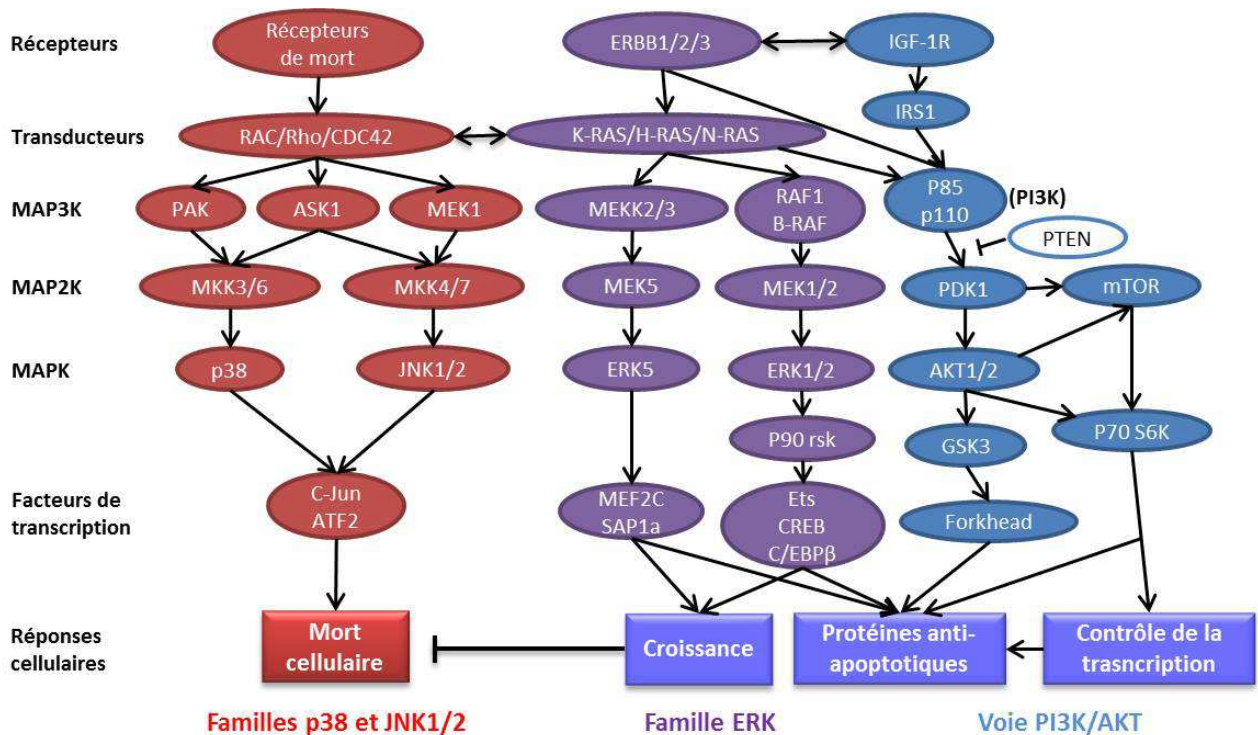


Figure 10 : Voies de signalisation MAPK et PI3K dans les cellules de carcinomes humains

(Adapté de Valerie et al., 2007)

Le facteur de transcription NF- κ B régule des gènes impliqués dans la transformation cellulaire, la prolifération, l'angiogenèse, et l'apoptose. Généralement, NF- κ B est associé à la protéine inhibitrice I κ B et maintenu dans le cytoplasme. En réponse à une modification de la balance oxydative, la dissociation de NF- κ B et I κ B permet la migration de NF- κ B dans le noyau et la transcription de gènes de réponse au stress oxydant (Allen & Tresini, 2000; Vera-Ramirez et al, 2011).

4° Senescence et morts cellulaires radioinduites

A la suite d'une irradiation et lorsque les dommages subis par la cellule normale ou tumorale sont trop importants, celle-ci peut entrer en sénescence ou déclencher une mort cellulaire programmée. La « mort cellulaire programmée » est par définition une mort contrôlée par des voies de signalisation, dont les trois principales formes sont l'apoptose, la nécrose et l'autophagie, bien que l'autophagie puisse également jouer un rôle dans la survie cellulaire (Hotchkiss et al, 2009). De plus, dans de nombreux cas, ces voies sont complémentaires les

unes des autres (Ouyang et al, 2012). Après une brève description de ces différents processus, nous verrons que les cellules tumorales mammaires irradiées meurent essentiellement dans un contexte particulier de catastrophe mitotique.

Senescence

La sénescence est un processus au cours duquel une cellule cesse de proliférer en phase G1 et adopte une morphologie large, plate et granuleuse, présente un cytoplasme vacuolisé, tout en restant métaboliquement active (Gewirtz et al, 2008; Vicencio et al, 2008). Les cellules sénescents présentent une activité β -Galactosidase acide élevée, ainsi qu'une accumulation des protéines p21 et p27. L'entrée en sénescence est déclenchée par différents facteurs, parmi lesquels le raccourcissement des télomères (sénescence réplivative décrite par Léonard Hayflick) et les dommages de l'ADN causés par des stress génotoxiques comme les rayonnements ionisants (sénescence accélérée). La sénescence est proposée traditionnellement comme un mécanisme suppresseur de tumeur, car elle permet d'éviter la prolifération de cellules endommagées. Toutefois, les cellules sénescents secrètent un cocktail de cytokines inflammatoires (Il6, Il8...), de facteurs de croissance et de protéases comme par exemple des métalloprotéinases (MMP). Le maintien d'un état inflammatoire permanent par les cellules sénescents contribuerait ainsi au vieillissement prématuré et favoriserait la cancérogenèse (Sabin & Anderson, 2011; Trentesaux & Riou, 2010).

Deux voies de signalisation sont impliquées dans l'entrée des cellules en sénescence réplivative : la voie p53 et la voie pRb (figure 11).

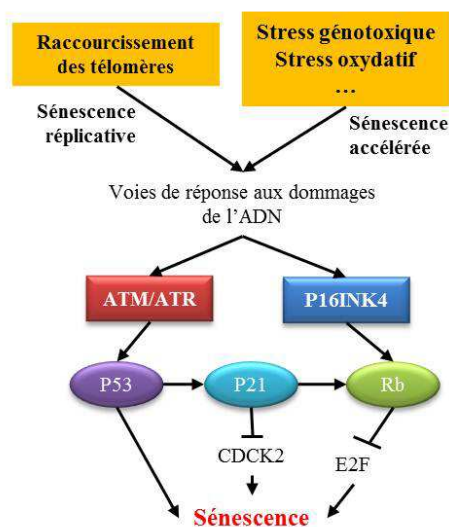


Figure 11 : Initiation et médiateurs moléculaires de la sénescence

(Adapté de Sabin et Anderson, 2011)

Seule la voie p53 serait impliquée dans l'entrée des cellules en sénescence accélérée. L'entrée en sénescence accélérée débute par l'activation des kinases ATM/ATR/Chk1/Chk2, qui à leur tour stabilisent p53. La stabilisation de p53 induit l'activité de p21 et l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1. Ainsi, les cellules tumorales mutées pour p53/p21 sont plutôt réfractaires à la sénescence, et entrent en apoptose ou subissent une catastrophe mitotique après irradiation.

Mort programmée de type I : L'apoptose

L'apoptose a été décrite pour la première fois par Kerr et al. en 1972 (Kerr et al, 1972), et est caractérisée d'un point de vue phénotypique par des changements de morphologie : contraction de la cellule, condensation et fragmentation de la chromatine, diminution du volume nucléaire. La structure des organites et l'intégrité des membranes sont préservés jusqu'à la transformation ultime de la cellule en corps apoptotiques qui seront ingérés par des macrophages. Ce type de mort cellulaire ne déclenche donc pas de réaction inflammatoire, et est généralement présenté comme la voie de mort empruntée préférentiellement lorsque les cellules sont trop endommagées (Hotchkiss et al, 2009). L'apoptose est un processus naturellement mis en œuvre dans différentes fonctions physiologiques comme l'embryogenèse ou l'involution de la glande mammaire à la fin de la lactation. Des défauts d'apoptose peuvent conduire à diverses pathologies. Une activation anormale de l'apoptose à lieu dans certaines maladies neuro-dégénératives ou anémies, au contraire une inhibition de l'apoptose est généralement observée dans la cancérogenèse, dans certains désordres auto-immuns et infections virales (Thompson, 1995). Enfin, l'apoptose est déclenchée par les cellules en cas de stress génotoxique, lorsque l'ADN est trop endommagé et ne peut être réparé.

On distingue deux formes d'apoptose déclenchées par des voies moléculaires distinctes : la voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort, et la voie intrinsèque ou voie mitochondriale (Marchetti, 2005) (figure 12). Ces deux voies peuvent de plus communiquer entre elles, et aboutissent à l'activation en cascade de caspases, qui contribuent au clivage des composants cellulaires.

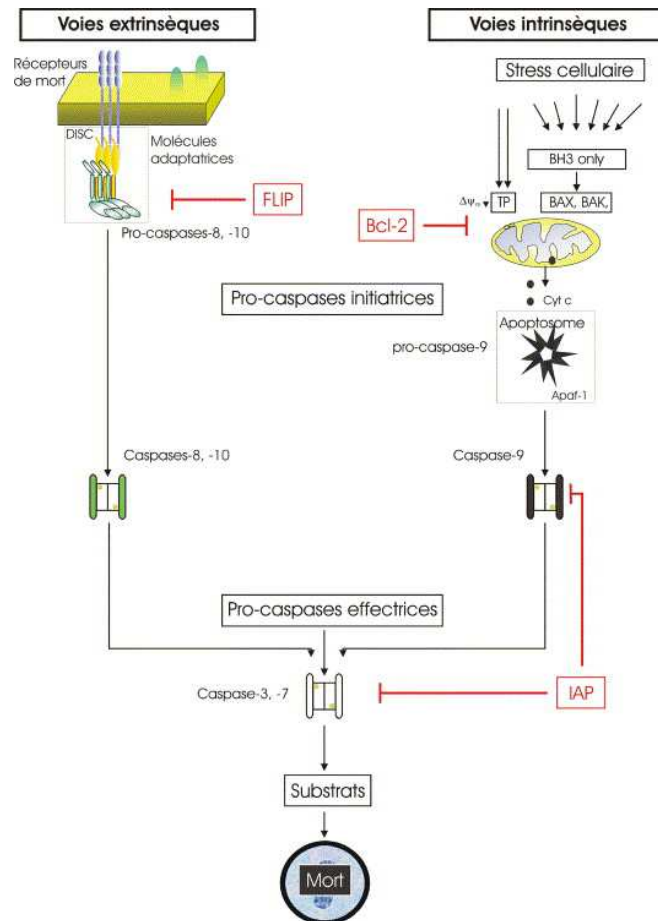


Figure 12 : Représentation simplifiée des voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèque
(Marchetti, 2005)

Les récepteurs de mort font partie de la super-famille TNF/TNF-R, qui contrôle différentes fonctions cellulaires comme l'apoptose, la prolifération, la survie et la différenciation. Plus de 30 récepteurs appartenant à cette super-famille ont été caractérisés, chacun étant activé par un ligand (Gaur & Aggarwal, 2003). Dans cette super-famille, les récepteurs de mort peuvent induire l'apoptose, grâce à la présence d'un domaine cytoplasmique appelé « domaine de mort » (*Death Domain*), qui permet la transmission du signal induit par l'interaction ligand-récepteur. La famille des récepteurs de mort comprend 8 membres composés de couples récepteurs/ligands, parmi lesquels 3 couples sont très impliqués dans le sein normal et cancéreux :

- Le récepteur FAS dont le ligand est FASL, fortement impliqué dans la plasticité de la glande mammaire au cours des cycles menstruels et de la grossesse

- Le récepteur TRAIL-R, surexprimé dans les cellules tumorales, et dont le ligand est TRAIL
- Le récepteur TNF-R1, dont le ligand est TNF- α

Le ligand TNF- α est une cytokine sécrétée. Les ligands FASL et TRAIL possèdent un domaine d'ancrage à la membrane, et fonctionnent par activation autocrine ou paracrine. Dans les cancers, FASL et TRAIL peuvent être clivés, et des formes solubles et actives des ligands sont alors sécrétées dans le milieu. Les protéines de clivage comprennent notamment les metalloprotéinases, comme par exemple la protéine MMP-7 capable de cliver le ligand FASL (Curtin & Cotter, 2003). Lorsque l'un des récepteurs de mort cités ici est activé par la fixation de son ligand, celui-ci déclenche une voie de signalisation comprenant des protéines adaptatrices, dont la protéine FADD, qui à leur tour activent par clivage les caspases 8 et 10 (Mahmood & Shukla, 2010).

La voie apoptotique intrinsèque (ou voie mitochondriale) est dépendante de la famille de protéines Bcl-2, qui exercent soit une action pro-apoptotique (Bax, Bcl-Xs, Bid, Bad...), soit une action anti-apoptotique (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bcl-W, A1, Boo...). Une rupture de la balance entre les facteurs pro- et anti-, en faveur des facteurs pro-apoptotiques, détermine l'entrée de la cellule en apoptose par relargage de cytochrome c mitochondrial et activation des caspases 9 et 3. L'apoptose mitochondriale peut de plus être activée sous le contrôle de p53, qui permet la transcription de nombreux gènes pro- et l'inhibition de gènes anti-apoptotiques. Enfin une augmentation du taux intracellulaire de céramides, due à l'endommagement de la membrane plasmique ou synthétisés par la Céramide Synthase, aboutit également à la transcription de gènes pro-apoptotique (Marchetti, 2005).

Les voies intrinsèque et extrinsèque aboutissent toutes deux à l'activation ultime des caspases 3 et 7. Ces caspases exécutrices, et en particulier la caspase 3, permettent le clivage de substrats et le déclenchement de l'apoptose (Fischer et al, 2003). On dénombre actuellement plusieurs centaines de substrats, répartis en grandes familles de fonctions :

- Dégradation de la molécule d'ADN et inhibition des voies de réparation : substrats ICAD, Rad51, PARP1, ATM, DNA-PK...
- Inhibition des mécanismes de transcription et de traduction
- Arrêt du cycle cellulaire : clivage de cyclines
- Levée de l'inhibition de l'apoptose : clivage de protéines anti-apoptotiques, Bcl-XL, Bcl-2 ou d'inhibiteurs de caspases
- Changement de morphologie cellulaire et nucléaire, par clivage de protéines du cytosquelette, de cadhérines, de laminines...

Le contrôle de l'apoptose est un processus dérégulé dans les cellules cancéreuses, et corrélé à l'instabilité génétique de plusieurs manières. A court terme une instabilité génétique excessive peut déclencher l'apoptose. A plus long terme, l'instabilité génétique peut conduire, par l'acquisition de mutations, à un échappement accru des cellules cancéreuses à l'apoptose. D'autre part, des défauts dans les voies de déclenchement de l'apoptose conduisent à la survie de cellules possédant des cassures de l'ADN et contribuent donc à augmenter l'instabilité génétique. Ces deux phénomènes sont donc intimement liés et leur désorganisation favorise la progression tumorale (Zhivotovsky & Kroemer, 2004).

Mort programmée de type II : L'autophagie

L'autophagie est un processus catabolique qui débute par la formation d'autophagosomes, structures délimitées par une double membrane, contenant des macromolécules et des organelles destinés à être recyclés par le lysosome (Chen & Karantza-Wadsworth, 2009). L'autophagie a la particularité de favoriser la survie cellulaire dans un contexte de stress ou de manque de nutriments, mais joue également un rôle de voie de mort programmée différente de l'apoptose et de la nécrose.

Les acteurs de la famille Atg (Autophagy related genes), parmi lesquels Beclin1, participent à toutes les étapes du processus d'autophagie : induction et formation de la vésicule, fusion avec le lysosome, dégradation de l'autophagosome. La protéine Beclin1 interagit en temps normal avec les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Lors d'une privation de nutriments, les acteurs pro-apoptotiques Bid, Bad, Bak et Bim se lient aux protéines anti-apoptotiques, ce qui libère la Beclin1 et déclenche l'autophagie. De plus, dans les tissus normaux, la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR régule négativement l'autophagie. Une privation de nutriments supprime la voie PI3K, ce qui conduit à une activation de l'autophagie et permet la survie de la cellule. Dans de nombreuses tumeurs, la voie PI3K/AKT/mTOR est constitutivement surexprimée, ce qui rend les cellules cancéreuses résistantes à la mort par autophagie. Enfin, p53 jouerait également un rôle dans le déclenchement de l'autophagie, via l'inhibition de mTOR ou l'activation de la protéine DRAM (Lefranc et al, 2007).

Des études ont démontré l'implication de l'autophagie d'une part dans la mort cellulaire radio-induite, mais également dans la survie des cellules tumorales après irradiation. L'autophagie semble donc jouer un rôle double dans la réponse à l'irradiation, ce rôle dépendant de différents facteurs comme la nature du tissu tumoral, l'état de la cellule au moment de l'irradiation ou encore le niveau de régulation de l'apoptose (Palumbo &

Comincini, 2013). Par exemple, des études réalisées sur des lignées de cancer du sein ont montré qu'un blocage de l'apoptose associé à un stress génotoxique induit une mort par autophagie, ayant pour résultat une mortalité globalement amplifiée. Parallèlement à cela, l'induction de l'autophagie par des analogues de la vitamine D permet de radio-sensibiliser des cellules de cancer du sein (Gewirtz et al, 2009).

Mort programmée de type III : La nécrose

Historiquement, la nécrose a été décrite comme une mort cellulaire incontrôlée et passive, en contexte inflammatoire, par rapport à l'apoptose ou à l'autophagie qui sont des phénomènes actifs (Golstein & Kroemer, 2007; Ouyang et al, 2012). Par la suite, différents modèles expérimentaux ont mis en évidence une séquence d'évènements commune à toutes les morts nécrotiques : dysfonction mitochondriale, déplétion en ATP et augmentation des ROS, perte de l'homéostasie du calcium, migration périnucléaire des organites, activation de protéases comme les cathepsines et les calpaïnes, rupture du lysosome et enfin rupture de la membrane plasmique et réponse inflammatoire déclenchée par les cellules immunitaires.

Certaines des caractéristiques de la nécrose sont communes à d'autres formes de morts cellulaires programmées. Ainsi, lorsque les caspases sont inactives, l'induction de la voie des récepteurs de mort, et notamment l'activation du récepteur TNF-R1 par FADD, provoque l'assemblage d'un complexe pro-nécrotique RIP1-RIP3 qui interagit avec des enzymes métaboliques comme PYGL, GLUL ou encore GLUD1, ce qui a pour conséquence une surproduction métabolique de ROS. Ces ROS en excès déclenchent alors le processus nécrotique en agissant sur la perméabilité mitochondriale. D'autres modulateurs de la nécrose ont été identifiés, comme par exemple PARP1, les polymères PAR, la NADPH oxydase ou encore les protéases de la famille des calpaïnes. Il est intéressant de noter que l'inhibition des voies d'apoptose peut déclencher un phénomène de nécrose, soulignant l'interconnexion qui existe entre les différents types de morts cellulaires programmées.

Catastrophe mitotique

Contrairement aux cellules de leucémies, la majorité des cellules de tumeurs solides, et notamment les cellules de cancer du sein, sont décrites comme réfractaires à l'apoptose immédiate après irradiation ou exposition à des drogues toxiques (Gewirtz, 2000). Au contraire, ces traitements induisent un arrêt prolongé de croissance en phase G2/M du cycle cellulaire, pouvant être associé à une perte de capacité clonogénique, et une mort cellulaire

tardive. Longtemps, la mort mitotique a été pauvrement caractérisée, et décrite principalement par des critères morphologiques, comme l'apparition de cellules géantes multinuclées, présentant des micro-noyaux et des vésicules (Roninson et al, 2001) (figure 13). Par la suite, différents travaux ont clairement montré qu'il pouvait exister un lien entre la catastrophe mitotique et l'apoptose. Il a ainsi été suggéré que la mort mitotique pouvait être un sous-type spécial d'apoptose radio-induite médiée par les caspases (Castedo et al, 2004b).



Figure 13 : Illustration de la catastrophe mitotique *in vitro*

Des cellules cancéreuses mammaires humaines MDA-MB-231 ont été irradiées à une dose unique de 10 Gy. 5 semaines après irradiation, on observe toujours en culture la présence de cellules géantes dont le diamètre dépasse 600 µm (flèche bleue), ainsi que des clones de cellules viables de taille normale (flèche verte).

D'un point de vue moléculaire, la catastrophe mitotique se traduit par un défaut des points de contrôle du cycle cellulaire, pouvant avoir pour conséquence une reprise des divisions cellulaires alors que l'ADN reste endommagé, et la réalisation d'une mitose aberrante (Castedo et al, 2004a; Castedo et al, 2004b; Quignon et al, 2007). Ces défauts peuvent survenir au niveau du point de contrôle de phase G1, par exemple dans la voie p53/p21 ou par dérégulation de cdc25A. Ils surviennent également au niveau du point de contrôle de phase G2, par exemple par l'absence de répression prolongée de la cycline kinase Cdk1. On parle alors de « *checkpoint adaptation* », ce qui désigne l'entrée en mitose de cellules présentant

des dommages persistants de l'ADN. A l'issue de cette période de « *checkpoint adaptation* » la cellule peut soit subir une apoptose, soit réaliser un « glissement mitotique ». Ce terme désigne l'achèvement d'une mitose aberrante, sans séparation des cellules filles et avec conservation de chromosomes endommagés. On assiste alors à la formation de cellules tétraploïdes en G1. Le « glissement mitotique » serait lié à une dégradation prématurée de la cycline B, permettant la sortie de mitose incomplète. Enfin, ces cellules tétraploïdes peuvent soit mourir d'apoptose ou de nécrose, soit survivre et générer des cellules aneuploïdes fortement instables, présentant une mortalité accrue (figure 14).

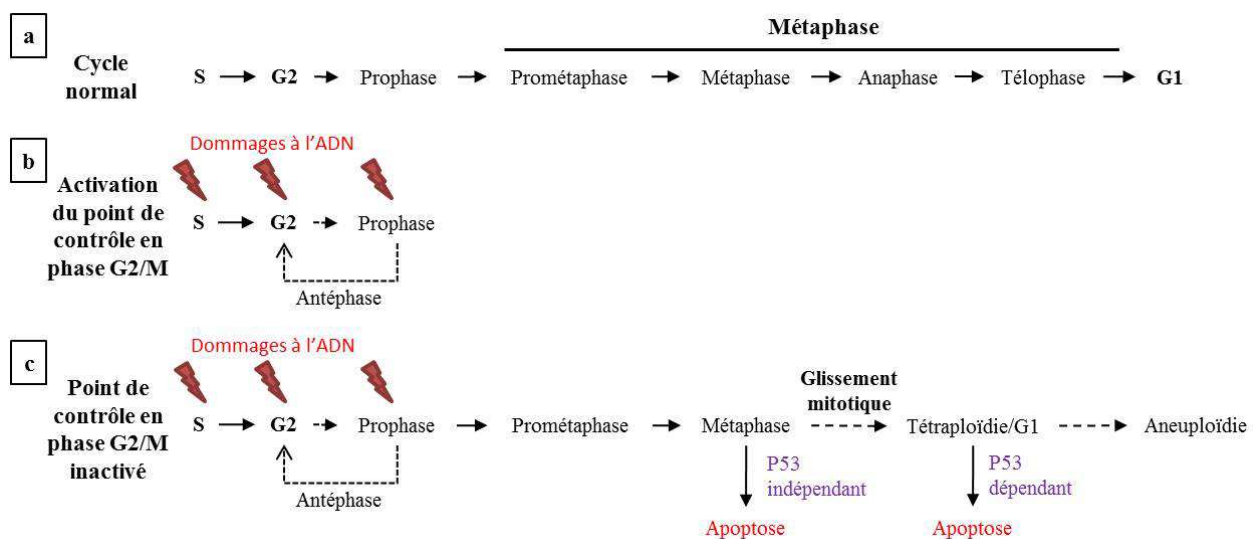


Figure 14 : Mort cellulaire par apoptose dans un contexte de catastrophe mitotique

(a) Cycle cellulaire normal. (b) Activation par l'irradiation du point de contrôle en phase G2. (c) Echec d'activation des points de contrôle : les cellules entrent en mitose avec un ADN endommagé et subissent soit une apoptose p53-indépendante, soit un glissement mitotique avec passage à la tétraploïdie et une apoptose p53-dépendante ou un passage à l'aneuploïdie (adapté de Castedo et al., 2004)

Des modèles cellulaires déficients pour un ou plusieurs points de contrôle ont montré que la catastrophe mitotique surviendrait en dernier recours, lorsqu'aucune voie de blocage du cycle ne peut être activée. Différentes hypothèses ont été avancées pour expliquer l'augmentation de taille des cellules en catastrophe mitotique. Il semble toutefois que la principale cause de ce gigantisme soit la réplication de l'ADN sans division des cellules filles, aussi appelé « *endocycling* », générant des cellules polyploïdes.

Il a été proposé que la catastrophe mitotique serait un mécanisme onco-suppressif permettant d'empêcher la prolifération de cellules aneuploïdes, et précédant la sénescence, la nécrose ou l'apoptose (Vitale et al, 2011). Ainsi, il a été montré que la mort des cellules polyploïdes pouvait être une apoptose p53-dépendante, impliquant notamment la caspase-2 et le relargage par la mitochondrie de cytochrome c (Vakifahmetoglu et al, 2008).

Les travaux réalisés précédemment au laboratoire ont mis en évidence qu'une irradiation à forte dose de cellules tumorales mammaires humaines induisait un blocage prolongé en phase G2/M. 3 à 4 jours après irradiation, une mort tardive est observée dans un contexte de catastrophe mitotique, accompagnée d'une forte instabilité génétique (Luce et al, 2009). Cette mort tardive qui est observée pendant 1 à 3 semaines après irradiation est essentiellement de type apoptotique caspase-dépendante et est principalement médiée par la voie des récepteurs de mort : FasL/Fas, Trail/Trail-R et TNF/TNF-R. En effet, une surexpression précoce des récepteur mais tardive des ligands est à l'origine de cette apoptose tardive.

C- Effets non ciblés des radiations ionisantes sur les cellules mammaires

Nous avons vu précédemment que les radiations ionisantes endommagent les composants cellulaires soit directement, soit indirectement en générant des espèces réactives de l'oxygène. On supposait traditionnellement que les effets de l'irradiation se limitaient aux cellules directement traversées par les rayonnements ionisants. On sait depuis plus d'une vingtaine d'années que cette vision de la radiobiologie est incomplète. En réalité, l'irradiation peut également avoir des effets sur les cellules voisines des cellules irradiées, c'est l'effet bystander, et sur les cellules descendantes des cellules irradiées, c'est l'effet transgénérationnel.

1° Effet bystander

Mise en évidence et modèles expérimentaux

L'effet bystander a été mis en évidence par Nagasawa et Little en 1992 (Nagasawa & Little, 1992). L'irradiation de 1% de cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) en culture, par des particules- α ou des rayons X, induit une instabilité chromosomique observable dans 30% des cellules cultivées. Par la suite, l'effet bystander a été défini comme l'ensemble des effets de l'irradiation survenant dans des cellules non irradiées (dites cellules bystander), dans le voisinage des cellules irradiées. Au sens large, ces effets comprennent l'instabilité chromosomique (déstructuration des chromosomes, cassures, échanges de chromatides), la formation de micronoyaux, les mutations du génome, la transformation néoplasique, la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire.

Deux mécanismes principaux ont été décrits pour expliquer l'effet bystander (Hamada et al, 2007; Little, 2006). D'une part, les cellules irradiées peuvent être en contact physique direct avec les cellules bystander, ce qui permet d'impliquer les jonctions intercellulaires opérationnelles. Le deuxième mécanisme implique la sécrétion de facteurs par la cellule irradiée, notamment des cytokines, qui peuvent agir à distance sur des cellules réceptrices. Ce mécanisme a été mis en évidence sur différents modèles, en particulier en utilisant des protocoles de transfert de milieux conditionnés.

Différents dispositifs permettent d'observer l'effet bystander :

- Les faisceaux de haute précision (rayons X, protons, particules α ...) permettant de cibler précisément une ou plusieurs cellules, ou même un compartiment au sein d'une seule cellule
- Les faisceaux larges délivrant des faibles doses, ou des particules de faible énergie, et permettant d'évaluer le nombre de cellules réellement traversées par les particules
- Les faisceaux larges délivrant de fortes doses, majoritairement utilisés pour les expériences de transfert de milieu
- Les faisceaux larges dont la cible est partiellement masquée, par exemple par un écran
- Les irradiations internes par des particules à faible portée, comme les particules β

De plus, les effets bystanders peuvent être observés *in vitro* ou *in vivo*, et dans une large gamme de modèles cellulaires parmi lesquels les cellules tumorales mammaires humaines. L'effet bystander jouerait un rôle positif dans les traitements des tumeurs mammaires par radiothérapie, en permettant d'affecter les cellules cancéreuses ayant échappé au faisceau direct des rayonnements ionisants. Cet effet non ciblé clinique est appelé effet abscopal (Little, 2006; Morgan & Sowa, 2007).

Mécanismes des effets de type bystander

Pour expliquer les effets bystander, l'existence de facteurs « clastogènes » a été proposée *in vitro* et *in vivo*. Ces facteurs ont été initialement décrits dans le plasma de patients irradiés, et sont capables d'induire des dommages chromosomiques dans les lymphocytes de patients non irradiés (expériences de co-culture). Ces facteurs ont été retrouvés dans le plasma des survivants de Hiroshima et Nagasaki (Pant & Kamada, 1977), d'enfants irradiés à Tchernobyl (Emerit et al, 1997) et de patients atteints de pathologies telles que l'ataxie télangectasie, le syndrome de Bloom et l'anémie de Fanconi (Huang et al, 2003).

Zhou et al. et Azzam et al. ont utilisé un faisceau de haute précision délivrant des particules α , pour irradier des cultures cellulaires confluentes (Autsavapromporn et al, 2011; Azzam et al, 1998; Zhou et al, 2000). Leurs différents travaux ont montré que l'effet bystander se traduit par la survenue de mutations, la formation de micronoyaux et une létalité augmentée dans les cellules bystander, ainsi que par l'induction de mécanismes de réponse à l'irradiation p53-dépendants. Les jonctions serrées (*gap junctions*) entre cellules jouent un rôle critique dans cet effet non ciblé. Le blocage chimique des jonctions serrées, ou l'extinction du gène codant pour la connexine 43 réduit cet effet bystander lié aux particules α . De petites molécules, de taille inférieure à 1kDA, peuvent circuler par les jonctions serrées entre cellules adjacentes et

joueraient un rôle dans de nombreux aspects de la réponse bystander. Ces molécules ne sont actuellement pas clairement identifiées, mais différents travaux ont montré une implication de la transmission d'espèces réactives de l'oxygène. Ainsi, bien que produits par les cellules directement endommagées par l'irradiation, les ROS peuvent être transmis aux cellules voisines non irradiées par diffusion passive dans le milieu intracellulaire, jonctions cellulaires ou transport actif. Bien que la plupart des ROS aient une demi-vie relativement courte, une implication des molécules H₂O₂ et NO (Shao et al, 2003) dans la médiation des effets bystander a été démontrée. De plus, Narayanan et al. ont montré une implication de l'enzyme NADPH-oxydase dans la génération des ROS par les cellules bystander de fibroblastes humains de poumons, irradiés par des particules α (Narayanan et al, 1997).

L'effet bystander peut également être dû aux cytokines et facteurs de croissance qui activent la voie des MAPK, résultant en une modulation de la survie et de la prolifération des cellules bystander. Les molécules décrites sont peu nombreuses, et comprennent notamment les ligands des récepteurs aux tyrosines kinases : TGF- α , TNF- α , TGF- β ... (Hamada et al, 2007). Comme indiqué précédemment, les travaux réalisés au laboratoire par Luce et al. ont montré une implication de la voie des récepteurs de mort dans la mortalité tardive de cellules mammaires irradiées, dans un contexte de catastrophe mitotique. Des formes solubles des ligands FasL, TRAIL et TNF- α ont été mises en évidence tardivement après irradiation. Par des expériences de transfert de milieux conditionnés, ces facteurs solubles sont capables d'induire une surmortalité cellulaire par un effet de type bystander (Luce et al, 2009).

2° Instabilité génétique transgénérationnelle

Définition et manifestations

L'instabilité génétique transgénérationnelle (IGT) désigne les effets de l'irradiation survenant à long terme, dans la descendance des cellules irradiées, et qui peuvent être observés durant plusieurs générations. De même que pour les effets bystander, l'IGT se manifeste par des mutations et cassures de l'ADN, une instabilité chromosomique (déstructuration des chromosomes, cassures, échanges de chromatides), la formation de micronoyaux, une diminution de l'efficacité de clonage, un changement de ploïdie et une mort cellulaire augmentée (Aypar et al, 2011).

Soupçonné depuis les années 80, cet effet non ciblé des radiations ionisantes a été mis en évidence par Kadhim et al. en 1992 (Kadhim et al, 1992). Ces auteurs ont irradié des cellules souches hématopoïétiques par des faibles doses de particules α , et montré une instabilité

chromosomique dans la descendance de ces cellules, 12 à 14 générations après irradiation. En transplantant des cellules souches hématopoïétiques irradiées et non irradiées chez des souris CBA/H, Watson et al. ont montré une instabilité chromosomique persistante dans la descendance des cellules irradiées plus de 1 an après irradiation (Watson et al, 2000). De manière intéressante, l'instabilité génétique était aussi observée dans la descendance des cellules non irradiées à long terme, suggérant le couplage d'un effet bystander avec l'IGT observée dans cette étude. Dans une étude *in vivo*, Barber et al. ont étudié l'IGT survenant dans la descendance non irradiée de souris mâle, elles-mêmes irradiées par des rayons X, de souches CBA/Ca (2 Gy) et BALB/c (1 Gy) (Barber et al, 2006). Ces auteurs montrent une augmentation de la fréquence des mutations, ainsi que des cassures spontanées doubles brin et simple brin dans les tissus germinaux et somatiques des souris descendantes. De manière intéressante, ces dommages surviennent également au locus *hprt* du chromosome X dans la descendance mâle, démontrant que les aberrations chromosomiques touchent également les chromosomes fournis par la femelle reproductrice non irradiée. L'instabilité du génome, en favorisant la survenue de mutations délétères, est un facteur de carcinogénèse et de progression tumorale, c'est pourquoi comprendre les causes et les mécanismes de l'IGT est un enjeu fondamental de la radioprotection. Dans les traitements par radiothérapie, en cas de rechute du cancer après traitement, les effets indirects peuvent contribuer à l'émergence de cellules plus agressives (Streffer, 2010).

Mécanismes de l'IGT

Deux mécanismes majoritaires sont proposés pour expliquer l'IGT. D'une part, un défaut des mécanismes de réparation de l'ADN pourrait expliquer la persistance de cassures spontanées (Huang et al, 2003). Les auteurs qui défendent cette hypothèse se basent sur les études des maladies humaines Ataxia-Telangectasia, syndrome de Bloom, Anémie de Fanconi, syndrome de Nijmegen, syndrome de Werner. Toutes ces maladies autosomales récessives sont caractérisées par une altération des mécanismes de réparation de l'ADN, et notamment des protéines senseurs de détection des cassures, ce qui se traduit en une instabilité génétique chronique et une prédisposition au cancer. Ainsi l'IGT pourrait refléter des défauts de réponse aux dommages de l'ADN, induits par l'irradiation.

D'autre part, un stress oxydatif persistant pourrait être la cause de ces altérations (Barber et al, 2006). Cette hypothèse des ROS persistants, décrite dans les effets bystander, a été développée par différents auteurs pour expliquer l'IGT. Notamment, Dayal et al. ont étudié un modèle cellulaire (lignée GM10115) précédemment décrit (Marder & Morgan, 1993),

constitué de clones génétiquement stables et instables, issus de cellules parentales irradiées par des rayons X à une dose de 5 Gy ou 10 Gy (Dayal et al, 2008). Ces auteurs montrent que l'instabilité de certains clones est liée à la persistance dans la cellule de peroxyde d'hydrogène, et à un défaut de détoxification de H₂O₂ par la Catalase et les GPx. De plus, une réduction de H₂O₂ dans les clones instables permet de diminuer la proportion d'aberrations chromosomiques. D'autres études démontrent la persistance d'espèces réactives de l'oxygène dans la descendance instable des cellules irradiées (Kim et al, 2006).

Sans être exclusives, les hypothèses des défauts de réparation et des ROS persistants sont probablement liées, les ROS pouvant moduler l'expression de gènes de réparation de l'ADN avec pour conséquence une modification de l'homéostasie globale de la cellule (figure 15).

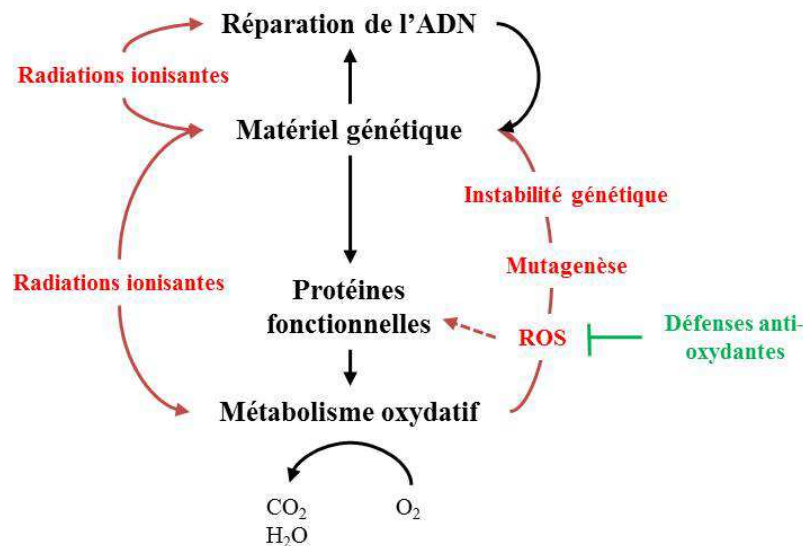


Figure 15 : Contribution du stress oxydant et des dommages à l'ADN dans l'établissement de l'instabilité génétique transgénérationnelle

(Adapté de Dayal et al., 2008)

Néanmoins il semble peu probable que la famille des gènes de réparation soit la première cible des rayonnements ionisants, étant donné que cette famille représente une « fenêtre cible » de taille réduite. En revanche, la mitochondrie pourrait être un organe central dans le phénomène d'IGT. Ainsi, les cellules irradiées présentent des dysfonctions mitochondriales, qui peuvent être à l'origine d'une production soutenue de ROS. Plusieurs raisons expliquent la vulnérabilité de cet organe face aux rayonnements ionisants. D'une part, l'ADN

mitochondrial (ADNmt) est localisé à proximité d'un des principaux sites de production des ROS, c'est à dire la membrane mitochondriale. D'autre part, l'ADNmt ne possède pas d'histones protectrices et, enfin, la mitochondrie possède un système de réparation de l'ADN limité. Des altérations radioinduites de l'ADNmt auraient donc pour conséquence un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire et une surproduction de ROS entraînant de nombreux dysfonctionnements au niveau des cellules irradiées, et dans leur descendance (figure 16). Limoli et al. ont ainsi démontré sur le modèle cellulaire GM10115 (Marder & Morgan, 1993) la présence d'un excès de ROS et un dysfonctionnement mitochondrial des clones instables (Limoli et al, 2003). Plus récemment, des travaux ont montré un dysfonctionnement du complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale dans les clones instables par rapport aux clones stables et aux cellules non irradiées (Dayal et al, 2009; Kim et al, 2006). Globalement, ces données suggèrent qu'un dysfonctionnement de la mitochondrie peut expliquer l'état de stress oxydant permanent. Enfin une implication du TGF- β , cytokine dont la production est amplifiée par l'irradiation, a été proposée dans la modulation de l'IGT, avec toutefois des rôles contradictoires selon les études présentées (Kim et al, 2006; Maxwell et al, 2008).

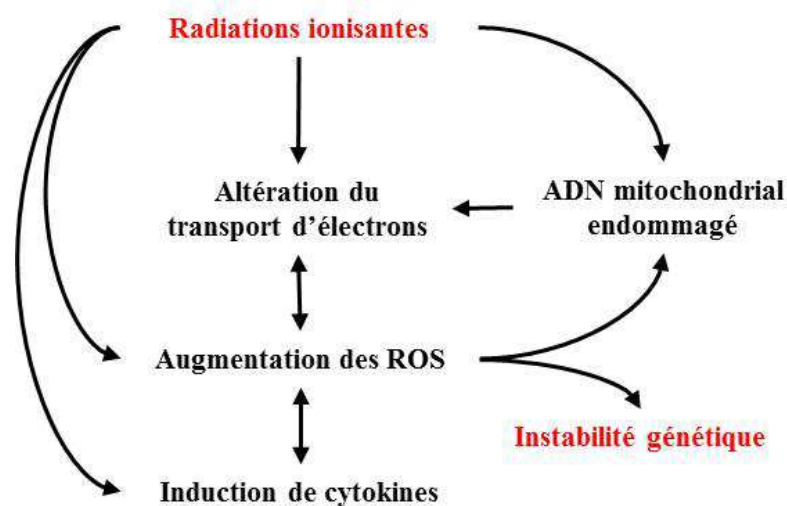


Figure 16 : Modélisation du rôle de la mitochondrie et de la perpétuation des ROS dans l'instabilité génétique transgénérationnelle

(Adapté de Kim et al., 2006)

Irradiation, effets non ciblés et mécanismes épigénétiques

Les modifications épigénétiques contrôlent de nombreuses fonctions cellulaires. De plus, le profil épigénétique des cellules cancéreuses est profondément transformé, caractérisé par un changement du profil de méthylation de l'ADN, ainsi que par un profil aberrant de modification des histones et d'expression des miRNA. Les modifications épigénétiques peuvent contribuer à l'instabilité du génome, en permettant la surexpression d'oncogènes et l'extinction de gènes suppresseurs de tumeur (Esteller, 2007). Plusieurs arguments permettent de penser que l'IGT aurait une origine épigénétique (Mothersill & Seymour, 2012). Ainsi l'IGT ne serait généralement pas un événement clonal. De plus il a été impossible de mettre en évidence des mutations communes à tous les clones et pouvant expliquer l'instabilité observée. L'IGT ne peut donc pas vraisemblablement être expliquée par des mutations ou cassures de l'ADN induites par l'irradiation mais plutôt par des transformations des profils épigénétiques (Aypar et al, 2011).

Par exemple, l'exposition de rats et souris à des radiations ionisantes induit une hypométhylation globale de l'ADN et une hyperméthylation ponctuelle de certains promoteurs, avec toutefois des variations dose-, tissu- et sexe-spécifiques. Ce changement de profil de méthylation de l'ADN pourrait conduire à la persistance de l'IGT. Par exemple, l'étude de Kaup et al. permet de corrélérer des changements de profils de méthylation de kératinocytes humains à l'IGT, plus de 20 générations après une exposition aux rayons gamma (Kaup et al, 2006). Dans ces cellules, les changements de méthylation de séquences répétées et de séquences satellites SAT2 pourraient expliquer l'instabilité génétique persistante. Ces modifications des profils de méthylation sont également observables après exposition de kératinocytes non irradiés à des milieux de culture de kératinocytes irradiés. Cette observation met une fois de plus en avant le lien existant entre effet bystander et IGT.

Les mécanismes de réparation de l'ADN nécessitent un remodelage de la chromatine aux sites de cassures. Des dysfonctions des histones dues à l'irradiation peuvent avoir pour conséquence des défauts de réparation de l'ADN et une instabilité génétique. Le lien entre histones et irradiation, et IGT et histones reste toutefois mal documenté.

Enfin, plusieurs études montrent des changements dans les profils d'expression des miRNA, en réponse à une irradiation à faible ou forte dose, et en réponse à un stress oxydant. Ainsi, les kinases ATM, ATR, Chk1, Chk2, DNA-PK pourraient, en réponse aux dommages de l'ADN, moduler directement ou indirectement le profil d'expression des miRNA. Les miRNA contrôlent diverses fonctions cellulaires comme la gestion du stress oxydatif, la réparation de l'ADN ou encore la régulation du cycle cellulaire (Wang & Taniguchi, 2012). Une altération

durable du profil d'expression des miRNA due à l'irradiation pourrait donc expliquer l'IGT, mais il n'existe pas actuellement d'études réalisées à ce sujet. De plus, une sécrétion de miRNA par les cellules endommagées pourrait être l'un des paramètres de l'effet bystander (Ilnytsky & Kovalchuk, 2011).

II- Les Cellules souches cancéreuses mammaires

A- La théorie des Cellules Souches Cancéreuses

1° Définition et mise en évidence des CSC

Définition

La théorie des Cellules Souches Cancéreuses (CSC) a émergé dans les années 2000, de la comparaison faite entre les mécanismes moléculaires permettant l'auto-renouvellement des cellules souches normales et les propriétés des cellules tumorales. Les cellules souches normales sont définies comme une sous population cellulaire rare, qui possède la capacité de s'auto-renouveler et de se différencier en différents types de cellules matures. Dès 1855, Rudolf Virchow a émis l'hypothèse que le cancer proviendrait de l'activation de cellules « dominantes » ayant conservé leurs propriétés embryonnaires au sein des tissus matures. En 1875, des pathologistes comme Julius Cohnheim ont développé cette idée, et supposé que le développement cancéreux serait originaire de cellules embryonnaires mal placées lors du développement fœtal (Schmitt et al, 2012). Ainsi, par la suite, une hypothèse a été émise selon laquelle les Cellules Souches Cancéreuses formeraient une sous population réduite et relativement indifférenciée, probablement issue de la cancérisation des cellules souches normales et dont la prolifération et la différenciation seraient à l'origine de la masse tumorale (Reya et al, 2001). Comme nous le verrons par la suite, il est probable que les cellules souches normales et cancéreuses partagent les mêmes machineries moléculaires, et les facteurs contrôlant les fonctions des cellules souches normales seraient impliqués dans le processus oncogénique. Yamanaka a montré que l'introduction de 4 facteurs (Oct3/4, Sox2, c-Myc et Klf4) suffisait à induire des cellules souches pluripotentes à partir de fibroblastes adultes ou embryonnaires (Takahashi & Yamanaka, 2006). Parallèlement à cela, l'introduction de ces facteurs dans des cellules mammaires immortalisées induit un phénotype de cellules souches tumorales (Nishi et al, 2013).

Mise en évidence des CSC et propriétés

Le modèle stochastique de progression tumorale établi traditionnellement qu'une tumeur peut provenir de la cancérisation de n'importe quelle cellule de l'organisme qui aurait accumulé aléatoirement certaines mutations. D'après ce modèle, les cellules de la tumeur forment un

groupe homogène également tumorigènes, qui possèdent toutes le même potentiel de prolifération, comme représenté sur la figure 17 (Ginestier et al, 2007b; Takebe et al, 2011a).

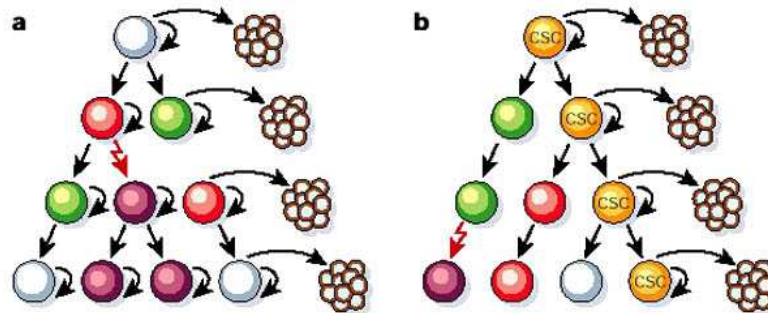


Figure 17 : Modèles stochastique et hiérarchique de prolifération tumorale

(a) *Modèle stochastique* : toutes les cellules de la tumeur possèdent le même potentiel tumorigénique, la progression tumorale est due à des mutations aléatoires qui confèrent à la cellule mutée un avantage prolifératif. (b) *Modèle hiérarchique* : un sous-groupe de cellules tumorales agressives, les « cellules souches cancéreuses » (CSC), possède la capacité de s'autorenouveler et constitue la masse tumorale en proliférant asymétriquement (Reya et al, 2001)

La nécessité de déterminer un nouveau modèle de carcinogenèse a été fondée sur l'observation que seules 0.001% à 1% des cellules leucémiques sont capables de former des colonies *in vitro* ou *in vivo* (Reya et al, 2001). Les cellules souches de leucémie myéloïde aigüe (AML) ont été identifiées dans les années 90, à partir du phénotype des cellules souches hématopoïétiques normales. Ainsi, Bonnet et al. ont démontré que les cellules de leucémie humaine possédant un phénotype $CD34^{++}CD38^{-}$ sont au moins 100 fois plus tumorigéniques que les cellules $CD34^{+}CD38^{+}$ lorsqu'elles sont injectées à des souris NOD/SCID. Les CSC de leucémie possèdent de plus la capacité de se différencier et exprimant différents marqueurs de lignées hématopoïétiques, et leur descendance reproduit l'hétérogénéité du cancer d'origine. Enfin, ces CSC peuvent être passées en souris NOD/SCID, ce qui prouve leur potentiel d'auto-renouvellement illimité. De même que les cellules souches normales, les CSC de leucémie forment une sous-population rare, ainsi les cellules $CD34^{++}CD38^{-}$ représentent environ 0.2% des cellules d'AML (Bonnet & Dick, 1997; Lapidot et al, 1994).

Les propriétés des cellules souches cancéreuses peuvent être généralisées, en comparaison avec les cellules souches normales (CSN). Les deux populations possèdent un potentiel de

prolifération en théorie illimitée, et leur descendance peut posséder le même potentiel ou au contraire se composer de cellules différenciées au potentiel de division limité. Les CSC sont plus tumorigéniques que les autres cellules composant la tumeur, et sont potentiellement à l'origine des métastases. Enfin, il est généralement suggéré que les CSC tout comme les CSN forment une sous-population rare au sein de la tumeur, cela est toutefois sujet à caution (Johnston et al, 2010).

On suppose habituellement que les CSC seraient issues de la transformation cancéreuse des CSN ou de cellules progénitrices. D'une part, ces cellules possèdent des voies moléculaires nécessaires aux CSC déjà activées, en d'autres termes la transformation d'une CSN en CSC nécessite d'accumuler moins de mutations que la transformation d'une cellule différenciée en CSC. D'autre part, la durée de vie d'une CSN et le grand nombre de divisions effectué par ces cellules augmente statistiquement la probabilité d'accumuler des mutations permettant la transformation cancéreuse (Reya et al, 2001; Woodward et al, 2005). Ainsi, on assimile généralement la « cellule d'origine », c'est-à-dire la cellule subissant la première transformation oncogénique à l'origine de la formation d'une tumeur, à une cellule souche cancéreuse. Cette vision linéaire de la progression tumorale est affinée actuellement par des modèles qui distinguent les notions de cellule d'origine et de CSC (Visvader, 2011).

Les principales voies moléculaires communes aux CSN et aux CSC sont les voies permettant l'auto-renouvellement illimité et la différenciation de ces cellules : Notch, Wnt et Hedgehog. Ainsi, la voie Notch joue un rôle dans la régulation des communications cellulaires au cours de l'embryogenèse, la prolifération et la différenciation et l'apoptose, et des inhibiteurs de cette voie sont testés en essais cliniques. La voie de signalisation Hedgehog contrôle la polarité cellulaire et la maintenance des cellules souches au cours du développement de l'embryon. En particulier, dans les leucémies et le cancer du sein, le répresseur de transcription Bmi-1 en aval de la voie Sonic-Hedgehog contrôlerait la maintenance des CSC. Enfin, dans les tissus adultes, la voie de signalisation Wnt- β catenin joue un rôle dans la régulation de l'auto-renouvellement cellulaire et une activité dérégulée de Wnt a été associée à l'activité des CSC (Takebe et al, 2011a). Une dérégulation concomitante et coordonnée de ces voies et d'autres acteurs moléculaires pourrait jouer un rôle dans le maintien des propriétés des CSC.

2° CSCs des tumeurs solides, controversé et cas du cancer du sein

D'abord mises en évidence dans les tumeurs liquides, les CSC ont par la suite été recherchées dans les tumeurs solides, qui sont comme les leucémies constituées d'un mélange hétérogène de cellules ne possédant pas toutes les mêmes capacités clonogéniques. Des CSC ont été mises en évidence dans de nombreux tissus cancéreux solides : sein, glioblastome, poumon, prostate, côlon... Dans ces tissus, les propriétés supposées des CSC restent les mêmes : capacité de prolifération illimitée et d'auto-renouvellement, de différenciation, tumorigénicité accrue par rapport au reste de la tumeur (Al-Hajj & Clarke, 2004). Les CSC des tumeurs solides ont la particularité de proliférer au sein d'une niche tumorale, et de pouvoir être influencées par leur microenvironnement (Casarsa et al, 2008; Vermeulen et al, 2012). Leur étude *in vitro* est donc rendue complexe par le fait que leur comportement peut être modifié par l'absence de niche tumorale. Le test de référence pour identifier les CSC des tumeurs solides reste la transplantation en série de cellules triées dans des souris immunodéprimées, ce qui permet de créer un microenvironnement qui reste malgré tout très artificiel. Ainsi, *in vivo*, les CSC forment des tumeurs hétérogènes et sont capables en théorie de s'auto-renouveler de manière illimitée. Un second test couramment utilisé, cette fois-ci *in vitro*, repose sur la capacité de ces cellules à pousser sans support d'adhésion, formant ainsi des « sphères » : mammosphères pour les cellules de sein, et neurosphères pour les cellules de glioblastome (Grotenhuis et al, 2012; Kai et al, 2009).

Limites du modèle des CSC

L'existence de CSC de tumeurs solides a tout d'abord été démontrée dans les cancers du sein, et de manière concomitante dans les tumeurs pédiatriques d'origine neuronale. Actuellement, on suspecte l'existence de CSC dans la plupart des tumeurs solides, la difficulté principale restant toutefois de caractériser ces CSC par des marqueurs appropriés (Visvader & Lindeman, 2008). Je reviendrai par la suite sur les efforts de caractérisation des CSC du sein, et sur la controverse subsistant à propos de ces marqueurs.

Le modèle hiérarchique de progression tumorale, intégrant l'hypothèse des CSC et en opposition au modèle stochastique cité précédemment, suppose que des CSC se divisent en donnant des CSC et des cellules progénitrices, qui elles-mêmes se différencient en cellules matures peu proliférantes formant la masse tumorale et possédant une durée de vie limitée. Certains auteurs remettent en cause ce modèle rigide de progression tumorale, mettant en avant le fait que les CSC des tumeurs solides caractérisées *in vitro* ont échoué jusqu'alors à

prédire l'issue clinique des cancers. Une seconde observation qui permet de remettre en cause l'hypothèse des CSC est le fait que la proportion de CSC est très variable d'une tumeur à l'autre et peut être importante. Ainsi dans le mélanome il a été démontré qu'une cellule sur 4 posséderait des propriétés de CSC, or il est généralement admis que les cellules souches, a fortiori les cellules souches cancéreuses des tumeurs solides doivent former une sous population rare au sein de la tumeur (Vermeulen et al, 2012). De plus, la proportion des CSC dans les tumeurs dépend souvent du modèle expérimental utilisé (Grotenhuis et al, 2012). Enfin, une accumulation de travaux tend à démontrer que des cellules qualifiées de non-CSC pourraient en se divisant être converties en CSC, suggérant une plasticité plus importante que celle décrite par le modèle initial (Chaffer et al, 2011; Marjanovic et al, 2013). L'existence et la caractérisation des CSC est donc toujours sujet à controverse, et il est désormais admis que la théorie des CSC initiale doit être redéfinie et assouplie pour mieux corrélérer les données de laboratoire aux observations cliniques.

Enjeu dans la prise en charge des tumeurs solides

Dans la théorie, les CSC sont un outil idéal pour affiner le pronostic des tumeurs solides. Ainsi une tumeur présentant un pourcentage important de CSC serait à priori de mauvais pronostic. On se rend compte toutefois que plus de 10 ans après les débuts des travaux sur les CSC, cette théorie n'a toujours pas été intégrée aux études cliniques et reste sujet à controverse. D'après Patsialou et al., les tentatives d'établissement d'une signature pronostic des cancers du sein ne tiennent pas suffisamment compte de l'hétérogénéité cellulaire au sein des tumeurs (Patsialou et al, 2012). En isolant *in vivo* des cellules cancéreuses invasives, ces auteurs ont établi une « signature d'invasion humaine », et montré que cette signature est prédictive du risque d'apparition de métastases. Sans citer la théorie des CSC, ces auteurs empruntent toutefois une démarche qui pourrait faciliter l'intégration de la théorie des CSC aux études cliniques.

D'autre part, un des principaux enjeux de l'étude des CSC du sein est de comprendre l'origine des récurrences tumorales après traitement. Ainsi les CSC, bien que possédant le même patrimoine génétique que les cellules non souche, semblent caractérisées par une résistance accrue aux traitements de chimiothérapie et radiothérapie. La survie de cette fraction cellulaire occasionnerait alors une repousse de la tumeur, survenant après une première période de rémission due à la fonte initiale de la tumeur. Le ciblage des CSC en combinaison avec une thérapie globale serait alors une approche thérapeutique efficace (figure 18), bien que compliquée à mettre en œuvre, puisque comme vu précédemment les voies moléculaires

spécifiques des CSC sont généralement aussi celles activées dans les cellules souches normales et les drogues inhibant ces voies peuvent donc présenter une forte toxicité. Une seconde possibilité est le ciblage des marqueurs des CSC, la difficulté principale de cette approche étant de déterminer précisément ces marqueurs. Enfin, un troisième axe thérapeutique peut consister à induire la différenciation des CSC en cellules non souches, ce qui permettrait leur éradication grâce aux traitements couramment utilisés (Grotenhuis et al, 2012; Yu et al, 2012).

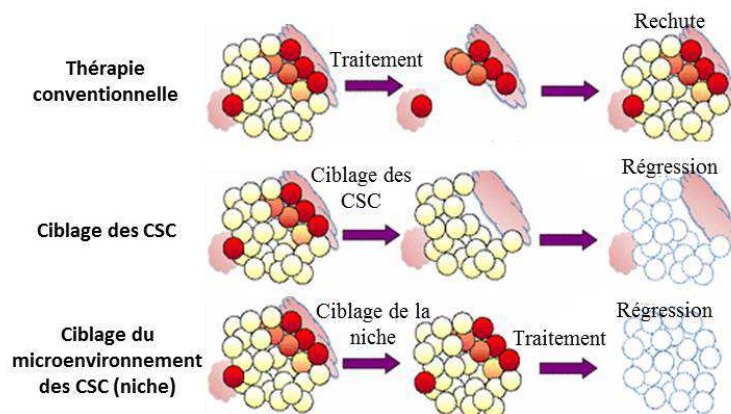


Figure 18 : Intégration de la théorie des CSC dans le traitement des tumeurs solides

Les traitements conventionnels, en permettant la survie des CSC, peuvent mener à des rechutes tumorales. L'intégration de la théorie des CSC dans la recherche de nouveaux traitements permettrait d'éliminer les facteurs nécessaires à la survie de cette sous-population. Les CSC sont représentées en rouge et les non CSC en blanc. (Adapté de Kai et al., 2009)

Vermeulen et al. suggèrent que les essais cliniques tels qu'ils sont menés actuellement ne permettent pas d'observer les effets d'une drogue sur les CSC (Vermeulen et al, 2012). En effet le critère RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors) utilisé pour évaluer l'efficacité d'une drogue en essai clinique de phase II tient compte principalement de la fonte tumorale, or on peut imaginer que des drogues ciblant uniquement une petite sous-population de CSC n'auront pas une grande incidence sur la taille de la tumeur à court ou moyen terme, mais en revanche auront des effets bénéfiques à long terme en supprimant les cellules responsable de l'auto-renouvellement de cette tumeur. Les essais cliniques intégrant des drogues dirigées contre les CSC devront donc tenir compte du mode d'action de ces drogues,

et de nouveaux critères d'efficacité devront être établis. Ces critères pourront ainsi être basés sur la présence de marqueurs cellulaires de CSC dans les biopsies, éventuellement de biomarqueurs sécrétés par les CSC, sur la capacité clonogénique des cellules tumorales ou encore sur le phénotype des cellules tumorales circulantes.

4° Lien entre CSC et transition épithéliale-mésenchymateuse

Acteurs de la transition épithéliale-mésenchymateuse

La transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT) et la transition mésenchymateuse-épithéliale (MET) sont des processus clés du développement embryonnaire. Au cours de l'EMT, les cellules perdent leurs caractéristiques épithéliales telles que l'adhésion cellulaire et la polarité basale/apicale et acquièrent des caractéristiques mésenchymateuses comme la mobilité, la résistance à l'apoptose et des capacités d'invasion. De nombreuses observations permettent de penser que les processus d'EMT et MET conduisent la progression tumorale. Ainsi, l'EMT serait à l'œuvre dans l'acquisition par la tumeur primaire de propriétés circulantes, tandis que la MET permettrait l'adhésion des cellules circulantes au site métastatique (Tsai et al, 2012). Dans la tumeur primaire, différents signaux moléculaires sont à l'origine de l'EMT. Les cytokines de la famille du TGF- β sont les inducteurs d'EMT les plus connus et les mieux caractérisés. Cette voie de signalisation passe par l'activation des facteurs de transcription SMAD et le déclenchement d'un programme cellulaire complexe (Pardali & Moustakas, 2007). D'autres voies induisent le processus d'EMT, parmi lesquelles les voies dites « embryonnaires » Wnt/ β catenin, Notch et Hedgehog (figure 19).

Le processus d'EMT est orchestré par différents facteurs de transcriptions : Snail1, Slug/Snail2, Zeb1, Sip1/Zeb2, Twist1 et Twist2. Ces facteurs sont à l'origine des changements phénotypiques observés : délocalisation des cadhérines, occludines, claudines et desmoplakines, induction de la N-Cadherine, la Vimentine, la Fibronectine entre autres, dont les conséquences sont une augmentation de la motilité des cellules qui, détachées de la matrice extra-cellulaire, passent d'une forme cuboïdale à une forme allongée (Hugo et al, 2007; Polyak & Weinberg, 2009).

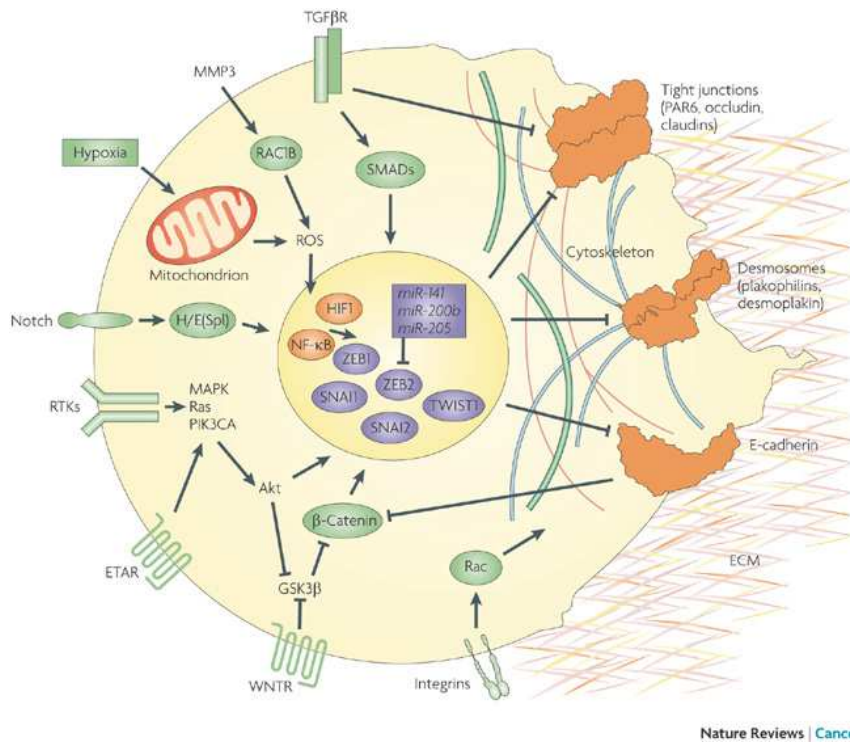


Figure 19 : Représentation simplifiée des voies moléculaires régulant la transition épithélio-mésenchymateuse

(Polyak et al., 2009)

La transition épithélio-mésenchymateuse, génératrice de CSC ?

Nous savons que la transition épithélio-mésenchymateuse est un des moteurs de la progression tumorale et du processus métastatique. De plus, la théorie des CSC place ces cellules à l'origine de la formation des tumeurs. Alors, quels sont les arguments en faveur d'un lien entre ces deux phénomènes dans la cancérogenèse?

Comme nous le verrons par la suite, les CSC mammaires sont définies par différents phénotypes dans la littérature, parmi lesquels le marquage de surface CD24⁻/CD44⁺ (voir partie II-B). La plupart des études montrant un lien entre CSC et EMT sont basées sur le phénotype de CSC CD24⁻/CD44⁺. Il a été montré que les voies du développement embryonnaires Wnt/βcatenin, Notch et Hedgehog induisant l'EMT sont également dérégulées dans les CSC, ces deux phénotypes étant plutôt associés aux sous-types cancéreux basal-like/basal B et/ou claudin-low/basal B (Blick et al, 2010; May et al, 2011). Une des premières études suggérant un lien entre CSC de type CD24⁻/CD44⁺ et l'EMT a été publiée par Shipitsin et al., qui ont montré une surexpression des gènes de la voie du TGF-β (TGF-β1, TGF-β2) dans les cellules CD44⁺ de cancer du sein, en comparaison avec les cellules CD44⁻/CD24⁺

(Shipitsin et al, 2007). Le lien direct entre les CSC et l'EMT a été fait ensuite d'une part par Mani et al. (Mani et al, 2008), qui ont observé les similitudes entre le processus métastatique et les mécanismes de réparation tissulaire, qui nécessitent la mise en circulation de cellules souches adultes. Ainsi, lorsque l'EMT est induite dans des cellules de sein humaines immortalisées (HMLE) par surexpression de Twist1, Snail ou exposition au TGF- β , on observe une induction dans les cellules du phénotype de CSC CD24⁻/CD44⁺. Ces CSC possèdent en outre une capacité accrue à former des mammosphères et la capacité à effectuer des divisions asymétriques. Ce phénotype est maintenu dans la descendance des cellules induites, ce qui suppose l'établissement d'un motif épigénétique particulier au cours de l'EMT. Parallèlement à ces travaux, Morel et al. ont montré que la transfection de cellules épithéliales mammaires (HMLE) initialement CD44^{faible}/CD24⁺ par H-Ras et le traitement concomitant par TGF- β 1 conduisent à une induction dans ces cellules du phénotype CD44⁺/CD24⁻ (Morel et al, 2008). Les cellules deviennent mésenchymateuses, contrairement aux cellules CD44^{faible}/CD24⁺ qui restent épithéliales. L'EMT est mise en évidence par la baisse de marqueurs épithéliaux (E-cadherine, β -caténine) et la hausse de marqueurs mésenchymateux (vimentine, fibronectine). En reprenant ce modèle, l'étude de Hollier et al. suggère un rôle décisif du facteur de transcription FOXC2 dans l'établissement conjoint de l'EMT et du phénotype de CSC (Hollier et al, 2013). De manière intéressante, FOXC2 serait de plus impliqué dans l'établissement du phénotype claudin^{low}/basal B des tumeurs mammaires.

Ces études reposent sur la transformation *in vitro* de cellules épithéliales immortalisées. Qu'en est-il de la transformation de lignées de cancer du sein ? Fang et al. ont surexprimé Twist2 dans les lignées mammaires MCF10A et MCF7 et ont observé une EMT concomitante avec une induction du phénotype CD24⁻/CD44⁺, une motilité accrue *in vitro*, et un accroissement de la tumorigénicité *in vivo* (Fang et al, 2011). De plus, Twist2 agirait directement ou indirectement sur le promoteur de la E-cadherine, exerçant par là une activité répressive sur cette protéine. Une surexpression du facteur Twist1 dans ces mêmes cellules induit la répression transcriptionnelle de CD24, la sélection des phénotypes CD24⁻/CD44⁺ et ALDH⁺, augmente l'exclusion du Hoechst 33342 en induisant la pompe ABCC1, et accroît la tumorigénicité des cellules *in vivo* (Vesuna et al, 2009). Plus généralement, les acteurs de l'EMT Twist, Zeb et Snail joueraient un rôle dans la modulation des facteurs de cellules souches tels que Bmi1, Sox2, Sox9 et Klf4 (Ansieau, 2012). Ces différentes études montrent l'existence d'un lien entre l'EMT et l'établissement du phénotype de CSC dans des types cellulaires peu transformés.

Finally, it is interesting to note that the work recently published by Ocana et al. se démarque des articles présentés ici (Ocana et al, 2012). Ces auteurs proposent l'existence d'un nouvel inducteur d'EMT, PRRX1, qui contrairement aux inducteurs couramment cités (Snail, Twist, Zeb), supprime le phénotype de CSC CD24⁻/CD44⁺ dans les cellules circulantes. De plus, la formation de métastases requiert la suppression de PRRX1, ce qui permet l'acquisition d'un phénotype CD24⁻/CD44⁺ par les cellules métastatiques. Enfin, les auteurs montrent que l'expression de PRRX1 est un facteur de bon pronostic.

Ces différents travaux montrent donc le parallélisme étroit existant entre les voies de signalisation de l'EMT et les voies des CSC dans la cancérogenèse. Qu'en est-il de l'acquisition par la tumeur primaire de propriétés métastatiques ?

CSC, EMT et processus métastatique

Les métastases reproduisant l'hétérogénéité de la tumeur primaire à partir d'une unique cellule circulante, il a été suggéré que les CSC sont à l'origine du processus métastatique (Visvader & Lindeman, 2008). Ainsi, les lignées cellulaires mammaires dérivées de métastases sont enrichies en marqueurs de CSC. De plus, de travaux ont montré que les cellules CD24⁻/CD44⁺ de cancer du sein surexpriment des gènes impliqués dans le processus métastatique. Les proportions dans la tumeur de cellules CD24⁻/CD44⁺ et de cellules surexprimant ALDH1 seraient corrélées négativement au pronostic clinique de survie sans métastase (voir partie marqueurs de CSC) (Hayashida et al, 2011). D'autre part, il est communément admis que les cellules métastatiques sont celles qui ont effectué une transition épithéliale-mésenchymateuse et perdu à cette occasion leurs propriétés d'adhésion à la tumeur primaire. Ces cellules circulantes, en effectuant une transition mésenchymateuse-épithéliale, seraient capable de se fixer dans un site différent de la tumeur primaire pour former des métastases.

Dans une étude réalisée sur 226 échantillons prélevés chez 39 patients traités pour un cancer du sein métastatique, Aktas et al. ont montré une surexpression des marqueurs d'EMT (Twist, Akt2, PI3K α) et/ou de ALDH1 dans la tumeur primaire des patients présentant également des cellules tumorales circulantes. Ces patients sont ceux qui présentent la plus faible réponse aux traitements (Aktas et al, 2009). Dans une seconde étude portant sur une cohorte plus étendue de 502 patients, les auteurs concluent à l'importance de développer des méthodes plus sensibles pour détecter ces mêmes marqueurs d'EMT et de CSC directement dans les cellules circulantes ou dans les cellules tumorales de la moelle osseuse (Kasimir-Bauer et al, 2012). D'après ces observations, on peut supposer que le processus d'EMT, par la génération de

cellules mobiles et aux caractéristiques de CSC, serait à l'origine des métastases. Toutefois il est important de noter que l'on manque actuellement de preuves directes faisant le lien entre ces phénomènes (Grotenhuis et al, 2012). Plusieurs facteurs peuvent expliquer ce retard. D'une part, le processus d'EMT pourrait être seulement en partie responsable du processus métastatique et n'impliquer qu'une fraction des cellules tumorales. De plus, les cellules tumorales ayant subi une EMT ressemblent phénotypiquement aux cellules stromales mésenchymateuses, ce qui rend leur détection et leur analyse difficile. Enfin, les cellules métastatiques ont a priori subi une transition MET, qui aura gommé au moins partiellement les preuves visibles d'EMT (Blick et al, 2010). Max S. Wicha suggère en revenant sur la « signature d'invasion humaine » décrite précédemment (Patsialou et al, 2012) que les signatures des CSC pourraient être différentes selon la position des cellules tumorales dans le processus d'EMT (Wicha, 2012). En outre, les travaux d'Ocana et al. montrent que le lien entre EMT et CSC n'est pas clairement établi, et que contrairement à l'EMT, c'est bien l'acquisition par les cellules d'un phénotype de souche lié au processus de MET qui induit la rechute métastatique (Ocana et al, 2012).

Comprendre et mettre en évidence le lien entre EMT et CSC à un objectif double. D'une part, le ciblage thérapeutique des voies embryonnaires Wnt/ β -catenin, Hedgehog et Notch devrait permettre d'atteindre des tumeurs composées de cellules mésenchymateuses aux caractéristiques de cellules souches. D'autre part, cibler les tumeurs possédant des caractéristiques combinées de mobilité et d'agressivité servirait à traiter les patients qui peuvent tirer un bénéfice de ce type de thérapies. (Takebe et al, 2011b). En revanche, les traitements de la tumeur primaire ciblant spécifiquement les CSC risquent d'avoir des effets indésirables, en induisant l'EMT et le processus métastatique sous la pression de sélection (Ansieau, 2012).

B- Marqueurs des CSCs du sein

L'intégration de la théorie des CSC dans les stratégies thérapeutiques nécessite de pouvoir identifier ces sous-populations. Cette identification est rendue compliquée par la grande hétérogénéité de phénotypes et de profils génétiques des CSC, selon le tissu considéré mais également pour un même organe (Morrison et al, 2011; Visvader & Lindeman, 2008) (figure 20). Dans ce chapitre je présenterai les différents marqueurs de CSC du sein proposés dans la littérature, et leurs propriétés.

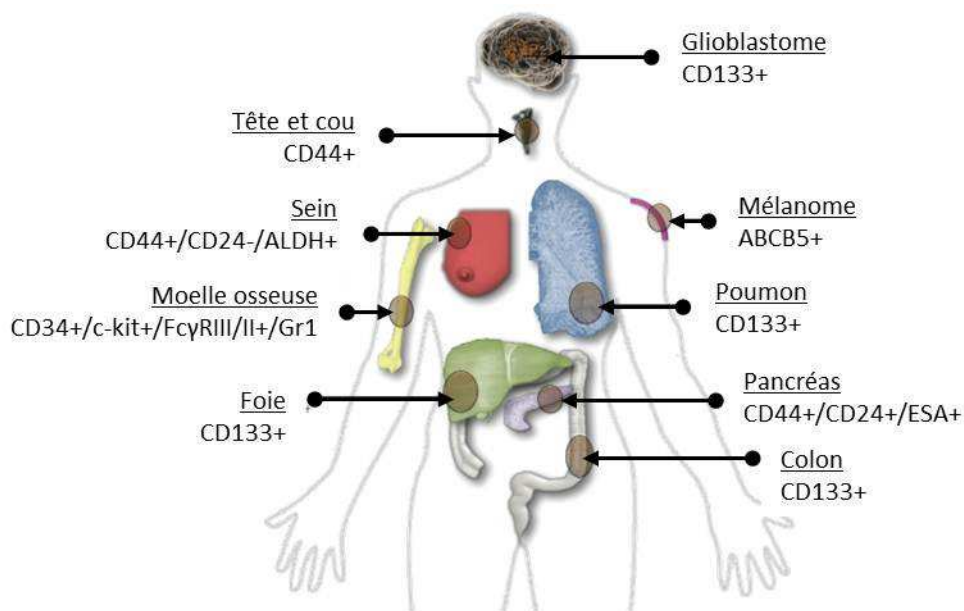


Figure 20 : Principaux marqueurs de CSC identifiés, en fonction de l'organe considéré

(Adapté de Morrison et al., 2011)

1° SP : marqueur de cellules souches normales et cancéreuses

Un certain nombre de travaux sur les cellules souches cancéreuses reposent sur l'identification d'une « Side Population » (SP) au sein de la population tumorale. Dans un premier temps, cette technique a été utilisée pour isoler les cellules souches normales par Goodell et al. en 1996 (figure 21) (Goodell et al, 1996). En cherchant à identifier des cellules souches hématopoïétiques en cours de division cellulaire, à l'aide de l'intercalant de l'ADN

Hoechst 33342, ces auteurs ont montré qu'une petite proportion de cellules détectable en cytométrie en flux possède la capacité d'exclure le Hoechst 33342 -toxique par ailleurs- à l'aide, notamment, des pompes membranaires ABCG2 et MDR1.

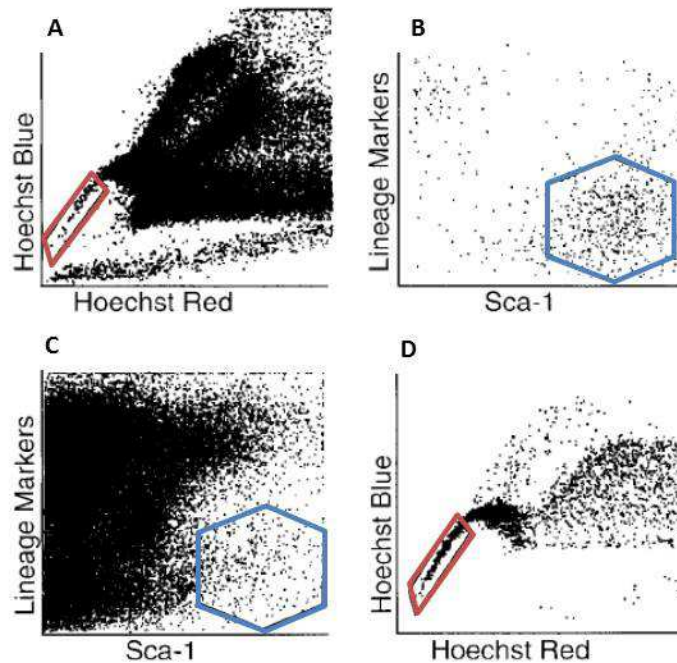


Figure 21 : Caractérisation de la population SP dans la moelle osseuse murine

(A) Moelle osseuse totale : La région SP (encadré rouge) représente 0,1% de la population (B) Expression du marqueur Sca-1 dans la population SP : 75% des cellules SP sont Sca-1+ (encadré bleu) (C) Moelle osseuse totale : les cellules Sca-1+ (encadré bleu) représentent 1% de la population cellulaire (D) Fraction SP au sein des cellules Sca-1+ : 10% des cellules Sca-1+ font partie de la fraction SP (encadré rouge) (Goodell et al., 1996)

Cette fraction cellulaire nommée SP présente en outre les marquages de cellules souches hématopoïétiques $Sca1^{+}lin^{neg/low}$ et des capacités d'autorenouveau lorsqu'elles sont injectées à des souris C57B1/6. La fraction SP a également été mise en évidence dans d'autres tissus. Dans l'épithélium mammaire normal, la fraction SP est composée de cellules relativement indifférenciées, capables de former des structures mammaires différenciées canalaire et lobulaire lorsqu'elles sont transplantées *in vivo* (Alvi et al, 2003). Par la suite, il a été suggéré que la sous population SP pourrait permettre d'identifier et d'isoler les CSC. Dans le neuroblastome, la population SP est constituée de cellules exprimant des facteurs de souches, capables de se diviser en cellules SP et non-SP, et présentant des capacités d'auto-

renouvellement. De manière intéressante, les cellules de la fraction SP sur-expriment les pompes à efflux ABCB1 (MDR1) et ABCG2, connues pour leur implication dans la chimio-résistance des tumeurs (Hirschmann-Jax et al, 2004). Dans les lignées cancéreuses mammaires, différentes études ont démontré l'existence d'une fraction SP plus ou moins étendue selon la lignée étudiée. Les cellules SP des lignées sont ainsi plus tumorigéniques que celles de la fraction non-SP lorsqu'elles sont injectées à des souris NOD/SCID et Nude (Han & Crowe, 2009), et elles surexpriment notamment la pompe à efflux ABCG2 (Patrawala et al, 2005) ainsi que l'antigène tumoral MUC1 (Christgen et al, 2007; Engelmann et al, 2008). La première étude décrivant des cellules SP dans des tumeurs mammaires primaires a été menée en 2010 par Nakanishi et al., qui ont également mis en évidence une corrélation entre la fraction SP et le sous type luminal, ainsi qu'un rôle de la voie HER2/AKT dans l'expansion de ces cellules (Nakanishi et al, 2010). Britton et al. ont, quant à eux, analysé des cellules de cancer du sein prélevées par biopsies et démontré une corrélation entre la fraction SP et le sous type ER-/triple négatif, ce qui est en opposition avec l'étude de Nakanishi et al. (Britton et al, 2012).

L'utilisation de la fraction SP pour étudier les CSC présente l'avantage d'être commune à tous les types de cancers, contrairement aux marqueurs de surface qui diffèrent selon les organes. Toutefois les études décrites ici mettent en avant les limites de ce type de marquage. Ainsi, d'une part, la fraction SP ne contiendrait pas uniquement des CSC mais serait seulement enrichie en CSC. Le marquage SP étant basé sur la capacité des cellules à rejeter la drogue toxique Hoechst 33342, la comparaison des cellules SP avec les cellules non SP qui, elles, contiennent la drogue, est forcément biaisée. Ainsi les cellules non SP, dont la viabilité est altérée par la présence du Hoechst 33342, ne peuvent pas être comparées aux cellules SP non altérées (Hadnagy et al, 2006). C'est ce que démontre l'étude de Christgen et al, qui présente une liste de gènes dérégulés par la présence du Hoechst 33342 dans la cellule parmi lesquels le gène Sox17, cible de la voie Wnt/ β -catenin (Christgen et al, 2009). Si l'utilisation du Hoechst 33342 entrave l'étude de la fraction SP, pourrait-on isoler ces cellules en se basant uniquement sur la surexpression de la pompe ABCG2 ? D'après différentes études, l'expression de la pompe ABCG2 ne serait que moyennement corrélée à la présence d'une fraction SP, et ne serait pas corrélée à la tumorigénicité des cellules, ce qui n'en fait pas un marqueur de CSC (Britton et al, 2012; Patrawala et al, 2005). Finalement, ces travaux démontrent les limites de l'étude de la fraction SP en tant que marqueur de CSC, et la nécessité d'utiliser d'autres marqueurs, éventuellement en complément de celui-ci.

2° Marquage CD24⁻/CD44⁺

Les marqueurs de surface CD24 et CD44 sont utilisés couramment depuis une dizaine d'années pour identifier les CSC dans différentes tumeurs solides, notamment dans les cancers du sein et du pancréas. La fiabilité et les certitudes quant à ces marqueurs dépend largement du type de tumeur étudiée (Jaggupilli & Elkord, 2012). Je détaillerai dans cette partie les travaux liés à la découverte de ces marqueurs dans le sein, et aux études moléculaires visant à leur associer des voies de signalisation. Mes travaux de thèse étant essentiellement associés au marqueur CD24, je me concentrerai plus particulièrement sur ce dernier.

Propriétés des cellules CD24⁻/CD44⁺ dans les cancers du sein

Parallèlement à l'étude des cellules SP, mammaires les efforts de caractérisation des CSC se sont concentrés sur l'étude de protéines membranaires inspirées des marqueurs de différenciation des cellules souches hématopoïétiques. En particulier, la corrélation faite entre l'agressivité de cellules tumorales mammaires et l'absence de la protéine CD24 date d'une étude de comparaison génomique entre différentes lignées, publiée par Schindelman et al. en 2002 (Schindelman et al, 2002). En 2003, Al-Hajj et al. ont appliqué pour la première fois le concept de cellules souches cancéreuses au cancer du sein (Al-Hajj et al, 2003). Leur travail montre l'existence dans les cancers du sein d'une sous population de cellules possédant des propriétés tumorigéniques accrues par rapport au reste de la tumeur, capables de se différencier et de s'auto-renouveler. Ainsi, 200 cellules de type CD24⁻/CD44⁺/Lin⁻/ESA⁺ triées à partir de tumeurs humaines suffisent à induire des tumeurs en souris NOD/SCID, ce qui rend cette population 50 fois plus tumorigénique que la tumeur dans son ensemble. Les auteurs ont également montré que les tumeurs issues de ces cellules CD24⁻/CD44⁺/Lin⁻/ESA⁺ peuvent être passées en série en souris NOD/SCID et reconstituent l'hétérogénéité de la tumeur d'origine, ce qui confère à ces cellules des caractéristiques de cellules souches cancéreuses. Les propriétés de CSC des cellules CD24⁻/CD44⁺ ont été confirmées par la suite, et des études ont montré la possibilité de les enrichir *in vitro*. En effet, leur faible nombre dans les tumeurs humaines est un facteur limitant pour le développement de thérapies ciblées. Ainsi, la culture de tumeurs humaines sous forme de mammosphères *in vitro* permet de conserver à long terme une forte proportion de cellules CD24⁻/CD44⁺ présentant des caractères de CSC comme la capacité à induire des tumeurs, l'expression de facteurs angiogéniques, la surexpression de oct-4, etc. (Ponti et al, 2005). De plus, les lignées

cellulaires de cancers du sein contiennent une proportion variable de cellules CD24⁻/CD44⁺ qui est maintenue au cours du temps et qui permet de classer les lignées selon leur sous type histologique, les lignées contenant une forte proportion de cellules CD24⁻/CD44⁺ étant plutôt de type basal-like/mésenchymateux (Fillmore & Kuperwasser, 2008; Sheridan et al, 2006). De même que pour les cultures primaires, les cellules CD24⁻/CD44⁺/ESA⁺ des lignées cellulaires forment des tumeurs hétérogènes lorsqu'elles sont injectées en très faible nombre à des souris NOD/SCID, celles-ci sont enrichies dans les cultures de mammosphères et leur vitesse de prolifération est réduite par rapport aux cellules CD24⁺/CD44⁻ (Fillmore & Kuperwasser, 2008).

Il est intéressant de noter certaines restrictions quant à l'utilisation du phénotype CD24⁻/CD44⁺ dans l'étude des CSC. D'une part, il semble que le pourcentage de cellules CD24⁻/CD44⁺ dans une lignée cellulaire ne soit pas directement corrélé avec la tumorigénicité globale de la lignée, tandis que le tri de cellules CD24⁻/CD44⁺/ESA⁺ permet d'accroître le potentiel tumorigénique des cellules par rapport au tri de cellules CD24⁻/CD44⁺ uniquement. La protéine ESA est exprimée par les cellules épithéliales, et semble jouer un rôle dans le phénotype des CSC (Fillmore & Kuperwasser, 2008). D'autre part, dans un modèle de souris Nude, le phénotype CD24⁻/CD44⁺ permet d'isoler à partir de lignées des cellules possédant un fort pouvoir tumorigénique, mais pas de prédire la capacité de ces cellules à former des métastases pulmonaires (Sheridan et al, 2006). Ces différents travaux suggèrent que les cellules CD24⁻/CD44⁺ présenteraient une agressivité accrue, mais que la caractérisation des CSC de sein telles qu'elles ont été décrites en théorie nécessiterait l'ajout d'autres marqueurs à ce phénotype (Jaggupilli & Elkord, 2012). Enfin il a été montré que des cellules CD24⁺/CD44⁺ issues de lignées cellulaires peuvent donner une descendance de type CD24⁻/CD44⁺ *in vitro*, ce qui suggère une plasticité entre ces phénotypes plus importante que celle suggérée par la théorie des CSC (Meyer et al, 2009). Toutefois et malgré ces restrictions, le marquage CD24⁻/CD44⁺, couplé ou non au phénotype ESA⁺, est le plus couramment utilisé dans la littérature pour étudier les CSC mammaires.

Profils génétiques et moléculaires des cellules CD24⁻/CD44⁺

La sous population cellulaire CD24⁻/CD44⁺ possédant des caractéristiques de CSC, la recherche de voies moléculaires impliquées dans le maintien de ce phénotype permettrait d'envisager de nouveaux traitements. En 2007, Shipitsin et al. ont publié une étude mettant en évidence des différences de profils moléculaires entre les cellules CD24⁻/CD44⁺ et CD24⁺/CD44⁻ de tissu de sein normal et cancéreux (Shipitsin et al, 2007). Ce travail a montré

dans les cellules CD24⁻/CD44⁺ cancéreuses l'expression différentielle de gènes impliqués dans la motilité et l'invasion, l'angiogenèse, l'apoptose, le remodelage de la matrice extracellulaire. Notamment, l'étude montre une activation de la voie du TGF- β dans les cellules CD24⁻/CD44⁺, suggérant un lien entre les cellules souches cancéreuses et la transition épithéliale-mésenchymateuse, et la possibilité de développer des thérapies ciblant les acteurs de cette voie. Il est intéressant de noter que ces auteurs ne concluent pas quant à la validité de la théorie des cellules souches cancéreuses, mais s'interrogent au contraire sur la possibilité d'une évolution clonale des sous populations CD24⁻/CD44⁺ et CD24⁺/CD44⁻, leurs profils génétiques et moléculaires étant très distincts. Une autre étude de profils génétiques et moléculaires datant de 2009 confirme l'activation de la voie du TGF- β dans les cellules CD24⁻/CD44⁺ de lignées cancéreuses mammaires, et met en évidence une activation de la voie RAS, et des voies de réponse au TNF et à l'Interféron. Cette étude démontre de plus une activation dans les CSC du facteur de transcription NF κ B, impliqué notamment dans la réponse à l'inflammation, l'angiogenèse, l'inhibition de l'apoptose et la tumorigenèse, et suggère un ciblage thérapeutique de cette molécule (Murohashi et al, 2009).

Récemment, Marotta et al. ont mis en œuvre une stratégie particulière pour la recherche de cibles thérapeutiques. En partant du postulat que les voies de signalisation suractivées dans une sous population cellulaire sont nécessaires à la survie de cette population, les auteurs ont réalisé un screening de shRNA sur des lignées cancéreuses mammaires triées, et ont identifié les gènes dont l'expression est indispensable à la viabilité des CSC de type CD24⁻/CD44⁺. Cette étude conclut à l'importance de la voie de signalisation IL6/JAK2/STAT3 dans la survie et la prolifération des CSC in vitro, et démontre de plus l'activation de Stat3 par immunofluorescence dans les cellules de type CD24⁻/CD44⁺ de tumeurs primaires humaines (Marotta et al, 2011). La dérégulation de la voie Jak-STAT dans les CSC de type CD24⁻/CD44⁺ est confirmée par Hernandez-Vargas et al.. Ainsi, leur étude montre une déméthylation des gènes de la voie Jak-STAT dans des lignées cellulaires enrichies en cellules CD24⁻/CD44⁺, associées à une activation de la transcription des gènes IL6/JAK3/STAT3 (Hernandez-Vargas et al, 2011).

Plus généralement, la recherche de voies moléculaires dérégulées dans les CSC de type CD24⁻/CD44⁺ s'inspire de la connaissance des cellules souches normales, et en particulier de voies permettant l'auto-renouvellement des cellules souches, connues depuis longtemps pour leur rôle dans la tumorigenèse mammaire : Notch, Wnt et Hedgehog (Harrison et al, 2010a; Harrison et al, 2010b; Liu & Wicha, 2010; Tanaka et al, 2009). Des agents thérapeutiques ciblant ces voies sont actuellement en cours d'essais cliniques (figure 22).

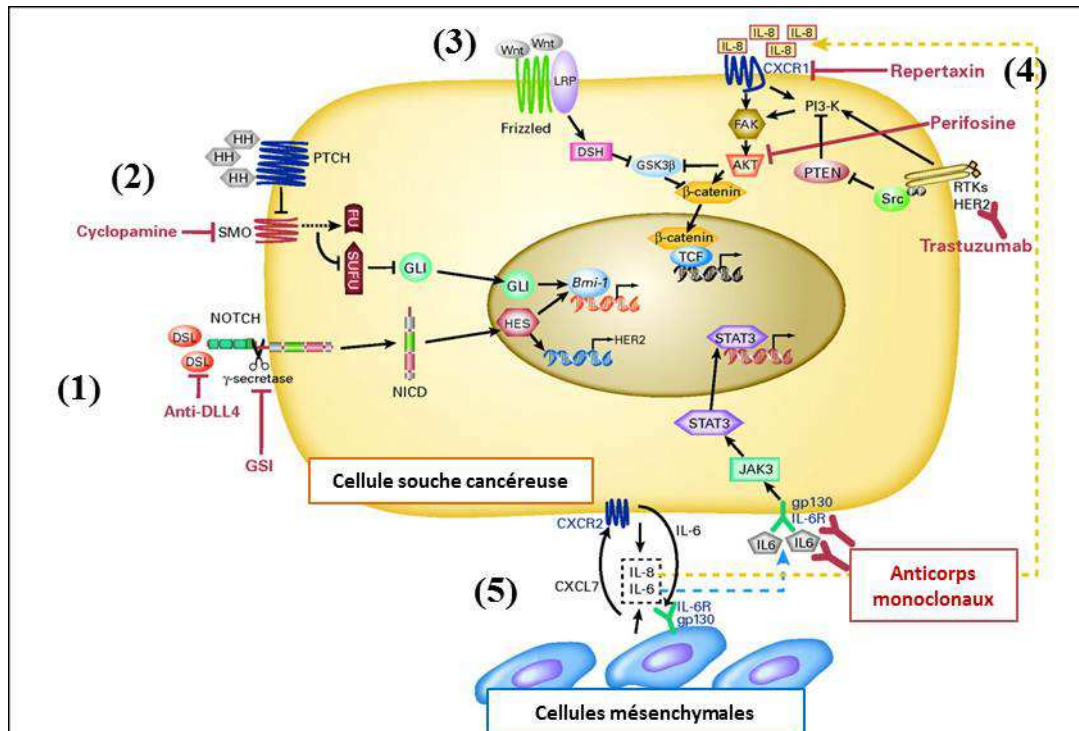


Figure 22 : Ciblage thérapeutique des voies de signalisation des CSC

Représentation schématique des voies de signalisation clés activées dans les CSC, ainsi que des cibles et des agents thérapeutiques (en rouge). Ces voies incluent les voies Notch (1), Hedgehog (2), Wnt (3), Her2/Akt (4), et des cytokines dont Il-6 et Il-8 (5) (Adapté de Liu et al., 2010)

Implication et rôle de CD24/CD44 dans les cancers du sein

En complément d'une recherche globale de voies de signalisation, une connaissance précise du rôle des protéines CD24 et CD44 aiderait au ciblage thérapeutique direct des CSC. La molécule CD44 est une glycoprotéine transmembranaire d'adhésion. Son extinction dans des cultures primaires de cancers du sein provoque une réduction de la transcription de gènes impliqués dans les voies de signalisation Wnt et Hedgehog, une réduction de la prolifération cellulaire et une baisse du potentiel tumorigénique. CD44 serait impliqué dans le maintien d'un phénotype indifférencié dans les CSC, dans la migration et l'invasion (Louderbough & Schroeder, 2011; Pham et al, 2011). Je me focaliserai ici sur le rôle de CD24, et sur les études visant à modifier son expression *in vitro*. Les CSC étant négatives pour CD24, leur ciblage direct est impossible et une meilleure connaissance des voies moléculaires directement associées à cette protéine est nécessaire pour la détermination de nouvelles cibles.

CD24 est une petite protéine glycosylée de 27 acides aminés, liée à la membrane par une ancre de glycosylphosphatidylinositol, ou ancre GPI. Elle est naturellement exprimée par les

lymphocytes B et par les neutrophiles, ainsi que par les tissus neuronaux, mais est absente de la surface des lymphocytes T et des monocytes. Elle permet l'adhésion des cellules sanguines aux plaquettes en se liant à la P-selectine. De plus, CD24 est exprimé dans divers types tumoraux, permettrait l'adhésion des cellules tumorales aux plaquettes sanguines activées et aux endothéliums, et par là même la dissémination de ces cellules dans l'organisme (Aigner et al, 1997; Fogel et al, 1999). Des études cliniques basées sur ces observations ont conclu en démontrant que la présence de cellules CD24⁺ dans du tissu tumoral serait de mauvais pronostic, bien que les CSC du sein aient été décrites comme étant CD24⁻. Je reviendrai par la suite sur ce paradoxe apparent souligné par les études cliniques. Un petit nombre de travaux ont eu pour objectif de modifier l'expression de la protéine CD24, afin de déterminer les phénotypes et les voies moléculaires affectées. Dans une étude publiée en 2005, Baumann et al. ont surexprimé CD24 dans une lignée de carcinome mammaire de rat (Baumann et al, 2005). Ces travaux montrent que la lignée positive pour CD24 (notée CD24^{high}) prolifère plus rapidement *in vivo* et forme plus de métastases pulmonaires que la lignée négative pour CD24 (notée CD24^{low}). De plus, les cellules CD24^{high} sont capables de se lier à la fibronectine, au collagène I et IV et à la laminine par l'intermédiaire des intégrines $\alpha_3\beta_1$ et $\alpha_4\beta_1$, ce qui modifie leurs propriétés d'adhésion à la matrice extra-cellulaire. Enfin, les cellules CD24^{high} sont plus mobiles et invasives *in vitro* que les cellules CD24^{low}. Ces résultats semblent en contradiction avec le concept de CSC de type CD24⁻/CD44⁺, toutefois on peut noter que ces travaux sont réalisés sur des cellules de rat et non pas sur des cellules humaines d'une part, et d'autre part que ces travaux sont cohérents avec le rôle suggéré de CD24 comme molécule permettant l'adhésion des cellules métastatiques aux plaquettes sanguines. Dans une seconde étude datant de 2005, publiée par Schabath et al., CD24 est surexprimée dans une lignée humaine de cancer du sein naturellement négative pour cette protéine (CD24^{high} vs. CD24^{low}) (Schabath et al, 2006). Ces travaux montrent que les cellules CD24^{high} sont moins mobiles et invasives *in vitro* et prolifèrent moins vite *in vivo* que les cellules CD24^{low}. Ces résultats sont en opposition avec les travaux de Baumann et al., et partiellement en accord avec la théorie des CSC de type CD24⁻/CD44⁺. De plus, Meyer et al. ont montré que la réduction de CD24 dans des lignées cellulaires avec des siRNA augmente la motilité cellulaire (Meyer et al, 2009). Enfin, en 2011, Ju et al. ont publié des travaux réalisés sur des lignées mammaires humaines, dans lesquels la protéine CD24 est surexprimée ou sous-exprimée à l'aide d'un siRNA (Ju et al, 2011). Cette étude met en évidence l'existence d'un lien entre CD24 et la voie NF κ B dans les lignées de type CD44⁺ uniquement. Ainsi, dans ces lignées, l'expression de CD24 atténue les acteurs de la voie NF κ B et augmente l'apoptose cellulaire en réponse à un stress chimique

ou à une irradiation. Au contraire, la sous-expression de CD24 induit la voie NFκB. Ces travaux suggèrent également une implication de la voie c-Raf/MEK/MAPK dans la répression de NFκB par CD24. Une seconde publication de la même équipe a montré récemment que la protéine CD24 activerait la voie Raf/MEK/ERK par l'intermédiaire des protéines intégrine-β1 et Src/FAK, avec pour conséquence une activation de la prolifération cellulaire (Lee et al, 2012). Ces résultats sont toutefois limités à certaines lignées cellulaires, les auteurs émettant l'hypothèse d'une implication du statut de CD44 dans ces voies de signalisation. Les travaux présentés ici montrent qu'il reste difficile d'associer *in vitro* les marqueurs CD24 et CD44 aux phénotypes tumoraux. Les observations contradictoires soulignent de plus l'importance du fond génétique du matériel cellulaire utilisé, ainsi que de la technique utilisée pour moduler l'expression des différentes protéines.

CD24 : marqueur de cellules progénitrices ?

Si les cellules CD44⁺/CD24⁻ ont été désignées comme étant des CSC du sein, les cellules CD44⁺/CD24^{low}, caractérisées par une faible expression de CD24, sont-elles alors des cellules progénitrices ? Dans ce cas, les cellules CD24^{low} seraient issues des cellules CD24⁻ et se distingueraient de ces dernières par leur capacité accrue à proliférer et à se différencier en cellules CD24⁺. Ainsi, Leth-Larsen et al. ont montré récemment que des cellules strictement CD44⁺/CD24⁻ présentant un phénotype mésenchymateux ne forment pas de tumeur, tandis que des cellules CD44⁺/CD24^{low} de phénotype épithélial forment des tumeurs et résistent à différentes drogues (Leth-Larsen et al, 2012). En particulier, l'étude transcriptomique de ces cellules leur a permis d'établir une signature de 31 gènes, prédictive de la récurrence tumorale. Ce travail suggère que les marqueurs de CSC du sein pourraient être affinés en tenant compte du niveau d'expression des protéines. Précisons que ce travail ne montre pas que les cellules CD24^{low} sont issues des cellules CD24⁻, ce qui est généralement admis.

3° Activité ALDH

Les Aldéhyde Déshydrogénases (ALDH) forment une famille d'isoenzymes cytosoliques responsables de la détoxification des aldéhydes intra-cellulaires en acides carboxyliques, et de l'oxydation du rétinol en acide rétinoïque. Ces enzymes jouent notamment un rôle critique dans la différenciation des cellules souches hématopoïétiques, en effet l'acide rétinoïque agit comme facteur de transcription, contrôlant des processus biologiques tels que la prolifération, la différenciation, l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Balicki, 2007; Douville et al, 2008;

Marcato et al, 2011). ALDH1 est le principal isoforme de la famille ALDH, et son activité a été proposée comme marqueur potentiel de CSC du sein en 2007, par Ginestier et al. (Ginestier et al, 2007a). Ainsi, leurs travaux ont montré que les cellules possédant une activité ALDH1 (notée ALDH⁺), isolées à partir de tumeurs du sein humaines, présentent un potentiel de différenciation élevé, forment des mammosphères *in vitro*, sont capables de s'auto-renouveler et sont au moins 100 fois plus tumorigéniques que les cellules ALDH⁻ quand elles sont injectées en souris NOD/SCID. Il est intéressant de noter que la sous population exprimant à la fois l'activité ALDH1 et le marquage de surface CD24⁻/CD44⁺ représente la fraction la plus tumorigénique de la tumeur, et est capable de proliférer en souris NOD/SCID à partir d'une injection de 20 cellules uniquement. L'expression ALDH1 est également désignée dans ces travaux comme un puissant facteur pronostique de survie globale (Balicki, 2007; Ginestier et al, 2007a). L'analyse des sous populations cellulaires ALDH⁺ sur un panel de lignées de cancer du sein confirme ces caractéristiques de CSC, telles que la tumorigénicité accrue en souris NOD/SCID, l'auto-renouvellement et la différenciation (Charafe-Jauffret et al, 2009b). La sous population ALDH⁺ surexprime de plus des gènes connus pour jouer un rôle dans la maintenance des cellules souches : NOTCH2, NFYA, RMB15/OTT, TPRXL, ST3GAL3.

Quels sont les arguments avancés par les détracteurs de l'utilisation du marquage CD24⁻/CD44⁺ par rapport au marqueur ALDH1⁺ pour identifier les CSC du sein ? D'après D. Balicki, tandis que les cellules CD24⁻/CD44⁺ sont en réalité un mélange de CSC et de progéniteurs, l'activité enzymatique ALDH est régulée dynamiquement au cours de la différenciation cellulaire et influencée par le micro-environnement (Balicki, 2007). Charafe-Jauffret et al ainsi que Douville et al. reprennent cet argument, appuyé par le fait que la population CD24⁻/CD44⁺ est largement étendue dans la plupart des lignées cellulaires, ce qui ne concorde pas avec l'hypothèse d'une sous-population de taille réduite à l'origine du renouvellement tumoral (Charafe-Jauffret et al, 2009b; Douville et al, 2008). Le marqueur de CSC ALDH1 possède enfin l'avantage d'être à priori applicable à tous les tissus tumoraux, ce qui n'est pas forcément le cas du marqueur CD24⁻/CD44⁺.

L'utilisation de l'activité ALDH comme marqueur de CSC comporte également des limites et est controversée (Neumeister & Rimm, 2009). En effet, l'analyse de l'activité ALDH sur coupes fixées est impossible, certaines des études cliniques sont donc réalisées en analysant la présence de la protéine ALDH. L'étude de Resetkova et al. montre ainsi une absence de corrélation entre l'expression d'ALDH1 et la survie globale, pas d'augmentation d'ALDH1 après une thérapie néoadjuvante mais une surexpression d'ALDH1 stromal dans la cohorte

triple négative corrélée à un bon pronostic (Resetkova et al, 2009). Ces auteurs concluent à un rôle de ALDH1 du microenvironnement dans la détermination du pronostic tumoral. Enfin, il semble qu'une distinction entre les différents isoformes de ALDH soit nécessaire, les isoformes responsables de l'activité ALDH semblant dépendre du type tumoral et du tissu étudié (Marcato et al, 2011).

4° Autres marqueurs de CSC du sein et associations de marqueurs

Bien que les travaux utilisant les marqueurs CD24/CD44, ALDH et SP représentent une très grande majorité de la littérature des CSC du sein, quelques autres marqueurs ont été proposés pour identifier et isoler ces CSC, souvent en association avec les phénotypes les plus courants.

CD133/prominin1

La protéine de surface CD133/prominin1 est un marqueur utilisé couramment pour isoler les CSC du glioblastome et du cancer colorectal, entre autres (Charafe-Jauffret et al, 2009a). Son utilisation dans le glioblastome a été proposée pour la première fois en 2004 par Singh et al., qui ont montré que 100 cellules CD133⁺ de glioblastome ou médulloblastome injectées à des souris NOD/SCID peuvent former des tumeurs hétérogènes, tandis que les cellules CD133⁻ ne forment pas de tumeurs (Singh et al, 2004). La valeur clinique de CD133 dans le sein a été examinée par quelques études, parmi lesquelles celle de Zhao et al., qui concluent à son intérêt dans la prédiction du pronostic des cancers triple-négatifs (Zhao et al, 2011). Dans les études *in vitro*, CD133 est généralement utilisé en association avec d'autres marqueurs de CSC. Ainsi, Croker et al. ont étudié le pouvoir métastatique de cellules triées à partir de lignées cancéreuses mammaires humaines en fonction de leurs phénotypes ALDH, CD24, CD44 et CD133 (Croker et al, 2008). Leurs travaux montrent que les cellules de type ALDH⁺/CD44⁺/CD24⁻ et ALDH⁺/CD44⁺/CD133⁺ se divisent plus vite, forment plus de colonies, sont plus invasives *in vitro*, et sont plus métastatiques *in vivo* que les cellules de type ALDH⁺/CD44⁻.

CD201/PROCR

Le récepteur de surface PROCR est un marqueur de cellules souches embryonniques, neurales, hématopoïétiques et folliculaires (Ivanova et al, 2002). Dans le sein, ce marqueur serait étroitement associé à l'expression de la protéine CD44. Ainsi toutes les cellules CD44⁺ sont également PROCR⁺, d'après l'étude de Shipitsin et al., qui démontre les similarités

moléculaires existant entre les cellules cancéreuses de type CD44⁺/PROCR⁺ et les cellules souches normales (Shipitsin et al, 2007). Les cellules CD44⁺/PROCR⁺ présentent en outre une signature moléculaire composée de gènes impliqués dans la mobilité cellulaire, l'invasion, l'apoptose et le remodelage de la matrice extra-cellulaire. Cette signature est validée en clinique et corrélée à un mauvais pronostic, mais indépendante de l'expression du récepteur ER et du grade tumoral.

Différents marqueurs, signatures de tumeurs hétérogènes ?

Comme vu précédemment, un grand nombre de marqueurs de CSC du sein ont été proposés depuis une dizaine d'années, et il existe des arguments en faveur de chacun de ces marqueurs. Faut-il alors considérer que ces différents marqueurs sont le reflet de l'hétérogénéité des tumeurs du sein et que la diversité des phénotypes proposés résulte de la diversité des sous-types de cancer du sein existant ? C'est l'hypothèse émise par Hwang-Verslues et al., à partir du phénotypage de différentes lignées mammaires et tumeurs primaires humaines, selon les marqueurs CD24, CD44, CD133, PROCR, ABCG2, ESA et ALDH (Hwang-Verslues et al, 2009). Cette étude soulève plusieurs points intéressants. D'une part, les marqueurs CD24⁻/CD44⁺ et ALDH⁺ les plus couramment utilisés pour étudier les CSC du sein ne seraient pas forcément adaptés à tous les sous-types de cancers du sein, et le marquage PROCR⁺/ESA⁺ permettrait en général d'identifier les cellules les plus tumorigéniques. D'autre part, l'hétérogénéité des phénotypes observés serait le reflet de différentes lignées cancéreuses originaires de plusieurs cellules cancéreuses ayant proliféré indépendamment, et qui cohabiteraient au sein d'une même tumeur. Plus récemment, différents auteurs ont postulé que les marqueurs présent dans la tumeur reflèterait l'identité de la cellule cancéreuse d'origine et le sous-type cancéreux (Ricardo et al, 2011; Visvader, 2011) (figure 23). Ainsi, les cellules CD24⁻/CD44⁺ signeraient les carcinomes basaux issus de la cancérisation de cellules mammaires indifférenciées, tandis que le phénotype ALDH⁺ permettrait d'identifier les tumeurs basal-like et HER2⁺ originaires de la cancérisation de progéniteurs luminaux. Enfin, le phénotype CD24⁺/CD44⁻ serait une signature de tumeurs lumineales A (Ricardo et al, 2011; Schmitt et al, 2012).

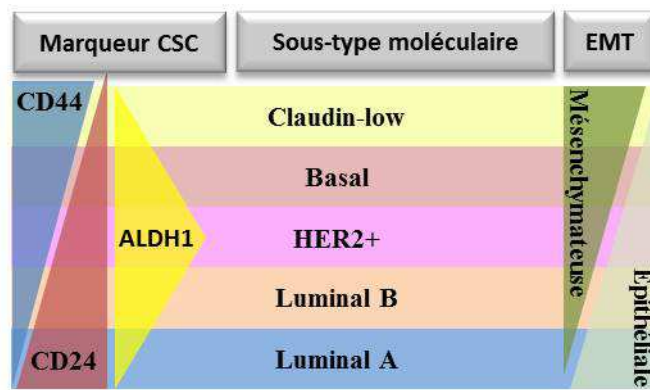


Figure 23 : Association entre les sous-types moléculaires de cancers du sein, la transition épithéliale-mésenchymateuse et l'expression des marqueurs de CSC

(Adapté de Schmitt et al, 2012)

Finale­ment, l'étude de Lehmann et al. contredit clairement les travaux sur les différents marqueurs de CSC (Lehmann et al, 2012). Ces auteurs ont dérivé deux lignées cellulaires à partir de deux tumeurs primaires, et ont cultivé ces lignées sous forme de couche adhérente ou de mammosphères. Pour une des deux lignées seulement, les cellules cultivées en mammosphères sont plus tumorigéniques *in vivo* que les cellules adhérentes, tandis que pour l'autre lignée les tumorigénicités sont équivalentes. Les lignées les plus tumorigéniques ne sont enrichies ni en cellules CD24⁻/CD44⁺, ni en cellules ALDH⁺, ni en cellules SP. De plus, il n'y a pas de surexpression dans ces cellules des facteurs Oct3, Sox1, Sox2 et Nanog, bien qu'une légère surexpression des facteurs d'EMT Snail2 et Twist1 et des facteurs KLF4 et Notch3 soit détectée. Ces auteurs concluent à l'invalidité des marqueurs de CSC proposés, et statuent sur l'existence de marqueurs de CSC encore non déterminés, ainsi que sur l'importance des facteurs environnementaux dans la modulation des phénotypes de CSC. Il est toutefois intéressant de souligner le faible nombre de tumeurs utilisées pour cette étude, ainsi que l'absence de précisions quant à l'origine histopathologique de ces tumeurs, qui a pu influencer les résultats comme vu précédemment.

C- CSC du sein : conséquences thérapeutiques et résistance aux traitements

1° Marqueurs de CSC et études cliniques

Dans ce chapitre je m'intéresserai aux études évaluant l'intérêt des CSC dans l'établissement de facteurs pronostiques de cancers du sein. Je me concentrerai en particulier sur le marqueur CD24⁻/CD44⁺ et sur les contradictions subsistant à l'heure actuelle dans la littérature.

Etudes cliniques associant l'expression de CD24 à la progression tumorale

La première étude cherchant à corréler CD24 à la progression tumorale date de 1999. Dans cet article, Fogel et al. montrent clairement une surexpression de CD24 dans tous les carcinomes mammaires canauxaux étudiés, quel que soit le grade tumoral, par rapport au sein normal contrôle. Notamment, les auteurs montrent un déplacement du marqueur CD24 au cours de la progression tumorale. Ainsi, les carcinomes canauxaux *in situ* de faible grade présentent un fort marquage apical et un faible marquage cytoplasmique de CD24 tandis que les carcinomes *in situ* de grade élevé et infiltrants présentent un fort marquage cytoplasmique (Fogel et al, 1999). L'étude de Bircan et al. confirme la surexpression de CD24 dans les carcinomes canauxaux par rapport au tissu de sein normal (Bircan et al, 2006). De plus, le marquage CD24 cytoplasmique serait corrélaté positivement au grade de la tumeur dans les carcinomes canauxaux *in situ* tandis que le marquage CD24 membranaire est corrélaté positivement au grade de la tumeur dans les carcinomes infiltrants. Finalement, CD24 ne serait pas corrélaté aux facteurs histopathologiques habituels (ER, PR, c-erbB2). Ces deux études concluent à la spécificité de localisation du CD24 en fonction du type tumoral (canauxaux ou infiltrant), mais ne statuent pas sur l'utilisation de CD24 comme facteur pronostique.

La valeur pronostique de CD24 est analysée dans un article publiée en 2003 par Kristiansen et al. (Kristiansen et al, 2003). Ces travaux, réalisés sur des carcinomes primaires canauxaux et lobulaires de différents grades, confirment la surexpression de CD24 par le tissu tumoral par rapport au tissu sain. Ainsi, la présence de CD24 cytoplasmique, indépendamment du niveau d'expression, serait un facteur général de mauvais pronostique associé à la récurrence et à la progression tumorale, et ce quel que soit le traitement reçu au moment du diagnostic (chirurgie, radiothérapie adjuvante ou non, chimiothérapie associée ou non au tamoxifène).

Plus récemment, Mylona et al. ont montré une corrélation négative entre la prévalence de cellules CD24⁺/CD44⁻, la durée sans rechute et la survie globale, notamment dans les tumeurs de grade II, tandis que la prévalence de cellules CD24⁻/CD44⁺ est plutôt associée à une absence de rechute (Mylona et al, 2008). Enfin, une étude portant sur les carcinomes infiltrants de faibles grades (I et II) et sur une grande cohorte de 1036 patientes indique une fois de plus la surexpression de CD24 par les cellules tumorales par rapport au tissu sain, et montre que le marquage CD24⁻/CD44⁺ est significativement de meilleur pronostique que le marquage CD24⁺/CD44⁻ (Ahmed et al, 2011). Notamment, CD44 serait corrélé positivement à la survie globale tandis que le marquage CD24 cytoplasmique ne serait pas corrélé à la survie.

En contradiction avec les travaux décrits précédemment un certain nombre d'études cliniques, basées sur le postulat des CSC, ont cherché à mettre en évidence une malignité accrue des cellules de type CD24⁻/CD44⁺. En effet, une analyse de carcinomes *in situ* réalisée par Giatromanolaki et al. a montré une corrélation entre le phénotype CD24⁻/CD44⁺, une angiogenèse accrue, les tumeurs triple-négatives (ER-, PR, c-erb-B2) et un mauvais pronostique en termes de survie globale (Giatromanolaki et al, 2010). Un pourcentage élevé de cellules CD24⁻/CD44⁺ au sein d'une tumeur a également été associé par Abraham et al. à la présence de métastases, mais ces auteurs ont montré une absence de corrélation avec le pronostique et la survie globale (Abraham et al, 2005). Une méta-analyse groupant 12 études cliniques a montré une corrélation entre les CSC de type CD24⁻/CD44⁺ et ALDH⁺ et les paramètres histo-pathologiques ER, PR, HER-2 ainsi que le grade de la tumeur (Zhou et al, 2010). En particulier, les marquages CD24⁻/CD44⁺ et ALDH⁺ sont associés dans cette étude à une survie globale réduite, bien que les marqueurs CD24⁻/CD44⁺ et ALDH⁺ ne soient pas corrélés l'un avec l'autre, ce qui peut être dû à l'hétérogénéité des travaux recoupés. Enfin, Lu et al. ont montré une augmentation de la proportion de cellules CD24⁻/CD44⁺ dans les carcinomes invasifs par rapport aux fibroadénomes et au sein normal, mais une absence de corrélation avec le sous-type histologique des tumeurs, et avec les paramètres cliniques utilisés habituellement (Lu et al, 2011).

Incohérences dans la littérature

La plupart des études citées précédemment s'accordent à reconnaître une surexpression de CD24 dans les tumeurs du sein par rapport au tissu sain. En revanche, la valeur pronostique des marqueurs CD24 et CD44 n'est clairement pas établie. Différentes raisons peuvent être avancées pour expliquer les incohérences de la littérature. D'une part, il semble que la

localisation du marquage CD24 quantifié (membranaire, cytoplasmique ou nucléaire) ait un impact sur les résultats obtenus, ainsi que l'anticorps utilisé pour réaliser l'immunohistochimie et la méthode de quantification du marquage positif. Notons que la plupart des études *in vitro*, dont la nôtre, étudie le phénotype CD24/CD44 par marquage membranaire sur cellules vivantes, analysé par cytométrie en flux, ce qui ne tient pas compte d'un éventuel marquage cytoplasmique. En outre, Ahmed et al. suggèrent un rôle prépondérant du microenvironnement dans les résultats des études cliniques, la plupart des expériences sur les CSC étant réalisées *in vitro* ou en souris immunodéficientes (Ahmed et al, 2011). Les CSC ayant été associées à la résistance des tumeurs aux chimiothérapies ou radiothérapies, leur valeur pronostique peut également différer en fonction du traitement reçu, du type tumoral et du grade au moment du dépistage. Effectivement, les études actuelles sont peu uniformes en termes de tumeurs observées, grade des tumeurs, taille des cohortes etc. L'association ou non du marqueur CD24 au marqueur CD44, éventuellement à d'autres marqueurs de CSC et au statut ER peut avoir un impact non négligeable sur les résultats (Ali et al, 2011). Enfin, il me semble qu'un dernier point mérite d'être évoqué : en effet alors que l'hypothèse des CSC accorde une place primordiale à une sous population cellulaire, certaines des études cliniques mentionnées étudient l'expression globale par la tumeur de CD24 et CD44. Peut-être serait-il intéressant d'adapter les études cliniques à la théorie des CSC, et donc de s'intéresser à la cohabitation de différentes sous populations cellulaires dans la tumeur plutôt qu'à son phénotype global.

2° Chimiorésistance des CSC

Comme mentionné précédemment, un des objectifs principaux de l'étude des cellules souches cancéreuses est de comprendre les mécanismes qui mènent à la rechute tumorale. Ainsi, bien que les thérapies conventionnelles (chimiothérapie et radiothérapie) permettent une fonte tumorale rapide chez la plupart des patientes, on observe parfois au bout d'un certain temps une récurrence de la tumeur. Les CSC étant par définition plus résistantes à la chimiothérapie et à la radiothérapie que le reste des cellules tumorales, celles-ci pourraient être à l'origine de la rechute. La résistance à la chimiothérapie des CSC est associée à des altérations des voies de signalisation contrôlant l'autorenouveau et la différenciation, telles que Notch, Wnt, Hedgehog et HER2 (Nguyen et al, 2010; Velasco-Velazquez et al, 2012).

Etudes in vitro

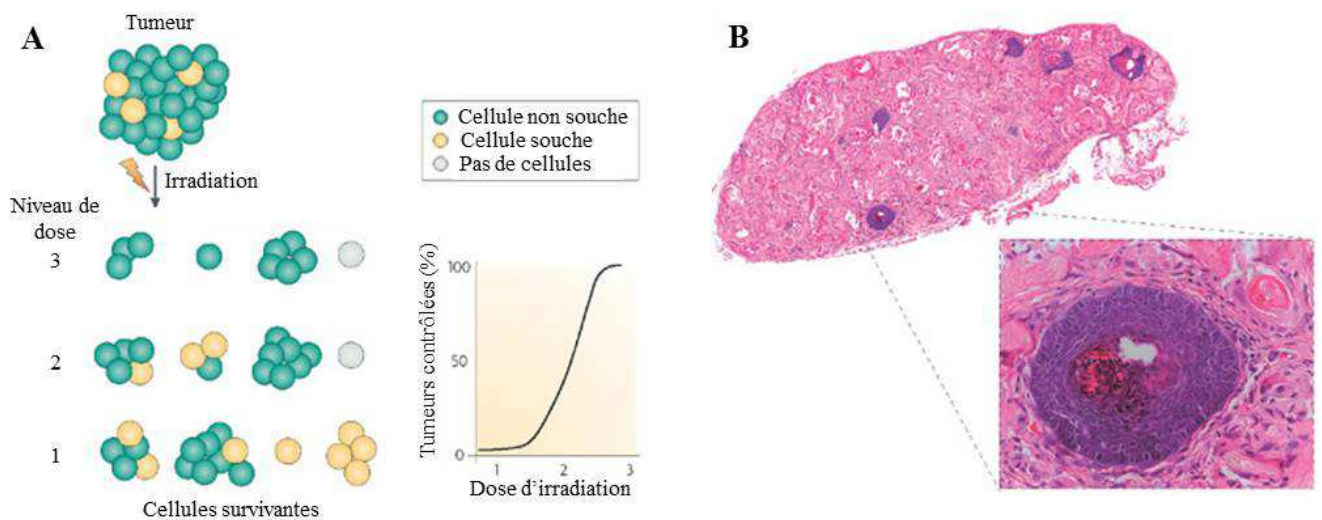
La définition des cellules SP repose sur leur capacité à effluer les drogues toxiques. Il est donc naturel de supposer que ces cellules sont à l'origine de la chimiorésistance des tumeurs. Ainsi, Hirschmann-Jax et al. cités précédemment ont montré une chimiorésistance amplifiée des cellules SP de neuroblastomes traités par la mitoxantrone (Hirschmann-Jax et al, 2004). Dans les cancers du sein, les cellules SP surexpriment des pompes à efflux, notamment ABCG2, qui leur permettraient de résister aux chimiothérapies. Britton et al. ont observé l'existence de cellules SP surexprimant ABCG2 dans des micro-aspirations de tumeurs (Britton et al, 2012). Ils ont de plus démontré la résistance à la mitoxantrone de ces cellules dans des lignées mammaires cancéreuses. D'autres marqueurs de CSC du sein ont été examinés pour isoler les cellules chimiorésistantes. Afin de démontrer la résistance accrue des CSC mammaires aux drogues toxiques utilisées en chimiothérapie, Crocker et al. ont trié et exposé aux drogues doxorubicine/paclitaxel les cellules de type $ALDH^+/CD44^+$ et $ALDH^-/CD44^-$ issues des lignées mammaires humaines MDA-MB-231 et MDA-MB-468 (Crocker & Allan, 2011). Au bout de 72h de traitement, les cellules $ALDH^+/CD44^+$ présentent un meilleur taux de survie, et l'inhibition de l'activité ALDH permet de chimio-sensibiliser ces cellules. L'activité ALDH serait donc fortement liée à la chimiorésistance des cellules, bien que cette étude ne propose pas de mécanismes pour expliquer ce phénotype. Une approche différente utilisée par Li et al. démontre la chimiorésistance de CSC murines *in vitro* (Li et al, 2008a). Ainsi, considérant la chimiorésistance des CSC acquise d'office, ces auteurs ont utilisé des drogues toxiques pour identifier le meilleur marqueur de CSC dans une lignée mammaire tumorale de souris. La lignée TM40D contient initialement 0.7 à 1.6% des cellules $CD24^-/CD44^+$. Après 10 passages sous forme de mammosphères en milieu sans sérum, suivis de 1 semaine de traitement paclitaxel/epirubicine, cette lignée contient plus de 99.8% de cellules $CD24^-/CD44^+$, hautement tumorigéniques lorsqu'elles sont injectées à des souris BALB/C. Ces auteurs concluent donc à la validité du marqueur $CD24^-/CD44^+$ pour identifier les CSC murines, et démontrent par la même occasion la chimiorésistance de ces cellules. Paradoxalement, il est généralement admis que les CSC murine possèdent un phénotype $CD29^+/CD24^+$ (Zhang et al, 2008). Les travaux de Li et al. se démarquent donc du reste de la littérature, et soulignent les incertitudes qui existent à l'heure actuelle sur les marqueurs de CSC murines. Enfin, Van Phuc et al. ont montré que l'inhibition de CD44 par siRNA permet de sensibiliser des cellules de cancer du sein à un traitement par la doxorubicine (Van Phuc et al, 2011).

Etudes cliniques

Dans des études cliniques, différents travaux ont cherché à mettre en évidence la résistance accrue des CSC à la chimiothérapie et à en comprendre les origines. Li et al. ont ainsi évalué la proportion de CSC dans des biopsies de patientes avant et après traitement (Li et al, 2008b). Leur étude montre que, 12 semaines après une chimiothérapie néoadjuvante (docetaxel, doxorubicine, cyclophosphamide), les tumeurs HER2⁻ sont enrichies en cellules CD24⁻/CD44⁺ et en cellules capables de former des mammosphères. De plus, les cellules ayant survécu à la chimiothérapie présentent une capacité accrue à former des tumeurs chez la souris SCID/Beige. En revanche, chez les patientes traitées par lapatinib (traitement des tumeurs qui surexpriment HER2), on observe une diminution non statistiquement significative du pourcentage de cellules CD24⁻/CD44⁺ et de cellules capables de former des mammosphères. La chimiothérapie conventionnelle pourrait donc sélectionner les CSC de type CD24⁻/CD44⁺, tandis que le lapatinib permettrait d'éliminer les CSC en ciblant la voie EGFR active dans les tumeurs HER2⁺. Cette étude est en contradiction avec les travaux de Tanei et al., qui ont quantifié les cellules CD24⁻/CD44⁺ et ALDH⁺ issues de biopsies de 108 patients, avant traitement et après chimiothérapie (paclitaxel, epirubicine) (Tanei et al, 2009). Dans ces échantillons, seul le marqueur ALDH⁺ est corrélé au risque de rechute. De plus, seules les cellules ALDH⁺ sont sélectionnées par le traitement, tandis que le pourcentage de cellules CD24⁻/CD44⁺ n'est pas modifié. Pour expliquer l'apparente contradiction de ces résultats avec ceux de Li et al., ces auteurs avancent des différences dans les protocoles de traitement et d'immunohistochimie. Bien que ne s'accordant pas sur le marqueur CSC le mieux adapté aux études cliniques, ces deux études suggèrent donc une sélection des CSC par le traitement de chimiothérapie sans proposer toutefois de mécanisme moléculaire mis en jeu. Un second travail publié par les mêmes auteurs va plus loin dans la caractérisation des cellules résistantes. A partir de tumeurs du sein, cette étude propose une signature moléculaire de 493 gènes issue du recoupement entre une signature des cellules CD24⁻/CD44⁺ et une signature de mammosphères. Cette signature, corrélée avec le sous-type tumoral claudin-low/basal B, est également enrichie dans les tumeurs après traitement endocrine au letrozole, ou chimio-thérapeutique au docetaxel. Enfin, de manière intéressante, parmi les gènes surexprimés après traitement dans les tumeurs figurent un certain nombre de gènes de la transition épithéliale-mésenchymateuse, ce qui confirme le lien établi entre EMT et CSC (Creighton et al, 2009).

3° CSC et résistance à l'irradiation

Les CSC sont-elles à l'origine de certains échecs thérapeutiques après traitement par radiothérapie? La radorésistance des CSC est appuyée par de nombreux arguments, que je détaillerai ici, en me concentrant plus particulièrement sur la résistance des cellules CD24⁻/CD44⁺. La radorésistance d'une sous-population cellulaire dans la tumeur a des conséquences thérapeutiques importantes, mais cette notion n'est pas nouvelle. L'observation de récurrences après irradiation, en particulier dans les cancers du sein et les glioblastomes, a suggéré aux radiothérapeutes l'existence d'une fraction tumorale présentant une résistance accrue aux traitements. Cette sous-population a par la suite été conceptualisée avec la théorie des CSC (figure 24). L'identification de ces CSC par des marqueurs, et des voies moléculaires à l'origine de leur radorésistance ouvre des perspectives thérapeutiques nouvelles. La principale difficulté de ces thérapies ciblées est toutefois de trouver une fenêtre thérapeutique épargnant les cellules souches normales, qui partagent avec les CSC leurs voies moléculaires de radorésistance (Baumann et al, 2008; Eyler & Rich, 2008).



Mise en évidence de la radiorésistance des CSC

La radiorésistance des CSC est décrite dès 2006 dans différents types cellulaires, avec la publication concomitante de trois articles essentiels. D'une part, l'étude de Bao et al. démontre la radiorésistance des CSC de gliome, identifiées par leur marquage positif pour la protéine CD133 (Bao et al, 2006). Ainsi, les cellules CD133⁺ sont enrichies après irradiation dans des cultures primaires de gliome humain, et dans des xénogreffes sous cutanées et intracrâniennes de gliome chez la souris. De plus, l'irradiation n'induit pas l'expression de CD133 dans des cellules CD133⁻, cet enrichissement est donc bien dû à une sélection de ces cellules. Après tri, les cellules CD133⁺ survivent mieux à l'irradiation que les cellules CD133⁻ et conservent après une irradiation de 2 Gy leur capacité à former des tumeurs in vivo.

Les travaux de Woodward et al., publiés également en 2006, portent essentiellement sur la radiorésistance de cellules épithéliales progénitrices non cancéreuses de souris BALB/c (Woodward et al, 2007). Ces cellules, identifiées par leur phénotype combiné sca1⁺/SP, survivent mieux à des doses cliniques d'irradiation et présentent moins de foci γ -H2AX 2h après irradiation que les cellules sca1⁻. La population SP est de plus induite dans les cellules de souris surexprimant Wnt-1 et la β -caténine stabilisée. La β -caténine et la survivine sont induites par l'irradiation dans les cellules Sca1⁺. Dans le cas du cancer du sein, les auteurs montrent que l'irradiation de la lignée MCF-7 sélectionne les cellules de type lin-CD24⁺/CD29⁺, mais tue sélectivement les cellules de type CD24⁺/CD29^{faible} et CD24⁻/CD29⁻. L'ensemble de ces résultats démontre que les cellules progénitrices survivraient mieux à l'irradiation que les cellules différenciées en activant la voie Wnt- β caténine et la survivine, en réponse à l'irradiation.

Enfin, une grande partie des travaux publiés à ce jour sur la résistance à l'irradiation des CSC du sein de type CD24⁻/CD44⁺, que je présenterai ici, provient de l'Université de Californie Los Angeles (UCLA), et réunit en particulier les auteurs F Pajonk, T Phillips, WH McBride, C Lagadec et E Vlashi. En 2006, Phillips et al. ont étudié la réponse à l'irradiation de deux lignées mammaires, MCF-7 et MDA-MB-231, en comparant des cultures adhérentes à des mammosphères, naturellement enrichies en cellules CD24⁻/CD44⁺ (Phillips et al, 2006). Leurs travaux montrent que les cultures de mammosphères sont plus radiorésistantes que les cultures adhérentes 28 jours après une irradiation unique de 2, 4, 6 ou 8 Gy, dans des essais de clonogénicité. De plus, après une irradiation unique de 10 Gy ou 3 irradiations fractionnées de 5 Gy, la fraction CD24⁻/CD44⁺ est enrichie dans les cellules non adhérentes. Il est important de noter que cet enrichissement est à la limite de la significativité (figure 25), et mis en évidence à court terme après irradiation. De plus les images de cytométrie en flux présentées

sur la figure 25 ne permettent pas d'observer un enrichissement significatif en cellules $CD24^-/CD44^+$ dans les mammosphères par rapport aux cellules adhérentes.

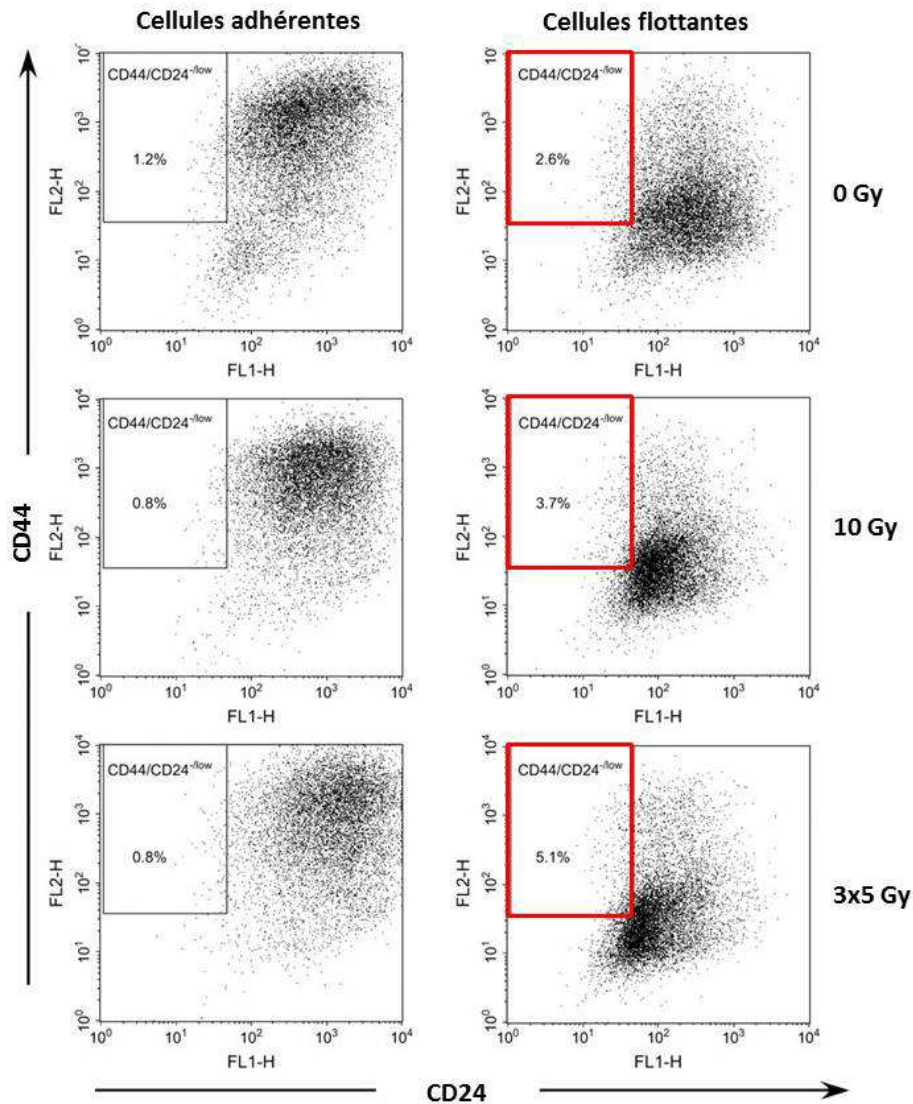


Figure 25 : Effets des rayonnements ionisants sur les CSC du sein

Les cellules adhérentes ou flottantes (mammosphères) ont été irradiées à une dose unique de 10 Gy ou par des doses fractionnées de 3 x 5 Gy. 48h après la dernière irradiation, un marquage CD24/CD44 et une analyse par cytométrie en flux sont réalisés. On observe dans la population flottante irradiée un décalage du nuage de cellule vers la gauche (phénotype $CD24^{faible}$) et une légère augmentation de la proportion de cellules $CD24^-/CD44^+$ (encadré rouge) (Phillips et al., 2006)

Après irradiation, les mammosphères présentent moins de foci γ -H2AX et une réduction des ROS par rapport aux cultures adhérentes, indiquant l'existence d'un meilleur système de détoxification des radicaux libres dans ces CSC. Enfin, dans le cas des irradiations fractionnées, une activation de la voie Notch, par l'intermédiaire des protéines Jagged-1 et Notch-1 pourrait être à l'origine de l'augmentation du nombre de CSC. Un éditorial publié en réponse à cet article par Diehn et Clarke soulève les problèmes posés par la culture de lignées cellulaires *in vitro*, dans des conditions artificielles et sans niche tumorale, bien que ces conditions soient employées dans la plupart des études (Diehn & Clarke, 2006).

Les résultats de cette équipe portant sur les doses fractionnées d'irradiation sont développés dans une seconde publication, qui s'intéresse notamment aux conséquences de ces irradiations sur les propriétés des CSC (Lagadec et al, 2010). Dans ces travaux, des doses fractionnées de 2 Gy appliquées sur les lignées mammaires T-47D et MCF-7 augmentent leur capacité à former des mammosphères, et n'affectent pas la vitesse de prolifération des CSC de type CD24⁻/CD44⁺ tandis qu'elles inhibent la croissance des cellules non-CSC qui évoluent alors vers un stade sénescence. En réponse aux doses fractionnées d'irradiation, les CSC seraient en outre mobilisées d'un état quiescent G0, propre aux cellules souches, vers un état de prolifération active, sans subir d'apoptose radio-induite. Les phénotypes dépendent du nombre de doses appliquées, et selon la lignée cellulaire un nombre suffisant de doses peut contribuer à tuer également les CSC.

L'ensemble de ces résultats tend à démontrer une radiorésistance accrue des cellules progénitrices et CSC dans différents systèmes cellulaires. Dans le cas des CSC humaines de sein, les travaux de l'équipe de F Pajonk suggèrent notamment la radiorésistance des cellules CD24⁻/CD44⁺. Il existe toutefois des travaux tendant à démontrer l'absence de radiorésistance spécifique des CSC. Ainsi Al-Assar et al. suggèrent que la radiorésistance des CSC n'est pas un phénomène généralisable à tous les types tumoraux, mais est une propriété restreinte à certaines lignées cellulaires (Al-Assar et al, 2009). Les auteurs apportent plusieurs explications à cette observation : les marqueurs de CSC employés actuellement ne seraient pas adaptés, ou les études *in vitro* ne permettraient pas de recréer la niche tumorale. De même, Zielske et al. montrent à partir de xénogreffes dérivées de 2 tumeurs humaines de que la sous-population de CSC CD24⁻/CD44⁺ peut être soit enrichie, soit diminuée par l'irradiation (Zielske et al, 2011). Ces travaux bien que peu nombreux mettent en lumière les incertitudes qui existent quant à la radiorésistance des CSC.

CSC et traitements : sélection ou induction ?

Les travaux de Bao et al. montrent une sélection des CSC de gliome par l'irradiation (Bao et al, 2006). Un second mécanisme suggère une induction du phénotype CSC du sein par l'activation de la voie Notch en réponse à l'irradiation (Phillips et al, 2006). De même, les travaux de Woodward et al. montrent une activation de la voie Wnt/ β caténine dans les cellules irradiées, qui pourrait mener à une radiorésistance accrue des cellules composant la rechute tumorale (Woodward et al, 2007). Quelles sont les preuves suggérant une induction du phénotype de CSC dans la tumeur ?

Le concept d'induction des CSC par l'irradiation est difficile à mettre en évidence, et n'est développé dans le cas des tumeurs mammaires que dans une seule publication récente, par Lagadec et al. (Lagadec et al, 2012b). Pour réaliser cette étude les auteurs ont utilisé plusieurs marqueurs de CSC mammaires : le phénotype $CD24^-/CD44^+$, l'activité ALDH et une faible activité du protéasome. Lorsque des cellules non souches (NCSC) sont triées et irradiées à une dose unique de 4 ou 8 Gy, les auteurs observent au bout de 5 jours une réapparition spontanée dose dépendante de CSC dans la population (appelées CSCi : CSC induites). D'après les auteurs, cet enrichissement rapide et important en CSCi ne peut être attribuable uniquement à une sélection par l'irradiation des CSC résiduelles. En revanche, une conversion des NCSC en CSCi expliquerait l'augmentation observée. Ces CSCi sont de plus dépendantes de l'expression du récepteur Notch1, et des gènes Oct4, Nanog, Sox2, Klf4. Curieusement, il semble que ces gènes soient surtout surexprimés dans les cellules polyplœides radioinduites. Les auteurs concluent que la polyplœidie, par la multiplication des chromosomes et donc des copies de gènes serait le mécanisme d'apparition des CSCi. Plusieurs points me semblent contestables dans cette étude. D'une part, les auteurs ont considéré dans leur modélisation que la prolifération des CSC n'est pas affectée par l'irradiation, ce qui reste à confirmer. De plus, l'induction de CSCi concernerait les cellules polyplœides radio-induites, or on sait que ces cellules sont caractéristiques d'une catastrophe mitotique et meurent majoritairement tardivement, dans les semaines qui suivent l'irradiation, sans donner de descendance viable. Enfin, nos propres travaux ont montré que les proportions relatives de cellules $CD24^-$ et $CD24^+$ ne sont pas modifiées à long terme après irradiation. Qu'en est-il dans le modèle de Lagadec et al. ?

Il est intéressant de noter que l'induction de CSC a également été suggérée dans d'autres modèles et pour d'autres types de traitements. Ainsi, le traitement chimiothérapeutique de cellules de carcinome hépatique par de faibles doses de carboplatine induirait la formation de CSC à partir de NCSC, de manière Sox2- et Oct3/4-dépendante (Hu et al, 2012). Ces mêmes

auteurs ont montré l'induction de CSC de glioblastomes après irradiation, identifiées par leur phénotype SP. Ici encore, l'induction serait dépendante de l'activation des facteurs Sox2 et Oct3/4 (Ghisolfi et al, 2012). Dans les glioblastomes, les CSC seraient également induites par l'hypoxie, responsable de la surexpression de Oct4, Nanog et c-Myc, pointant du doigt l'implication du microenvironnement dans l'expression de ce phénotype (Heddleston et al, 2009).

Ces résultats nécessitent confirmation car ils permettraient d'apporter une explication à certains échecs thérapeutiques, mais les études à ce sujet restent peu nombreuses. L'induction de CSC par les traitements pose un problème majeur, en rendant les cellules tumorales survivantes potentiellement plus agressives que la tumeur d'origine (Lagadec & Pajonk, 2012). Il est possible que la sélection et l'induction des CSC soient deux phénomènes concomitants impliqués dans la résistance à l'irradiation des cellules tumorales mammaires. Un troisième mécanisme, impliquant la prolifération accrue des CSC survivantes, pourrait intervenir dans la réponse à l'irradiation des CSC. Quels sont les poids relatifs de ces différents phénomènes ? Ces poids dépendent-ils de la dose d'irradiation appliquée ? Quels sont-ils dans le cas de doses moyennes fractionnées, comme c'est le cas dans les protocoles de radiothérapie ?

4° Mécanismes moléculaires de la radiorésistance des CSC

Si la résistance à l'irradiation des CSC du sein a été démontrée dans différentes publications, on connaît encore mal les voies moléculaires qui en sont à l'origine. Les travaux que je détaillerai ici portent sur la détoxification des ROS radioinduits par les CSC ainsi que sur le contrôle du cycle cellulaire et des dommages de l'ADN, principaux mécanismes proposés pour expliquer la radiorésistance de ces cellules.

CSC du sein et hypoxie

L'oxygène est connu depuis longtemps comme l'un des principaux agents de radiosensibilisation des tumeurs. Certaines cellules tumorales, regroupées dans des niches hypoxiques, seraient protégées des effets des rayonnements ionisants. Pourtant, des études ont montré que les CSC ne se situeraient pas dans ces niches hypoxiques, mais au contraire dans des zones oxygénées. Ainsi, Vlashi et al. ont mis au point une protéine de fusion fluorescente, accumulée dans des cellules de cancer du sein en l'absence d'activité protéasome 26S (Vlashi

et al, 2009a). Ces cellules possédant une faible activité protéasome présentent des caractéristiques de CSC : elles forment des mammosphères, sont 100 fois plus tumorigéniques que les autres cellules tumorales, et expriment des marqueurs de CSC. Les auteurs ont ainsi montré qu'il est possible de suivre *in vivo* la présence de CSC dans les tumeurs, grâce à leur faible activité protéasome (figure 26). De manière intéressante, ils constatent que ces CSC sont situées dans des niches périvasculaires, donc dans des zones relativement bien oxygénées, et que leur nombre augmente 72h après irradiation.

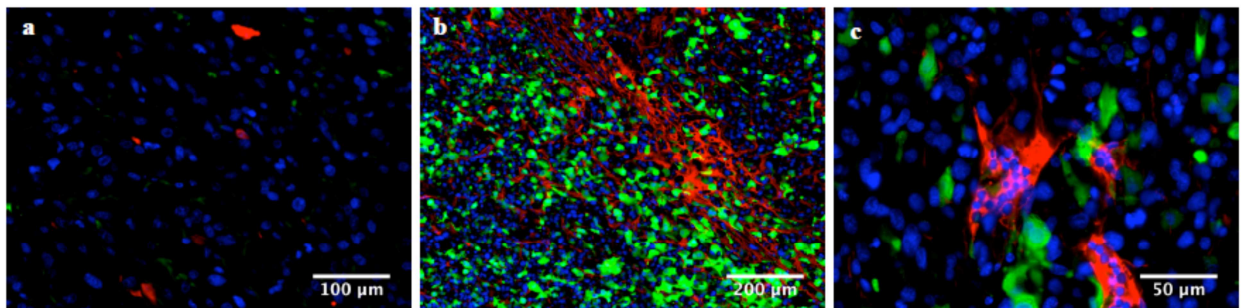


Figure 26 : Identification et localisation *in vivo* des CSC du sein

Les CSC (cellules ZsGreen-positives, en vert) sont localisées dans les régions péri-vasculaires bien oxygénées (b et c, vaisseaux sanguins en rouge) et absentes des zones nécrotiques mal oxygénées (a) (Vlashi et al., 2009, Supplementary figure 3)

Ces observations laissent à penser que les CSC ont la capacité de résister à l'irradiation autrement que grâce à l'hypoxie. Ceci pourrait expliquer pourquoi, de manière contre-intuitive, les traitements anti-angiogéniques couplés à l'irradiation ont démontré leur efficacité. Ainsi, ces traitements cibleraient la niche de CSC, apportant un poids non négligeable au traitement par irradiation (Morrison et al, 2011; Vlashi et al, 2009b). L'indépendance des CSC vis-à-vis de l'hypoxie a été confirmée par Lagadec et al., qui ont examiné la radio-sensibilité de lignées cellulaires mammaires en situations d'hypoxie et d'oxygénation (Lagadec et al, 2012a). Ainsi, lorsque les cellules sont cultivées en conditions d'adhérence et composées d'une faible proportion de CSC, l'hypoxie augmente considérablement la survie clonogénique après irradiation. En revanche, lorsque les cellules sont cultivées sous forme de mammosphères, donc enrichies en CSC, la survie clonogénique est la même en conditions hypoxique et oxygénée, et est comparable à la survie en hypoxie

des cultures adhérentes pour la plupart des lignées testées. Ces résultats démontrent l'indépendance des CSC de lignées mammaires vis-à-vis des conditions d'oxygénation, et suggèrent l'activation d'un système de détoxification plus efficace des espèces réactives de l'oxygène dans ces cellules.

Détoxification des ROS dans les CSC

Quels sont les mécanismes permettant aux CSC de résister à l'irradiation ? Comme décrit précédemment, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont naturellement présentes dans les cellules aérobies qui possèdent des systèmes constitutifs de détoxification. Le maintien par la cellule d'un taux de base de ROS variable selon les types cellulaires permet le contrôle de la prolifération et de la survie. Lorsque les cellules sont irradiées, le niveau de ROS augmente considérablement et est à l'origine de dommages causés à l'ADN, à l'ARN et aux protéines, pouvant induire la mort cellulaire. Les cellules possédant un système de détoxification efficace sont donc susceptibles de résister mieux à la mort radioinduite, c'est le cas par exemple des cellules souches hématopoïétiques (Kobayashi & Suda, 2012) (figure 27).

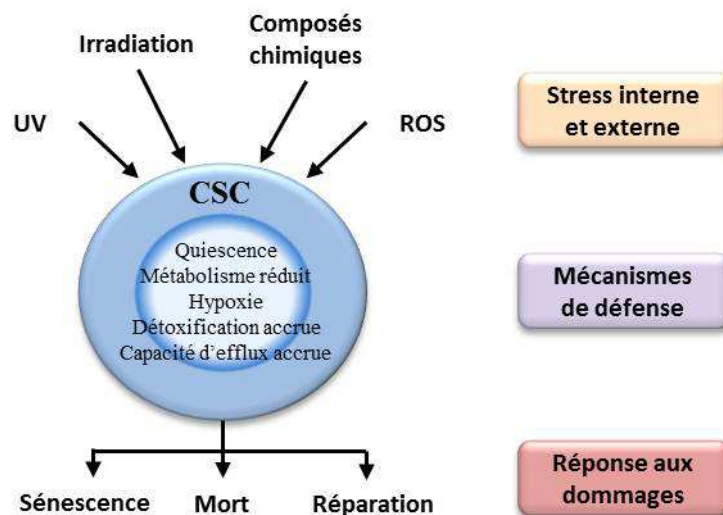


Figure 27 : Mécanismes de défense et de réponse au stress des CSC

(Adapté de Kobayashi et al., 2012)

Dans les CSC mammaires, l'activation des voies de détoxification des ROS a été suggérée dans un premier temps par les travaux de Phillips et al., décrits précédemment et qui

impliquent la voie Notch dans la survie des CSC (Phillips et al, 2006). Un article provenant de la même équipe, cité dans le chapitre précédent et portant sur le comportement des CSC face à l'hypoxie, met en évidence des mécanismes de détoxification plus ou moins activés selon l'agressivité des cellules tumorales (Lagadec et al, 2012a). Les lignées cellulaires les plus agressives surexpriment les gènes TMX3/FOXO1/GSS/SOD2 et inhibent l'expression des gènes TMX1/SOD1 par rapport aux lignées lumineales. Une meilleure survie clonogénique des lignées et des échantillons de patientes est corrélée avec une forte expression de SOD2 et une faible expression de TMX1 et SOD1.

Bien que l'implication des voies de détoxification des ROS dans la radiorésistance des CSC soit suggérée par ces deux publications, le principal article publié sur le sujet en 2009 est celui de Diehn et al. (Diehn et al, 2009). Leurs travaux ont montré que, dans des tumeurs du sein, la sous population CD24⁻/CD44⁺ présente un niveau de base de ROS moins élevé, et que certains gènes des voies de détoxification des ROS sont globalement surexprimés dans ces cellules. Ces observations sont également valables pour les CSC murines de type Thy1⁺/CD24⁺/Lin⁻, isolées à partir de tumeurs spontanées de souris surexprimant Wnt-1. Après irradiation, ces CSC murines présentent moins de cassures de l'ADN et moins de foci γ -H2AX. Enfin, l'irradiation *in vivo* augmente le pourcentage de cellules Thy1⁺/CD24⁺/Lin⁻ dans les tumeurs. Les CSC murines et humaines seraient donc plus radiorésistantes que les cellules composant le reste de la tumeur, et cette résistance serait associée à une surexpression des défenses contre le stress oxydant, réduisant les dommages à l'ADN radioinduits. Quelles sont ces défenses ? Comme dans l'article de Phillips et al., les auteurs ont mis en évidence la surexpression dans les CSC de plusieurs gènes impliqués dans le stress oxydant. D'une part, ils observent une surexpression des gènes Gss et Gclm, impliqués dans la biosynthèse du glutathion (GSH), un agent cellulaire antioxydant impliqué dans la chimio- et radiorésistance des cellules. La déplétion pharmacologique du GSH par exposition au Buthionine sulphoximine (BSO) permet de radiosensibiliser les CSC. D'autre part, ils observent une surexpression dans les CSC du gène Foxo1, facteur de transcription impliqué dans la régulation du stress oxydant des cellules souches hématopoïétiques (Kobayashi & Suda, 2012). Ces différentes données en accord indiquent un contrôle du stress oxydant accru dans les CSC de sein, qui leur permettrait de survivre à l'irradiation. De manière intéressante les niveaux de ROS observés dans les CSC sont hétérogènes, indiquant peut être que la population étudiée n'est pas composée uniquement de souches cancéreuses, ou que les niveaux de ROS dans les CSC diffèrent en fonction des conditions environnementales.

Notons que ces différentes études ne dégagent pas de consensus quant aux gènes responsables de la détoxification des ROS dans les CSC.

CSC, contrôle du cycle cellulaire et réparation des dommages à l'ADN

Le contrôle du cycle cellulaire est un élément essentiel de la réponse à l'irradiation. En effet, de nombreux travaux assez anciens indiquent que la radiosensibilité des cellules change en fonction de leur position dans le cycle cellulaire. Les cellules mitotiques sont définies comme plus sensibles aux effets des radiations ionisantes, tandis que les cellules quiescentes seraient plus résistantes. C'est le cas par exemple des cellules souches hématopoïétiques ou épidermiques qui, maintenues généralement dans un état quiescent, sont moins sensibles aux stress génotoxiques et présentent de plus un système de réparation des cassures plus efficace (Maugeri-Sacca et al, 2012). Le blocage du cycle en cas de cassures de l'ADN permet la réparation des dommages. Outre la surexpression des défenses contre les ROS radioinduits, des modifications du contrôle du cycle cellulaire et de la réparation des dommages à l'ADN pourraient donc expliquer la radiorésistance des CSC (Moncharmont et al, 2012). Précédemment, nous avons vu que l'activation des voies ATM/ATR/Chk1/Chk2 en réponse à une irradiation permet le blocage du cycle cellulaire et la réparation des cassures de l'ADN.

Les travaux de Bao et al. et de Eyler et al. ont montré que la radiorésistance des CSC de gliome repose sur l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire : les cellules CD133⁺ activeraient mieux les checkpoints de mitose en réponse aux dommages à l'ADN, en particulier grâce aux protéines ATM et Chk1. La radiorésistance des CSC peut de plus être abrogée par inhibition de Chk1 et Chk2 (Bao et al, 2006; Eyler & Rich, 2008). Plusieurs travaux ont suggéré un meilleur contrôle du cycle cellulaire et une efficacité de réparation des cassures accrue dans les CSC de pancréas, prostate, colon, poumon, mélanome... (Mathews et al, 2011a; Mathews et al, 2011b)

Karimi-Busheri et al. ont étudié la réponse à l'irradiation des CSC de type CD24⁻/CD44⁺ de la lignée mammaire MCF-7, cultivée sous forme de mammosphères (Karimi-Busheri et al, 2010). Ainsi, le niveau constitutif de ROS est moins élevé dans les mammosphères que dans les cellules adhérentes, mais l'induction des ROS par l'irradiation est la même dans ces deux populations. Les CSC présentent un meilleur système de réparation des cassures simples brins. En revanche, la formation et la vitesse de réparation des cassures double brin est équivalente dans les deux sous-populations, alors que les CSC présentent un niveau plus important d'ATM phosphorylé avant et après irradiation. Les quantités de protéines Chk1 et Chk2 sont plus élevées dans les CSC, mais présentent un niveau de phosphorylation plus

faible. Ces auteurs ont ensuite étudié la sénescence radioinduite dans les CSC, évaluée par l'activité télomérase et une faible expression de la protéine p21. La sénescence est réduite dans les cellules CD24⁻/CD44⁺. Karimi-Busheri et al. concluent que la dérégulation des voies impliquant la télomérase et contrôlant la sénescence dans les CSC permettrait à ces cellules de mieux survivre à l'irradiation. Finalement les auteurs proposent que la protéine ATM, plus activée dans les CSC, pourrait permettre une réparation plus efficace des cassures de l'ADN radioinduites, sans toutefois montrer ici de différences de réparation entre les CSC et non-CSC. Les travaux de Yin et al. ont confirmé l'activation d'ATM dans les CSC (Yin & Glass, 2011). Ces auteurs proposent que les cellules de type CD24⁻/CD44⁺ de différentes lignées de cancer du sein seraient plus radorésistantes que les cellules CD24⁺/CD44⁻. Cette radorésistance ne dépendrait pas de différences d'activation du NHEJ, ni de différences en nombre de foci γ -H2AX, et les auteurs n'ont pas recherché de différences d'activation de la voie HR (recombinaison homologue). En revanche, la phosphorylation de la kinase ATM est plus importante et dure plus longtemps dans les CSC après irradiation, indiquant potentiellement un meilleur contrôle de la réparation de l'ADN en réponse au stress cellulaire. La molécule KU-55933, un inhibiteur d'ATM, permet de réduire la radorésistance des cellules CD24⁻/CD44⁺ dans ces lignées et dans des cellules primaires tumorales.

Kim et al. ont très récemment publié un article en opposition avec les données présentées précédemment (Kim et al, 2012). Ainsi, ces auteurs suggèrent grâce à des expériences de clonogénicité que les CSC sont plus radiosensibles que les cellules non-CSC, et que cette radiosensibilité serait liée à un défaut d'activation d'ATM dans ces cellules. Il me semble toutefois que le matériel cellulaire utilisé dans ces travaux est inadapté. Les auteurs ont utilisé deux lignées cellulaires mammaires de phénotype CD24⁻ : MDA-MB-453 et MDA-MB-231. Afin de créer des « cellules pseudo-souches », ils ont surexprimé Oct3/4 dans ces lignées, avec pour résultat une induction de CD44 dans la lignée MDA-MB-453, tandis que la lignée MDA-MB-231 est déjà naturellement CD44⁺. Les propriétés étudiées par ces auteurs sont donc celles de cellules Oct3/4⁺ et non pas réellement de CSC de type CD24⁻/CD44⁺.

Enfin, différents travaux ont montré l'implication de la voie Wnt/ β caténine dans le contrôle du cycle cellulaire et la tolérance aux dommages de l'ADN (Eyler & Rich, 2008). Or, Woodward et al. ont montré une surexpression de cette voie dans les CSC mammaires irradiées (Woodward et al, 2007). Les travaux de Zhang et al. ont également montré une implication des voies PI3K/Akt et Wnt/ β caténine dans la radorésistance des CSC murines de type Lin⁻/CD24⁺/CD29⁺ (Zhang et al, 2010). Ces voies pourraient donc également être impliquées dans la radorésistance des CSC.

L'ensemble de ces résultats suggère que la radiorésistance des CSC mammaires serait due en partie à un meilleur système de contrôle du cycle cellulaire grâce à l'activation d'ATM, en réponse aux radiations ionisantes, ainsi qu'à un contrôle de la sénescence radioinduite. Par contre, des différences dans l'efficacité de réparation des cassures n'ont pas été démontrées. Paradoxalement, des cellules quiescentes, normales ou cancéreuses, subissant des cassures doubles brins sont réparées par le système NHEJ qui autorise les erreurs. Lorsque ces erreurs de réparation concernent des cellules souches, elles peuvent être transmises à la descendance, et favoriser un contexte d'instabilité génétique (Maugeri-Sacca et al, 2012).

Projet de recherche et résultats

Comme nous l'avons vu précédemment, différentes données de la littérature indiquent que les cellules cancéreuses mammaires humaines sont relativement réfractaires à une apoptose immédiate, suite à une irradiation ou à l'administration de drogues induisant des dommages de l'ADN, aussi bien *in vivo* que *in vitro* (Gewirtz, 2000). En revanche, cela ne signifie pas que ces cellules sont radiorésistantes à long terme, en effet leur capacité d'auto-renouveau est quasiment perdue après traitement.

Lorsque l'on irradie des lignées de cellules cancéreuses mammaires à forte dose (10 Gray), la première réponse est essentiellement un arrêt prolongé de croissance (blocage en phase G2/M), suivi au bout de plusieurs jours d'une forte mortalité dans un contexte de catastrophe mitotique (Luce et al, 2009). Cette mortalité peut durer plusieurs semaines et s'accompagne d'une forte instabilité génétique. Il a été observé au laboratoire qu'à long terme après irradiation seul un très petit nombre de cellules est capable de proliférer normalement et de donner une descendance, ce qui se traduit selon les lignées étudiées par une efficacité de clonage se situant entre 10^{-6} et 10^{-4} après une irradiation de 10 Gy. Ces cellules radiorésistantes « survivantes » ont une importance capitale, car elles sont par définition à la base de la rechute thérapeutique, suite à une radiothérapie. De plus, des travaux réalisés au laboratoire ont montré que la descendance des cellules mammaires irradiées présente une instabilité génétique accrue, alors que les cellules prolifèrent normalement, cette instabilité persistant pendant plus 35 doublements de population. L'instabilité génétique se traduit par l'apparition de cassures chromosomiques spontanées, ainsi que par une proportion importante de cellules polyploïdes dans la population. Là encore, cette instabilité à long terme, que l'on peut définir comme un effet « non ciblé » des radiations ionisantes, indique que les cellules qui échappent à la catastrophe mitotique radio-induite transmettent une prédisposition accrue à acquérir des mutations génétiques. Cette instabilité est donc potentiellement associée à l'acquisition par les cellules instables de nouvelles propriétés en termes d'agressivité et de progression tumorale.

Mon travail de thèse s'inscrit dans la caractérisation des cellules radiorésistantes des cancers du sein, survivant à la catastrophe mitotique, et qui sont à l'origine d'une descendance présentant une instabilité chromosomique persistante. Une des pistes pour aborder la caractérisation de cette sous-population est l'utilisation de marqueurs utilisés dans la littérature pour identifier, au sein des tumeurs, une sous population de cellules de type souches. Les « Cellules Souches Cancéreuses » (CSC) sont définies comme une sous-

population cellulaire présentant une capacité accrue à induire des tumeurs et à proliférer. Le caractère « souche » serait réversible, et modulé par des mécanismes de type épigénétique. Il est important de noter que ces CSC sont définies comme relativement radiorésistantes, et ont été placées au centre de la résistance thérapeutique et de la récurrence tumorale après traitement (Bao et al, 2006; Phillips et al, 2006). Toutefois, la théorie des CSC est actuellement remise en cause par l'observation d'une plasticité cellulaire plus importante que celle décrite initialement par ce modèle, ainsi que par la confusion résultant du grand nombre de marqueurs proposés, aucun de ces marqueurs n'étant validé pour un usage clinique.

Au cours de mon travail de thèse, j'ai donc étudié plusieurs marqueurs de CSC mammaires afin de caractériser les cellules survivantes à une irradiation à forte dose, pour ainsi clarifier le rôle des CSC dans la radiorésistance et dans l'établissement d'une instabilité génétique radio-induite. Les travaux entrepris au cours de la première partie de ma thèse ayant permis de mettre en lumière l'importance d'un marqueur en particulier, CD24, je me suis ensuite intéressée au rôle de la protéine CD24 en tant qu'acteur à la fois dans le maintien du phénotype « CSC mammaire » et dans la réponse à l'irradiation. Pour réaliser ce travail, j'ai utilisé un ensemble de lignées de cellules cancéreuses mammaires humaines présentées dans le tableau suivant (Neve et al, 2006).

Tableau 1 : Caractéristiques des lignées tumorales mammaires étudiées au laboratoire

Lignée	ER	PR	HER2	Type histologique	Tumorigénicité (souris athymique)	Sous-type	Fraction CD24 ⁺ /CD44 ⁺
T-47D	+	+	-	Carcinome ductal infiltrant	Faible	Luminal Epithélial	< 0,5 %
MCF7	+	+	-	Adénocarcinome	Faible	Luminal Epithélial	< 0,5 %
BT-20	-	-	-	Carcinome ductal infiltrant	Modérée	Basal A Epithélial	15-20 %
MDA-MB-157	-	-	-	Carcinome métaplasique	Forte	Basal B Mésoenchymateuse	65-75 %
MDA-MB-436	-	-	-	Adénocarcinome	Forte/métastatique	Basal B Mésoenchymateuse	> 95 %
MDA-MB-231	-	-	-	Adénocarcinome	Forte/métastatique	Basal B Mésoenchymateuse	> 95 %

Ces lignées sont en partie représentatives de l'hétérogénéité des cancers du sein, elles proviennent de différents types tumoraux et présentent des niveaux de tumorigénicité variables chez la souris athymique. Il est intéressant de noter que le taux de cellules $CD24^{-low}/CD44^{+}$, un des principaux marquages utilisés pour caractériser les CSC mammaires, est corrélé avec la tumorigénicité chez la souris athymique et le classement des lignées en sous-types. Ainsi, les lignées de type basal-like et mésenchymateuses présentent la plus forte proportion de cellules $CD24^{-}/CD44^{+}$. Enfin, des travaux réalisés au laboratoire ont montré que ces différentes lignées présentent toutes un arrêt prolongé en phase G2/M suite à une irradiation à forte dose, une mort tardive débutant au bout de 2 à 4 jours après irradiation, et une forte instabilité génétique, la catastrophe mitotique se prolongeant pendant plusieurs semaines.

La première partie de mon travail a mis en évidence le rôle joué par les cellules $CD24^{-/low}$ dans la transmission de l'instabilité génétique radioinduite différée. De nombreux marqueurs de CSC différents ayant été proposés dans la littérature, nous avons montré que seul le marqueur CD24 permet d'identifier les cellules résistantes à l'irradiation. Ainsi, seules les cellules mammaires de type $CD24^{-}$ survivent et sont sélectionnées après une irradiation γ . Ces cellules pourraient donc être impliquées directement dans la transmission de l'instabilité génétique. Classiquement, on définit les CSC, de même que les cellules souches normales, comme relativement stables génétiquement, grâce à des mécanismes de défense et de réponse au stress plus efficaces (Bao et al, 2006; Diehn et al, 2009). Nous avons donc cherché à savoir si les cellules $CD24^{-}$ potentiellement impliquées dans la transmission de l'instabilité génétique à leur descendance, présentaient une instabilité de base ou radioinduite différente des autres cellules. Nous avons ainsi montré que les cellules $CD24^{-}$ survivantes à l'irradiation sont relativement stables, mais ont acquis la capacité de transmettre une instabilité génétique persistante à leur descendance. Cette instabilité génétique ne s'exprime que dans les cellules descendantes portant le phénotype $CD24^{+}$, suggérant fortement l'implication de mécanismes épigénétiques. Ce travail a fait l'objet d'une publication (Bensimon et al, 2013).

Suite à ces observations, la seconde partie de mon travail a porté sur la mise en évidence du rôle joué par CD24 dans l'établissement du phénotype de CSC mammaires et dans la réponse à l'irradiation. En effet, si l'expression de CD24, en association avec CD44, est le marquage le plus utilisé et le mieux documenté pour caractériser les CSC mammaires, en revanche son rôle biologique dans les cancers reste pratiquement inconnu. Tout d'abord, les études

cliniques ne montrent pas de corrélation claire entre l'expression de CD24 et les facteurs histopathologiques de la tumeur, le grade, les métastases, le traitement, la survie globale... De plus, les travaux ayant cherché à modifier l'expression de la protéine CD24 pour déterminer son rôle dans la progression tumorale mammaire humaine sont peu nombreux et contradictoires. Enfin, aucune étude n'a cherché à établir un rôle de CD24 comme acteur de la réponse cellulaire à l'irradiation. Dans ce contexte, nous avons modulé l'expression de CD24 dans 2 lignées mammaires humaines, par surexpression ou inhibition de son ARN messager. Dans un premier temps, nous avons montré que l'inhibition de l'expression de CD24 induisait à elle seule une partie des propriétés biologiques classiquement associées aux CSC: régulation de la prolifération cellulaire *in vitro* et *in vivo*, contrôle du taux de ROS intracellulaires et baisse de l'instabilité chromosomique. Ces phénotypes étant classiquement associés à la radorésistance, nous avons par la suite mis en évidence une modification de la radiosensibilité des cellules transfectées, en termes de mort cellulaire radio-induite et de capacité à générer une descendance après irradiation. Enfin, cette modulation de la radorésistance apparait liée à la baisse du niveau de ROS intracellulaires dans les cellules CD24⁻ après irradiation. Ces résultats indiquent que CD24 n'est pas uniquement un marqueur de CSC mammaires, mais qu'il peut être défini comme un acteur de ce phénotype, en étant un modulateur important de la réponse à l'irradiation.

Article I

Le marqueur de cellules souches cancéreuses CD24^{/low} définit une population de cellules radiorésistantes, impliquées dans la mémorisation et la transmission de l'instabilité génomique radioinduite

CD24^{/low} stem-like breast cancer marker defines the radiation-resistant cells involved in memorization and transmission of radiation induced genomic instability

Présentation de l'article I

Dans cette partie il sera fait référence aux figures et tableaux de l'article I

Les cellules cancéreuses mammaires irradiées meurent dans un contexte de catastrophe mitotique, qui s'accompagne d'une forte instabilité génétique. Certaines cellules survivent à l'irradiation et se divisent, générant une descendance génétiquement instable. Des données de la littérature suggèrent que les cellules souches cancéreuses sont plus résistantes à l'irradiation que les cellules cancéreuses non souches, indiquant que ces CSC pourraient constituer la fraction cellulaire survivant à l'irradiation, capable de se diviser et de générer une descendance. Les CSC joueraient donc un rôle dans la mémorisation et la transmission de l'instabilité génétique radioinduite.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons dans un premier temps démontré que l'instabilité génétique est transmise à la descendance des cellules irradiées. Des cellules T-47D et BT-20 ont été irradiées à une dose unique de 10 Gy, entraînant une mort massive durant les 2 à 3 semaines suivant l'irradiation. 3 à 4 semaines après irradiation, on observe l'apparition dans la culture de clones proliférant normalement. Ces clones présentent un nombre élevé de cassures chromosomiques (figures 1 a et c), et une proportion élevée de cellules polyploïdes (figures 1 b et d), signes d'une instabilité génétique persistante. Cette instabilité est particulièrement importante 3 à 4 semaines après irradiation, puis décroît mais reste élevée jusqu'à 9 semaines après irradiation, soit durant 35 générations environ. Ces résultats indiquent qu'une instabilité génétique persistante est transmise par les cellules cancéreuses mammaires irradiées à leur descendance, et perpétuée durant de nombreuses générations.

Les CSC ont été décrites comme résistantes à l'irradiation, et de nombreux marqueurs de CSC mammaires différents ont été proposés dans la littérature. Nous avons donc recherché lequel de ces marqueurs permet de caractériser une population radiorésistante. Les lignées T-47D, BT-20, MDA-MB-231 et MDA-MB-157 (tableau 1) présentent des proportions variables de cellules ALDH⁺, SP, CD24⁻, CD44⁺, ESA⁺ et PROCR⁺ (tableau 2). 2 à 4 semaines après irradiation, seule la sous-population CD24⁻ est enrichie dans la population cellulaire, dans toutes les lignées étudiées, proportionnellement au taux initial de cellules CD24⁻ (figure 2 b). Cet enrichissement est transitoire, et la proportion de cellules CD24⁻ retrouve sa valeur initiale 5 à 9 semaines après irradiation, c'est-à-dire lorsque les cellules recommencent à proliférer normalement. Nous avons donc utilisé le marqueur CD24 pour identifier les cellules radio-résistantes, capables de générer une descendance à long terme après irradiation.

Afin d'étudier les propriétés des cellules CD24⁻, nous avons dans un premier temps irradié des cellules CD24⁻ et CD24⁺ triées à partir des lignées T-47D et BT-20. Nous avons montré que seules les cellules CD24⁻ sont capables de générer une descendance après irradiation, tandis que les cellules CD24⁺ meurent dans un contexte de catastrophe mitotique sans générer de descendance (figures 3 a et b). Nous avons de plus confirmé que la descendance des cellules CD24⁻ irradiées se compose de cellules CD24⁻ et CD24⁺ en proportions identiques à celles observées dans la population initiale (figure 3 c). Ces résultats indiquent que seules les cellules CD24⁻ survivent à une irradiation de 10 Gy, et que leur différenciation en cellules CD24⁺ reconstitue l'hétérogénéité initiale.

Finalement, nous avons voulu savoir si les cellules CD24⁻ résistantes à l'irradiation transmettent une instabilité génétique à leur descendance. Pour cela, nous avons dans un premier temps étudié l'instabilité génétique des cellules CD24⁻ 3 semaines après irradiation. Nous avons montré que la forte instabilité génétique observée dans la population globale à cette période n'est pas due aux cellules CD24⁻ survivantes, mais plutôt à l'ensemble des cellules parentales CD24⁺ restant en culture. Nous avons ensuite quantifié l'instabilité génétique dans la descendance des cellules CD24⁻ irradiées, et montré que cette instabilité est portée uniquement par les cellules descendantes de type CD24⁺ (figure 4).

Les cellules CD24^{-/low} sont donc capables de transmettre une « mémoire » de l'irradiation se traduisant par une instabilité génétique dans les cellules descendantes non irradiées, probablement par des mécanismes de type épigénétique. Par ailleurs, outre ce résultat novateur sur un effet non ciblé des radiations ionisantes, on attribue aussi pour la première fois un rôle aux cellules de type souche cancéreuses CD24^{-/low} dans la mesure où elles semblent médier la transmission de l'instabilité génétique au cours des générations (figure 5). Il apparaît donc que les CSCs pourraient jouer un rôle délétère dans le processus de rechute après radiothérapie. Considérant leur radiorésistance potentielle, les CSCs irradiées survivantes contribueraient à l'acquisition par la tumeur d'un phénotype plus agressif.

ORIGINAL ARTICLE

CD24^{-/low} stem-like breast cancer marker defines the radiation-resistant cells involved in memorization and transmission of radiation-induced genomic instability

J Bensimon¹, S Altmeyer-Morel¹, H Benjelloun², S Chevillard¹ and J Lebeau¹

A growing body of evidence attributes properties of chemo- and/or radiation-resistance to cancer stem cells (CSCs). Moreover, non-targeted delayed effects such as genomic instability, transmitted through many generations, can be observed in the progeny of surviving irradiated cells. As a consequence, we propose that radiation-resistance properties associated to CSCs could confer a key role to this subpopulation in the transmission of genomic instability. To test this hypothesis, we searched the CSC markers associated to radiation-resistance in breast cancer cell lines and studied the role of the resistant cells in the transmission of genomic instability. First, we show that irradiation induces a 2–4 weeks period of intense cell death leading to the emergence of chromosomal unstable cells during more than 35 population doublings. Then, among seven breast CSC markers, we identify CD24^{-/low} labelling as a marker of radiation-resistance. We demonstrate that CD24⁺ progeny of irradiated cells exclusively descends from CD24^{-/low} cells. Finally, we show that delayed chromosomal instability is only expressed by CD24⁺ cells, but is transmitted by stable surviving CD24^{-/low} cells. So, for the first time a CSC marker, CD24, is associated with the transmission of genomic instability. This work may assign a new deleterious role to breast CSCs in aggressive recurrence after radiotherapy, as the transmitted genomic instability potentially leads tumour cells to acquire more aggressive characteristics.

Oncogene (2013) 32, 251–258; doi:10.1038/onc.2012.31; published online 13 February 2012

Keywords: radiation effects; breast cancer stem cells; genomic instability

INTRODUCTION

Over the last two decades, experimental data indicate that the biological effects of ionizing radiation (IR) are not restricted to directly irradiated cells (targeted effects), but are also observed in non-irradiated cells and/or in the progeny of irradiated cells (non-targeted effects). These effects include bystander effects and genomic instability. Genomic instability is characterized by delayed effects such as delayed reproductive death, chromosomal instability and mutagenesis.^{1–3} IR can lead to the appearance of chromosomal aberrations arising *de novo* in the cell progeny several generations after irradiation. Delayed genomic instability has been observed in many types of mammalian cells, particularly in mammary epithelial cells.^{4,5} However, the mechanisms underlying the initiation / manifestation of radiation-induced chromosomal instability are far from understood. To explain the perpetuation of this phenomenon, the presence of a mechanism by which exposed cells transmit the memory of irradiation through their progeny has been postulated.⁶ This attractive idea strongly suggests the existence of epigenetic mechanisms driving the radiation-induced instability, memorized and transmitted by non-directly irradiated surviving cells.

This hypothesis, never supported by any evidence, assigns a crucial role to the potentially radioresistant subpopulation surviving the initial radiation exposure, in terms of generation of the progeny of irradiated cells and in transmission of radiation memory. Such characteristics have been associated with a limited subpopulation of tumour cells called tumour-initiating cells or

cancer stem cells (CSCs).⁷ CSCs display stem-like characteristics and were initially defined as cells endowed with long-term self-renewal and a differentiation capacity. In solid tumours, CSCs are thought to represent a small proportion of the tumour cells, able to form colonies in an *in vitro* clonogenic assay and to form tumours in an *in vivo* assay.⁸ In breast cancer, CSCs were first described as a population bearing the ESA⁺/CD44⁺/CD24⁻ phenotype, with a 50-fold higher ability to form tumours in immunodeficient mice and capable of differentiation into distinct cellular subtypes.⁹ In breast cancer cell lines, CD44⁺/CD24⁻ cells were also described as a subpopulation bearing an invasive capacity and a genetic signature underlying an aggressive phenotype.^{10,11} Breast CSCs have been characterized by many markers in the literature, CD44⁺/CD24^{-/low} being the more widely used marker, but others have also been associated with CSC characteristics: presence of a side population (SP) (Hoechst 33342 exclusion), aldehyde dehydrogenase activity, and other prospective markers as CD133⁺, ESA⁺, PROCR⁺ and CXCR4⁺.¹² As the subpopulations detected by these markers only partially overlap, controversy about the specificity of these markers remains. However, it has been proposed that several stem/progenitor cell-like populations can coexist in breast tumours and/or that cells characterized by an association between these different markers would present enhanced invasion properties.^{12,13} *In vitro* and *in vivo*, CSCs are capable of asymmetric division, that is, few daughter cells maintaining the CSC pool and the others differentiating into tumour cells.^{12,14} Recent experimental data

¹CEA, DSV, iRCM, SREIT, Laboratoire de Cancérologie Expérimentale (LCE), Fontenay-aux-Roses, France and ²CEA, DSV, iRCM, SCSR, plateforme de tri cellulaire, Fontenay-aux-Roses, France. Correspondence: Dr J Lebeau, CEA, DSV, iRCM, SREIT, Laboratoire de Cancérologie Expérimentale (LCE), Fontenay-aux-Roses F-92265, France. E-mail: jerome.lebeau@cea.fr

Received 6 October 2011; revised 16 December 2011; accepted 3 January 2012; published online 13 February 2012

support the concept that CSCs are more radioresistant and chemoresistant than their non-stem counterparts.^{15–17} In breast tumour cells, radioresistance of CSCs has been related to lower radical oxygen species levels and enhanced radical oxygen species defences,^{18,19} as well as low proteasome activity.²⁰

Taken together, these data strongly suggest that CSCs could have an important role in radiation-induced genomic instability. We have previously shown that γ -irradiation of breast cancer cell lines led to delayed cell death in a context of great genomic instability.²¹ Therefore, if CSCs are radioresistant, they could be potentially involved in the transmission of the memory of radiation-induced chromosomal instability. To test this hypothesis, we have studied delayed chromosomal instability and the expression of CSC markers in the progeny of irradiated cancer cells. We show that chromosomal instability can be observed for more than 35 doubling populations after radiation exposure and that progeny of irradiated cells arises exclusively from CD24^{-/low} cells. Delayed chromosomal instability is only observed in CD24⁺ cells, but is transmitted by stable CD24^{-/low} cells. Overall these results define the CD24^{-/low} cells as potential mediators of the memory of radiation-induced chromosomal instability.

RESULTS

IR induces long-term genomic instability in breast cancer cell lines

To investigate the ability of high-dose irradiation to produce delayed genomic aberrations in breast cancer cell lines, T-47D cells were 10 Gy-irradiated and studied for 10 weeks. As described previously,²¹ an early mitotic blockade was followed 5 days after radiation exposure by a mitotic catastrophe associated with apoptosis, resulting in the death of more than 95% of irradiated cells during the first 2 weeks after irradiation. Few cell clones appeared in the culture 3 to 4 weeks after irradiation (plating efficiency between 2×10^{-4} and 4×10^{-4})²¹ with a growth rate similar to non-irradiated cells. Analyses of surviving cells showed a large increase in chromosomal breaks and an increased proportion of polyploid cells (Figures 1a and b) 3 to 4 weeks after irradiation. Then, the number of chromosomal breaks decreased but remained significantly high 9 weeks after irradiation (Figure 1a), whereas the proportion of polyploid cells remained high 7 weeks after irradiation (Figure 1b).

The same results were observed when another breast cancer cell line, BT-20, was 10 Gy-irradiated. After a wave of cell death after 3–4 weeks followed by an almost fully clonogenic survival inhibition (plating efficiency $\sim 10^{-3}$), a large increase in chromosomal breaks and the polyploid cell population was observed, both remaining significantly higher than in non-irradiated cells more than 9 weeks after irradiation, corresponding to more than 35 population doublings (Figures 1c and d).

Taken together, these results indicate that long-term persistent genomic instability is observed in breast cancer cell lines after a 10-Gy irradiation and that this instability can be transmitted through many cell generations.

IR selectively enriches the CD24^{-/low} subpopulation in breast cancer cell lines

To characterize the cell subpopulation that survives after irradiation, expression of seven breast CSC markers was monitored by flow cytometry analysis on four breast cancer cell lines (Table 1). Aldehyde dehydrogenase activity, SP cells and five cell surface markers: CD133⁺, PROCR⁺, ESA⁺, CD44⁺ and CD24^{-/low} showed heterogeneous expression in the cell lines (Table 2).

To identify if these markers could be associated with radioresistance, the cell lines were 10 Gy-irradiated and expression of the markers was studied 2 to 4 weeks after irradiation on the surviving cells. No significant variation of expression was observed between non-irradiated control cells and irradiated cells for

aldehyde dehydrogenase activity, CD133, PROCR, ESA and CD44 (Supplementary Figure S1). After irradiation, a strong increase in SP cells proportion was observed for T-47D and MDA-MB-157, but not for BT-20 and MDA-MB-231 cell lines (Figure 2a and Supplementary Figure S1). Therefore, SP did not seem to be a general marker of surviving breast cancer cells. Interestingly, irradiation induced a decrease in the CD24⁺/CD24^{-/low} ratio in T-47D, BT-20 and MDA-MB-157 cells, but not in MDA-MB-231 cells, which did not express CD24 before or after irradiation (Figure 2b and Supplementary Figure S1). This variation was observed 2 to 4 weeks after irradiation and was proportional to the CD24^{-/low} population before irradiation. Moreover, it was a transitory phenomenon as the CD24⁺ cell population progressively increased in a cell line-dependent fashion and reached its initial level 5 to 9 weeks after irradiation.

Altogether, these results indicate that CD24 expression and the SP phenotype displayed different expression levels after a 10-Gy irradiation, as compared with control cells. Although this increase in SP after irradiation is not a general property of the studied cell lines, the CD24⁺ cell population decrease after irradiation was seen in the three cell lines expressing the CD24 marker. Thus, we used this marker to characterize radiation-resistant cells and their role in the transmission of chromosomal instability through the progeny of irradiated cells.

Progeny of irradiated cells exclusively arises from CD24^{-/low} breast cancer cells

To understand why CD24^{-/low} cells are transiently selected and/or induced by 10-Gy irradiation, we analysed the relationship between CD24 expression and intrinsic radiosensitivity. CD24^{-/low} and CD24⁺ cells from BT-20 and T-47D cell lines were sorted and 100 000 cells of each subpopulation were then plated and immediately irradiated. Cells were counted every week for 6 weeks. For both cell lines, CD24⁻ as well as CD24⁺ cells died after exposure over a period of 3 weeks (Figure 3a). After this period, while irradiated CD24⁺ cells mainly appeared as giant cells, did not grow and progressively disappeared, a few phenotypically normal clones with a proliferation rate similar to that of control cells emerged in CD24^{-/low} irradiated cells (Figure 3b).

As decreased CD24 expression after irradiation is a transitory phenomenon, surviving CD24^{-/low} cells were sorted 3 weeks after irradiation, and 3 to 7 days after sorting CD24 labelling was performed. In the two cell lines, the sorted CD24^{-/low} subpopulation could give rise to CD24⁺ cells (Figure 3c), indicating that CD24^{-/low} cells are able to resume the initial CD24⁻/CD24⁺ ratio.

Taken together, these results indicate that progeny of irradiated cells exclusively descends from CD24^{-/low} cells. Furthermore, the capacity of CD24^{-/low} cells to differentiate into CD24⁺ cells leads to the reconstitution of the initial CD24⁻/CD24⁺ ratio in the progeny. Finally, the enrichment in CD24^{-/low} cells after irradiation might be due to selection of CD24^{-/low} cells rather than to a CD24⁺ to CD24^{-/low} cell transition.

Genomic instability is transmitted by CD24^{-/low} cells but is observed in the CD24⁺ progeny

As observed above, long-term chromosomal instability occurs in the progeny of irradiated breast cancer cells, and this progeny arises from CD24^{-/low} cells. To determine any correlation between CD24 expression and chromosomal instability in irradiated cells, CD24^{-/low} cells from T-47D and BT-20 were sorted 3 weeks after irradiation (W3-CD24^{-/low}) and chromosomal rearrangements were compared with those in the whole-cell population (W3-total) (Figures 4a and b). Irradiated T-47D cells displayed a lower level of chromosomal breaks in W3-CD24^{-/low} cells than in W3-total cells (28 vs 403 breaks/100 metaphases, $P=0.001$) and the W3-CD24^{-/low} instability was not statistically different from that in the non-irradiated control cells (28 vs 15 breaks/100 metaphases,

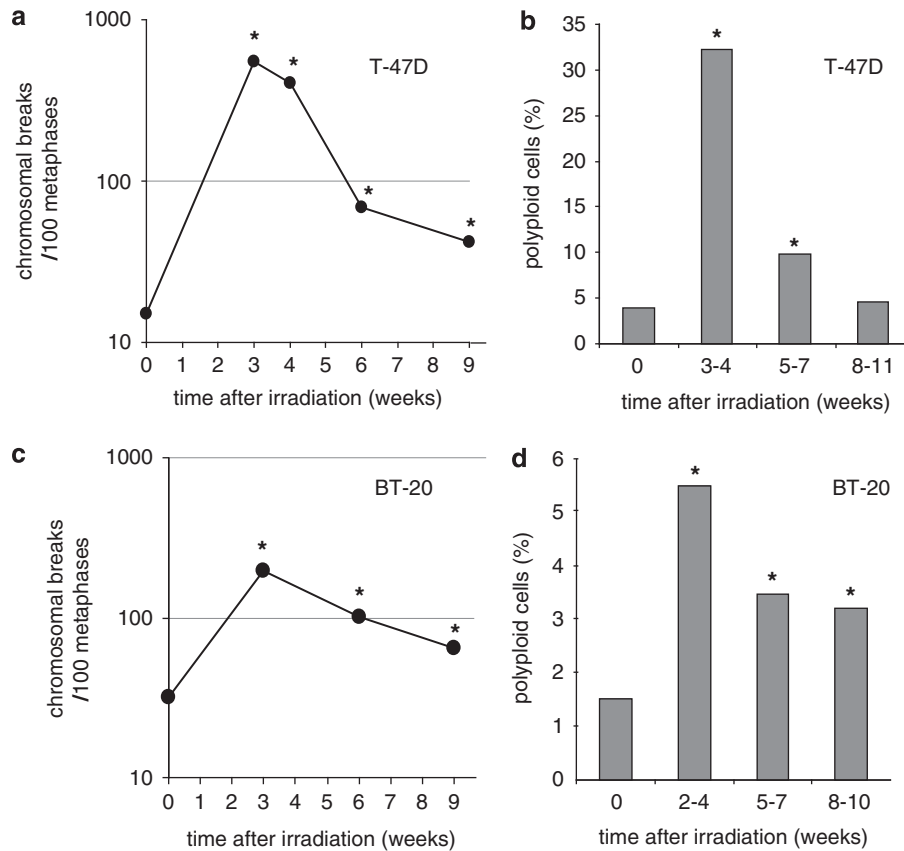


Figure 1. High-dose γ -irradiation induces long-term chromosomal instability in breast cancer cell lines. **(a, c)** Total numbers of chromosomal breaks for 100 metaphases at various times after 10 Gy irradiation of T-47D cells **(a)** and of BT-20 cells **(c)**. In these studies, numbers of breaks presented correspond to the sum of breaks obtained from two to three independent experiments. **(b, d)** Percentage of polyploid T-47D and BT-20 cells at various times after 10 Gy irradiation. Results correspond to the mean \pm s.d. of two independent experiments. (For all figures, *0 Gy vs 10 Gy, $P < 0.05$).

Table 1. Biological characteristics of the breast cancer cell lines

	T-47D	BT-20	MDA-MB-157	MDA-MB-231
ER	+	-	-	-
PR	+	-	-	-
HER2	-	-	-	-
Histological type	Infiltrating ductal carcinoma	Infiltrating ductal carcinoma	Metaplastic carcinoma	Adenocarcinoma
Tumourigenicity	Non- or weakly tumourigenic	Moderate	Tumourigenic	Tumourigenic metastatic
Subtype	Luminal epithelial	Basal A epithelial	Basal B mesenchymal	Basal B mesenchymal

Abbreviations: ER, estradiol receptor; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; PR, progesterone receptor.

Table 2. Markers expression in human breast cancer cell lines

	ALDH	CD133	PROCR	ESA	CD44	CD24	SP
T-47D	+	0	++	+++	+	+++	-
BT-20	++	0	++	+++	+++	+++	+
MDA-MB-157	+	0	++	++	+++	++	-
MDA-MB-231	+	0	++	+++	+++	-	-

Abbreviations: ALDH, aldehyde dehydrogenase; SP, side population.
 0: 0%, -: 0.05-0.5%, +: 0.5-10%, ++: 10-90%, +++: 90-100%.

$P = 0.13$). Similarly, for irradiated BT-20 cells the rate of chromosomal breaks was significantly lower in W3-CD24^{-/low} cells than in W3-total cells (96 vs 198 breaks/100 metaphases, $P = 0.002$). However, in this case, chromosomal instability was

significantly higher in W3-CD24^{-/low} cells than in non-irradiated control cells (96 vs 32 breaks/100 metaphases, $P = 0.003$). Thus, 3 weeks after irradiation, chromosomal instability was essentially found in CD24⁺ cells, the rate of chromosomal breaks in CD24^{-/low} cells being higher but close to the rate observed in non-irradiated cells.

To evaluate genomic instability in the progeny of irradiated CD24⁻ cells, we performed a second cell sorting from W3-CD24^{-/low} cells, 9 weeks after irradiation (W9-CD24^{-/low} and W9-CD24⁺). For both cell lines, we observed that chromosomal instability was significantly lower in W9-CD24^{-/low} than in W9-CD24⁺ cells (T47D: 26 vs 71 breaks/100 metaphases, $P = 0.02$ and BT20: 44 vs 102 breaks/100 metaphases, $P = 0.001$). Chromosomal instability was not significantly different between W9-CD24^{-/low} cells and non-irradiated control cells, but was significantly higher in W9-CD24⁺ cells than in control cells (T-47D: 71 vs 15 breaks/

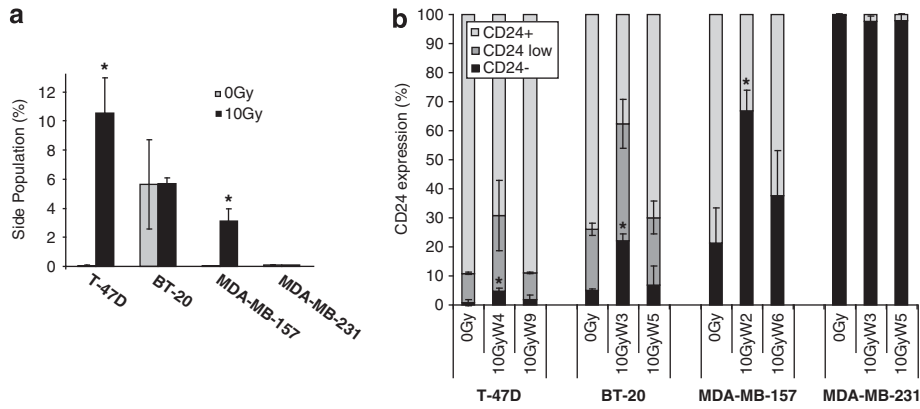


Figure 2. Expression of CSC markers after 10 Gy irradiation of breast cancer cell lines. (a) SP in non-irradiated and 10 Gy-irradiated cell lines. The SP was assessed before irradiation and 2–4 weeks after 10 Gy irradiation (T-47D: 3 weeks, BT-20: 2 weeks, MDA-MB-231: 1 week). The SP significantly increased with irradiation in T-47D and MDA-MB-157 (*0 Gy vs 10 Gy, $P < 0.05$). (b) CD24 expression in non-irradiated and 10 Gy-irradiated cell lines. CD24^{-/low} and CD24⁺ populations were assessed 2–4 weeks after irradiation and long term after irradiation. CD24⁻ and CD24^{low} populations increased in T-47D, BT-20 and MDA-MB-157 2–4 weeks after irradiation and returned to their baseline values more than 5 weeks after irradiation. (CD24⁻ rate, *0 Gy vs 10 Gy 2–4 weeks, $P < 0.05$).

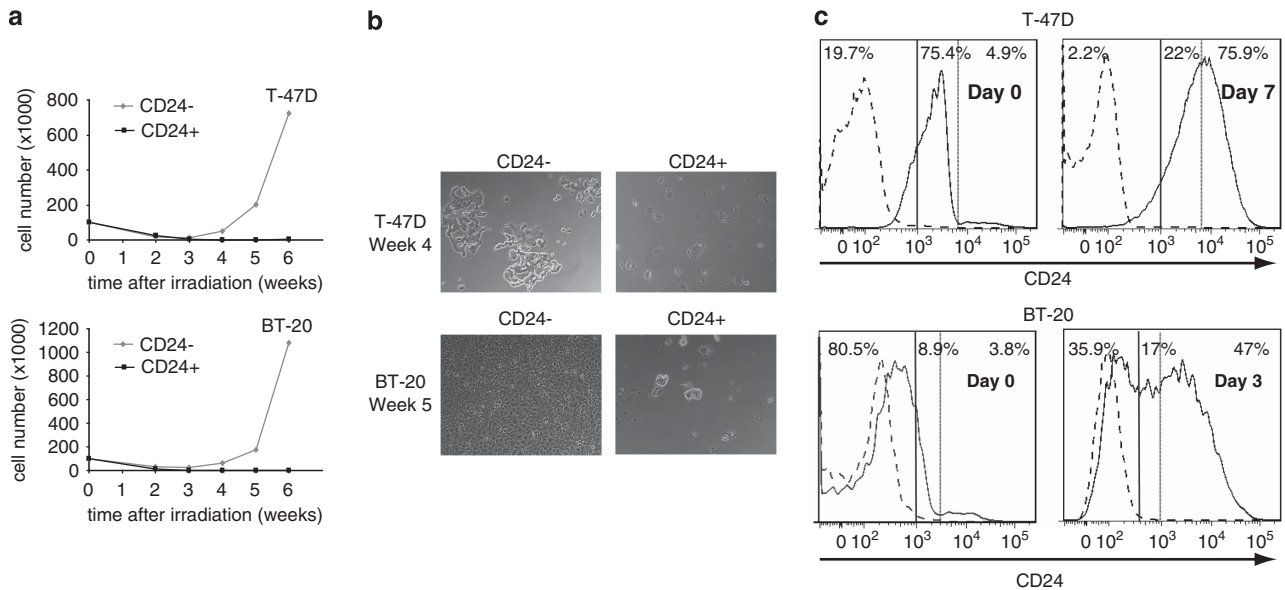


Figure 3. CD24^{-/low} cells are selected by 10 Gy irradiation and can resume the initial CD24⁻/CD24⁺ proportions. (a) Proliferation of 10 Gy-irradiated FACS-sorted CD24^{-/low} and CD24⁺ cells. T-47D and BT-20 were FACS-sorted, immediately 10 Gy-irradiated and 100 000 cells were plated. Viable cells were counted after trypan blue staining at different times after irradiation. Results presented are representative of three independent experiments. (b) Phase-contrast image of the progeny of 10 Gy-irradiated CD24^{-/low} and CD24⁺ cells, 4 weeks after irradiation (T-47D) or 5 weeks after irradiation (BT-20). (c) Short-term fate of irradiated CD24^{-/low} cells. Three weeks after 10 Gy irradiation of T-47D and BT-20 cells, FACS-sorted CD24^{-/low} cells were plated and CD24 expression was analysed by flow cytometry 3 and 7 days after irradiation.

100 metaphases, $P < 0.0001$ and BT-20: 102 vs 32 breaks/100 metaphases, $P = 0.001$). So, long-term chromosomal instability is essentially observed in CD24⁺ cells arising from irradiated CD24^{-/low} cells.

To confirm that long-term genomic instability is only the consequence of initial irradiation, we performed the same kind of study in non-irradiated cells. First, chromosomal breaks numbers in parental CD24^{-/low} and CD24⁺ cells displayed no statistical differences (Figures 4c and d: 0 Gy). Then, sorted CD24⁻ cells were long term cultivated and chromosomal breaks were scored again in CD24^{-/low} and CD24⁺ progeny. We observed the restoration of a strongly predominant CD24⁺ population (Supplementary Figure

S2). Furthermore, the level of chromosomal breaks in CD24^{-/low} and CD24⁺ cells remained low and statically identical to the level observed in parental subpopulation (Figure 4c and d: 0 Gy progeny). Finally, only W9-CD24⁺ cells express a strong genomic instability, when compared with W9-CD24⁻ cells, to non-irradiated parental cells and to non-irradiated CD24⁻ progeny (Figures 4c and d: W9).

As a second marker of genomic instability, we analysed the proportion of polyploid cells according to CD24 expression in the BT20 cell line (Figure 4e). In non-irradiated cells, the polyploid cell population was significantly higher in CD24^{-/low} cells than in CD24⁺ cells ($P < 0.05$), and 2 to 3 weeks after irradiation the

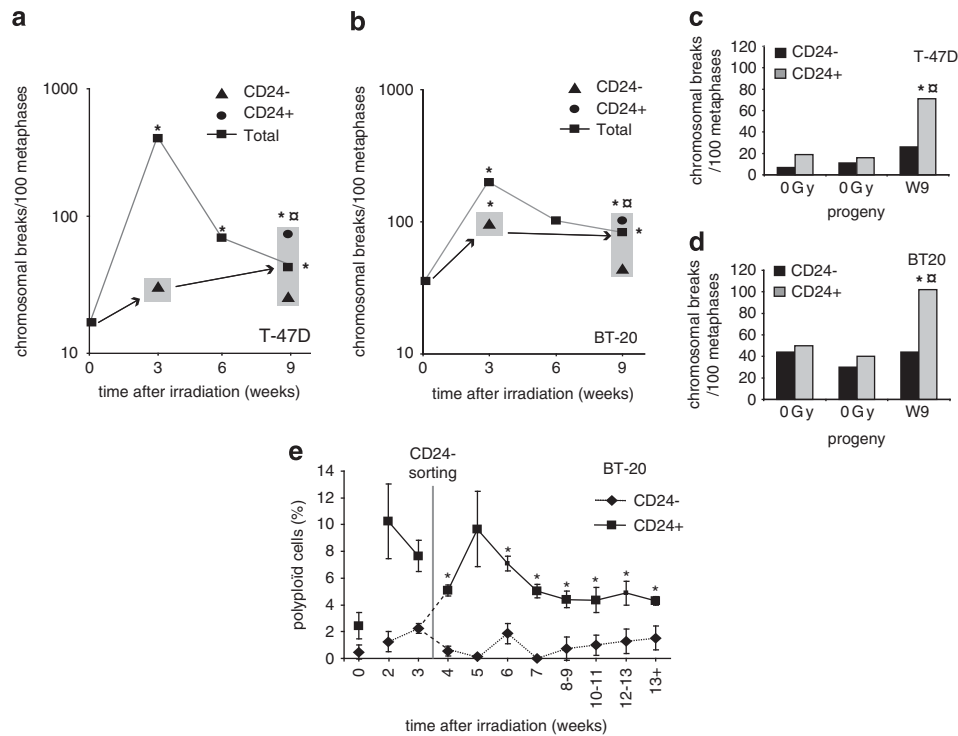


Figure 4. Radiation-induced chromosomal instability is observed essentially in CD24⁺ cells but is transmitted by CD24^{-/low} cells. **(a, b)** Total number of chromosomal breaks per 100 metaphases was scored in T-47D and BT-20 W3-CD24^{-/low} and in a second sorting from the progeny of CD24^{-/low} cells, W9-CD24^{-/low} and W9-CD24⁺ (arrows). Chromosomal breaks in total unsorted irradiated cells are also presented. **(c, d)** Number of chromosomal breaks per 100 metaphases was scored in sorted non-irradiated T47D and BT20 CD24^{-/low} and CD24⁺ cells (0 Gy). Sorted CD24^{-/low} cells were plated, and chromosomal breaks were scored in the CD24^{-/low} and CD24⁺ progeny (0 Gy progeny). Chromosomal breaks in W9-CD24^{-/low} and W9-CD24⁺ are also presented (W9). Numbers of breaks presented correspond to the sum of breaks obtained from two to three independent experiments. (*Analysis vs 0 Gy, $P < 0.05$ and □ Analysis vs corresponding CD24⁻, $P < 0.05$.) **(e)** Percentage of polyploid BT-20 cells in relationship with CD24 expression after 10 Gy irradiation. Concomitant analysis of DNA content and CD24 expression was performed in non-irradiated cells and 2 and 3 weeks after irradiation. Three weeks after irradiation, CD24^{-/low} cells were sorted and plated, and the analysis was performed for 10 weeks. Results correspond to the mean \pm s.d. of two independent experiments. (*Analysis vs CD24⁺ 0 Gy, $P < 0.05$).

polyploid cell population increased strongly in CD24⁺ cells, but only moderately in CD24^{-/low} cells. When CD24^{-/low} cells were sorted 3 weeks after irradiation, polyploidy increased quickly in CD24⁺ progeny while it remained very low in CD24^{-/low} progeny. Polyploidy remained significantly higher in CD24⁺ than in CD24^{-/low} cells during the 13 weeks after irradiation. For T-47D, even if the increase in polyploidy disappeared progressively and was no longer significant after 8 weeks, the polyploid cell population always remained higher in CD24⁺ than in CD24^{-/low} cells (Supplementary Figure S3). As MDA-MB-231 cells are exclusively CD24⁻, we analysed the rate of chromosomal breaks in non-irradiated cells at time zero and again 6 weeks after irradiation (Supplementary Figure S4). We did not observe statistical differences before and after irradiation, indicating an absence of delayed chromosomal instability in the absence of CD24⁺ cells.

Altogether, these results indicate that long-term chromosomal instability is mainly driven by CD24⁺ cells. Cell sorting experiments show that the instability is observed in CD24⁺ cells, but is transmitted through stable CD24^{-/low} cells previously irradiated. As the progeny of irradiated cells exclusively arises from CD24^{-/low} cells, this subpopulation could be defined as the mediator of the memory of radiation-induced chromosomal instability.

DISCUSSION

The data presented in this paper provide evidence that IR can induce chromosomal instability observed many generations after

irradiation of breast cancer cell lines. This delayed instability arises after a long period of mitotic blockade followed by mitotic catastrophe associated essentially with apoptosis.²¹ Several reports have indicated that breast cancer cells are generally defined as relatively refractory to early cell death in response to IR and chemotherapeutic agents, and are characterized by prolonged G2 arrest followed by a huge loss of self-renewal capacity.²² Nevertheless, prolonged growth arrest could allow the development of radioresistant populations capable of resuming proliferation and potentially associated with increased chromosomal instability.^{23,24}

In our model, the very high level of chromosomal aberrations observed during the first 2–4 weeks after irradiation corresponds to the wave of intense cell death. Three weeks after irradiation, the cell population is composed by parental irradiated cells and few clones starting to emerge. Therefore, the observed chromosomal instability is essentially the consequence of DNA breaks directly induced by IR in parental cells (Figures 1a and c). However, after this period, the level of instability decreases but remains significantly higher than the basal level and is observed in surviving cells emerging from the few clones displaying a normal proliferation rate. So, delayed instability takes place in the progeny of radioresistant-irradiated cells.

In our experiments, in order to characterize the surviving radioresistant cells, we tested seven markers potentially associated with the breast cancer stem-like phenotype. Our results clearly show a weak or null expression of only the CD24 marker in the population surviving after the period of mitotic catastrophe

(Supplementary Figure S1), indicating that the other markers fail to characterize the radioresistant population. As the different markers described in the literature are not sufficient to identify a single population, the existence of different lineages of breast CSCs potentially leading to different types of breast cancer and also coexisting within the same tumour can be suggested.¹² Interestingly, except for CD133 (negative labelling for all cell lines), every marker displayed staining that was heterogeneous between cell lines but also within each cell line (Table 2).

Breast CSC characteristics generally associate CD24 and CD44 as CD44⁺/CD24^{-/low} cells have higher tumourigenic potential in immunodeficient mice and express epithelial-mesenchymal transition markers.^{9,25,26} In our model, the CD24^{-/low} percentage is associated with histological subtype and parallels the classification T-47D < BT-20 < MDA-MB-157 < MDA-MB-231 as a function of tumourigenicity in athymic mice (Table 1 and Figure 2b). Furthermore, it is broadly admitted that the CD44⁺/CD24^{-/low} phenotype fits with CSC radioresistance,^{18,19} however, we failed to observe any increase in CD44⁺ expression in association with the CD24^{-/low} enrichment after irradiation. In our model, the radioresistant subpopulation was restricted to CD24^{-/low} cells, the expression of CD44 probably being associated with other properties of breast CSCs.

CSC radioresistance has been observed in different cell types.²⁷ Even though the specific mechanisms are not yet fully elucidated, the notch signalling pathway, which is known to be involved in breast CSC maintenance, is activated after irradiation of breast CD24^{-/low} cells¹⁹ and could be associated with the increased number of CSCs. In parallel, enhanced DNA repair, low constitutive and radiation-inducible radical oxygen species levels have been described in CSCs as well.^{17,28} Regarding our data, these mechanisms could be implicated in the lowest level of chromosomal breaks observed in CD24^{-/low} cells. Radiation-induced cell death is related to unrepairable DNA lesions, as double-strand breaks. So, greater accumulation of lethal lesions in CD24⁺ compared with CD24^{-/low} cells could contribute to the selection of CD24^{-/low} cells.

Surprisingly, clinical studies seem to be contradictory regarding involvement of the CD24 phenotype in carcinogenesis. CD44⁺/CD24^{-/low} cells have been associated with distant metastases or unfavourable prognosis or both,^{29,30} but, in contrast, higher CD24 expression was also shown to be an indicator of malignant transformation and tumoural progression.³¹⁻³³ Several explanations have been proposed to solve this apparent paradox¹¹ and our results may in part highlight and account for these contradictory results. Indeed, we observe that CD24^{-/low} cells memorize and transmit radiation-induced chromosomal instability, which is expressed only when cells bear the CD24 marker. So, although the CD24^{-/low} phenotype is necessary to ensure an infinite potential life span, on the other hand CD24 expression in a context of strong genomic instability could allow the acquisition of properties that have the potential to contribute to tumour growth and metastasis.

From a mechanistic point of view, direct alterations of DNA sequences cannot account for the initiation and perpetuation of radiation-induced genomic instability and recently Aypar *et al.*³⁴ suggested the involvement of epigenetic mechanisms. It is notable that irradiated cells acquire epigenetic changes characterized by alterations of global DNA methylation and epigenetic aberrations that may arise in irradiated cells without initiating chromosomal instability.^{34,35} This last observation is in good agreement with our results showing that CD24^{-/low} cells may potentially transmit the memory of radiation-induced instability to their progeny without expressing this instability. We postulate that, in our model, all cells in the progeny of irradiated cells may contain the epigenetic information driving the memorization of instability, the expression of this instability being effective only in cells bearing the cell surface marker CD24. In line with this hypothesis, epigenetic changes of DNA repair genes have been

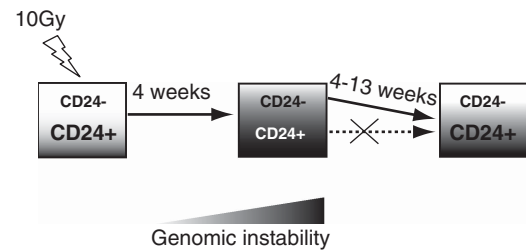


Figure 5. Proposed role of CD24 in memorization and transmission of radiation-induced genomic instability.

shown to have a crucial role in tumour progression³⁶ and specific DNA methylation patterns of CSCs have been suggested and demonstrated.^{37,38} So, analysis of the DNA methylation profile in CD24^{-/low} and CD24⁺ cells before and after irradiation could help to characterize the mechanisms underlying long-term transmission and expression of radiation-induced chromosomal instability.

In conclusion, our results clearly show the involvement of CD24^{-/low} cells in the transmission of chromosomal instability induced by IR in breast cancer cell lines. These results can be resumed in a model presented in Figure 5. To our knowledge, this is the first model attributing a role to breast CSCs in mediating the memory of radiation-induced chromosomal instability. Moreover, these data are valuable for the further characterization of epigenetic alterations induced by IR in breast CSCs. Our findings are consistent with the putative resistant phenotype traditionally associated with stem-like CD44⁺/CD24^{-/low} cells. Moreover, our results highlight the deleterious role of CSCs in aggressive tumour recurrence after radiotherapy, as we can assign an additional role to the classic properties of these cells (self-renewal, tumourigenicity) in the transmission of genomic instability, potentially leading tumour cells to acquire more aggressive characteristics.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture

T-47D, BT-20, MDA-MB-157 and MDA-MB-231 cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). Cell lines differ by their biological properties, and their characteristics are summarized in Table 1. All cell lines were grown in adherent conditions, maintained in Dulbecco's modified Eagle medium 4.5 g/l glucose, 0.11 g/l sodium pyruvate, glutamate (GlutaMAX 1) and pyridoxine, supplemented with 5% (T-47D, MDA-MB-231) or 10% (BT-20, MDA-MB-157) foetal calf serum, penicillin, streptomycin and amphotericin B (antibiotic-antimycotic mix) (all from Life Technologies, Cergy-Pontoise, France). All cell cultures were done in 5% CO₂ and 95% humidity. Cell proliferation and survival analyses were performed in two or more independent experiments, by scoring at least 300 cells each time. Discrimination between viable and dead cells was performed by trypan blue exclusion.

Chemical, reagents and antibodies

All biochemicals were from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France) unless otherwise specified. Antibodies to CD24 (clone ML5), CD44 (clone C26) and CD201 (PROCR) (clone RCR-252) and isotypic controls were from BD Biosciences (San Jose, CA, USA). Antibodies and isotypic controls to CD133 (clone EMK08) and EpCAM (ESA) (clone 1B7) were from eBioscience (San Diego, CA, USA). Aldehyde dehydrogenase staining was performed using the ALDEFUOR kit from StemCell Technologies (Grenoble, France). SP analysis was performed using Hoechst33342 (Sigma) and inhibitor KO143 from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

Irradiation

Cells were plated at least 24 h before irradiation. On day 0, cells were γ -irradiated using a ¹³⁷Cs irradiation unit at a dose rate of ~2 Gy/min, and

then incubated with fresh medium. In every experiment, studied cells were 10 Gy-irradiated and control cells were submitted to sham irradiation.

Cell staining

For CSC marker analysis, cells were labelled with the following antibodies: CD24-PE, CD44-FITC, CD201-PE (PROCR) from BD Bioscience (San Jose, CA, USA) and CD133-PE and EpCAM-Alexa Fluor 647 (ESA) from eBioscience, and counterstained with propidium iodide. Isotypic controls were used to calibrate each experiment. The CD24⁻ subpopulation was defined using the isotypic control, and the CD24^{low} subpopulation was defined as the lowest 10% (T-47D) or 20% (BT-20) of CD24⁻-positive cells in non-irradiated control cells. For polyploid cell analysis, CD24⁻ stained cells were permeabilized with Cytofix-Cytoperm kit from BD Bioscience, according to the manufacturer's recommendation, and DNA was counterstained with DAPI. For SP analysis, cells were stained as described by Rossi *et al.*³⁹ Briefly, cells were stained with Hoechst33342 5 µg/ml for 90 min at 37 °C. As CSCs are potentially capable of drugs efflux, SP was defined as the cell population-containing no or low levels of Hoechst33342, and gated compared with KO143 inhibited sample.

Flow cytometry

Cells were analysed on a SORP LSR-II analyzer and sorted on a BD Influx sorter (BD Biosciences), both in the same configuration (488 nm, 561 nm, 405 nm, 355 nm and 635 nm). For cell sorting, CD24^{-/low} and CD24⁺ subpopulations were defined as the lowest and highest 15% of PE fluorescence intensity. Three weeks after irradiation, CD24^{-/low} cells and the total population (W3-CD24^{-/low} and W3-total, respectively) were sorted, as well as subpopulations resulting from W3-CD24^{-/low} (second sorting) 9 weeks after irradiation (W9-CD24^{-/low} and W9-CD24⁺, respectively) Data were analysed with FlowJo v7.6.1 (Tree Star, Ashland OR, USA) or BD FACSDiva v6.1.2 software (BD Bioscience).

Cytogenetic analysis

Metaphase preparations were performed after colcemide (0.06 µg/ml. for 1.5 h) and hypotonic (0.075 M KCl for 25 min) treatment, followed by gradual fixations in methanol-acetic acid (3/1). Metaphase spreads were hybridized with a telomeric cyanine 3-conjugated PNA probe (DAKO, Trappes, France) followed by hybridization with a FITC-Pan centromeric DNA probe (CAMBIO, Cambridge, UK). The chromosome preparations were counterstained with DAPI and observed under a fluorescence microscope (NIKON FXA, Kingston, UK). Image acquisition was controlled through QUIPS CGH Analysis software (VYSIS, Rungis, France). For the breaks count, the following chromosome aberrations were scored: dicentric (dic), centric and acentric rings (r) and chromosome breaks (csb). Dic and r were assumed to result from two breaks and csb from one break.

Statistical analysis

All statistical tests were performed using Statview software (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA). The unpaired two-tailed Student's *t*-test was used and a *P*-value of ≤0.05 was considered to indicate statistically significant differences.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr P-H. Romeo for constructive criticism on this manuscript. We also thank Drs J Baijier, D Lewandowski and P Fouchet for flow cytometry technical assistance and advices. This work was supported by grants from Electricité de France (EDF) and from MELODI and DoReMi Networks.

REFERENCES

1 Little JB. Radiation-induced genomic instability. *Int J Radiat Biol* 1998; **74**: 663-671.

- 2 Morgan WF, Day JP, Kaplan MI, McGhee EM, Limoli CL. Genomic instability induced by ionizing radiation. *Radiat Res* 1996; **146**: 247-258.
- 3 Mothersill C, Seymour CB. Mechanisms and implications of genomic instability and other delayed effects of ionizing radiation exposure. *Mutagenesis* 1998; **13**: 421-426.
- 4 Ponnaiya B, Cornforth MN, Ullrich RL. Induction of chromosomal instability in human mammary cells by neutrons and gamma rays. *Radiat Res* 1997; **147**: 288-294.
- 5 Sudo H, Garbe J, Stampfer MR, Barcellos-Hoff MH, Kronenberg A. Karyotypic instability and centrosome aberrations in the progeny of finite life-span human mammary epithelial cells exposed to sparsely or densely ionizing radiation. *Radiat Res* 2008; **170**: 23-32.
- 6 Suzuki K, Ojima M, Kodama S, Watanabe M. Delayed activation of DNA damage checkpoint and radiation-induced genomic instability. *Mutat Res* 2006; **597**: 73-77.
- 7 Rosen JM, Jordan CT. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science* 2009; **324**: 1670-1673.
- 8 Kai K, Arima Y, Kamiya T, Saya H. Breast cancer stem cells. *Breast Cancer* 2010; **17**: 80-85.
- 9 Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 3983-3988.
- 10 Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, Mehrotra S, Bhat-Nakshatri P, Turner CH *et al*. CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res* 2006; **8**: R59.
- 11 Shipitsin M, Campbell LL, Argani P, Weremowicz S, Bloushtain-Qimron N, Yao J *et al*. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell* 2007; **11**: 259-273.
- 12 Hwang-Verslues WW, Kuo WH, Chang PH, Pan CC, Wang HH, Tsai ST *et al*. Multiple lineages of human breast cancer stem/progenitor cells identified by profiling with stem cell markers. *PLoS One* 2009; **4**: e8377.
- 13 Resetkova E, Reis-Filho JS, Jain RK, Mehta R, Thorat MA, Nakshatri H *et al*. Prognostic impact of ALDH1 in breast cancer: a story of stem cells and tumor microenvironment. *Breast Cancer Res Treat* 2010; **123**: 97-108.
- 14 Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, Gong C *et al*. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell* 2007; **131**: 1109-1123.
- 15 Fillmore CM, Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res* 2008; **10**: R25.
- 16 Nguyen NP, Almeida FS, Chi A, Nguyen LM, Cohen D, Karlsson U *et al*. Molecular biology of breast cancer stem cells: potential clinical applications. *Cancer Treat Rev* 2010; **36**: 485-491.
- 17 Pajonk F, Vlashi E, McBride WH. Radiation resistance of cancer stem cells: the 4 R's of radiobiology revisited. *Stem Cells* 2010; **28**: 639-648.
- 18 Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN *et al*. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* 2009; **458**: 780-783.
- 19 Phillips TM, McBride WH, Pajonk F. The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst* 2006; **98**: 1777-1785.
- 20 Lagadec C, Vlashi E, Della Donna L, Meng Y, Dekmezian C, Kim K *et al*. Survival, self-renewing capacity and multi-lineage potency of breast cancer initiating cells during fractionated radiation treatment. *Breast Cancer Res* 2010; **12**: R13.
- 21 Luce A, Courtin A, Levalois C, Altmeyer-Morel S, Romeo PH, Chevillard S *et al*. Death receptor pathways mediate targeted and non-targeted effects of ionizing radiations in breast cancer cells. *Carcinogenesis* 2009; **30**: 432-439.
- 22 Gewirtz DA. Growth arrest and cell death in the breast tumor cell in response to ionizing radiation and chemotherapeutic agents which induce DNA damage. *Breast Cancer Res Treat* 2000; **62**: 223-235.
- 23 Gewirtz DA, Sundaram S, Magnet KJ. Influence of topoisomerase II inhibitors and ionizing radiation on growth arrest and cell death pathways in the breast tumor cell. *Cell Biochem Biophys* 2000; **33**: 19-31.
- 24 Olivier M, Bautista S, Valles H, Theillet C. Relaxed cell-cycle arrests and propagation of unrepaired chromosomal damage in cancer cell lines with wild-type p53. *Mol Carcinog* 1998; **23**: 1-12.
- 25 Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY *et al*. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008; **133**: 704-715.
- 26 Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D *et al*. Isolation and *in vitro* propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* 2005; **65**: 5506-5511.
- 27 Vlashi E, McBride WH, Pajonk F. Radiation responses of cancer stem cells. *J Cell Biochem* 2009; **108**: 339-342.
- 28 Debeb BG, Xu W, Woodward WA. Radiation resistance of breast cancer stem cells: understanding the clinical framework. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2009; **14**: 11-17.

- 29 Abraham BK, Fritz P, McClellan M, Hauptvogel P, Athellogou M, Brauch H. Prevalence of CD44⁺/CD24⁻/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clin Cancer Res* 2005; **11**: 1154-1159.
- 30 Giatromanolaki A, Sivridis E, Fiska A, Koukourakis MI. The CD44⁺/CD24⁻ phenotype relates to 'triple-negative' state and unfavorable prognosis in breast cancer patients. *Med Oncol* 2011; **28**: 745-752.
- 31 Baumann P, Cremers N, Kroese F, Orend G, Chiquet-Ehrismann R, Uede T *et al*. CD24 expression causes the acquisition of multiple cellular properties associated with tumor growth and metastasis. *Cancer Res* 2005; **65**: 10783-10793.
- 32 Bircan S, Kapucuoglu N, Baspinar S, Inan G, Candir O. CD24 expression in ductal carcinoma *in situ* and invasive ductal carcinoma of breast: an immunohistochemistry-based pilot study. *Pathol Res Pract* 2006; **202**: 569-576.
- 33 Kristiansen G, Winzer KJ, Mayordomo E, Bellach J, Schluns K, Denkert C *et al*. CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003; **9**: 4906-4913.
- 34 Aypar U, Morgan WF, Baulch JE. Radiation-induced genomic instability: are epigenetic mechanisms the missing link? *Int J Radiat Biol* 2011; **87**: 179-191.
- 35 Aypar U, Morgan WF, Baulch JE. Radiation-induced epigenetic alterations after low and high LET irradiations. *Mutat Res* 2011; **707**: 24-33.
- 36 Lahtz C, Pfeifer GP. Epigenetic changes of DNA repair genes in cancer. *J Mol Cell Biol* 2011; **3**: 51-58.
- 37 Bloushtain-Qimron N, Yao J, Snyder EL, Shipitsin M, Campbell LL, Mani SA *et al*. Cell type-specific DNA methylation patterns in the human breast. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 14076-14081.
- 38 Hernandez-Vargas H, Ouzounova M, Le Calvez-Kelm F, Lambert MP, McKay-Chopin S, Tavtigian SV *et al*. Methyome analysis reveals Jak-STAT pathway deregulation in putative breast cancer stem cells. *Epigenetics* 2011; **6**: 428-439.
- 39 Rossi L, Challen GA, Sirin O, Lin KK, Goodell MA. Hematopoietic Stem Cell Characterization and Isolation. *Methods Mol Biol* 2011; **750**: 47-59.

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)

Legends for supplementary figures

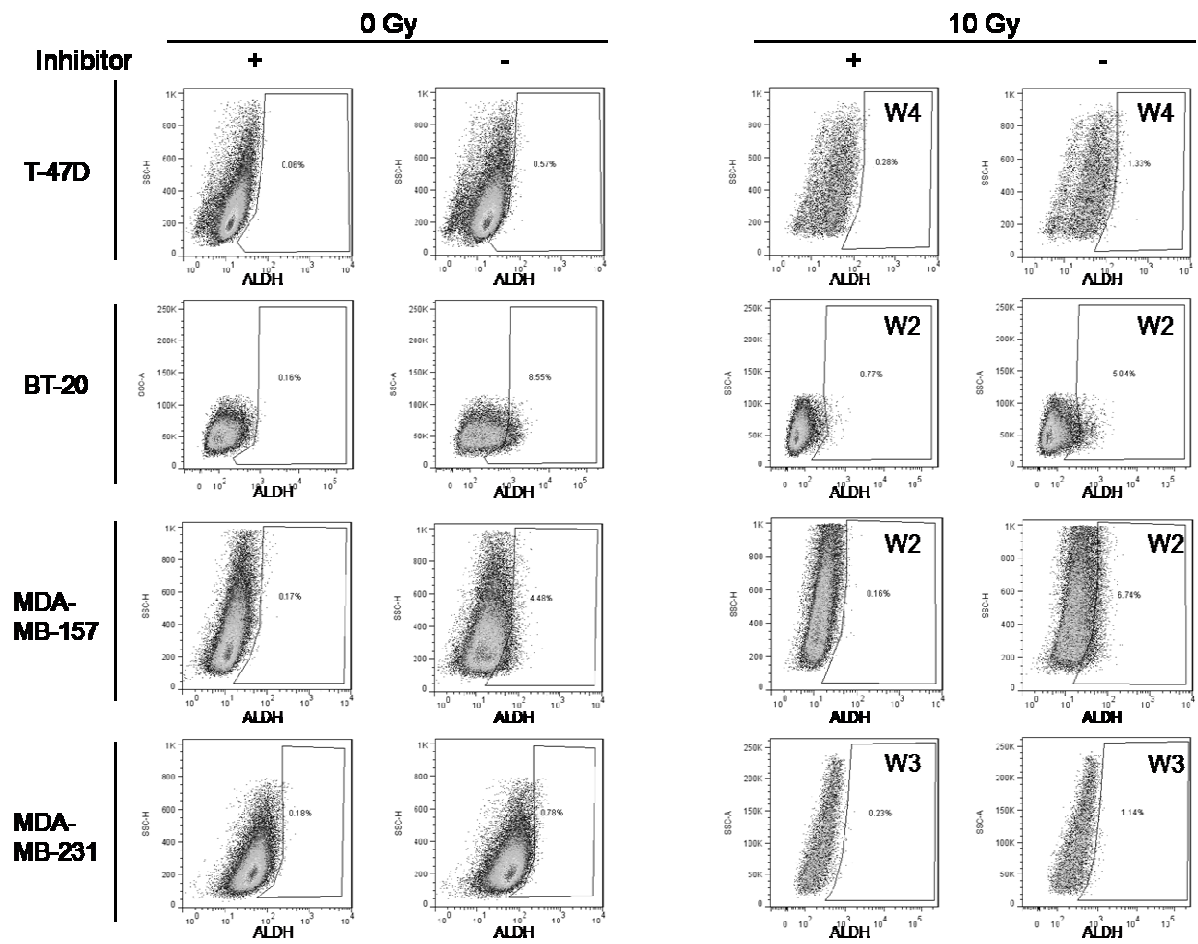
Supplementary Figure S1. FACS analysis of different markers, before and after irradiation, in the four cell lines studied.

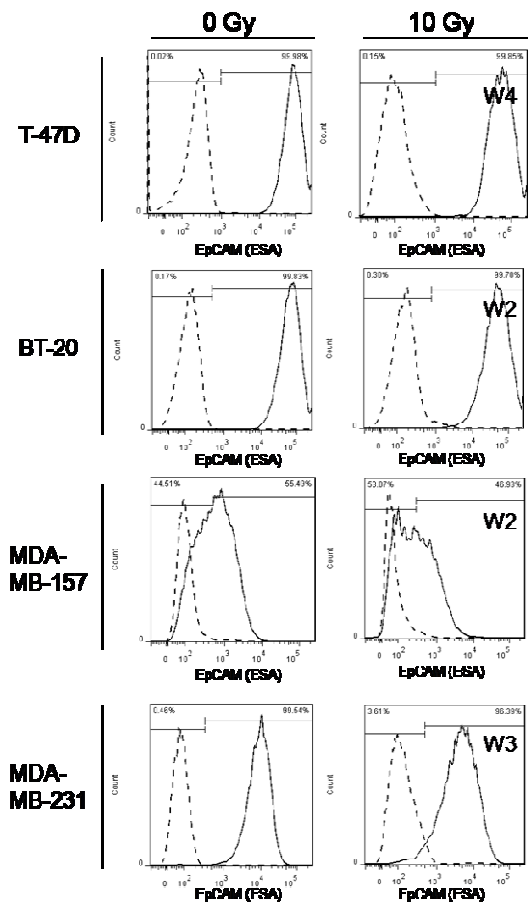
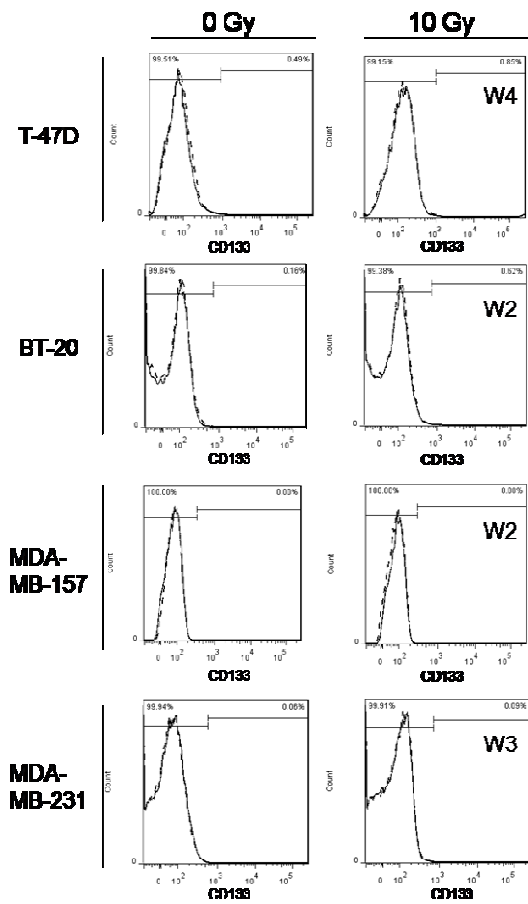
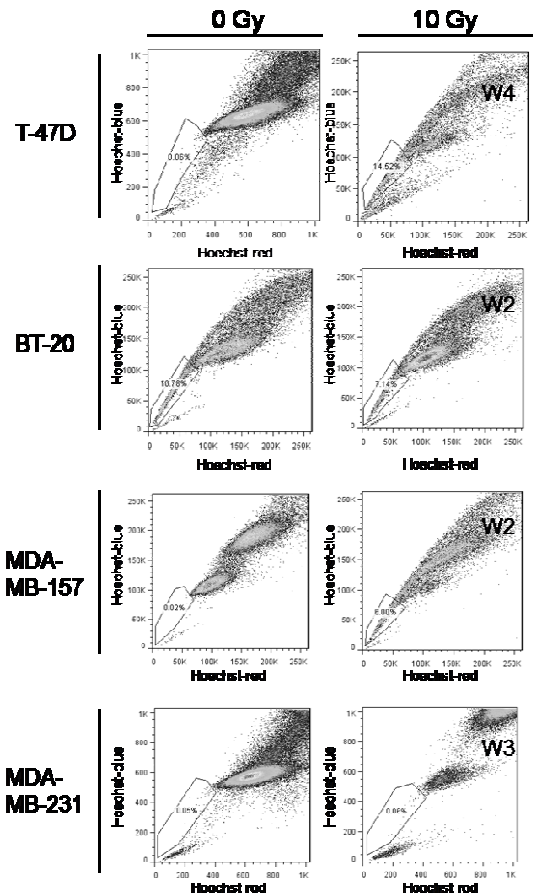
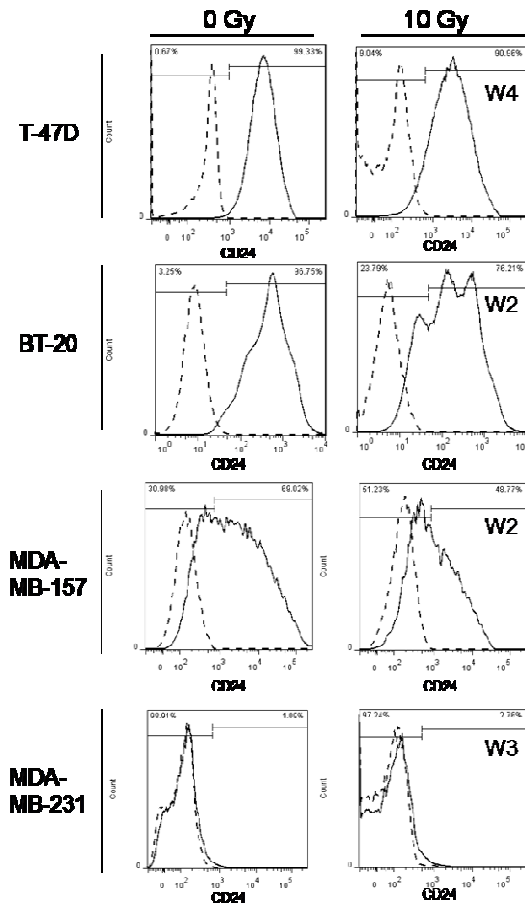
Supplementary Figure S2. CD24 labelling of T-47D and BT-20 in non-irradiated cells (0 Gy) and in CD24^{-low} progeny, 3 weeks after sorting (0 Gy progeny).

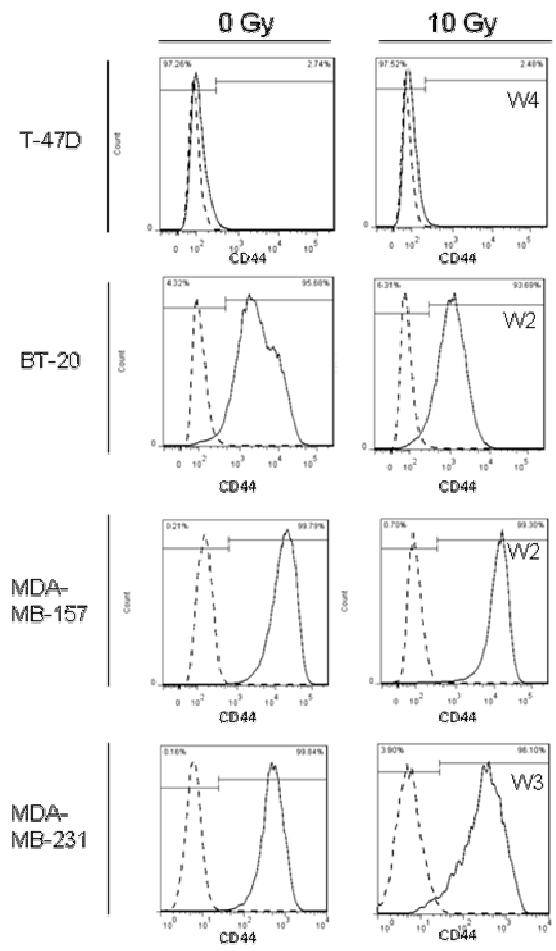
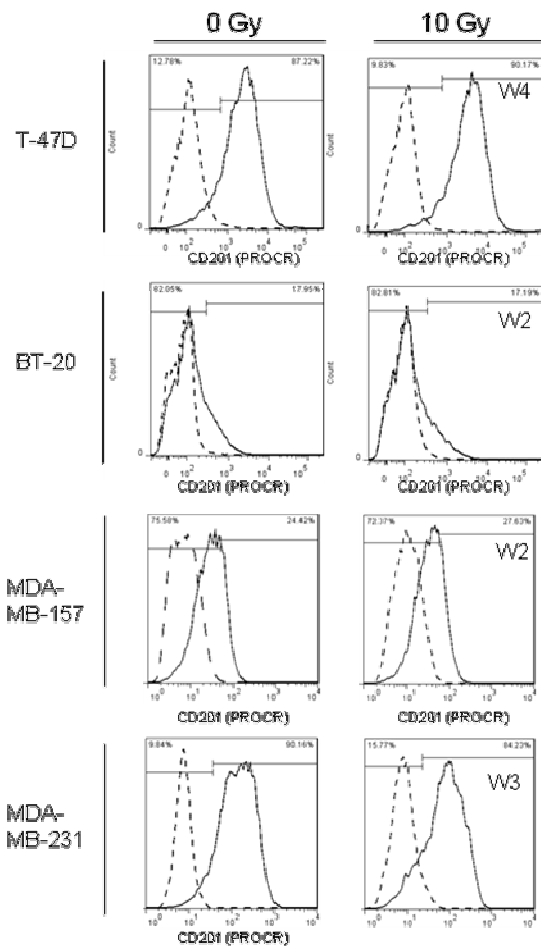
Supplementary Figure S3. Percentage of polyploid T-47D cells in relationship to CD24 expression after 10 Gy irradiation. (* Analysis vs. CD24⁺ 0Gy, p<0.05)

Supplementary Figure S4. Total numbers of chromosomal breaks for 100 metaphases before and 6 weeks after 10 Gy irradiation of MDA-MB-231 cells.

Supplementary figure S1

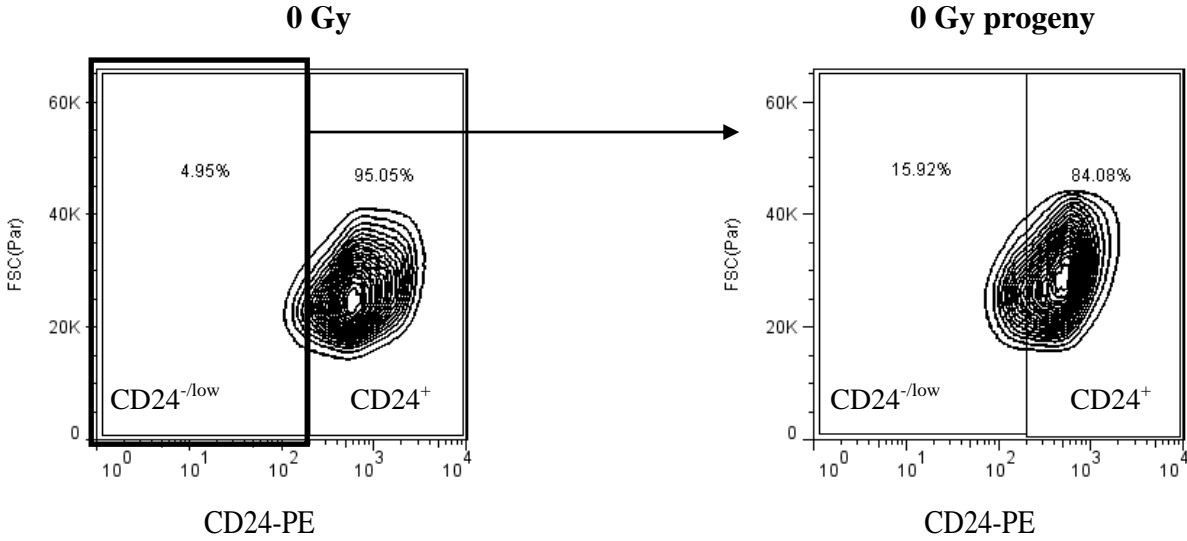




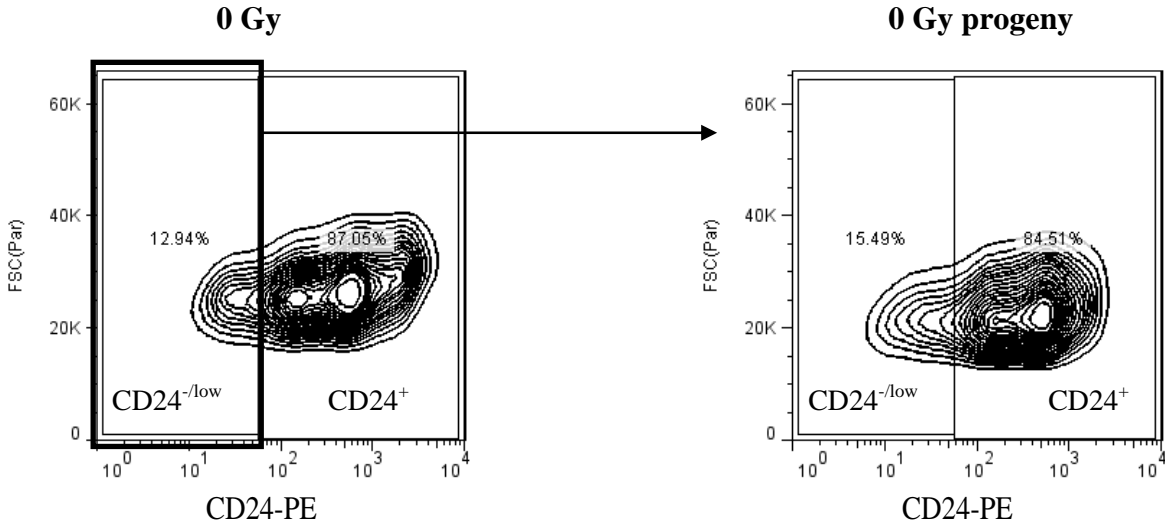


Supplementary figure S2

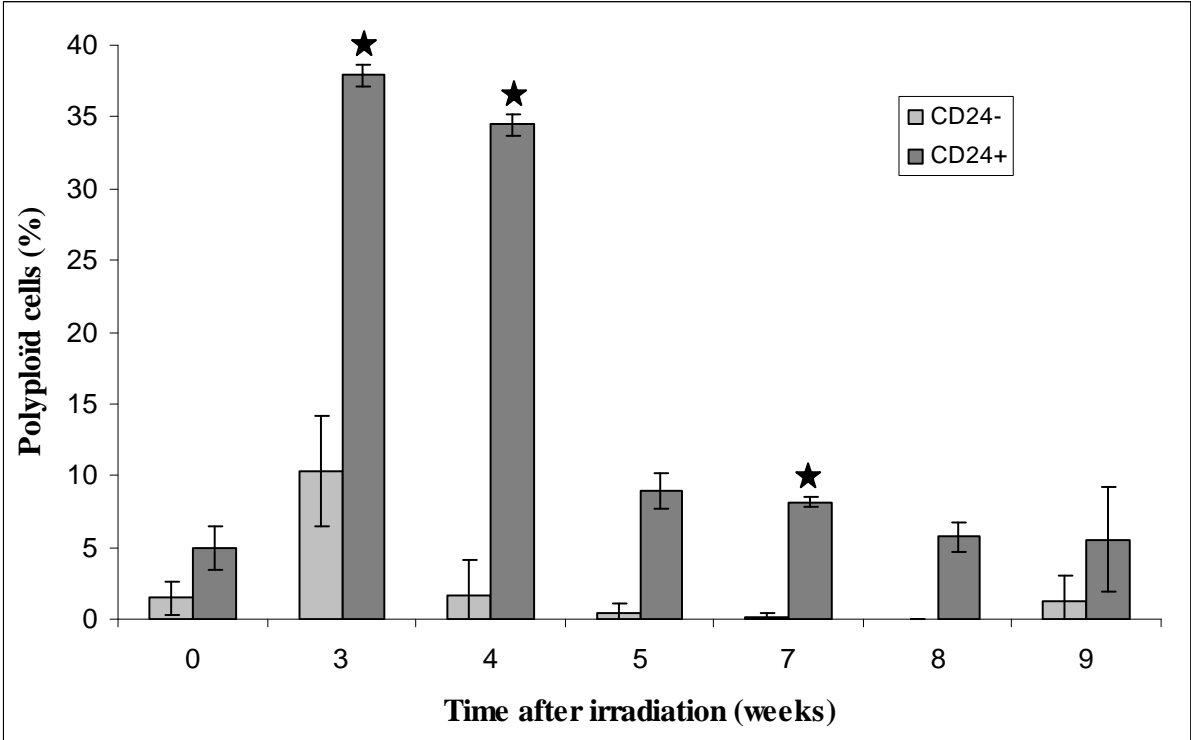
T-47D



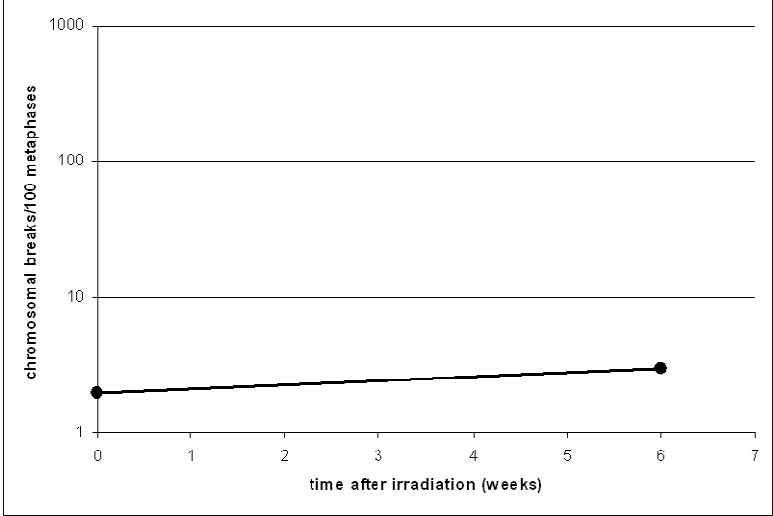
BT-20



Supplementary figure S3



Supplementary figure S4



Article II

L'extinction du marqueur de cellules souches cancéreuses mammaires CD24 induit la radiorésistance grâce au contrôle des espèces réactives de l'oxygène

Forced extinction of CD24 stem-like breast cancer marker alone promotes radiation resistance through the control of oxidative stress

Présentation de l'article II

Dans cette partie il sera fait référence aux figures et tableaux de l'article II

Nous avons montré précédemment que le marqueur CD24 permet d'identifier les cellules cancéreuses mammaires humaines résistantes à l'irradiation. Ainsi, seules les cellules CD24⁻ survivent à une irradiation γ de 10 Gy et transmettent à leur descendance une instabilité génétique persistante, exprimée uniquement par les cellules de phénotype CD24⁺. La présence de la protéine CD24 à la surface des cellules semble donc jouer un rôle dans la réponse cellulaire à l'irradiation. Bien que de nombreux travaux utilisent CD24 comme marqueur de CSC mammaires, peu d'études ont cherché à caractériser le rôle joué par la protéine CD24 dans ces cellules. Ces rares travaux, présentés dans l'introduction bibliographique, sont de plus contradictoires les uns avec les autres. Enfin, aucune étude n'a cherché à mettre en évidence une action directe de cette protéine dans la réponse à l'irradiation.

Afin d'étudier le rôle de CD24 dans les cellules mammaires humaines, nous avons modulé l'expression de cette protéine dans des lignées cancéreuses mammaires humaines. Nous avons surexprimé CD24 dans une lignée de type basal-like/basal B, mésenchymateuse, fortement tumorigénique et essentiellement CD24⁻ (MDA-MB-436). Parallèlement à cela, nous avons sous-exprimé CD24 à l'aide de siRNA dans une lignée luminale, épithéliale, peu tumorigénique, essentiellement CD24⁺ (MCF-7). Ces deux lignées sont donc opposées en termes de types histologiques et de « malignité » au sens large. Nous avons validé ce modèle cellulaire en contrôlant la stabilité des transfections au cours du temps par qRT-PCR (figure 1 A) et par cytométrie en flux (figure 1 B).

Nous avons montré dans un premier temps que la modulation de la protéine CD24 joue un rôle dans l'établissement d'une partie des propriétés habituellement associées aux CSC mammaires, mais n'induit pas artificiellement tous les phénotypes associés à ces cellules. En effet, nous n'avons pas observé d'influence de CD24 sur l'expression d'autres marqueurs de CSC décrits dans la littérature : CD44, ALDH1, SP. Toutefois, il semble que CD24 soit associé au marqueur PROCR (CD201), peu étudié dans la littérature mais potentiellement lié à un phénotype CSC (figure additionnelle 1). De plus, la surexpression et l'extinction de CD24 n'ont pas d'influence sur la formation de mammosphères et sur la capacité de ces cellules à former des tumeurs chez la souris Nude (tableau additionnel 1), deux propriétés essentielles des CSC. En revanche, les cellules négatives pour CD24 (CD24^{-/low}) prolifèrent plus lentement *in vitro* que les cellules qui expriment CD24 (CD24⁺) (figure 1C). Lorsque ces

cellules sont injectées à des souris Nude, on observe que la croissance tumorale est plus rapide pour les tumeurs provenant de cellules CD24⁺ (figure 1 D).

Ensuite, nous avons mis en évidence une influence de CD24 sur le stress oxydatif et l'instabilité génétique des cellules cancéreuses mammaires. Ainsi, les cellules CD24^{-low} présentent un niveau de ROS (*Reactive Oxygen Species*) plus faible que les cellules CD24⁺ (figure 2 A). Le stress oxydatif étant une cause majeure d'instabilité génétique, nous avons ensuite montré que les cellules CD24⁺ présentent plus de cassures chromosomiques spontanées que les cellules CD24^{-low} (figure 2B). CD24 agirait donc sur le niveau de ROS, et donc sur l'instabilité génétique.

L'ensemble des phénotypes contrôlés par CD24 étant classiquement associés à la radorésistance des cellules, nous avons étudié le rôle de la protéine CD24 dans la réponse à l'irradiation. Des tests de clonogénicité réalisés sur les lignées transfectées ont montré que les cellules CD24^{-low} génèrent plus de clones après irradiation que les cellules CD24⁺ (figure 3 A). Il apparaît que ces différences de clonogénicité peuvent être reliées à une baisse de la mortalité radio-induite dans les cellules CD24^{-low} (figure 3 B) ainsi qu'à une baisse du blocage en phase G2/M radio-induit (figure 3 C). Ces différents résultats indiquent que CD24 joue un rôle dans la radorésistance des cellules mammaires humaines, et dans la capacité de ces cellules à générer une descendance après irradiation.

Nous avons recherché les voies modulées par CD24, pouvant être à l'origine de la résistance à l'irradiation des cellules CD24^{-low}. Dans la littérature, différents mécanismes de radorésistance des CSC ont été proposés parmi lesquels (1) une activation des points de contrôle du cycle cellulaire via les voies ATM / ATR et (2) un niveau élevé de défenses anti-oxydantes permettant une élimination des ROS plus efficace. Dans un premier temps, nous avons montré que l'expression et l'activité des kinases ATM / ATR / Chk1 / Chk2 ne sont pas altérées dans les cellules transfectées. Comme les cellules CD24^{-low} présentent un taux basal de ROS plus faible et sont plus résistantes à l'irradiation que les cellules CD24⁺, nous avons émis l'hypothèse que CD24 régule le niveau de ROS après irradiation.

Nous avons quantifié les taux de ROS intracellulaires après irradiation dans les lignées transfectées, et montré que les cellules CD24⁺ présentent globalement plus de ROS radioinduits que les cellules CD24^{-low}, concomitants avec une mort cellulaire massive. Nous avons ensuite exploré les voies potentiellement impliquées, en analysant l'expression de 84 gènes de réponse au stress oxydant avant et après irradiation, et montré qu'un petit nombre de

gènes sont dérégulés dans les cellules CD24^{-low}. Ces dérégulations vont globalement dans le sens d'une protection accrue des cellules CD24^{-low} contre le stress oxydant.

Ces résultats montrent pour la première fois que CD24 n'est pas uniquement un marqueur, mais bien un acteur de la réponse à l'irradiation. Ainsi, CD24 contrôle la prolifération cellulaire *in vitro* et *in vivo*, ainsi que les niveaux de ROS avant et après irradiation. L'ensemble de ces phénotypes aboutit à une sensibilité réduite des cellules CD24^{-low} à l'irradiation γ , ainsi qu'à une baisse de l'instabilité génétique. Ces résultats présentent un intérêt dans l'interprétation des travaux cliniques contradictoires utilisant le marquage CD24, ainsi que dans l'évaluation de la radiorésistance intrinsèque des tumeurs mammaires.

Forced extinction of CD24 stem-like breast cancer marker alone promotes radiation resistance through the control of oxidative stress

Running title: CD24 controls radiation response through ROS level

Julie Bensimon^{1,°}, Denis Biard², Maud Goislard¹, Sandrine Morel-Altmeier¹, Sylvie Chevillard^{1,°} and Jérôme Lebeau^{1,*°}

¹CEA, DSV, iRCM, SREIT, Laboratoire de Cancérologie Expérimentale (LCE), Fontenay-aux-Roses, F-92265, France and ²CEA, DSV, IMETI, SEPIA, BP6 92265 Fontenay-aux-Roses, cedex France.

° These authors contributed equally to this work

*To whom correspondence should be addressed. Dr J Lebeau, CEA, DSV, iRCM, SREIT, Laboratoire de Cancérologie Expérimentale (LCE), Fontenay-aux-Roses, F-92265, France.
Tel: + 33 1 46 54 89 43; Fax: + 33 1 46 54 88 86; E-mail: jerome.lebeau@cea.fr

Abstract

Along with CD44, CD24 is a key marker of breast cancer stem cells (CSCs). Among all phenotypes classically attributed to breast CSCs, radiation resistance has been extensively described and seen as being implicated in radiotherapy failure. Our previous data indicated that CD24⁻ cells constitute a radiation-resistant subpopulation transitory selected by high doses of ionizing radiation. However, little is known about the biological role of CD24 in breast cancers, and no function has been assigned to CD24 in radiation response. Here, CD24 expression was induced in CD24⁻ cells or knocked-down in CD24⁺ cells. We show that forced extinction of CD24 expression is associated with decreased proliferation rate, lower levels of reactive oxygen species (ROS) and decreased genomic instability. On the opposite when CD24 is artificially expressed in CD24⁻ cells, proliferation rates *in vitro* and *in vivo*, ROS levels and genomic instability are enhanced. Moreover, we observe that loss of CD24 expression leads to radiation resistance, by preventing radiation-induced cell death and promoting generation of progeny in relation to lower G2/M blockade and a smaller proportion of polyploid cells. Finally, control of ROS levels appears to be the key event in the CD24-mediated radiation response. So, a functional role is attributed to CD24 in the radiation response, through the control of oxidative stress. For the first time, CD24 is proposed as a direct actor in radiation response of breast CSCs, independently of CD44 expression. These findings could have interesting applications in evaluating the intrinsic radiation response of primary tumors.

Keywords: breast cancer, CD24, irradiation, oxidative stress, genomic instability

Abbreviations: ALDH1, aldehyde dehydrogenase 1; APOE, apolipoprotein E; ATM, ataxia telangiectasia mutated; ATR, ataxia telangiectasia and Rad3 related; BNIP3, BCL2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3; CD, cluster of differentiation; Chk1/2, cell cycle checkpoint kinase 1/2; CSC, cancer stem cell; DCF-DA, dichlorofluorescein diacetate; EBV, Epstein-Barr virus; EMT, epithelial to mesenchymal transition; GPx1, glutathione peroxidase 1; MT3, metallothionein 3; NME5, non-metastatic cells 5, protein expressed in; PRDX3/4, peroxiredoxin 3/4; PROCR, protein C receptor, endothelial (CD201); ROS, reactive oxygen species

Introduction

A growing body of evidence indicates that solid tumors, including breast cancers, display hierarchical organization where only a small cell subpopulation possesses the ability to regrow a tumor. These cells are commonly named tumor-initiating cells (TICs) or cancer stem cells (CSCs). Breast CSCs have been associated with relative resistance to radiation and to chemotherapy, are responsible for the failure of conventional treatments and have been clinically associated with tumor recurrence and metastasis (1-4).

Many markers are used in the literature to characterize breast CSCs: presence of a side population, aldehyde dehydrogenase activity, markers as CD133⁺, ESA⁺, PROCR⁺, CXCR4⁺, and CD44⁺ / CD24^{-low} double labeling which is the most extensively used (5), usually in association with ESA. The CD44⁺ / CD24^{-low} phenotype is strongly associated with long term self-renewal (6, 7), high tumorigenic potential after transplantation in immunodeficient mice (6) and development of non-adherent highly tumorigenic mammospheres in a low attachment *in vitro* culture system (7). These cells also express markers of the epithelial to mesenchymal transition (EMT), which conversely generates CD44⁺ / CD24^{-low} CSCs (8, 9), thereby linking the CSC phenotype to the metastatic process. Finally, the CSC concept has been strongly correlated with conventional therapy failure, CSCs being inherently resistant to radiation and chemotherapeutic agents (10-12). In these studies, the radiation resistance of CD44⁺ / CD24^{-low} cells was associated with better DNA repair efficacy (13) and / or with lower ROS levels and enhanced ROS defenses (14).

Whereas the CD44⁺ / CD24^{-low} phenotype is commonly acknowledged to define breast CSCs, the intrinsic biological functions of CD44 and CD24 proteins and their role in the stemness phenotype and breast carcinogenesis remain poorly documented. CD44 expression is

associated with the undifferentiated phenotype, migration properties and invasion of CSCs in various solid tumors, including breast cancer (15, 16).

CD24 is a surface glycoprotein mainly expressed by B lymphocytes. CD24 is also highly expressed in a variety of solid tumors, has mucin-like characteristics and is thought to function as an adhesion molecule. The role of CD24 in solid tumors is ambiguous as it is correlated positively with tumorigenicity in pancreatic cancer but negatively in breast cancers (17). Clinical studies associating CD24 expression and breast tumor progression are conflicting. In a few studies, the CD24⁺ marker alone or CD44⁻ / CD24⁺ double labeling is associated with a poor prognosis, in obvious opposition to the CSC theory (18-20). By contrast, CD44⁺ / CD24^{-/low} cells are also associated with unfavorable prognosis in terms of global survival and distant metastases (1, 2, 21). Finally, no clear relationship with clinical resistance to chemotherapy or radiation has been described in breast cancer.

To investigate the functional role of CD24, its expression has been modified in few reports, in human and murine mammary cancer cells. The results are contradictory, since CD24 positively or negatively modulates cellular phenotypes as proliferation, adhesion, motility, and metastatic potential, depending on the cellular model used (22-25).

The aim of our work was to study the role of CD24 in the radiation response of mammary cancer cells. We showed previously that high-dose irradiation of breast cancer cells leads to an early mitotic blockade, followed by delayed mitotic catastrophe associated with massive apoptotic cell death (26). We observed that the CD24^{-/low} phenotype was associated with radiation resistance, CD24^{-/low} cells being transiently selected by high doses of ionizing radiation independently of CD44 expression (27). In the present work, to understand the functional role of CD24, we over-expressed CD24 in CD24⁻ breast cancer cells, and down-regulated CD24 expression in CD24⁺ breast cancer cells. We show that CD24 alone is associated with enhanced proliferation capacity *in vitro* and *in vivo*, ROS level and genomic

instability. After irradiation, loss of CD24 expression protects against cell death, most likely through decreased radiation-induced ROS levels, which implies that ROS defenses are activated. Finally, our findings clearly demonstrate that CD24 specifically controls radiation response, independently of other properties of breast CSCs as mammospheres forming capacities and tumorigenic potential.

Results

Loss of CD24 expression is associated with a reduced proliferation rate both *in vitro* and *in vivo*

To investigate the biological function of CD24 protein in breast cancer cells we transfected a CD24-negative basal B cell line (MDA-MB-436) with a p-EBV plasmid expressing CD24 mRNA: MDA-MB-436-CD24^{high}. We also transfected a CD24-positive luminal cell line (MCF-7) with two p-EBV plasmids expressing two different CD24 siRNAs, leading to two different levels of CD24 extinction in MCF-7 cells: MCF-7-CD24^{low} and MCF-7-CD24^{neg}. As controls, the two parental cell lines were transfected with empty p-EBV vector (MDA-MB-436-Mock and MCF-7-Mock). CD24 mRNA was upregulated 140 times ($p < 0.001$) in MDA-MB-436-CD24^{high} cells compared with MDA-MB-436-Mock cells. CD24 mRNA was down-regulated 4 times ($p < 0.001$) in MCF-7-CD24^{low} cells and 10 times ($p < 0.001$) in MCF-7-CD24^{neg} cells compared with MCF-7-Mock cells (Figure 1A). Up- and down-regulation of CD24 surface protein expression was confirmed by flow cytometry analysis, and was checked every week (Figure 1B).

To characterize transfected cells, we first analyzed if CD24-forced protein expression and CD24 knockdown affect the expression of other proposed breast CSC markers. Transfected cell lines were analyzed by flow cytometry for CD44, CD133, ESA, PROCR protein expression, ALDH1 activity and the presence of a side population (Hoechst 33342 exclusion). Whatever the CSC marker, we observed no difference in expression when comparing CD24⁺ and CD24^{-/low} cells in both transfected MDA-MB-436 and MCF-7 (data not shown), except for PROCR which is respectively down- and up-regulated in CD24⁺ and CD24^{-/low} cells, suggesting a possible link between these two markers (supplementary Figure S1).

We next examined the influence of CD24 expression on cellular phenotypes classically associated with CD44⁺/CD24^{-low} breast CSCs: mammosphere formation, tumor initiation and lower proliferation rate. We did not see any difference in mammosphere formation between transfected MCF-7 cells or MDA-MB-436 cells (data not shown). Tumor initiation was tested on Nu/Nu nude mice by injecting $5 \cdot 10^4$, $2.5 \cdot 10^5$ and $2 \cdot 10^6$ MDA-MB-436 cells (MCF-7 cells are not tumorigenic and therefore were not injected). Again we did not observe any difference when comparing MDA-MB-436-Mock cells and MDA-MB-436-CD24^{high} cells (supplementary Table 1).

Regarding cell proliferation, *in vitro* data showed that CD24 forced expression in transfected MDA-MB-436 cells resulted in increased cell proliferation, while CD24 knockdown caused decreased proliferation rate in transfected MCF-7 cells (Figure 1C). These results indicate that loss of CD24 expression is correlated with reduced proliferation rate *in vitro*. We also explored the influence of CD24 expression on growth of *in vivo* tumors: $2.5 \cdot 10^5$ MDA-MB-436-Mock cells and MDA-MB-436-CD24^{high} cells were subcutaneously injected in Nu/Nu nude mice, and tumors were measured every week, starting from week 3 (W3), each subsequent measurement being normalized by the W3 tumor volume, to evaluate volume increase over time. As seen in Figure 1D, 7 and 9 weeks after injection (W7, W9), volume increase was statistically higher in MDA-MB-436-CD24^{high} than in MDA-MB-436-Mock, indicating that, as *in vitro*, CD24 expression *in vivo* is associated with faster proliferation rate. Stability of CD24 expression was checked by RT-PCR after autopsy (supplementary Figure S2). Taken together, these data indicate that the absence of CD24 expression alone does not restore CSC properties as mammosphere formation and tumor initiation, and has no influence on the expression of other CSC markers. However, artificial loss of CD24 expression can be sufficient to restore *in vitro* as well as *in vivo* slow proliferation properties of natural breast CSCs.

Reduced CD24 expression decreases oxidative stress and genomic instability

Because previous reports indicated that breast CSCs display enhanced ROS detoxification (12, 14), we investigated whether CD24 protein controlled ROS level in our cell lines. Using DCF-DA staining, we observed that constitutive ROS level was significantly higher in MDA-MB-436-CD24^{high} cells than in MDA-MB-436-Mock cells, and significantly lower in MCF-7-CD24^{low} and MCF-7-CD24^{neg} cells than in MCF-7-Mock cells (Figure 2A). These results indicate that loss of CD24 expression is correlated with decreased ROS level in breast cancer cells.

Because sustained oxidative stress induces genomic instability, we tested whether CD24 expression would have an impact on chromosomal breaks. Cytogenetic analysis of transfected cell lines indicated that the rate of chromosomal breaks was increased 2.9-fold in MDA-MB-436^{high} cells compared with MDA-MB-436-Mock cells ($p < 0.01$). The rate of chromosomal breaks was slightly but not significantly lower in MCF-7-CD24^{low} cells than in MCF-7-Mock cells, and was almost nil in MCF-7-CD24^{neg} cells (Figure 2B). Therefore, in our model, CD24⁺ cells display higher genomic instability than CD24⁻ cells.

Altogether, these data indicate that low CD24 expression alone leads to reduced oxidative stress, associated with increased genomic stability. This is consistent with our previous results (27) demonstrating that sorted CD24⁻ breast cancer cells show fewer spontaneous chromosomal breaks than CD24⁺ cells.

CD24 controls breast cancer radiation response

As previously reported, irradiation of breast cancers induces delayed cell death leading to transitory selection of CD24^{-/low} cells. Hence, we set out to demonstrate that CD24 protein is directly implicated in phenotypes relevant to the radiation response. First, to investigate the

involvement of CD24 expression in clonogenic survival after irradiation, clonogenic assays were performed on both transfected cell lines (Figure 3A). Surviving fractions at 4 Gy and 6 Gy were significantly lower in MDA-MB-436-CD24^{high} cells than in MDA-MB-436-Mock cells. Surviving fractions at 4 Gy and 6 Gy in MCF-7-CD24^{neg} cells and at 6 Gy in MCF-7-CD24^{low} were significantly higher than in MCF-7-Mock cells. Interestingly, surviving fractions at 4 Gy and 6 Gy were also significantly higher in MCF-7-CD24^{neg} cells than in MCF-7-CD24^{low} cells. These results indicate that CD24^{-/low} cells generate a larger progeny than CD24⁺ cells after irradiation, and that the size of this progeny depends on CD24 expression level. To evaluate the mortality rate after irradiation, transfected cells were plated and irradiated and living and dead cells were counted over 10 days (Figure 3B). Mortality rate was significantly higher in MDA-MB-436-CD24^{high} cells than in MDA-MB-436-Mock cells, and was significantly reduced in MCF-7-CD24^{low} cells and MCF-7-CD24^{neg} cells compared with MCF-7-Mock cells. These data indicate that CD24^{-/low} cells have an enhanced ability to survive after irradiation.

We analyzed the cell cycle of transfected cell lines 3 or 5 days after irradiation (MDA-MB-436 and MCF-7, respectively), as cells were already engaged in mitotic catastrophe, but before massive cell death (Figure 3C). Three days after irradiation MDA-MB-436-CD24^{high} cells showed a strongly enhanced G2/M fraction and increased proportion of polyploid cells, compared with MDA-MB-436-Mock cells. In contrast, in transfected MCF-7 cells a strong decrease in G2/M fraction and in the proportion of polyploid cells was observed in CD24^{neg} cells, whereas CD24^{low} cells displayed a slight, non-significant, decrease.

These results provide evidence that CD24 protein alone controls the radiation response. As for sorted CD24⁻ breast cancer cells (27), transfected CD24^{-/low} cells displayed a lower radiation-induced G2/M blockade and a subsequently lower proportion of polyploid cells. As a

consequence, a lower cell death rate and higher cloning efficiency was observed for CD24^{-/low} cells after irradiation.

CD24 loss decreases radiation-induced ROS levels

As we demonstrated that CD24 controls radiation-induced cell death, we examined the pathways potentially involved in CD24-mediated radiation response. Proposed mechanisms for CSC radiation resistance include: (1) enhanced DNA damage checkpoint response through activation of the ATM / ATR pathways, leading to increased DNA repair capacity, and (2) higher ROS scavengers leading to lower ROS levels.

Western blot experiments showed no differences in expression and phosphorylation for ATM, ATR, Chk1 and Chk2 in the two transfected cell lines, suggesting that CD24-mediated radiation response does not involve modulation of the ATM / ATR DNA damage checkpoint in our model (data not shown).

Then, to study whether levels of radiation-induced ROS are controlled by CD24, transfected cells were DCF-DA labeled after 10 Gy irradiation. ROS level was evaluated at the beginning of delayed massive cell death, so at days 2 and 5 after irradiation for transfected MDA-MB-436 and days 6 and 8 for MCF-7. MDA-MB-436-CD24^{high} cells displayed higher ROS levels after irradiation than MDA-MB-436-Mock cells. Moreover, MCF-7-CD24^{low} cells and MCF-7-CD24^{neg} cells displayed lower ROS levels after irradiation than MCF-7-Mock cells (Figure 4A). These data indicate that CD24 down-regulation leads to decreased radiation-induced oxidative stress concomitant with radiation resistance in mammary cancer cells.

We next studied whether ROS modulation by CD24 could be related to differential regulation of oxidative stress-related genes. We examined the expression of 84 oxidative stress-related genes, using the Human Oxidative Stress and Antioxidant Defense RT² Profiler PCR array. Experiments were performed on MDA-MB-436-Mock cells and MDA-MB-436-CD24^{high}

cells. The cells were either not irradiated (T0), or 10 Gy irradiated and gene expression was measured 1 h (T1) or 24 h (T24) after irradiation. At times T0, T1 and T24, gene expression was compared between MDA-MB-436-Mock cells and MDA-MB-436-CD24^{high} cells. Only genes statistically deregulated ($p < 0.05$) at T0, T1 and T24 are presented in Figure 4B.

Only MT3 (metallothionein 3) gene expression was down-regulated in MDA-MB-436-CD24^{high} cells compared with MDA-MB-436-Mock cells before and after irradiation. APOE (apolipoprotein E) and PRDX3 (peroxiredoxin 3) were down-regulated in MDA-MB-436-CD24^{high} cells compared with MDA-MB-436-Mock cells at T1 as well as T24. PRDX4 (peroxiredoxin 4), BNIP3 (BCL2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3), and NME5 (non-metastatic cells 5, protein expressed in) were down-regulated, and GPX1 (glutathione peroxidase 1) was up-regulated in MDA-MB-436-CD24^{high} cells compared with MDA-MB-436-Mock cells at T24 only. Overall, the genes related to oxidative stress balance are modulated by irradiation toward a depletion of ROS scavengers in CD24⁺ cells.

Taken together, these data show that CD24 alone is able to modulate ROS levels. As sustained low ROS level contributes to tumor radiation resistance, ROS control appears to be a causal key event in CD24-mediated radiation response and cell death.

Discussion

Since the CD24⁻/CD44⁺ marker was suggested to identify breast CSCs (6), this phenotype has turned into a cornerstone of breast CSC studies. However, little is known about the role of CD24 in breast cancers: it remains a simple marker without an assigned function. To understand CD24's functional significance in breast cancer, we stably modulated its expression in two well-defined breast cancer cell lines. MCF-7 is a luminal, epithelial, weakly tumorigenic cell line whereas MDA-MB-436 is a basal B, mesenchymal, strongly tumorigenic cell line. These cell lines display different positions in tumor progression, indicating strong differences in genetic background, and end up in different positions in the EMT. Transition toward a mesenchymal phenotype was linked to an increased proportion of CSCs (8, 9). The MCF-7 cell line displays 0.5% CD24⁻/CD44⁺ cells whereas MDA-MB-436 exhibits more than 95% CD24⁻/CD44⁺ cells. In this study, CD24 expression was stably induced in MDA-MB-436 cells, and silenced in MCF-7 cells. We analyzed phenotypes associated with natural breast CSCs. In both cell systems we observed that, independently of genetic background, loss of CD24 expression was associated with a reduced proliferation potential *in vitro* and tumor growth *in vivo*, lower ROS level and decreased genomic instability.

It is generally admitted that CSCs are maintained in a relatively quiescent state, in opposition to fast-cycling progenitor cells. Interestingly, low proliferation rate was shown to be a common characteristic of both normal (28, 29) and cancer stem cells (30-32) in several tissues. Moreover, this quiescent state is correlated with low protein turnover and reduced metabolism, as demonstrated by experiments using a low proteasome activity to isolate breast CSCs (33). In agreement with a low metabolic activity and quiescent state, normal and cancer stem cells were shown to exhibit reduced ROS levels in several tissues, mostly through enhancement of ROS-controlling pathways (12, 14, 34, 35). Finally, low ROS levels

contribute to decreased chromosomal instability, which is consistent with our previously published data demonstrating increased chromosomal breaks and an increased proportion of polyploid cells in sorted CD24⁺ cells, in comparison to stem-like CD24⁻ breast cancer cells (27). So, in our model, since proliferation and ROS levels are impacted when CD24 is artificially modified, this indicates that loss of CD24 directly drives the relative quiescent state observed in CSCs. In contrast, CD24 expression alone drives the cells toward a faster-cycling progenitor phenotype with elevated ROS level, subsequently inducing genomic instability.

Interestingly, the phenotypes controlled by CD24 are all linked to radiation resistance, as fast-cycling cells, expressing high ROS levels and genomic instability, are prone to enhanced radiation-induced cell death. Moreover, we demonstrated previously that sorted CD24^{-/low} cells survive high-dose irradiation and are able to divide and generate progeny several weeks after irradiation (27). Here we show that CD24 knockdown is sufficient to induce radiation resistance, in terms of cell death and generation of progeny. This enhanced radiation resistance is linked to lower ROS levels after irradiation in CD24⁻ cells. Conversely, forced expression of CD24 induces loss of clonogenic capacity and enhances ROS levels after irradiation. Therefore, our study is the first to provide evidence for the direct involvement of CD24 protein alone in the radiation response, and oxidative stress control appears to be a key element in this response. However, activation of the ATM / ATR pathways, leading to increased DNA repair capacity, was proposed as another mechanism implicated in breast CSC radiation resistance (10, 13). In our model, these pathways do not seem to be regulated directly by CD24.

In an attempt to explore the molecular mechanisms of CD24-modulated ROS defenses, we examined the expression of oxidative stress-related genes in transfected MDA-MB-436 cells. Several genes were found to be affected by forced expression of CD24. MT3 was the only

gene down-regulated in CD24⁺ cells, before and after irradiation. Interestingly, MT3 over-expression was correlated with a poor prognosis in breast cancer (36), was shown to play a role in oxidative stress regulation (37) and to inhibit proliferation of breast cancer cell lines (38). So, MT3 regulation by CD24 suggests a potential role of this gene in proliferation properties, as well as in the low ROS levels of CD24⁻ cells. All genes differentially regulated after irradiation, except for GPX1, were overexpressed in CD24⁻ cells, strongly suggesting that global ROS scavengers are reduced in CD24⁺ cells. It is noteworthy that PRDX3 and PRDX4 are peroxiredoxins, members of a major family of well-characterized antioxidant enzymes involved in the chemotherapy resistance and radiation resistance of various cancers (39-41). It has been proposed that PRDX4 is a marker of poor prognosis in triple-negative breast cancers (42).

Ours is the first analysis of the effects of CD24 modulation on cellular radiation response and clearly shows that the loss of CD24 is implicated in the radiation resistance of breast cancer. However, we did not observe any impact of CD24 modulation on other CSC phenotypes, like mammosphere formation and tumor initiation. As indicated above, the role of CD24 in breast cancers is poorly documented, and few authors have modulated CD24 expression in breast cancer cell lines. In these studies, ROS levels were never measured, and data concerning proliferation capacities, invasion and motility are mostly conflicting (22-25). This inconsistency can be explained by the use of different cellular models that differ in genetic background and/or expression of other breast CSC markers. Moreover, cancer stemness phenotypes cannot be restricted to CD24 expression, and could be related to other markers, such as CD44. Interestingly, CD44 has been associated with metastatic progression, invasion and motility in late stage breast cancers, but further investigation is needed to shed light on its precise role (43, 44). Hence, while our model does not mimic all breast CSC characteristics, it does allow precise analysis of the role of CD24 independently of CD44 in breast cancers.

Finally, clinical studies that have evaluated the prognostic value of CD24 have given conflicting results, as CD24 expression has been associated with both good (18, 19) and poor (21) prognosis in breast cancers. Although CD24 expression modulates radiation sensitivity and proliferation rate, we did not observe any involvement of CD24 in tumorigenic potential in nude mice. So, the CD24⁻ phenotype may be little involved in tumor development and metastasis.

In conclusion, our results clearly demonstrate a direct relationship between CD24 expression and cellular radiation response. To our knowledge, this is the first study attributing a functional role to CD24 in radiation response through control of proliferation rate and ROS levels. These data are valuable in helping to understand why CD24⁻ cells are genetically more stable than CD24⁺ cells and are therefore selected by irradiation. CD24's lack of involvement in tumorigenicity-related phenotypes might explain inconsistencies observed in clinical studies. Our findings could have interesting applications in the evaluation of the intrinsic radiation response of primary tumors. Therefore, CD24 labeling could help to design better therapeutic protocols.

Material and Methods

Cell culture

MCF-7 and MDA-MB-436 cell lines were from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). The cell lines were grown in adherent conditions, maintained in Dulbecco's modified Eagle medium 4.5 g/L glucose, 0.11 g/L sodium pyruvate, glutamate (GlutaMAX 1™) and pyridoxine, supplemented with 5% fetal calf serum, penicillin, streptomycin and amphotericin B (antibiotic-antimycotic mix) (all from Life Technologies, Cergy-Pontoise, France). Medium for transfected cell lines was supplemented with 0.4 µg/mL puromycin during the transfectant selection phase, and 0.2 µg/mL in routine cell culture. For mammosphere formation, cells were seeded at a concentration of 10³ cells/mL or 10⁴ cells/mL in serum-free culture medium, supplemented with 1/50 B27, 20 ng/mL EGF, 0.4% bovine serum albumin and 4 µg/mL insulin.

All cells were cultured in an atmosphere of 5% CO₂ and 95% humidity. Cell proliferation and survival analyses were performed in three independent experiments, by scoring at least 300 cells each time. The trypan blue exclusion test was used to discriminate between viable and dead cells.

Chemical, reagents and antibodies

All biochemicals were from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France) unless otherwise specified. Reagents for breast cancer stem cell markers are listed in reference (27). Western blot antibodies against ATM, ATR, Chk1, Chk2, and phosphorylated forms were from Cell Signaling (Beverly, MA).

Plasmids and transfection

To stably knock down the expression of CD24 in MCF-7 cells, short hairpin (shRNA)-expressing vectors (puromycin-resistant pEBV-siRNA) were used. SiRNA design and cloning in pEBVsiRNA vectors and establishment of stable knockdown and control clones and populations were carried out as previously described (45). To design shRNA sequences we adopted the DSIR program developed by Vandenbrouck et al. (46). Control cells carried a plasmid expressing an inefficient shRNA sequence.

To induce CD24 expression, open reading frame (ORF) of human CD24 was amplified from an I.M.A.G.E. clone (ID_5591617, Thermo Scientist) with the following primers: 5'-ATGGGCAGAGCAATGGTGGCCAGGCTC-3' and 5'-TTAAGAGTAGAGATGCAGAAGAGAGAG-3' and introduced into a puromycin-resistant pEBV plasmid downstream of a CAG promoter.

Cells were plated 24 h before transfection with Fugene HD (Promega, Madison WI) according to the manufacturer's recommendations. After 24-h incubation, cells were trypsinized and seeded in culture medium supplemented with puromycin. Experiments were performed either on the whole transfected population or on selected clones.

Irradiation

For all experiments except clonogenic assays, cells were plated at least 24 h prior to irradiation. On day 0, cells were γ -irradiated using a ^{137}Cs irradiation unit at a dose rate of ~2 Gy/min, and then incubated with fresh medium. In every experiment, studied cells were 10 Gy-irradiated and control cells were submitted to sham irradiation. For clonogenic assays cells were trypsinized and immediately irradiated in suspension for the time required to generate a dose curve of 0, 2, 4, and 6 Gy.

Clonogenic assays

Colony-forming assays were performed immediately after irradiation by plating cells into 6-well plates, in triplicate. After 14 days (MDA-MB-436) or 21 days (MCF-7), cells were fixed for 30 minutes in 4% paraformaldehyde, washed and stained overnight in methylene blue/30% methanol. Colonies containing more than 50 cells (MDA-MB-436) or 10 cells (MFC-7) were counted. The surviving fraction at each radiation dose was normalized to that of the non-irradiated sample, and points were fitted using an exponential tendency curve. At least three independent experiments were performed.

Cell staining

Cancer stem cell marker labeling and analysis were performed as described in Bensimon et al (27). For cell cycle analysis, cells were fixed in 70% ethanol overnight, washed in PBS and stained in PBS + 0.025 mg/mL propidium iodide + 0.05 mg/mL RNase A, for 30 minutes at 37°C. For ROS analysis, after soft trypsinization cells were loaded with 2 μ M DCF-DA (Invitrogen) and incubated for 30 minutes at 37°C. Labeled cells were washed, refrigerated on ice and immediately analyzed by flow cytometry.

Flow cytometry

Cells were analyzed on a SORP LSR-II analyzer (Configuration: 488 nm, 561 nm, 405 nm, 355 nm and 635 nm) for cancer stem cell markers, or on a BD FACSCalibur (Configuration: 488 nm and 635 nm) (BD Biosciences, San Jose CA). Data were analyzed with FlowJo v7.6.1 (Tree Star) or BD FACSDiva v6.1.2 software.

Cytogenetic analysis

Metaphase preparations were performed after colcemid (0.06 µg/mL for 1.5 h) and hypotonic (0.075 M KCl for 25 min) treatment, followed by gradual fixations in methanol–acetic acid (3/1). Metaphase spreads were hybridized with a telomeric cyanine 3-conjugated PNA probe (DAKO) followed by hybridization with a FITC-Pan centromeric DNA probe (CAMBIO). The chromosome preparations were counterstained with DAPI and observed under a fluorescence microscope (NIKON FXA). Image acquisition was controlled through QUIPS CGH Analysis software (VYSIS). The following chromosome aberrations were scored: dicentrics (dic), centric and acentric rings (r) and chromosome breaks (csb). Dic and r were assumed to result from two breaks and csb from one break.

RNA extraction and quantitative real-time PCR

Total RNA was extracted from frozen cell pellets with a phenol/chloroform/isopropanol protocol, using RNA Instapure reagent (Eurogentec, France). cDNA synthesis was performed with the SuperScript VILO[®] cDNA Synthesis Kit (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) according to the manufacturer's recommendations. RT-PCR was performed with an ABI Prism 7300 detection apparatus (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) using the Taqman Universal Master Mix according to the manufacturer's recommendations. The Ct value was determined with the Sequence Detection System software. The primers were from Applied Biosystems: Hs02379687_s1 (CD24), Hs99999905_m1 (GAPDH) and Hs99999902_m1 (RPLPO). Levels of gene expression were determined using GENORM software and normalized using GAPDH and RPLPO.

Oxidative stress and antioxidant defense PCR microarray

First strand cDNA synthesis and RT-PCR were performed with the RT² First Strand Kit and RT² Profiler PCR Array (96-well format) “Human Oxidative Stress and Antioxidant Defense” (SA Bioscience Courtaboeuf, France). Assays were performed according to the manufacturer’s recommendations.

In vivo experiments

In vivo experiments were performed on 6-week-old athymic nude female mice (CrI:NU(NCR)-Foxn1^{nu}, Charles River). For each tumor xenograft, cells were mixed in 1:1 PBS/Matrigel in a final volume of 50-100 μ L (BD Bioscience, San Jose CA, USA) and subcutaneously injected. Each group contained 10 mice. Tumor growth was followed by measuring length and width with a digital caliper. Tumor volume was calculated as follows: volume = length * width * mean (length;width)* $\pi/6$.

Statistical analysis

All statistical tests were performed using Statview software. The unpaired two-tailed Student’s t-test was used and a p-value of ≤ 0.05 was considered to indicate statistically significant differences. For PCR microarray analysis, the EMts_2PCA strategy (47) followed by a quadratic distance simple Eisen was used to identify and visualize a gene signature discriminating the samples.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Aknowledgement

We thank F. Chevalier and J. Depagne for western blot experiments, J. Baijer and N. Deschamps for flow cytometry technical assistance and advices and L. Radjou, H. Benjelloun and D. Lewandowski for assistance and advices on ROS experiments. We also acknowledge C Joubert, V Neuville, J Tilliet and all the staff of animal facilities. This work was supported by grants from Electricité de France (EDF).

References

1. Abraham BK, Fritz P, McClellan M, Hauptvogel P, Athelougou M, Brauch H. Prevalence of CD44⁺/CD24⁻/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(3):1154-9. Epub 2005/02/15.
2. Zhou L, Jiang Y, Yan T, Di G, Shen Z, Shao Z, et al. The prognostic role of cancer stem cells in breast cancer: a meta-analysis of published literatures. *Breast cancer research and treatment*. 2010;122(3):795-801. Epub 2010/06/24.
3. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Wicinski J, Cervera N, Finetti P, et al. Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer research*. 2009;69(4):1302-13. Epub 2009/02/05.
4. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell stem cell*. 2007;1(5):555-67. Epub 2008/03/29.
5. Hwang-Verslues WW, Kuo WH, Chang PH, Pan CC, Wang HH, Tsai ST, et al. Multiple lineages of human breast cancer stem/progenitor cells identified by profiling with stem cell markers. *PloS one*. 2009;4(12):e8377. Epub 2009/12/23.
6. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(7):3983-8. Epub 2003/03/12.
7. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer research*. 2005;65(13):5506-11. Epub 2005/07/05.
8. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008;133(4):704-15. Epub 2008/05/20.
9. Morel AP, Lievre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PloS one*. 2008;3(8):e2888. Epub 2008/08/07.
10. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*2006. p. 756-60.
11. Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF, et al. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *Journal of the National Cancer Institute*. 2008/05/01 ed2008. p. 672-9.
12. Phillips TM, McBride WH, Pajonk F. The response of CD24⁻/low/CD44⁺ breast cancer-initiating cells to radiation. *Journal of the National Cancer Institute*2006. p. 1777-85.
13. Blanpain C, Mohrin M, Sotiropoulou PA, Passegue E. DNA-damage response in tissue-specific and cancer stem cells. *Cell stem cell*. 2011;8(1):16-29. Epub 2011/01/08.
14. Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature*2009. p. 780-3.

15. Jaggupilli A, Elkord E. Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: an enduring ambiguity. *Clinical & developmental immunology*. 2012;2012:708036. Epub 2012/06/14.
16. Pham PV, Phan NL, Nguyen NT, Truong NH, Duong TT, Le DV, et al. Differentiation of breast cancer stem cells by knockdown of CD44: promising differentiation therapy. *Journal of translational medicine*. 2011;9:209. Epub 2011/12/14.
17. Morrison R, Schleicher SM, Sun Y, Niermann KJ, Kim S, Spratt DE, et al. Targeting the mechanisms of resistance to chemotherapy and radiotherapy with the cancer stem cell hypothesis. *Journal of oncology*. 2011;2011:941876. Epub 2010/10/29.
18. Ahmed MA, Aleskandarany MA, Rakha EA, Moustafa RZ, Benhasouna A, Nolan C, et al. A CD44(-)/CD24(+) phenotype is a poor prognostic marker in early invasive breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2012;133(3):979-95. Epub 2011/11/29.
19. Kristiansen G, Winzer KJ, Mayordomo E, Bellach J, Schluns K, Denkert C, et al. CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2003;9(13):4906-13. Epub 2003/10/29.
20. Mylona E, Giannopoulou I, Fasomytakis E, Nomikos A, Magkou C, Bakarakos P, et al. The clinicopathologic and prognostic significance of CD44+/CD24(-/low) and CD44-/CD24+ tumor cells in invasive breast carcinomas. *Human pathology*. 2008;39(7):1096-102. Epub 2008/05/23.
21. Giatromanolaki A, Sivridis E, Fiska A, Koukourakis MI. The CD44+/CD24- phenotype relates to 'triple-negative' state and unfavorable prognosis in breast cancer patients. *Med Oncol*. 2011;28(3):745-52. Epub 2010/04/21.
22. Baumann P, Cremers N, Kroese F, Orend G, Chiquet-Ehrismann R, Uede T, et al. CD24 expression causes the acquisition of multiple cellular properties associated with tumor growth and metastasis. *Cancer research*. 2005;65(23):10783-93. Epub 2005/12/03.
23. Ju JH, Jang K, Lee KM, Kim M, Kim J, Yi JY, et al. CD24 enhances DNA damage-induced apoptosis by modulating NF-kappaB signaling in CD44-expressing breast cancer cells. *Carcinogenesis*. 2011;32(10):1474-83. Epub 2011/07/30.
24. Meyer MJ, Fleming JM, Ali MA, Pesesky MW, Ginsburg E, Vonderhaar BK. Dynamic regulation of CD24 and the invasive, CD44posCD24neg phenotype in breast cancer cell lines. *Breast cancer research : BCR*. 2009;11(6):R82. Epub 2009/11/13.
25. Schabath H, Runz S, Joumaa S, Altevogt P. CD24 affects CXCR4 function in pre-B lymphocytes and breast carcinoma cells. *Journal of cell science*. 2006;119(Pt 2):314-25. Epub 2006/01/05.
26. Luce A, Courtin A, Levalois C, Altmeyer-Morel S, Romeo PH, Chevillard S, et al. Death receptor pathways mediate targeted and non-targeted effects of ionizing radiations in breast cancer cells. *Carcinogenesis*. 2009;30(3):432-9. Epub 2009/01/08.
27. Bensimon J, Altmeyer-Morel S, Benjelloun H, Chevillard S, Lebeau J. CD24(-/low) stem-like breast cancer marker defines the radiation-resistant cells involved in memorization and transmission of radiation-induced genomic instability. *Oncogene*. 2013;32(2):251-8. Epub 2012/02/15.

28. Pece S, Tosoni D, Confalonieri S, Mazzarol G, Vecchi M, Ronzoni S, et al. Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content. *Cell*. 2010/01/16 ed2010. p. 62-73.
29. Woodward WA, Chen MS, Behbod F, Rosen JM. On mammary stem cells. *J Cell Sci*. 2005/08/18 ed2005. p. 3585-94.
30. Dembinski JL, Krauss S. Characterization and functional analysis of a slow cycling stem cell-like subpopulation in pancreas adenocarcinoma. *Clinical & experimental metastasis*. 2009/05/08 ed2009. p. 611-23.
31. Holyoake T, Jiang X, Eaves C, Eaves A. Isolation of a highly quiescent subpopulation of primitive leukemic cells in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 1999/09/09 ed1999. p. 2056-64.
32. Roesch A, Fukunaga-Kalabis M, Schmidt EC, Zabierowski SE, Brafford PA, Vultur A, et al. A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell*. 2010/05/19 ed2010. p. 583-94.
33. Vlashi E, Kim K, Lagadec C, Donna LD, McDonald JT, Eghbali M, et al. In vivo imaging, tracking, and targeting of cancer stem cells. *Journal of the National Cancer Institute*. 2009;101(5):350-9. Epub 2009/02/27.
34. Ito K, Hirao A, Arai F, Matsuoka S, Takubo K, Hamaguchi I, et al. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*. 2004/10/22 ed2004. p. 997-1002.
35. Smith J, Ladi E, Mayer-Proschel M, Noble M. Redox state is a central modulator of the balance between self-renewal and differentiation in a dividing glial precursor cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000/08/16 ed2000. p. 10032-7.
36. Sens MA, Somji S, Garrett SH, Beall CL, Sens DA. Metallothionein isoform 3 overexpression is associated with breast cancers having a poor prognosis. *The American journal of pathology*. 2001;159(1):21-6. Epub 2001/07/05.
37. You HJ, Oh DH, Choi CY, Lee DG, Hahm KS, Moon AR, et al. Protective effect of metallothionein-III on DNA damage in response to reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*. 2002/10/18 ed2002. p. 33-8.
38. Gurel V, Sens DA, Somji S, Garrett SH, Nath J, Sens MA. Stable transfection and overexpression of metallothionein isoform 3 inhibits the growth of MCF-7 and Hs578T cells but not that of T-47D or MDA-MB-231 cells. *Breast cancer research and treatment*. 2003/08/12 ed2003. p. 181-91.
39. Pak JH, Choi WH, Lee HM, Joo WD, Kim JH, Kim YT, et al. Peroxiredoxin 6 overexpression attenuates cisplatin-induced apoptosis in human ovarian cancer cells. *Cancer investigation*. 2010/12/21 ed2011. p. 21-8.
40. Svendsen A, Verhoeff JJ, Immervoll H, Brogger JC, Kmiecik J, Poli A, et al. Expression of the progenitor marker NG2/CSPG4 predicts poor survival and resistance to ionising radiation in glioblastoma. *Acta neuropathologica*. 2011/08/25 ed2011. p. 495-510.
41. Neumann CA, Fang Q. Are peroxiredoxins tumor suppressors? *Current opinion in pharmacology*. 2007/07/10 ed2007. p. 375-80.

42. Karihtala P, Kauppila S, Soini Y, Arja Jukkola V. Oxidative stress and counteracting mechanisms in hormone receptor positive, triple-negative and basal-like breast carcinomas. *BMC cancer*. 2011/06/23 ed2011. p. 262.
43. Louderbough JM, Schroeder JA. Understanding the dual nature of CD44 in breast cancer progression. *Molecular cancer research : MCR*. 2011/10/06 ed2011. p. 1573-86.
44. Jaggupilli A, Elkord E. Significance of CD44 and CD24 as Cancer Stem Cell Markers: An Enduring Ambiguity. *Clin Dev Immunol*2012. p. 708036.
45. Biard DS, Despras E, Sarasin A, Angulo JF. Development of new EBV-based vectors for stable expression of small interfering RNA to mimick human syndromes: application to NER gene silencing. *Molecular cancer research : MCR*. 2005;3(9):519-29. Epub 2005/09/24.
46. Vert JP, Foveau N, Lajaunie C, Vandenbrouck Y. An accurate and interpretable model for siRNA efficacy prediction. *BMC bioinformatics*. 2006;7:520. Epub 2006/12/02.
47. Ugolin N, Ory C, Lefevre E, Benhabiles N, Hofman P, Schlumberger M, et al. Strategy to find molecular signatures in a small series of rare cancers: validation for radiation-induced breast and thyroid tumors. *PloS one*. 2011;6(8):e23581. Epub 2011/08/20.

Titles and Legends to Figures

Figure 1: Modulation of CD24 expression in mammary cell lines: effects on *in vitro* and *in vivo* cell growth. Evaluation of transfection efficiency by (A) qRT-PCR (CD24^{high/low/neg} vs. corresponding Mock, ** $p < 0,01$) and (B) flow cytometry (---- isotypic control) (C) Proliferation of transfected MDA-MB-436 and MCF-7 cell lines (D) Relative volume increase of MDA-MB-436 tumors in Nu/Nu nude mice, during 9 weeks after injection (CD24^{high} vs. corresponding Mock, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$) (10 mice/group)

Figure 2: CD24 expression induces oxidative stress and genomic instability. (A) DCF-DA fluorescence in transfected cell lines (--- negative control), representative of ten independent experiments (B) Total numbers of chromosomal breaks for 100 metaphases in transfected cell lines (CD24^{high/neg} vs. corresponding Mock, * $p < 0,05$)

Figure 3: CD24 controls breast cancer radiation response (A) Clonogenic assays after 2, 4 and 6 Gy irradiation of transfected MDA-MB-436 and MCF-7 cells (CD24^{high/low} vs. corresponding Mock, * $p < 0,05$) (B) Time course of cell death of irradiated transfected MDA-MB-436 cells (8 Gy) and MCF-7 cells (10 Gy) (C) Cell cycle analysis of transfected MDA-MB-436 and MCF-7, not irradiated and 3 days (MDA-MB-436) or 5 days (MCF-7) after 10 Gy irradiation

Figure 4: CD24 loss decreases radiation-induced ROS levels (A) DCF-DA fluorescence in 10 Gy irradiated transfected cell lines (--- negative control), representative of five independent experiments. D: days after irradiation (B) Differentially regulated oxidative stress-related genes in transfected MDA-MB-436, without irradiation, and 1 or 24 hours after 10 Gy

irradiation. Independent experiments were performed three times on MDA-MB-436-Mock cells and two times on MDA-MB-436-CD24^{high} cells.

Figures

Figure 1

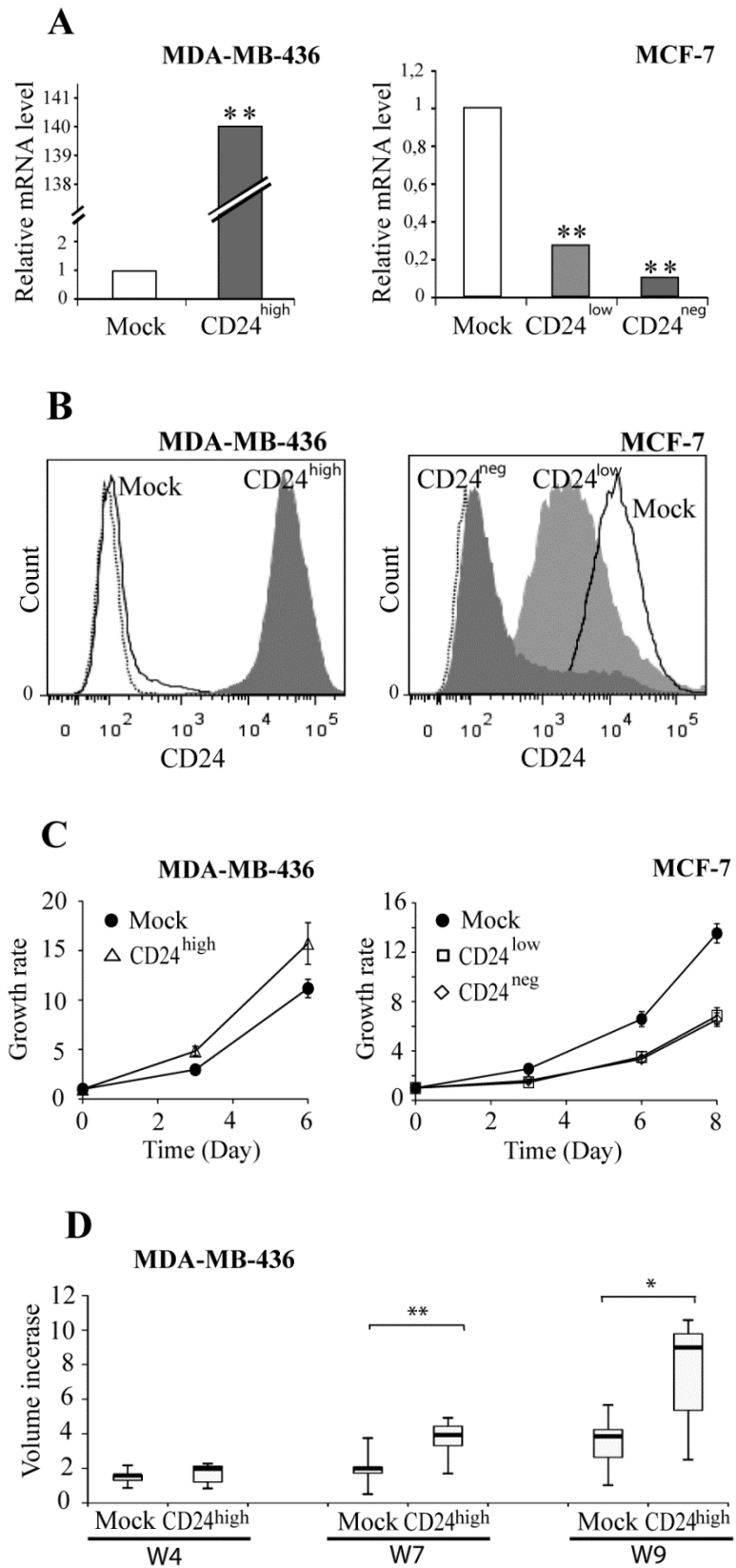


Figure 2

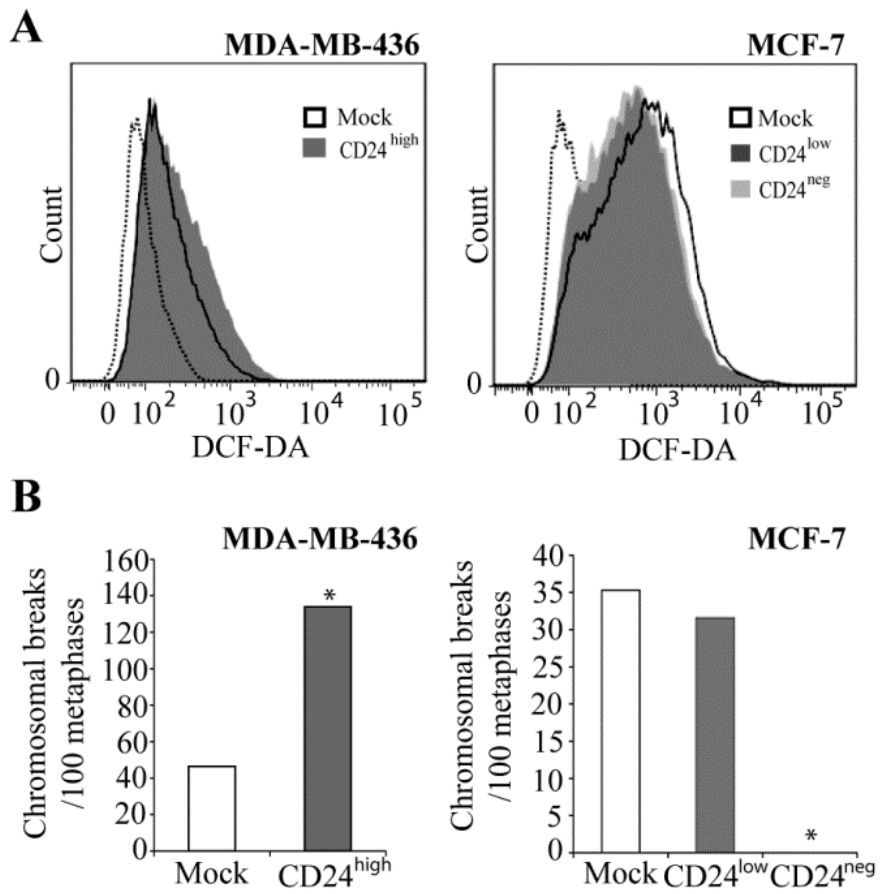


Figure 3

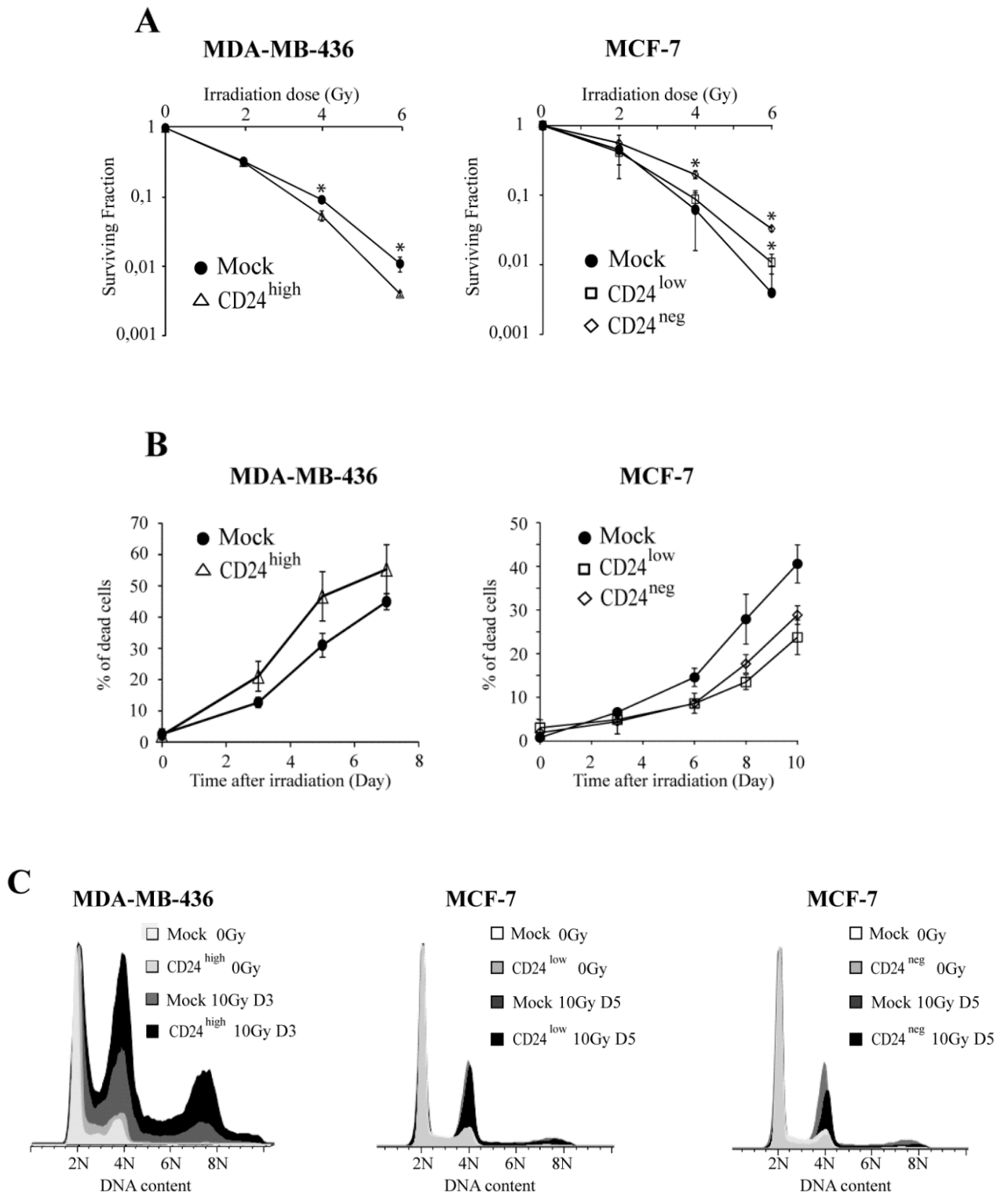
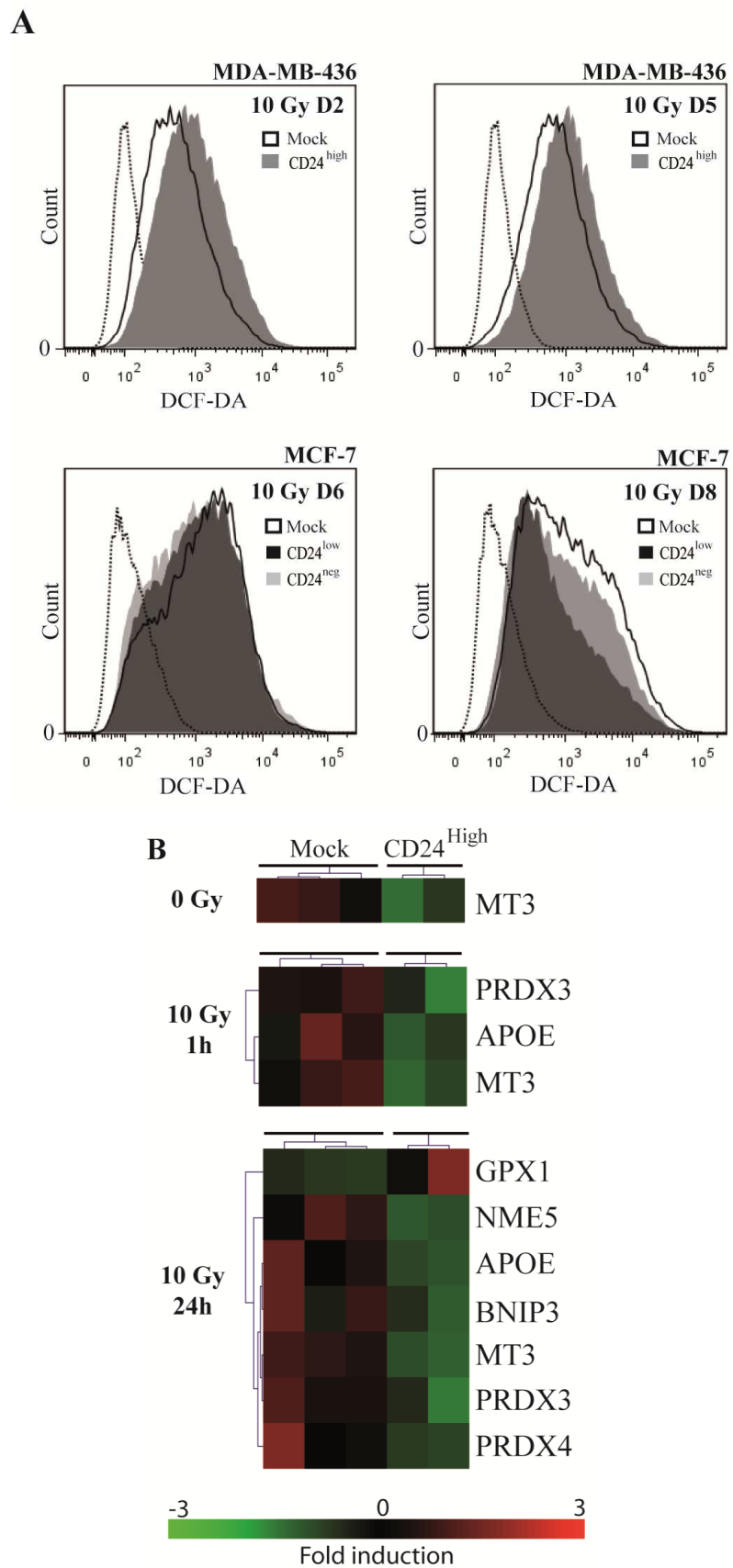


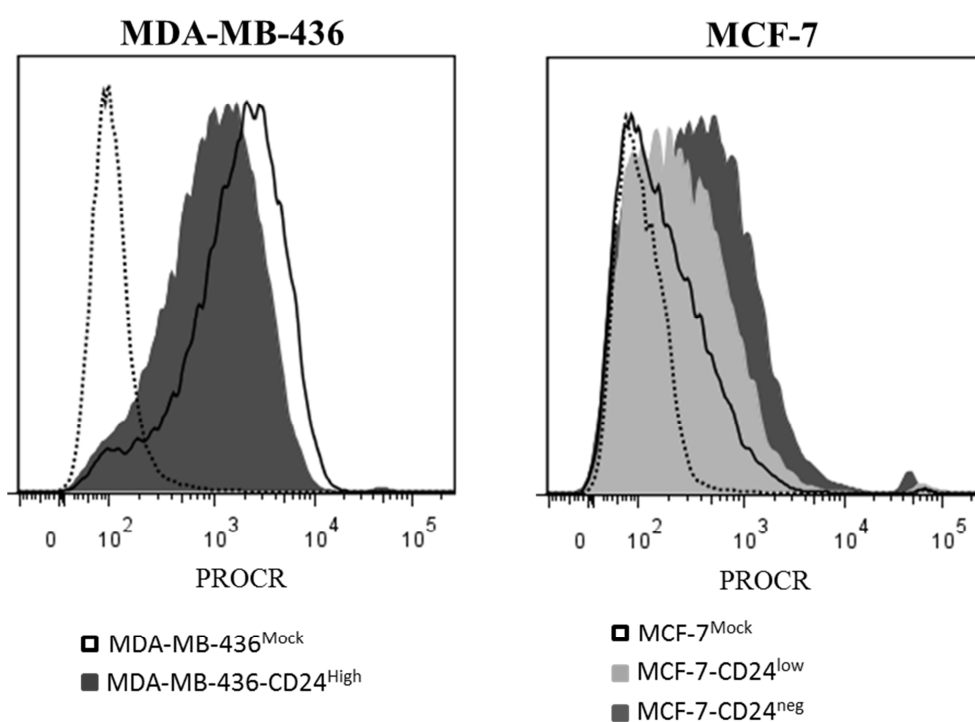
Figure 4



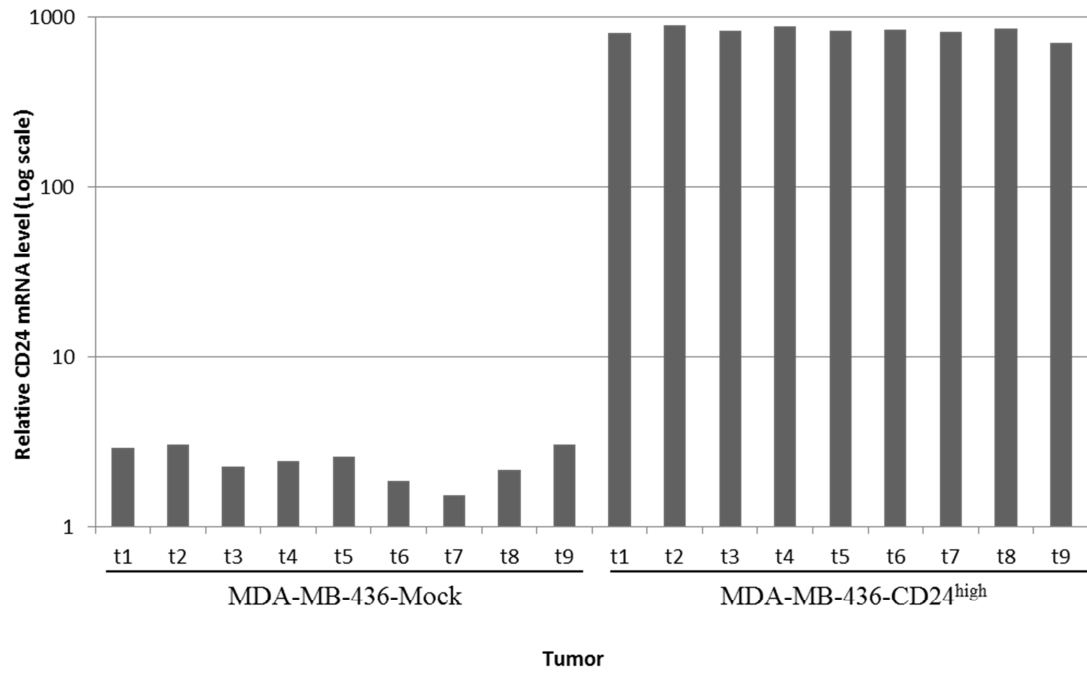
Supplementary figures and tables

	Tumors/injections		
	$5 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^6$
MDA-MB-436-Mock	2/10	9/10	10/10
MDA-MB-436-CD24 ^{high}	2/10	7/10	10/10

Supplementary table 1: Tumors formation ability of transfected MDA-MB-436 cells. Cells were subcutaneously injected in Nu/Nu nude mice at $5 \cdot 10^4$, $2,5 \cdot 10^5$ and $2 \cdot 10^6$ cells per injection. Tumor formation was assessed 6 weeks after injection



Supplementary Figure S1: Flow cytometry analysis of PROCR (CD201) expression in transfected MDA-MB-436 and MCF-7 cells.



Supplementary Figure S2: QRT-PCR analysis of CD24 expression in tumors grown with either MDA-MB-436-Mock cells or MDA-MB-436-CD24^{high} cells.

Conclusion et perspectives

Les résultats présentés dans ce manuscrit posent plusieurs questions, parmi lesquelles 3 nous ont semblé particulièrement intéressantes. D'une part, quelle est la pertinence de CD24 comme marqueur de CSC ? D'autre part, quel est son rôle biologique dans la réponse à l'irradiation ? Enfin, quels enjeux cliniques se dégagent de l'étude de ce marqueur de CSC ? Ces questions ont débouché sur différents axes de recherche développés au laboratoire, et qui seront présentés ici.

CD24, marqueur de cellules souches cancéreuses

Le modèle de progression tumorale hiérarchique suppose qu'une petite sous-population unique de cellules est à l'origine de la masse tumorale, grâce à un potentiel de différenciation et d'auto-renouvellement illimité. Les tentatives d'identification de cette sous-population reposent sur différentes propriétés : tumorigénicité *in vivo*, croissance sans support, divisions asymétriques... Les travaux publiés depuis une dizaine d'années sur les CSC de différents types tumoraux ont montré d'une part l'impossibilité d'identifier un marqueur unique et commun à tous les tissus cancéreux, et d'autre part l'absence de marqueur unique au sein d'un même tissu. En ce qui concerne le cancer du sein, de nombreux marqueurs de CSC ont été proposés, parmi lesquels les principaux sont CD24, CD44, ALDH, Side Population, ESA, PROCR, activité du protéasome faible, CD133... Même si certains de ces marqueurs de CSC mammaires sont plus représentés que d'autres dans la littérature, en particulier CD24/CD44 et ALDH, il semble aujourd'hui évident qu'un seul de ces phénotypes ne peut pas suffire à identifier les CSC telles qu'elles sont décrites dans le modèle de progression tumorale hiérarchique.

Les résultats présentés ici permettent d'associer la protéine CD24 à un ensemble de propriétés bien précises : vitesse de prolifération, niveau de ROS et radiorésistance. Il est intéressant de noter que si CD24 joue un rôle direct dans la réponse à l'irradiation, en revanche, la modification de l'expression de CD24 n'a pas de répercussions sur des phénotypes tels que la capacité à former des mammosphères et la tumorigénicité chez la souris athymique. De plus, CD24 ne semble pas être lié aux autres marqueurs de CSC. Ainsi des marquages multiples ont été réalisés au laboratoire et n'ont montré aucune corrélation particulière entre les différents marqueurs utilisés, et la modification de CD24 dans les lignées mammaires n'a pas eu de répercussions sur les autres marqueurs de CSC, à l'exception de PROCR. Cette protéine de

surface est un marqueur connu de cellules souches embryonnaires, hématopoïétiques et neurales (Ivanova et al, 2002). Notons que le rôle de PROCR, proposé comme marqueur de CSC du sein dans quelques rares articles (Hwang-Versluis et al, 2009; Shipitsin et al, 2007), reste globalement inconnu et nécessiterait d'être approfondi.

On peut donc envisager que chacune des protéines ou activités proposées comme marqueurs de CSC mammaires confère aux cellules un certain nombre de propriétés, indépendamment les unes des autres. Ainsi, ALDH1 est une enzyme responsable de la détoxification des aldéhydes intracellulaires en acides carboxyliques, et SP signe la présence de pompes transmembranaires permettant à aux cellules d'exclure les drogues toxiques. Ces deux activités sont donc liées de fait à la chimiorésistance par leur rôle dans la détoxification des substances toxiques. De même, notre travail indique que CD24 est une protéine associée à la prolifération cellulaire, aux niveaux de ROS intracellulaires et à la réponse à l'irradiation. Enfin, comme pour CD24, le rôle direct de CD44 mériterait d'être approfondi. En effet, il a été proposé que CD44 permettrait d'identifier des cellules tumorigéniques et métastatiques, bien que son implication dans la progression tumorale reste controversée, et dépendrait notamment des modifications post-traductionnelles subies par la protéine (Louderbough & Schroeder, 2011).

Il est intéressant de souligner que le double marquage $CD24^-/CD44^+$ est fréquemment utilisé dans la littérature, et permet d'identifier une sous-population cellulaire possédant un grand nombre de propriétés essentielles attendues des CSC mammaires humaines. En particulier, les lignées cellulaires que nous avons utilisées dans nos travaux présentent des proportions variables de cellules $CD24^-/CD44^+$, et ces proportions sont corrélées à la tumorigénicité de la lignée chez la souris athymique. Cette corrélation n'est pas observée pour les autres marqueurs de CSC. De manière intéressante, alors que nous n'avons pas observé d'influence directe de CD24 sur l'expression de CD44, ces deux protéines seraient co-régulées par le processus d'EMT (Mani et al, 2008; Morel et al, 2008). Ainsi l'EMT et le maintien de voies de signalisations autocrines et paracrines favoriseraient la persistance des cellules dans un état mésenchymateux, caractérisé par une forte proportion de cellules $CD24^-/CD44^+$. L'inhibition de ces voies de signalisation conduirait au contraire à un retour à l'état épithélial, en théorie caractérisé par une proportion prépondérante de cellules $CD24^+/CD44^-$ non souches (Scheel et al, 2011). Enfin, très récemment, Ocana et al. ont proposé que la MET induite par la perte de Prrx1 pourrait également être associée à l'acquisition d'un phénotype de type souche (Brabletz, 2012; Ocana et al, 2012). Globalement, le lien entre les marqueurs de CSC du sein,

notamment entre CD24 et CD44, et le rapport de ces marqueurs avec le processus d'EMT reste à déterminer.

L'ensemble de ces données étayant l'existence d'un modèle de progression tumorale hiérarchique souple, dans lequel le phénotype de CSC serait réversible, plus ou moins couplé à l'EMT, et soumis aux pressions de l'environnement tumoral. Plusieurs sous-populations de CSC pourraient coexister en parallèle dans les cancers du sein, expliquant notamment la difficulté à utiliser les marqueurs de CSC comme marqueurs cliniques fiables. Finalement, l'interconnexion entre ces sous-populations reste un domaine à explorer.

CD24 est impliqué dans un phénotype de résistance à l'irradiation

Comme nous l'avons vu dans un premier temps, le marquage CD24^{-low} permet d'identifier des cellules mammaires radio-résistantes, capables de générer une descendance viable mais génétiquement instable après irradiation. Cette propriété étant généralisable à toutes les lignées cellulaires testées, il était par la suite cohérent de s'intéresser au rôle de CD24 dans la réponse à l'irradiation. Ainsi dans un second temps, la modulation de l'expression de CD24 dans des lignées CD24⁺ et CD24⁻ nous a permis de démontrer que CD24 n'est pas uniquement un marqueur de la réponse à l'irradiation, mais bien un acteur de cette réponse. L'expression forcée de CD24 est à l'origine d'une prolifération plus rapide, d'une augmentation du stress oxydant et de l'instabilité génétique globale. Ces cellules proliférant rapidement sont également plus radiosensibles, en termes de mortalité et de capacités clonogéniques. Au contraire, l'extinction de la protéine CD24 permet de réduire la prolifération, les cellules présentent un stress oxydant moins important et sont plus résistantes à l'irradiation. L'observation de ces propriétés en « miroir », dans des lignées situées aux deux extrémités du processus d'EMT, est un argument fort qui appuie l'hypothèse d'un rôle réel de CD24 quelles que soient les anomalies génétiques associées aux cellules cancéreuses mammaires.

Nous avons démontré que les cellules CD24⁻ qui survivent à l'irradiation transmettent une instabilité génétique persistante à leur descendance, exprimée uniquement par les cellules de type CD24⁺. L'ensemble des résultats obtenus au cours de ma thèse permet d'imaginer un scénario cohérent de transmission de l'instabilité génétique. En effet, comme vu dans l'introduction bibliographique, de nombreux travaux attribuent l'instabilité génétique transgénérationnelle (IGT) à une persistance des ROS en excès dans la descendance des cellules irradiées. Cette perpétuation des ROS serait liée à des modifications épigénétiques des cellules irradiées. Il a notamment été proposé qu'un dysfonctionnement mitochondrial

radio-induit, transmis au cours des divisions cellulaires sur de nombreuses générations, pourrait être responsable de l'instabilité persistante à long terme (Limoli et al, 2003). Nous avons montré que les cellules CD24⁺ présentent un niveau de ROS radio-induits plus élevés et une altération des défenses contre le stress oxydant. On peut donc supposer que l'excès de ROS radioinduits lié à un processus de détoxification moins efficace dans ces cellules est à l'origine de l'augmentation de leur radio-sensibilité. Au contraire, les cellules CD24⁻ seraient sélectionnées par l'irradiation du fait de leur capacité à détoxifier les ROS radioinduits, et seraient seules ainsi capables de générer une descendance viable après une période de mort cellulaire intense. A plus long terme, une surproduction constitutive de ROS serait alors transmise à la descendance des cellules irradiées. Tandis que les cellules CD24⁻ possèdent les défenses adéquates pour éliminer ces ROS, les cellules CD24⁺ présentent une instabilité génétique persistante accrue, de par leur incapacité à les supprimer (figure 28).

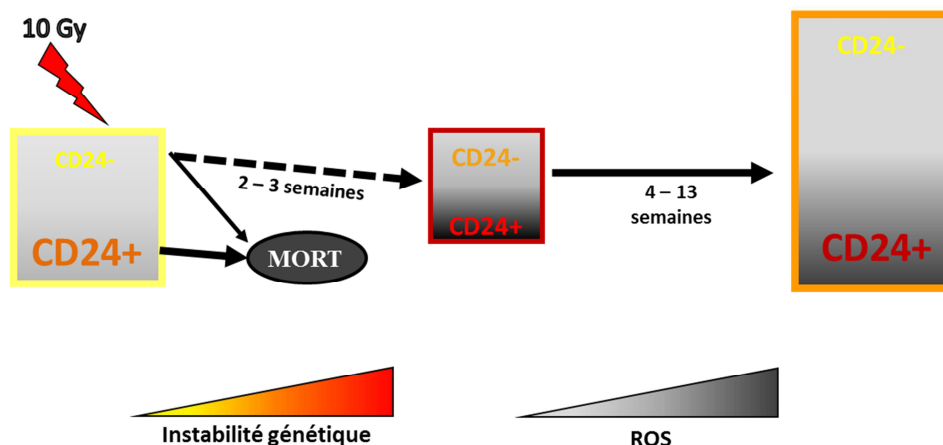


Figure 28 : rôle de CD24 dans la réponse à l'irradiation des cellules de cancer du sein : radiorésistance, instabilité génétique radioinduite et implication des ROS

Ce modèle pose deux questions essentielles : (i) quelle est la nature des modifications épigénétiques transmises par les cellules CD24⁻ irradiées, à l'origine de l'instabilité chromosomique exprimée par la descendance de type CD24⁺ exclusivement ? (ii) Quels mécanismes moléculaires supportent les différences de stress oxydant observées entre les cellules CD24⁻ et CD24⁺? Ces questions font actuellement l'objet de recherches plus approfondies au laboratoire.

(i) *Recherche de modifications épigénétiques responsables de la transmission de l'instabilité génétique persistante radioinduite*

Comme présenté dans l'article I, notre travail suggère fortement l'existence de mécanismes épigénétiques dans la transmission de l'instabilité génétique radioinduite. En revanche, ces mécanismes demeurent inconnus. Des données de la littérature ont montré des changements dans le méthylome global des cellules génétiquement instables après irradiation (Kaup et al, 2006). De plus, des études ont montré des différences de profils de transcription entre les cellules CD24⁻ et CD24⁺ des cancers du sein (Murohashi et al, 2009; Shipitsin et al, 2007). Une hypométhylation des gènes de la voie de signalisation JAK-STAT permettrait de différencier les cellules souches cancéreuses de type CD44⁺/CD24⁻ des cellules CD44⁻/CD24⁺ (Hernandez-Vargas et al, 2011). Enfin, une étude publiée récemment par Armstrong et al. attribue un rôle aux DNA-méthyltransférases dans la radiorésistance des CSC et dans l'instabilité génétique radioinduite (Armstrong et al, 2012). Pour préciser les mécanismes décrits dans l'article I, nous avons choisi dans un premier temps de rechercher si des variations de méthylation de l'ADN et d'expression de gènes pouvaient être responsables de la transmission par les cellules CD24⁻, et de l'expression par les cellules CD24⁺ de l'instabilité génétique radioinduite.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons débuté l'étude des variations des profils de méthylation en utilisant la technique combinée d'enrichissement des régions méthylées (MeDIP : Methylated DNA Immunoprecipitation) suivie par une analyse sur puces de méthylome NimbleGen (Roche). Deux lignées mammaires humaines sont étudiées : T-47D et BT-20. L'objectif est de comparer les profils de méthylation des cellules triées CD24^{-low} et CD24⁺ avant et 3 semaines après irradiation. En parallèle, nous avons également débuté une analyse du transcriptome de ces mêmes cellules sur puces Nimblegen. Les résultats sont actuellement en cours d'analyse et devraient nous permettre de mettre en regard les profils de méthylome et de transcriptome, afin de déterminer si des régions chromosomiques particulières peuvent être à l'origine des différences observées entre les cellules CD24⁻ et CD24⁺, et entre les cellules irradiées et non irradiées. D'autres types d'analyses épigénétiques pourraient également être réalisées : étude du profil d'acétylation de l'ADN, des histones... Notons plus particulièrement que si différentes études ont attribué un rôle central à certains miRNA dans le phénotype de CSC et dans la réponse à l'irradiation, en revanche il n'existe pas de travaux impliquant les miRNA dans la radiorésistance des CSC mammaires. Il serait donc particulièrement pertinent d'étudier les profils de miRNA dans notre modèle.

(ii) *Implication des gènes de réponse au stress oxydant dans la radiorésistance des cellules CD24⁻*

Dans l'article II, nous avons cherché à identifier les voies moléculaires de détoxification des ROS contrôlées par CD24. Plusieurs gènes candidats ont été mis en évidence, notamment MT3, PRDX3/4, GPX1 et NME5. Deux gènes, fortement dérégulés dans notre modèle, nous semblaient pertinents à étudier : NME5 et MT3. En effet, comme indiqué dans l'article II, une surexpression de MT3 a été corrélée à un mauvais pronostic dans les cancers du sein (Sens et al, 2001). Cette protéine jouerait un rôle dans la régulation du stress oxydant (You et al, 2002), et inhiberait la croissance de lignées cancéreuses mammaires (Gurel et al, 2003). Ces propriétés sont en accord avec un rôle de MT3 dans les propriétés de prolifération et de radiorésistance observée.

La protéine NME5 serait quant à elle impliquée dans la résistance à la Gemcitabine des cellules de cancer du pancréas (Li et al, 2012). Nous avons analysé le niveau d'expression du gène NME5 avant et après irradiation à partir du modèle cellulaire de l'article II, c'est-à-dire pour les lignées MCF-7 et MDA-MB-436 qui surexpriment ou sous-expriment CD24. Les résultats préliminaires indiquent que pour les 2 lignées cellulaires, les cellules CD24⁻ expriment plus fortement le gène NME5 que les cellules CD24⁺, et que l'irradiation module l'expression de ce gène. Nous avons également cherché à sous-exprimer NME5 à l'aide de siRNA dans ce même modèle cellulaire, et nous avons constaté que l'extinction de ce gène est extrêmement toxique, en particulier pour les cellules CD24⁻. Enfin, nous avons constaté que la sous-expression de NME5 augmente la mortalité radioinduite des cellules MCF-7 (figure 29).

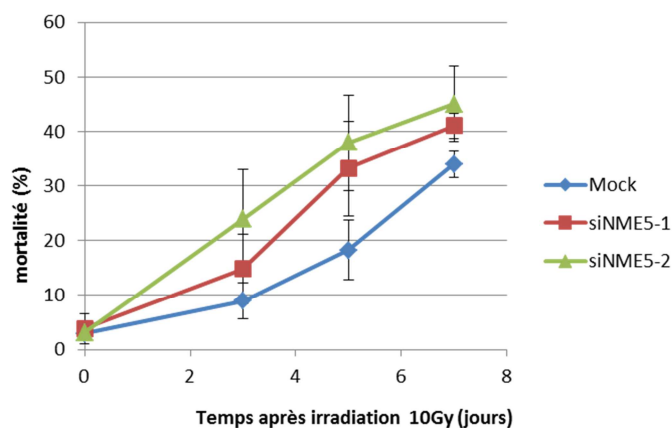


Figure 29 : Effet de la sous-expression de NME5 sur la mortalité radioinduite des cellules MCF-7

L'ensemble de ces données prometteuses laisse supposer que NME5 jouerait un rôle dans la réponse à l'irradiation, en étant régulé par CD24, et que les cellules CD24⁻ dépendraient de l'expression de ce gène pour leur survie. Afin de poursuivre ce travail, il faudra confirmer le rôle de NME5 dans la réponse à l'irradiation sur plusieurs lignées cellulaires. L'extinction de NME5 étant toxique, l'obtention de cellules exprimant faiblement NME5 s'avère assez difficile. Il serait alors intéressant d'observer les effets de la surexpression de ce gène. Enfin il faudrait rechercher les intermédiaires potentiels entre NME5 et CD24. Pour ces deux gènes pris séparément, une interaction directe avec le facteur de transcription NFκB a été décrite (Ju et al, 2011; Li et al, 2012). La régulation de NME5 par CD24 au travers du facteur NFκB semble donc être une piste intéressante à explorer.

CD24 et enjeux cliniques

Quels sont les enjeux cliniques des travaux présentés ici ? Comme décrit dans l'introduction bibliographique, les études de CD24 comme marqueur prédictif ou pronostique sont globalement contradictoires. Les tumeurs du sein se distinguent du tissu sain environnant par la surexpression de CD24 (Bircan et al, 2006; Fogel et al, 1999; Kristiansen et al, 2003). Notons que l'étude de Fogel et al. a proposé l'utilisation de CD24 comme marqueur de cancer du sein plusieurs années avant les travaux de caractérisation des CSC mammaires par le marquage CD24⁻/CD44⁺ (Al-Hajj et al, 2003). Il ressort des études cliniques l'impossibilité d'associer CD24 au pronostique, au risque de rechute et au grade tumoral (Abraham et al, 2005; Giatromanolaki et al, 2010; Zhou et al, 2010).

L'impossibilité d'utiliser CD24 comme marqueur clinique repose peut-être sur les propriétés intrinsèques des cellules CD24⁻ et CD24⁺, démontrées ici. Les cellules CD24⁺ prolifèrent rapidement, comme nous l'avons observé dans les expériences de xénotreffes, et forment rapidement de grosses tumeurs, contrairement aux cellules CD24⁻ qui forment des tumeurs plus petites. De plus CD24 est surexprimé en général par les tumeurs primaires du sein, mais son expression semble décroître au fur et à mesure de la progression tumorale. La surexpression de CD24 est peut-être un avantage sélectif dans les premières étapes de la tumorigenèse mammaire, et conduirait à l'émergence rapide de la tumeur primaire. En revanche, les cellules CD24⁻ sont plus résistantes à l'irradiation et potentiellement à d'autres types de traitements. L'utilisation de CD24 en clinique nécessiterait donc de mieux stratifier les groupes de patientes en fonction du grade tumoral et du traitement reçu, et l'ajout à CD24 d'un marqueur supplémentaire comme CD44 semble incontournable, comme cela a été fait

dans certaines études. Il est toutefois intéressant de noter que les études cliniques évaluant la valeur pronostique de CD44 soulèvent les mêmes questions. Ainsi, dans les tumeurs de faible grade, l'expression de CD44 semble être un marqueur de bon pronostic, tandis que dans les grades élevés son expression n'est soit pas corrélée à l'issue clinique, soit un marqueur de mauvais pronostic (Louderbough & Schroeder, 2011). Ainsi l'utilisation des marqueurs de CSC en clinique se révèle plus compliquée qu'initialement prévue, plus de 10 ans après leur identification.

Des études ont montré que la formation de métastases serait directement liée à la capacité des cellules de la tumeur primaire à effectuer une EMT, suivie d'une transition inverse MET (Ocana et al, 2012; Tsai et al, 2012). Des travaux préliminaires sur le modèle cellulaire présenté dans l'article II ont été réalisés au laboratoire, afin de savoir si la modulation de CD24 peut avoir une influence sur la position des cellules dans l'EMT. En effet, des travaux ont montré que l'induction de l'EMT est associée à un changement phénotypique des cellules $CD24^{low}/CD44^{+}$ en $CD44^{+}/CD24^{low}$ (Mani et al, 2008; Morel et al, 2008). De plus, la proportion naturelle de cellules $CD24^{-}/CD44^{+}$ dans les lignées mammaires est d'autant plus importante que ces lignées présentent un phénotype mésenchymateux et/ou tumorigénique. En revanche il n'existe pas d'étude permettant d'attribuer un rôle à CD24 ou CD44 dans le processus d'EMT. Nous avons donc quantifié différents marqueurs d'EMT et facteurs de transcription dans les lignées MCF-7 et MDA-MB-436, de phénotypes $CD24^{-}$ et $CD24^{+}$. D'une part, nous avons observé grâce à des marquages de cytométrie en flux que la Cadhérine N membranaire diminue dans les cellules MDA-MB-436 qui sur-expriment CD24. D'autre part, il semble que CD24 joue un rôle dans la modulation de certains facteurs de transcription liés à l'EMT. Ainsi, pour la lignée MDA-MB-436, les facteurs Snail2 et Zeb2 sont réprimés dans les cellules qui sur-expriment CD24. A l'inverse, pour la lignée MCF-7, le facteur Snail2 est induit dans les cellules qui présentent une extinction de CD24. Ces résultats préliminaires indiquent que l'absence de CD24 pourrait contribuer à l'induction du processus d'EMT, probablement par le contrôle des facteurs de transcription.

Si le phénotype de souche est étroitement lié au processus d'EMT, quel est l'implication de ces voies dans la radiorésistance des cellules mammaires ? Cette thématique est actuellement développée au laboratoire. En utilisant le modèle cellulaire décrit par Mani et al. (Mani et al, 2008), on constate que l'activation de la voie du TGF- β induit un phénotype mésenchymateux, concomitant avec l'apparition de cellules $CD24^{-}/CD44^{+}$. Cette induction de CSC permet d'étudier les propriétés (radiorésistance et instabilité génétique) des cellules

CD24⁻ dans un modèle mammaire différent de ceux utilisés précédemment. Ce modèle est pertinent pour étudier le rôle du TGF- β dans la radiorésistance des cellules, comme suggéré précédemment (Andarawewa et al, 2007; Bouquet et al, 2011). Enfin, ce modèle permet de décomposer les rôles de CD24 et CD44 dans le processus de cancérogenèse mammaire.

Les tumeurs du sein sont presque toujours traitées par radiothérapie. Cette irradiation quasi-systématique souligne l'importance de l'étude du rôle de CD24. Les résultats présentés ici sont toutefois ambivalents quant aux conséquences de l'expression de CD24 pour les traitements. D'une part, une prépondérance de cellules CD24⁻ dans la tumeur rend celle-ci à priori plus résistante à l'irradiation, et accroît le risque de rechute. D'autre part, nous avons montré que les cellules CD24⁺ descendantes des cellules CD24⁻ présentent après irradiation une instabilité génétique accrue et persistante. Cette instabilité peut conduire ces cellules par des mutations successives à acquérir de nouvelles propriétés, et potentiellement à devenir plus agressives. Cette mutabilité est d'autant plus préjudiciable si l'on considère que ces cellules CD24⁺ sont également capables de générer des cellules CD24⁻ plus résistantes aux traitements, notamment via un processus de type EMT / MET. Il serait donc intéressant d'étudier *in vivo* les conséquences de l'instabilité génétique radio-induite. Notons enfin que le modèle cellulaire présenté dans l'article II pourrait apporter des éléments de réponse quant au lien entre l'expression de CD24 et le processus métastatique. Si nos travaux ont montré un lien entre CD24 et la vitesse de prolifération *in vivo*, il serait ainsi également intéressant de rechercher systématiquement la présence de métastases chez la souris athymique après injection de ces cellules. De telles données pourraient aider à mettre en évidence un rôle de CD24 comme marqueur pronostic.

Il n'existe pas actuellement de recherche de corrélation clinique entre l'expression de CD24 dans les tumeurs mammaires et la réponse à l'irradiation. Finalement, il me semble que le marquage CD24 pourrait présenter un intérêt dans la mise en place des protocoles de radiothérapie.

Références Bibliographiques

Abraham BK, Fritz P, McClellan M, Hauptvogel P, Athellogou M, Brauch H. (2005) Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clin Cancer Res*, Vol. 11, pp. 1154-1159.

Ahmed MA, Aleskandarany MA, Rakha EA, Moustafa RZ, Benhasouna A, Nolan C, Green AR, Ilyas M, Ellis IO. (2011) A CD44(-)/CD24 (+) phenotype is a poor prognostic marker in early invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*.

Aigner S, Sthoeger ZM, Fogel M, Weber E, Zarn J, Ruppert M, Zeller Y, Vestweber D, Stahel R, Sammar M, Altevogt P. (1997) CD24, a mucin-type glycoprotein, is a ligand for P-selectin on human tumor cells. *Blood*, Vol. 89, pp. 3385-3395.

Aktas B, Tewes M, Fehm T, Hauch S, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. (2009) Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res*, Vol. 11, p. R46.

Al-Assar O, Muschel RJ, Manton TS, McKenna WG, Brunner TB. (2009) Radiation response of cancer stem-like cells from established human cell lines after sorting for surface markers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, Vol. 75, pp. 1216-1225.

Al-Hajj M, Clarke MF. (2004) Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene*, Vol. 23, pp. 7274-7282.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 100, pp. 3983-3988.

Ali HR, Dawson SJ, Blows FM, Provenzano E, Pharoah PD, Caldas C. (2011) Cancer stem cell markers in breast cancer: pathological, clinical and prognostic significance. *Breast Cancer Res*, Vol. 13, p. R118.

Allen RG, Tresini M. (2000) Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med*, Vol. 28, pp. 463-499.

Alvi AJ, Clayton H, Joshi C, Enver T, Ashworth A, Vivanco MM, Dale TC, Smalley MJ. (2003) Functional and molecular characterisation of mammary side population cells. *Breast Cancer Res*, Vol. 5, pp. R1-8.

Andarawewa KL, Erickson AC, Chou WS, Costes SV, Gascard P, Mott JD, Bissell MJ, Barcellos-Hoff MH. (2007) Ionizing radiation predisposes nonmalignant human mammary epithelial cells to undergo transforming growth factor beta induced epithelial to mesenchymal transition. *Cancer Res*, Vol. 67, pp. 8662-8670.

Ansieau S. (2012) EMT in breast cancer stem cell generation. *Cancer Lett.*

Armstrong CA, Jones GD, Anderson R, Iyer P, Narayanan D, Sandhu J, Singh R, Talbot CJ, Tufarelli C. (2012) DNMTs are required for delayed genome instability caused by radiation. *Epigenetics*, Vol. 7, pp. 892-902.

Autsavapromporn N, de Toledo SM, Little JB, Jay-Gerin JP, Harris AL, Azzam EI. (2011) The role of gap junction communication and oxidative stress in the propagation of toxic effects among high-dose alpha-particle-irradiated human cells. *Radiat Res*, Vol. 175, pp. 347-357.

Aypar U, Morgan WF, Baulch JE. (2011) Radiation-induced genomic instability: are epigenetic mechanisms the missing link? *Int J Radiat Biol*, Vol. 87, pp. 179-191.

Azzam EI, de Toledo SM, Gooding T, Little JB. (1998) Intercellular communication is involved in the bystander regulation of gene expression in human cells exposed to very low fluences of alpha particles. *Radiat Res*, Vol. 150, pp. 497-504.

Balicki D. (2007) Moving forward in human mammary stem cell biology and breast cancer prognostication using ALDH1. *Cell Stem Cell*, Vol. 1, pp. 485-487.

Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. (2006) Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, Vol. 444, pp. 756-760.

Barber RC, Hickenbotham P, Hatch T, Kelly D, Topchiy N, Almeida GM, Jones GD, Johnson GE, Parry JM, Rothkamm K, Dubrova YE. (2006) Radiation-induced transgenerational alterations in genome stability and DNA damage. *Oncogene*, Vol. 25, pp. 7336-7342.

Baumann M, Krause M, Hill R. (2008) Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. *Nat Rev Cancer*, Vol. 8, pp. 545-554.

Baumann P, Cremers N, Kroese F, Orend G, Chiquet-Ehrismann R, Uede T, Yagita H, Sleeman JP. (2005) CD24 expression causes the acquisition of multiple cellular properties associated with tumor growth and metastasis. *Cancer Res*, Vol. 65, pp. 10783-10793.

Bensimon J, Altmeyer-Morel S, Benjelloun H, Chevillard S, Lebeau J (2013) CD24(-/low) stem-like breast cancer marker defines the radiation-resistant cells involved in memorization and transmission of radiation-induced genomic instability. *Oncogene* **32**: 251-258

Bircan S, Kapucuoglu N, Baspinar S, Inan G, Candir O. (2006) CD24 expression in ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of breast: an immunohistochemistry-based pilot study. *Pathol Res Pract*, Vol. 202, pp. 569-576.

Blick T, Hugo H, Widodo E, Waltham M, Pinto C, Mani SA, Weinberg RA, Neve RM, Lenburg ME, Thompson EW. (2010) Epithelial mesenchymal transition traits in human breast cancer cell lines parallel the CD44(hi)/CD24 (lo/-) stem cell phenotype in human breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, Vol. 15, pp. 235-252.

Bonnet D, Dick JE. (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, Vol. 3, pp. 730-737.

Bouquet F, Pal A, Pilonis KA, Demaria S, Hann B, Akhurst RJ, Babb JS, Lonning SM, DeWyngaert JK, Formenti SC, Barcellos-Hoff MH. (2011) TGFbeta1 inhibition increases the radiosensitivity of breast cancer cells in vitro and promotes tumor control by radiation in vivo. *Clin Cancer Res*, Vol. 17, pp. 6754-6765.

Brabletz T (2012) EMT and MET in metastasis: where are the cancer stem cells? *Cancer cell* **22**: 699-701

Brady CA, Attardi LD. (2010) p53 at a glance. *J Cell Sci*, Vol. 123, pp. 2527-2532.

Britton KM, Eyre R, Harvey IJ, Stemke-Hale K, Browell D, Lennard TW, Meeson AP. (2012) Breast cancer, side population cells and ABCG2 expression. *Cancer Lett*, Vol. 323, pp. 97-105.

Casarsa C, Oriana S, Coradini D. (2008) The controversial clinicobiological role of breast cancer stem cells. *J Oncol*, Vol. 2008, p. 492643.

Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. (2004a) Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*, Vol. 23, pp. 2825-2837.

Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Valent A, Raslova H, Yakushijin K, Horne D, Feunteun J, Lenoir G, Medema R, Vainchenker W, Kroemer G. (2004b) Mitotic catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose suppression entails aneuploidy. *Oncogene*, Vol. 23, pp. 4362-4370.

Chaffer CL, Brueckmann I, Scheel C, Kaestli AJ, Wiggins PA, Rodrigues LO, Brooks M, Reinhardt F, Su Y, Polyak K, Arendt LM, Kuperwasser C, Bierie B, Weinberg RA. (2011) Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 108, pp. 7950-7955.

Chapman JR, Taylor MR, Boulton SJ. (2012) Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell*, Vol. 47, pp. 497-510.

Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Birnbaum D. (2009a) Breast cancer stem cells: tools and models to rely on. *BMC Cancer*, Vol. 9, p. 202.

Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Wicinski J, Cervera N, Finetti P, Hur MH, Diebel ME, Monville F, Dutcher J, Brown M, Viens P, Xerri L, Bertucci F, Stassi G, Dontu G, Birnbaum D, Wicha MS. (2009b) Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Res*, Vol. 69, pp. 1302-1313.

Chen N, Karantza-Wadsworth V. (2009) Role and regulation of autophagy in cancer. *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1793, pp. 1516-1523.

Christgen M, Ballmaier M, Bruchhardt H, von Wasielewski R, Kreipe H, Lehmann U. (2007) Identification of a distinct side population of cancer cells in the Cal-51 human breast carcinoma cell line. *Mol Cell Biochem*, Vol. 306, pp. 201-212.

Christgen M, Geffers R, Ballmaier M, Christgen H, Poczka J, Krech T, Kreipe H, Lehmann U. (2009) Downregulation of the fetal stem cell factor SOX17 by H33342: A mechanism responsible for differential gene expression in breast cancer side population cells. *J Biol Chem*.

Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B. (2003) Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*, Vol. 193, pp. 3-34.

Courtillot C. (2008) Risques génétiques de cancers: que dire, que faire? *Gynécologie et Obstétrique pratique*, Vol. 207.

Creighton CJ, Li X, Landis M, Dixon JM, Neumeister VM, Sjolund A, Rimm DL, Wong H, Rodriguez A, Herschkowitz JI, Fan C, Zhang X, He X, Pavlick A, Gutierrez MC, Renshaw L, Larionov AA, Faratian D, Hilsenbeck SG, Perou CM, Lewis MT, Rosen JM, Chang JC. (2009) Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 106, pp. 13820-13825.

Croker AK, Allan AL. (2011) Inhibition of aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity reduces chemotherapy and radiation resistance of stem-like ALDH(hi)CD44 (+) human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*.

Croker AK, Goodale D, Chu J, Postenka C, Hedley BD, Hess DA, Allan AL. (2008) High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. *J Cell Mol Med*.

Curtin JF, Cotter TG. (2003) Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cell Signal*, Vol. 15, pp. 983-992.

Cutuli B. (2012) [Radiotherapy for breast cancer: which strategy in 2012?]. *Cancer Radiother*, Vol. 16, pp. 493-502.

Dayal D, Martin SM, Limoli CL, Spitz DR. (2008) Hydrogen peroxide mediates the radiation-induced mutator phenotype in mammalian cells. *Biochem J*, Vol. 413, pp. 185-191.

Dayal D, Martin SM, Owens KM, Aykin-Burns N, Zhu Y, Boominathan A, Pain D, Limoli CL, Goswami PC, Domann FE, Spitz DR. (2009) Mitochondrial complex II dysfunction can contribute significantly to genomic instability after exposure to ionizing radiation. *Radiat Res*, Vol. 172, pp. 737-745.

Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, Qian D, Lam JS, Ailles LE, Wong M, Joshua B, Kaplan MJ, Wapnir I, Dirbas FM, Somlo G, Garberoglio C, Paz B, Shen J, Lau SK, Quake SR, Brown JM, Weissman IL, Clarke MF. (2009) Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature*, Vol. 458, pp. 780-783.

Diehn M, Clarke MF. (2006) Cancer stem cells and radiotherapy: new insights into tumor radioresistance. *J Natl Cancer Inst*, Vol. 98, pp. 1755-1757.

Douville J, Beaulieu R, Balicki D. (2008) ALDH1 as a Functional Marker of Cancer Stem and Progenitor Cells. *Stem Cells Dev*.

Emerit I, Quastel M, Goldsmith J, Merkin L, Levy A, Cernjavski L, Alaoui-Youssefi A, Pogossian A, Riklis E. (1997) Clastogenic factors in the plasma of children exposed at Chernobyl. *Mutat Res*, Vol. 373, pp. 47-54.

Engelmann K, Shen H, Finn OJ. (2008) MCF7 side population cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the tumor antigen MUC1. *Cancer Res*, Vol. 68, pp. 2419-2426.

Espié M, Gorins A. (2002) Le sein ; du normal au pathologique : état de l'art In ESKA E (ed.).

Esteller M. (2007) Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature*, Vol. 8, pp. 286-298.

Eyler CE, Rich JN. (2008) Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis. *J Clin Oncol*, Vol. 26, pp. 2839-2845.

Fang X, Cai Y, Liu J, Wang Z, Wu Q, Zhang Z, Yang CJ, Yuan L, Ouyang G. (2011) Twist2 contributes to breast cancer progression by promoting an epithelial-mesenchymal transition and cancer stem-like cell self-renewal. *Oncogene*, Vol. 30, pp. 4707-4720.

Fillmore CM, Kuperwasser C. (2008) Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res*, Vol. 10, p. R25.

Finkel T, Holbrook NJ. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, Vol. 408, pp. 239-247.

Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K. (2003) Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ*, Vol. 10, pp. 76-100.

Fogel M, Friederichs J, Zeller Y, Husar M, Smirnov A, Roitman L, Altevogt P, Sthoeger ZM. (1999) CD24 is a marker for human breast carcinoma. *Cancer Lett*, Vol. 143, pp. 87-94.

Gaur U, Aggarwal BB. (2003) Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol*, Vol. 66, pp. 1403-1408.

Gewirtz DA. (2000) Growth arrest and cell death in the breast tumor cell in response to ionizing radiation and chemotherapeutic agents which induce DNA damage. *Breast Cancer Res Treat*, Vol. 62, pp. 223-235.

Gewirtz DA, Hilliker ML, Wilson EN. (2009) Promotion of autophagy as a mechanism for radiation sensitization of breast tumor cells. *Radiother Oncol*, Vol. 92, pp. 323-328.

Gewirtz DA, Holt SE, Elmore LW. (2008) Accelerated senescence: an emerging role in tumor cell response to chemotherapy and radiation. *Biochem Pharmacol*, Vol. 76, pp. 947-957.

Ghisolfi L, Keates AC, Hu X, Lee DK, Li CJ. (2012) Ionizing radiation induces stemness in cancer cells. *PLoS One*, Vol. 7, p. e43628.

Giatromanolaki A, Sivridis E, Fiska A, Koukourakis MI. (2010) The CD44+/CD24- phenotype relates to 'triple-negative' state and unfavorable prognosis in breast cancer patients. *Med Oncol*.

Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G. (2007a) ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*, Vol. 1, pp. 555-567.

Ginestier C, Korkaya H, Dontu G, Birnbaum D, Wicha MS, Charafe-Jauffret E. (2007b) [The cancer stem cell: the breast cancer driver]. *Med Sci (Paris)*, Vol. 23, pp. 1133-1139.

Golstein P, Kroemer G. (2007) Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci*, Vol. 32, pp. 37-43.

Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. (1996) Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med*, Vol. 183, pp. 1797-1806.

Grotenhuis BA, Wijnhoven BP, van Lanschot JJ. (2012) Cancer stem cells and their potential implications for the treatment of solid tumors. *J Surg Oncol*, Vol. 106, pp. 209-215.

Gudkov AV, Komarova EA. (2003) The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. *Nat Rev Cancer*, Vol. 3, pp. 117-129.

Gurel V, Sens DA, Somji S, Garrett SH, Nath J, Sens MA (2003) Stable transfection and overexpression of metallothionein isoform 3 inhibits the growth of MCF-7 and Hs578T cells but not that of T-47D or MDA-MB-231 cells. *Breast Cancer Res Treat* **80**: 181-191

Hadnagy A, Gaboury L, Beaulieu R, Balicki D. (2006) SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations. *Exp Cell Res*, Vol. 312, pp. 3701-3710.

Hamada N, Matsumoto H, Hara T, Kobayashi Y. (2007) Intercellular and intracellular signaling pathways mediating ionizing radiation-induced bystander effects. *J Radiat Res (Tokyo)*, Vol. 48, pp. 87-95.

Han JS, Crowe DL. (2009) Tumor initiating cancer stem cells from human breast cancer cell lines. *Int J Oncol*, Vol. 34, pp. 1449-1453.

Hannoun-Levi JM, Marsiglia H. (2004) [Brachytherapy boost for breast cancer: what do we know? Where do we go?]. *Cancer Radiother*, Vol. 8, pp. 248-254.

Harrison H, Farnie G, Brennan KR, Clarke RB. (2010a) Breast cancer stem cells: something out of notching? *Cancer Res*, Vol. 70, pp. 8973-8976.

Harrison H, Farnie G, Howell SJ, Rock RE, Stylianou S, Brennan KR, Bundred NJ, Clarke RB. (2010b) Regulation of breast cancer stem cell activity by signaling through the Notch4 receptor. *Cancer Res*, Vol. 70, pp. 709-718.

Hayashida T, Jinno H, Kitagawa Y, Kitajima M. (2011) Cooperation of cancer stem cell properties and epithelial-mesenchymal transition in the establishment of breast cancer metastasis. *J Oncol*, Vol. 2011, p. 591427.

Heddleston JM, Li Z, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN. (2009) The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle*, Vol. 8, pp. 3274-3284.

Hernandez-Vargas H, Ouzounova M, Le Calvez-Kelm F, Lambert MP, McKay-Chopin S, Tavtigian SV, Puisieux A, Matar C, Herceg Z. (2011) Methylome analysis reveals Jak-STAT pathway deregulation in putative breast cancer stem cells. *Epigenetics*, Vol. 6, pp. 428-439.

Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U, Goodell MA, Brenner MK. (2004) A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 101, pp. 14228-14233.

Hollier BG, Tinnirello AA, Werden SJ, Evans KW, Taube JH, Sarkar TR, Sphyris N, Shariati M, Kumar SV, Battula VL, Herschkowitz JI, Guerra R, Chang JT, Miura N, Rosen JM, Mani

SA. (2013) FOXC2 expression links epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties in breast cancer. *Cancer Res.*

Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. (2009) Cell death. *N Engl J Med*, Vol. 361, pp. 1570-1583.

Hu X, Ghisolfi L, Keates AC, Zhang J, Xiang S, Lee DK, Li CJ. (2012) Induction of cancer cell stemness by chemotherapy. *Cell Cycle*, Vol. 11, pp. 2691-2698.

Huang L, Snyder AR, Morgan WF. (2003) Radiation-induced genomic instability and its implications for radiation carcinogenesis. *Oncogene*, Vol. 22, pp. 5848-5854.

Hugo H, Ackland ML, Blick T, Lawrence MG, Clements JA, Williams ED, Thompson EW. (2007) Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression. *J Cell Physiol*, Vol. 213, pp. 374-383.

Hwang-Verslues WW, Kuo WH, Chang PH, Pan CC, Wang HH, Tsai ST, Jeng YM, Shew JY, Kung JT, Chen CH, Lee EY, Chang KJ, Lee WH. (2009) Multiple lineages of human breast cancer stem/progenitor cells identified by profiling with stem cell markers. *PLoS One*, Vol. 4, p. e8377.

Iliakis G, Wang Y, Guan J, Wang H. (2003) DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene*, Vol. 22, pp. 5834-5847.

Ilnytskyy Y, Kovalchuk O. (2011) Non-targeted radiation effects-an epigenetic connection. *Mutat Res*, Vol. 714, pp. 113-125.

INCA. (2012) www.e-cancer.fr.

Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C, Hackney JA, Moore KA, Lemischka IR. (2002) A stem cell molecular signature. *Science*, Vol. 298, pp. 601-604.

Jaggupilli A, Elkord E. (2012) Significance of CD44 and CD24 as Cancer Stem Cell Markers: An Enduring Ambiguity. *Clin Dev Immunol*, Vol. 2012, p. 708036.

Johnston MD, Maini PK, Jonathan Chapman S, Edwards CM, Bodmer WF. (2010) On the proportion of cancer stem cells in a tumour. *J Theor Biol*, Vol. 266, pp. 708-711.

Ju JH, Jang K, Lee KM, Kim M, Kim J, Yi JY, Noh DY, Shin I. (2011) CD24 enhances DNA damage-induced apoptosis by modulating NF- κ B signaling in CD44 expressing breast cancer cells. *Carcinogenesis*.

Kadhim MA, Macdonald DA, Goodhead DT, Lorimore SA, Marsden SJ, Wright EG. (1992) Transmission of chromosomal instability after plutonium alpha-particle irradiation. *Nature*, Vol. 355, pp. 738-740.

- Kai K, Arima Y, Kamiya T, Saya H. (2009) Breast cancer stem cells. *Breast Cancer*.
- Karimi-Busheri F, Rasouli-Nia A, Mackey JR, Weinfeld M. (2010) Senescence evasion by MCF-7 human breast tumor-initiating cells. *Breast Cancer Res*, Vol. 12, p. R31.
- Kasimir-Bauer S, Hoffmann O, Wallwiener D, Kimmig R, Fehm T. (2012) Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in primary breast cancer patients with circulating tumor cells. *Breast Cancer Res*, Vol. 14, p. R15.
- Kass EM, Jasin M. (2010) Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways. *FEBS Lett*, Vol. 584, pp. 3703-3708.
- Kaup S, Grandjean V, Mukherjee R, Kapoor A, Keyes E, Seymour CB, Mothersill CE, Schofield PN. (2006) Radiation-induced genomic instability is associated with DNA methylation changes in cultured human keratinocytes. *Mutat Res*, Vol. 597, pp. 87-97.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, Vol. 26, pp. 239-257.
- Kim GJ, Chandrasekaran K, Morgan WF. (2006) Mitochondrial dysfunction, persistently elevated levels of reactive oxygen species and radiation-induced genomic instability: a review. *Mutagenesis*, Vol. 21, pp. 361-367.
- Kim SY, Rhee JG, Song X, Prochownik EV, Spitz DR, Lee YJ. (2012) Breast cancer stem cell-like cells are more sensitive to ionizing radiation than non-stem cells: role of ATM. *PLoS One*, Vol. 7, p. e50423.
- Kobayashi CI, Suda T. (2012) Regulation of reactive oxygen species in stem cells and cancer stem cells. *J Cell Physiol*, Vol. 227, pp. 421-430.
- Kristiansen G, Winzer KJ, Mayordomo E, Bellach J, Schluns K, Denkert C, Dahl E, Pilarsky C, Altevogt P, Guski H, Dietel M. (2003) CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer. *Clin Cancer Res*, Vol. 9, pp. 4906-4913.
- Lagadec C, Dekmezian C, Bauche L, Pajonk F. (2012a) Oxygen levels do not determine radiation survival of breast cancer stem cells. *PLoS One*, Vol. 7, p. e34545.
- Lagadec C, Pajonk F. (2012) Catch-22: does breast cancer radiotherapy have negative impacts too? *Future Oncol*, Vol. 8, pp. 643-645.
- Lagadec C, Vlashi E, Della Donna L, Dekmezian C, Pajonk F. (2012b) Radiation-induced reprogramming of breast cancer cells. *Stem Cells*, Vol. 30, pp. 833-844.

Lagadec C, Vlashi E, Della Donna L, Meng Y, Dekmezian C, Kim K, Pajonk F. (2010) Survival, self-renewing capacity and multi-lineage potency of breast cancer initiating cells during fractionated radiation treatment. *Breast Cancer Res*, Vol. 12, p. R13.

Langerak P, Russell P. (2011) Regulatory networks integrating cell cycle control with DNA damage checkpoints and double-strand break repair. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, Vol. 366, pp. 3562-3571.

Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. (1994) A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, Vol. 367, pp. 645-648.

Lee KM, Ju JH, Jang K, Yang W, Yi JY, Noh DY, Shin I. (2012) CD24 regulates cell proliferation and transforming growth factor beta-induced epithelial to mesenchymal transition through modulation of integrin beta1 stability. *Cell Signal*, Vol. 24, pp. 2132-2142.

Lefranc F, Facchini V, Kiss R. (2007) Proautophagic drugs: a novel means to combat apoptosis-resistant cancers, with a special emphasis on glioblastomas. *Oncologist*, Vol. 12, pp. 1395-1403.

Lehmann C, Jobs G, Thomas M, Burtscher H, Kubbies M. (2012) Established breast cancer stem cell markers do not correlate with in vivo tumorigenicity of tumor-initiating cells. *Int J Oncol*.

Leth-Larsen R, Terp MG, Christensen AG, Elias D, Kuhlwein T, Jensen ON, Petersen OW, Ditzel HJ. (2012) Functional heterogeneity within the CD44 high human breast cancer stem cell-like compartment reveals a gene signature predictive of distant metastasis. *Mol Med*.

Li F, Hu G, Jiang Z, Guo J, Wang K, Ouyang K, Wen D, Zhu M, Liang J, Qin X, Zhang L. (2012) Identification of NME5 as a contributor to innate resistance to gemcitabine in pancreatic cancer cells. *FEBS J*, Vol. 279, pp. 1261-1273.

Li HZ, Yi TB, Wu ZY. (2008a) Suspension culture combined with chemotherapeutic agents for sorting of breast cancer stem cells. *BMC Cancer*, Vol. 8, p. 135.

Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF, Hilsenbeck SG, Pavlick A, Zhang X, Chamness GC, Wong H, Rosen J, Chang JC. (2008b) Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*, Vol. 100, pp. 672-679.

Limoli CL, Giedzinski E, Morgan WF, Swarts SG, Jones GD, Hyun W. (2003) Persistent oxidative stress in chromosomally unstable cells. *Cancer Res*, Vol. 63, pp. 3107-3111.

Little JB. (2006) Cellular radiation effects and the bystander response. *Mutat Res*, Vol. 597, pp. 113-118.

Liu S, Wicha MS. (2010) Targeting breast cancer stem cells. *J Clin Oncol*, Vol. 28, pp. 4006-4012.

Louderbough JM, Schroeder JA. (2011) Understanding the dual nature of CD44 in breast cancer progression. *Mol Cancer Res*, Vol. 9, pp. 1573-1586.

Lu X, Xu K, Lu H, Yin Y, Ma C, Liu Y, Li H, Suo Z. (2011) CD44(+)/CD24(-) cells are transit progenitors and do not determine the molecular subtypes and clinical parameters in breast carcinomas. *Ultrastruct Pathol*, Vol. 35, pp. 72-78.

Luce A, Courtin A, Levalois C, Altmeyer-Morel S, Romeo PH, Chevillard S, Lebeau J. (2009) Death receptor pathways mediate targeted and non-targeted effects of ionizing radiations in breast cancer cells. *Carcinogenesis*, Vol. 30, pp. 432-439.

Mahmood Z, Shukla Y. (2010) Death receptors: targets for cancer therapy. *Exp Cell Res*, Vol. 316, pp. 887-899.

Maingon P, Chapet O, Barillot I, Romestaing P. (2004) [To boost the tumor bed: the age of reason]. *Cancer Radiother*, Vol. 8, pp. 33-38.

Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg RA. (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, Vol. 133, pp. 704-715.

Marcato P, Dean CA, Giacomantonio CA, Lee PW. (2011) Aldehyde dehydrogenase: its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. *Cell Cycle*, Vol. 10, pp. 1378-1384.

Marchetti P. (2005) [Apoptosis: basic knowledge and applications]. *Gynecol Obstet Fertil*, Vol. 33, pp. 632-641.

Marder BA, Morgan WF. (1993) Delayed chromosomal instability induced by DNA damage. *Mol Cell Biol*, Vol. 13, pp. 6667-6677.

Marjanovic ND, Weinberg RA, Chaffer CL. (2013) Cell plasticity and heterogeneity in cancer. *Clin Chem*, Vol. 59, pp. 168-179.

Marotta LL, Almendro V, Marusyk A, Shipitsin M, Schemme J, Walker SR, Bloushtain-Qimron N, Kim JJ, Choudhury SA, Maruyama R, Wu Z, Gonen M, Mulvey LA, Bessarabova MO, Huh SJ, Silver SJ, Kim SY, Park SY, Lee HE, Anderson KS, Richardson AL, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Liu XS, Root DE, Hahn WC, Frank DA, Polyak K. (2011) The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of CD44CD24 stem cell-like breast cancer cells in human tumors. *J Clin Invest*, Vol. 121, pp. 2723-2735.

Mathews LA, Cabarcas SM, Farrar WL. (2011a) DNA repair: the culprit for tumor-initiating cell survival? *Cancer Metastasis Rev*, Vol. 30, pp. 185-197.

Mathews LA, Cabarcas SM, Hurt EM, Zhang X, Jaffee EM, Farrar WL. (2011b) Increased expression of DNA repair genes in invasive human pancreatic cancer cells. *Pancreas*, Vol. 40, pp. 730-739.

Maugeri-Sacca M, Bartucci M, De Maria R. (2012) DNA damage repair pathways in cancer stem cells. *Mol Cancer Ther*, Vol. 11, pp. 1627-1636.

Maxwell CA, Fleisch MC, Costes SV, Erickson AC, Boissiere A, Gupta R, Ravani SA, Parvin B, Barcellos-Hoff MH. (2008) Targeted and nontargeted effects of ionizing radiation that impact genomic instability. *Cancer Res*, Vol. 68, pp. 8304-8311.

May CD, Sphyris N, Evans KW, Werden SJ, Guo W, Mani SA. (2011) Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: a dangerously dynamic duo in breast cancer progression. *Breast Cancer Res*, Vol. 13, p. 202.

Medema RH, Macurek L. (2012) Checkpoint control and cancer. *Oncogene*, Vol. 31, pp. 2601-2613.

Meyer MJ, Fleming JM, Ali MA, Pesesky MW, Ginsburg E, Vonderhaar BK. (2009) Dynamic regulation of CD24 and the invasive, CD44posCD24neg phenotype in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res*, Vol. 11, p. R82.

Moncharmont C, Levy A, Gilormini M, Bertrand G, Chargari C, Alphonse G, Ardail D, Rodriguez-Lafrasse C, Magne N. (2012) Targeting a cornerstone of radiation resistance: cancer stem cell. *Cancer Lett*, Vol. 322, pp. 139-147.

Morel AP, Lievre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. (2008) Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*, Vol. 3, p. e2888.

Morgan WF, Sowa MB. (2007) Non-targeted bystander effects induced by ionizing radiation. *Mutat Res*, Vol. 616, pp. 159-164.

Morrison R, Schleicher SM, Sun Y, Niermann KJ, Kim S, Spratt DE, Chung CH, Lu B. (2011) Targeting the mechanisms of resistance to chemotherapy and radiotherapy with the cancer stem cell hypothesis. *J Oncol*, Vol. 2011, p. 941876.

Mothersill C, Seymour C. (2012) Are epigenetic mechanisms involved in radiation-induced bystander effects? *Front Genet*, Vol. 3, p. 74.

Murohashi M, Hinohara K, Kuroda M, Isagawa T, Tsuji S, Kobayashi S, Umezawa K, Tojo A, Aburatani H, Gotoh N. (2009) Gene set enrichment analysis provides insight into novel signalling pathways in breast cancer stem cells. *Br J Cancer*.

Mylona E, Giannopoulou I, Fasomytakos E, Nomikos A, Magkou C, Bakarakos P, Nakopoulou L. (2008) The clinicopathologic and prognostic significance of CD44+/CD24(-/low) and CD44-/CD24+ tumor cells in invasive breast carcinomas. *Hum Pathol*, Vol. 39, pp. 1096-1102.

Nagasawa H, Little JB. (1992) Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles. *Cancer Res*, Vol. 52, pp. 6394-6396.

Nakanishi M, Shimada M, Niida H. (2006) Genetic instability in cancer cells by impaired cell cycle checkpoints. *Cancer Sci*, Vol. 97, pp. 984-989.

Nakanishi T, Chumsri S, Khakpour N, Brodie AH, Leyland-Jones B, Hamburger AW, Ross DD, Burger AM. (2010) Side-population cells in luminal-type breast cancer have tumour-initiating cell properties, and are regulated by HER2 expression and signalling. *Br J Cancer*, Vol. 102, pp. 815-826.

Narayanan PK, Goodwin EH, Lehnert BE. (1997) Alpha particles initiate biological production of superoxide anions and hydrogen peroxide in human cells. *Cancer Res*, Vol. 57, pp. 3963-3971.

Neumeister V, Rimm D. (2009) Is ALDH1 a good method for definition of breast cancer stem cells? *Breast Cancer Res Treat*.

Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe JP, Tong F, Speed T, Spellman PT, DeVries S, Lapuk A, Wang NJ, Kuo WL, Stilwell JL, Pinkel D, Albertson DG, Waldman FM, McCormick F, Dickson RB, Johnson MD, Lippman M, Ethier S, Gazdar A, Gray JW. (2006) A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*, Vol. 10, pp. 515-527.

Nguyen NP, Almeida FS, Chi A, Nguyen LM, Cohen D, Karlsson U, Vinh-Hung V. (2010) Molecular biology of breast cancer stem cells: Potential clinical applications. *Cancer Treat Rev*.

Nishi M, Sakai Y, Akutsu H, Nagashima Y, Quinn G, Masui S, Kimura H, Perrem K, Umezawa A, Yamamoto N, Lee SW, Ryo A. (2013) Induction of cells with cancer stem cell properties from nontumorigenic human mammary epithelial cells by defined reprogramming factors. *Oncogene*.

Ocana OH, Corcoles R, Fabra A, Moreno-Bueno G, Acloque H, Vega S, Barrallo-Gimeno A, Cano A, Nieto MA. (2012) Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1. *Cancer Cell*, Vol. 22, pp. 709-724.

Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, Bao JK. (2012) Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif*, Vol. 45, pp. 487-498.

Palumbo S, Comincini S. (2013) Autophagy and ionizing radiation in tumors: the "survive or not survive" dilemma. *J Cell Physiol*, Vol. 228, pp. 1-8.

Pant GS, Kamada N. (1977) Chromosome aberrations in normal leukocytes induced by the plasma of exposed individuals. *Hiroshima J Med Sci*, Vol. 26, pp. 149-154.

Pardali K, Moustakas A. (2007) Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1775, pp. 21-62.

Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Zhou J, Claypool K, Tang DG. (2005) Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2+ and ABCG2- cancer cells are similarly tumorigenic. *Cancer Res*, Vol. 65, pp. 6207-6219.

Patsialou A, Wang Y, Lin J, Whitney K, Goswami S, Kenny PA, Condeelis JS. (2012) Selective gene-expression profiling of migratory tumor cells in vivo predicts clinical outcome in breast cancer patients. *Breast Cancer Res*, Vol. 14, p. R139.

Perou CM. (2011) Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist*, Vol. 16 Suppl 1, pp. 61-70.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, Vol. 406, pp. 747-752.

Pham PV, Phan NL, Nguyen NT, Truong NH, Duong TT, Le DV, Truong KD, Phan NK. (2011) Differentiation of breast cancer stem cells by knockdown of CD44: promising differentiation therapy. *J Transl Med*, Vol. 9, p. 209.

Phillips TM, McBride WH, Pajonk F. (2006) The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst*, Vol. 98, pp. 1777-1785.

Polyak K, Weinberg RA. (2009) Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer*, Vol. 9, pp. 265-273.

Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, Pilotti S, Pierotti MA, Daidone MG. (2005) Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res*, Vol. 65, pp. 5506-5511.

Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, He X, Perou CM. (2010) Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*, Vol. 12, p. R68.

Quignon F, Rozier L, Lachages AM, Bieth A, Simili M, Debatisse M. (2007) Sustained mitotic block elicits DNA breaks: one-step alteration of ploidy and chromosome integrity in mammalian cells. *Oncogene*, Vol. 26, pp. 165-172.

Rass E, Grabarz A, Bertrand P, Lopez BS. (2012) [Double strand break repair, one mechanism can hide another: alternative non-homologous end joining]. *Cancer Radiother*, Vol. 16, pp. 1-10.

Resetskova E, Reis-Filho JS, Jain RK, Mehta R, Thorat MA, Nakshatri H, Badve S. (2009) Prognostic impact of ALDH1 in breast cancer: a story of stem cells and tumor microenvironment. *Breast Cancer Res Treat*.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, Vol. 414, pp. 105-111.

Ricardo S, Vieira AF, Gerhard R, Leitao D, Pinto R, Cameselle-Teijeiro JF, Milanezi F, Schmitt F, Paredes J. (2011) Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *J Clin Pathol*, Vol. 64, pp. 937-946.

Roninson IB, Broude EV, Chang BD. (2001) If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat*, Vol. 4, pp. 303-313.

Roschke AV, Glebov OK, Lababidi S, Gehlhaus KS, Weinstein JN, Kirsch IR. (2008) Chromosomal instability is associated with higher expression of genes implicated in epithelial-mesenchymal transition, cancer invasiveness, and metastasis and with lower expression of genes involved in cell cycle checkpoints, DNA repair, and chromatin maintenance. *Neoplasia*, Vol. 10, pp. 1222-1230.

Sabin RJ, Anderson RM. (2011) Cellular Senescence - its role in cancer and the response to ionizing radiation. *Genome Integr*, Vol. 2, p. 7.

Scandalios JG. (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res*, Vol. 38, pp. 995-1014.

Schabath H, Runz S, Joumaa S, Altevogt P. (2006) CD24 affects CXCR4 function in pre-B lymphocytes and breast carcinoma cells. *J Cell Sci*, Vol. 119, pp. 314-325.

Scheel C, Eaton EN, Li SH, Chaffer CL, Reinhardt F, Kah KJ, Bell G, Guo W, Rubin J, Richardson AL, Weinberg RA (2011) Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast. *Cell* **145**: 926-940

Schindelmann S, Windisch J, Grundmann R, Kreienberg R, Zeillinger R, Deissler H (2002) Expression profiling of mammary carcinoma cell lines: correlation of in vitro invasiveness with expression of CD24. *Tumour Biol* **23**: 139-145

Schmitt F, Ricardo S, Vieira AF, Dionisio MR, Paredes J. (2012) Cancer stem cell markers in breast neoplasias: their relevance and distribution in distinct molecular subtypes. *Virchows Arch*, Vol. 460, pp. 545-553.

Sedelnikova OA, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Georgakilas AG, Bonner WM. (2010) Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. *Mutat Res*, Vol. 704, pp. 152-159.

Sens MA, Somji S, Garrett SH, Beall CL, Sens DA. (2001) Metallothionein isoform 3 overexpression is associated with breast cancers having a poor prognosis. *Am J Pathol*, Vol. 159, pp. 21-26.

Shao C, Stewart V, Folkard M, Michael BD, Prise KM. (2003) Nitric oxide-mediated signaling in the bystander response of individually targeted glioma cells. *Cancer Res*, Vol. 63, pp. 8437-8442.

Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, Mehrotra S, Bhat-Nakshatri P, Turner CH, Goulet R, Jr., Badve S, Nakshatri H. (2006) CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res*, Vol. 8, p. R59.

Shipitsin M, Campbell LL, Argani P, Weremowicz S, Bloushtain-Qimron N, Yao J, Nikolskaya T, Serebryiskaya T, Beroukhim R, Hu M, Halushka MK, Sukumar S, Parker LM, Anderson KS, Harris LN, Garber JE, Richardson AL, Schnitt SJ, Nikolsky Y, Gelman RS, Polyak K. (2007) Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell*, Vol. 11, pp. 259-273.

Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. (2004) Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, Vol. 432, pp. 396-401.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lonning PE, Borresen-Dale AL. (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 98, pp. 10869-10874.

Steffler C. (2010) Strong association between cancer and genomic instability. *Radiat Environ Biophys*, Vol. 49, pp. 125-131.

Takahashi K, Yamanaka S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, Vol. 126, pp. 663-676.

Takebe N, Harris PJ, Warren RQ, Ivy SP. (2011a) Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. *Nat Rev Clin Oncol*, Vol. 8, pp. 97-106.

Takebe N, Warren RQ, Ivy SP. (2011b) Breast cancer growth and metastasis: interplay between cancer stem cells, embryonic signaling pathways and epithelial-to-mesenchymal transition. *Breast Cancer Res*, Vol. 13, p. 211.

Tanaka H, Nakamura M, Kameda C, Kubo M, Sato N, Kuroki S, Tanaka M, Katano M. (2009) The Hedgehog signaling pathway plays an essential role in maintaining the CD44+CD24-/low subpopulation and the side population of breast cancer cells. *Anticancer Res*, Vol. 29, pp. 2147-2157.

Tanei T, Morimoto K, Shimazu K, Kim SJ, Tanji Y, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. (2009) Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. *Clin Cancer Res*, Vol. 15, pp. 4234-4241.

Thompson CB. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, Vol. 267, pp. 1456-1462.

Trentesaux C, Riou JF. (2010) [Senescence and cellular immortality]. *Bull Cancer*, Vol. 97, pp. 1275-1283.

Tsai JH, Donaher JL, Murphy DA, Chau S, Yang J. (2012) Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer Cell*, Vol. 22, pp. 725-736.

Vakifahmetoglu H, Olsson M, Zhivotovsky B. (2008) Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ*, Vol. 15, pp. 1153-1162.

Valerie K, Yacoub A, Hagan MP, Curiel DT, Fisher PB, Grant S, Dent P. (2007) Radiation-induced cell signaling: inside-out and outside-in. *Mol Cancer Ther*, Vol. 6, pp. 789-801.

Van Phuc P, Nhan PL, Nhung TH, Tam NT, Hoang NM, Tue VG, Thuy DT, Ngoc PK. (2011) Downregulation of CD44 reduces doxorubicin resistance of CD44CD24 breast cancer cells. *Onco Targets Ther*, Vol. 4, pp. 71-78.

Velasco-Velazquez MA, Homsí N, De La Fuente M, Pestell RG. (2012) Breast cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*.

Vennin P, Adenis C (2008) Qu'est-ce qu'une femme à risque génétique de cancer du sein? *Gynécologie et Obstétrique pratique* **207**: 6-7

Vera-Ramirez L, Sanchez-Rovira P, Ramirez-Tortosa MC, Ramirez-Tortosa CL, Granados-Principal S, Lorente JA, Quiles JL. (2011) Free radicals in breast carcinogenesis, breast cancer progression and cancer stem cells. Biological bases to develop oxidative-based therapies. *Crit Rev Oncol Hematol*, Vol. 80, pp. 347-368.

Vermeulen L, de Sousa e Melo F, Richel DJ, Medema JP. (2012) The developing cancer stem-cell model: clinical challenges and opportunities. *Lancet Oncol*, Vol. 13, pp. e83-89.

Vesuna F, Lisok A, Kimble B, Raman V. (2009) Twist modulates breast cancer stem cells by transcriptional regulation of CD24 expression. *Neoplasia*, Vol. 11, pp. 1318-1328.

Vicencio JM, Galluzzi L, Tajeddine N, Ortiz C, Criollo A, Tasdemir E, Morselli E, Ben Younes A, Maiuri MC, Lavandro S, Kroemer G. (2008) Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path--a mini-review. *Gerontology*, Vol. 54, pp. 92-99.

Visvader JE. (2011) Cells of origin in cancer. *Nature*, Vol. 469, pp. 314-322.

Visvader JE, Lindeman GJ. (2008) Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*, Vol. 8, pp. 755-768.

Vitale I, Galluzzi L, Castedo M, Kroemer G. (2011) Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol*, Vol. 12, pp. 385-392.

Vlashi E, Kim K, Lagadec C, Donna LD, McDonald JT, Eghbali M, Sayre JW, Stefani E, McBride W, Pajonk F. (2009a) In vivo imaging, tracking, and targeting of cancer stem cells. *J Natl Cancer Inst*, Vol. 101, pp. 350-359.

Vlashi E, McBride WH, Pajonk F. (2009b) Radiation responses of cancer stem cells. *J Cell Biochem*, Vol. 108, pp. 339-342.

Wang Y, Taniguchi T. (2012) MicroRNAs and DNA damage response: Implications for cancer therapy. *Cell Cycle*, Vol. 12.

Waris G, Ahsan H. (2006) Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinog*, Vol. 5, p. 14.

Watson GE, Lorimore SA, Macdonald DA, Wright EG. (2000) Chromosomal instability in unirradiated cells induced in vivo by a bystander effect of ionizing radiation. *Cancer Res*, Vol. 60, pp. 5608-5611.

Wicha MS. (2012) Migratory gene expression signature predicts poor patient outcome: Are cancer stem cells to blame? *Breast Cancer Res*, Vol. 14, p. 114.

Woodward WA, Chen MS, Behbod F, Alfaro MP, Buchholz TA, Rosen JM. (2007) WNT/beta-catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 104, pp. 618-623.

Woodward WA, Chen MS, Behbod F, Rosen JM. (2005) On mammary stem cells. *J Cell Sci*, Vol. 118, pp. 3585-3594.

Yin H, Glass J. (2011) The Phenotypic Radiation Resistance of CD44/CD24 Breast Cancer Cells Is Mediated through the Enhanced Activation of ATM Signaling. *PLoS One*, Vol. 6, p. e24080.

You HJ, Oh DH, Choi CY, Lee DG, Hahm KS, Moon AR, Jeong HG. (2002) Protective effect of metallothionein-III on DNA damage in response to reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1573, pp. 33-38.

Yu Y, Ramena G, Elble RC. (2012) The role of cancer stem cells in relapse of solid tumors. *Front Biosci (Elite Ed)*, Vol. 4, pp. 1528-1541.

Zhang M, Atkinson RL, Rosen JM. (2010) Selective targeting of radiation-resistant tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 107, pp. 3522-3527.

Zhang M, Behbod F, Atkinson RL, Landis MD, Kittrell F, Edwards D, Medina D, Tsimelzon A, Hilsenbeck S, Green JE, Michalowska AM, Rosen JM. (2008) Identification of tumor-initiating cells in a p53-null mouse model of breast cancer. *Cancer Res*, Vol. 68, pp. 4674-4682.

Zhao P, Lu Y, Jiang X, Li X. (2011) Clinicopathological significance and prognostic value of CD133 expression in triple-negative breast carcinoma. *Cancer Sci*, Vol. 102, pp. 1107-1111.

Zhivotovsky B, Kroemer G. (2004) Apoptosis and genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol*, Vol. 5, pp. 752-762.

Zhou H, Randers-Pehrson G, Waldren CA, Vannais D, Hall EJ, Hei TK. (2000) Induction of a bystander mutagenic effect of alpha particles in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 97, pp. 2099-2104.

Zhou L, Jiang Y, Yan T, Di G, Shen Z, Shao Z, Lu J. (2010) The prognostic role of cancer stem cells in breast cancer: a meta-analysis of published literatures. *Breast Cancer Res Treat*, Vol. 122, pp. 795-801.

Ziech D, Franco R, Pappa A, Panayiotidis MI. (2011) Reactive oxygen species (ROS)--induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutat Res*, Vol. 711, pp. 167-173.

Zielske SP, Spalding AC, Wicha MS, Lawrence TS. (2011) Ablation of breast cancer stem cells with radiation. *Transl Oncol*, Vol. 4, pp. 227-233.

Annexe I

Accumulation of cyclophilin A isoforms in conditioned medium of irradiated breast cancer cells

Chevalier F., Depagne J., Hem S., Chevillard S., Bensimon J., Bertrand P., Lebeau J.

2012, *Proteomics*, Vol. 12, pp. 1756-66

Précédemment au laboratoire, il a été montré que les formes solubles de Fas-L, TRAIL et TNF- α sont secrétées par les cellules mammaires après irradiation et contribuent à la mort cellulaire radioinduite par un effet de type bystander. L'objectif de ce travail est d'identifier de nouveaux facteurs diffusibles, secrétés par les cellules mammaires après irradiation, pouvant participer à cet effet bystander. Pour cela, la lignée T-47D a été irradiée à une dose de 10 Gy, ou non irradiée, et incubée 6 jours plus tard durant 18h dans du milieu neuf. Les protéines solubles du milieu ont ensuite été recherchées grâce à une séparation sur gel 2D suivi par une analyse MALDI-TOF-MS. Différentes protéines sont différentiellement exprimées entre les milieux issus des cellules irradiées et non irradiées. En particulier, la cyclophiline A est augmentée dans les milieux conditionnés des cellules irradiées, et pourrait être impliquée dans la réponse apoptotique des cellules mammaires humaines. Cette approche pourra être appliquée à la recherche et à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

RESEARCH ARTICLE

Accumulation of cyclophilin A isoforms in conditioned medium of irradiated breast cancer cells

François Chevalier¹, Jordane Depagne¹, Sonia Hem², Sylvie Chevillard³, Julie Bensimon³, Pascale Bertrand^{1,4} and Jérôme Lebeau³

¹CEA, DSV, iRCM Plateforme de Protéomique, Fontenay-aux-Roses, France

²INRA, UR 1199, Laboratoire de Protéomique Fonctionnelle, Montpellier, France

³CEA, DSV, iRCM, SREIT Laboratoire de Cancérologie Expérimentale, Fontenay-aux-Roses, France

⁴CEA, DSV, IRCM, SIGRR, Laboratoire des Mécanismes de la Recombinaison, Fontenay-aux-Roses, France

Secreted proteins play a key role in cell signaling and communication. We recently showed that ionizing radiations induced a delayed cell death of breast cancer cells, mediated by the death receptor pathways through the expression of soluble forms of “death ligands.” Using the same cell model, the objective of our work was the identification of diffusible factors, secreted following cell irradiation, potentially involved in cell death signaling. Differential proteomic analysis of conditioned media using 2DE resulted in detection of numerous spots that were significantly modulated following cell irradiation. The corresponding proteins were identified using MALDI-TOF MS and LC-MS/MS approaches. Interestingly, five isoforms of cyclophilin A were observed as increased in conditioned medium of irradiated cells. These isoforms differed in isoelectric points and in accumulation levels. An increase of cyclophilin A secretion was confirmed by Western blotting of conditioned media of irradiated or radiosensitive mammary cells. These isoforms displayed an interesting pattern of protein maturation and post-translational modifications, including an alternating removal of N-terminal methionine, associated with a combination of acetylations and methylations. The role of the protein is discussed in relation with its potential involvement in the mechanisms of intercell relationships and radiosensitivity.

Received: June 17, 2011
Revised: December 16, 2011
Accepted: February 21, 2012

**Keywords:**

Breast cancer / Cell biology / Cyclophilin A / Irradiation / Radiosensitivity / Secretome

1 Introduction

The secretome refers to the global study of proteins that are secreted by a cell, a tissue, or an organism [1]. Although the secretome is a potential source suitable for the discovery of new therapeutic targets or biomarker candidates, the access to

secreted proteins using proteomic analysis represents a challenge for three reasons: (i) the very low concentration in the culture media of most secreted proteins makes their analysis difficult; (ii) their covering and contamination by cytoplasmic or other normally nonsecreted proteins released following cell lysis and death; (iii) the use of FCS in culture media, mandatory to most cell lines, interferes with proteomics techniques [2]. Several technical possibilities were offered to address these three problems: (i) the high separation power of gel-based proteomics methods [3,4], coupled with enrichment techniques based on trichloroacetic acid (TCA) precipitation allowed the concentration and the study of secreted proteins [2,5]; (ii) additional control samples (cytoplasmic and total cell extracts) can limit false positive spots during gel picture analysis; (iii) secreted proteins were collected from cells grown without FCS in culture media in order to reduce serum protein contamination [6,7].

Correspondence: Dr. François Chevalier, CEA, DSV, iRCM, Plateforme de Protéomique, 92260 Fontenay-aux-Roses, France

E-mail: francois.chevalier@cea.fr

Fax: +33-146-549-138

Abbreviations: **Cc**, cytoplasmic extract proteins of control cells; **Ci**, cytoplasmic extract proteins of irradiated cells; **CyPA**, cyclophilin A; **IR**, ionizing radiation; **Sc**, conditioned media of control cells; **SFM**, serum free medium; **Si**, conditioned media of irradiated cells; **Tc**, total extract proteins of control cells; **TCA**, trichloroacetic acid; **Ti**, total extract proteins of irradiated cells

While genetic analyses may provide a list of potentially secreted proteins, proteome analysis is essential to identify proteins actually secreted by cells and tissues under certain conditions. Indeed, secreted proteins from cancer cells were able to control many biological and physiological processes [8].

Cellular exposure to ionizing radiation (IR) can result in the secretion of soluble factors by irradiated cells [9]. In this case, a bystander effects can occur in cells that were never themselves irradiated but were either in close proximity to irradiated cells. In vivo, a bystander effect was observed after injecting mice with either neutron irradiated cells [10] or radioactively labeled cells [11], mixing these with nonirradiated cells and observing subsequent effects in the nonirradiated cells.

Following gamma-irradiation, breast tumor displayed a prolonged G2 blockage, accompanied by a mitotic disorder and considered as a frequent mode of cell death [12]. The mechanisms underlying radiation-induced bystander effects are as yet unclear and the identity of the bystander factors is partially defined. Several interleukine and cytokine were described to participate in such bio-cellular mechanisms [13,14], but it is likely that multiple pathways are involved in the bystander phenomenon, and different cell types respond differently to bystander signaling. We have shown previously that irradiation of mammary tumor cells led to late cell death by apoptosis. After a 10-Gy irradiation, the proliferative capacity was almost fully inhibited; only few cell clones were able to emerge, showing the selection of radioresistant cells. This growth inhibition was mediated by the Fas, TRAIL, and TNF-alpha death receptor pathways through the expression of mains ligands/receptors implicated in these three pathways. Moreover, we showed that the three ligands were also produced as soluble forms whose secretion can induce the death of sensitive cells through a “bystander” type effect [15].

The aim of the present work is focused on the research and characterization of new diffusible factors during radioinduced cell death of mammary cancer cells. These diffusible factors could be implicated in cell death and potentially associated with bystander effects. So, using a proteomic strategy specifically developed for secreted proteins, the goal of this study was the investigation of cell secretome for the identification of proteomic changes associated with IRs.

According to a gel-based secretomic analysis, several isoforms of cyclophilin A (CyPA) were observed as specifically over-expressed in conditioned medium from irradiated cells. Spot isoforms were analyzed by MS, and the level of secreted CyPA was estimated in different mammary cell lines. Our study provides evidence that protein secretion was increased following irradiation and protein function could be connected to radiosensitivity.

2 Materials and methods

2.1 Cell cultures

T-47D, MCF7, BT-20, ZR-75-1, MDA-MB-157, and MDA-MB-231 cell lines were obtained from the American Type

Culture Collection (Rockville, MD, USA). Cells were maintained in DMEM, 4.5 g/L glucose, 0.11 g/L sodium pyruvate, glutamate (GlutaMAX 1™) and pyridoxine, supplemented with 5% (T-47D, MCF7, and MDA-MB-231), or 10% (BT-20 and MDA-MB-157) FCS, penicillin, streptomycin, and amphotericin B (antibiotic–antimycotic mix) (all from Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) in 5% CO₂ and 95% humidity. Cell proliferation and survival analyses were performed in two or more independent experiments, by scoring at least 300 cells each time. Discrimination between viable and dead cells was performed by trypan blue exclusion.

2.2 Irradiation and conditioned medium collection

Cells were plated 48 h prior to irradiation. On day 0 (concentration of 4×10^6 cells per 75 cm² flask), cells were 10 Gy-irradiated in a serum-free DMEM, using a 137Cs irradiation unit at dose rate of 2 Gy/min, and then incubated with fresh medium. Six days after irradiation, the medium was removed and the cell layer was washed once with PBS and thrice with serum-free medium (SFM), SFM was added to the cells for an incubation period of 18 h after which cell layer as well as SFM were collected (Fig. 1). In parallel, non-irradiated cells (concentration of 4×10^5 cells per 75 cm² flask at day 0, in order to obtain a concentration of 4×10^6 cells per flask at day 6) were similarly treated. Two independent biological replicates were used for subsequent proteomic analyses.

2.3 Conditioned medium, cytosolic, and total protein extraction

Proteins were extracted from conditioned medium by precipitation. Briefly, SFM with secreted proteins was centrifuged at $10\,000 \times g$ for 10 min at 4°C to remove dead cells and large debris. Proteins were precipitated according to the method of Hirtz et al. applied for secreted salivary proteins [5], with the modification of Chevallet et al. applied for cell secretome [2].

Briefly, secreted proteins in SFM were incubated with 7.5% TCA and 0.1% NLS (N-Lauroyl Sarcosine) at –20°C overnight. The protein suspension was then centrifuged at $42\,000 \times g$ for 10 min at 4°C and the pellet was washed two times with ice cold acetone/2-ME (0.07% v/v), centrifuged again as previously, and the final pellet was dried in the air. Proteins were resuspended in proteomic sample buffer containing 9 M urea, 4% CHAPS, 0.05% Triton X-100, 65 mM DTT, and a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Meylan, France). Samples were stored at –20°C.

Total proteins were extracted from intact cell as following. Cells were collected following trypsinization and cell pellets were washed three times in PBS. Half of cells were dissolved in proteomic sample buffer to obtain the total protein extract. This suspension was centrifuged at 68 000 rpm for 60 min, supernatants were collected, aliquoted, and stored

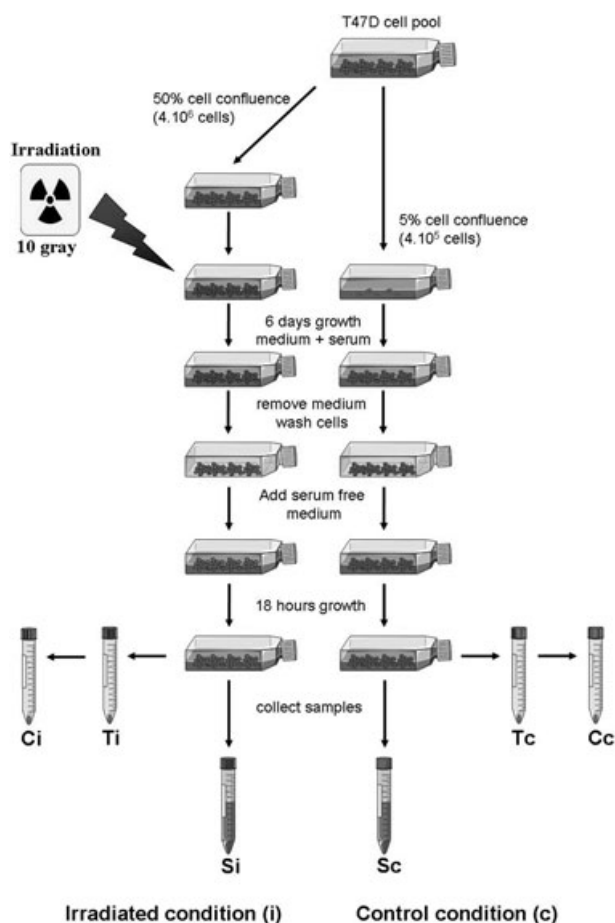


Figure 1. Protocol strategy to produce conditioned media of control (Sc) or irradiated cell (Si); total cell extracts of control (Tc) or irradiated cell (Ti); cytoplasmic cell extracts of control (Cc) or irradiated cell (Ci).

at -20°C until usage. The other half of intact cell was used to extract cytosolic proteins. Cells were resuspended in fresh SFM, cytosolic fraction was obtained after cell membrane disruption with ten strokes in a dounce potter (verified by microscopy) and centrifuge at $10\,000 \times g$ for 5 min at 4°C to remove cell nuclei and membrane debris. Cytosolic proteins were then precipitated as described previously for the secreted proteins.

The protein content of the solubilized samples was estimated using the Bradford method.

2.4 2DE

2DE was performed as previously described [16] with three technical replicates and two independent biological experiments using precast 18 cm strips, pH range 3–10 NL (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), for the first dimension,

and 12% acrylamide SDS-polyacrylamide gel for the second dimension. Gels were batch-stained with silver nitrate [17] with a Dodeca stainer unit (Bio-Rad) and scanned to images that were digitized with a GS 800 densitometer (Bio-Rad).

2.5 Image analysis

Images from stained gels were digitalized at 300 dpi with a GS 710 densitometer (Biorad, Hercules, CA, USA) and analyzed using the Samespots software v4.0 (Non-linear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK). Gel replicates were grouped to create a global analysis with all conditions. Spots of each samples were compared between control and irradiated conditions. A multivariate statistic analysis was performed using the statistic mode of the Samespots software (Non-linear Dynamics). Spots with significant differences between control and irradiated cells (ANOVA t -test $p < 0.05$) were first extracted. Then, only spots with a q value < 0.05 and a power > 0.8 were finally selected. Spots of interest were selected for subsequent protein identification by MS analysis.

2.6 In-gel digestion

Spots were excised from gels manually. All subsequent steps were done automatically using a Multiprobe II robot (Perkin-Elmer). Spots were first washed with $300\ \mu\text{L}$ of water and then $300\ \mu\text{L}$ of $25\ \text{mM}\ \text{NH}_4\text{HCO}_3$. Destaining was performed twice in the presence of $300\ \mu\text{L}$ of 50% ACN in $25\ \text{mM}\ \text{NH}_4\text{HCO}_3$. Gel pieces were then dehydrated twice by $300\ \mu\text{L}$ of 100% CH_3CN , and finally dried at 37°C for 1 h. Eight microliters of a trypsin solution (Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega, Madison, WI, USA), at a concentration of $0.0125\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ in $25\ \text{mM}\ \text{NH}_4\text{HCO}_3$, was added to every spot. Digestion was performed overnight at 37°C and was stopped by addition of 0.1% TFA. Resulting fragments were extracted twice with $50\ \mu\text{L}$ ACN/water (1:1, v/v) containing 0.1% TFA for 15 min. Pooled supernatants were concentrated with a speedvac to a final volume of ca $20\ \mu\text{L}$.

2.7 MALDI-TOF MS analysis

For the direct identification of protein, peptides were simultaneously desalted and concentrated with C18 Zip-Tip micro-columns to a final volume of $3\ \mu\text{L}$. An aliquot of each sample was mixed (1/1) with the CHCA matrix at half saturation in ACN/water (1:1, v/v) and the mixture was immediately spotted on the MALDI target. For the analysis of phosphorylations, protein digests were diluted in loading buffer (80% ACN, 5% TFA) [18], and loaded on TiO_2 home-made micro-columns as described previously [19, 20]. After two washing steps with $10\ \mu\text{L}$ loading buffer and $60\ \mu\text{L}$ buffer 2 (80% ACN,

1% TFA), phosphopeptides were eluted using 2 μ L NH_4OH , pH 12 directly onto the MALDI target, then mixed with 1 μ L of DHB matrix (20 g/L) in acetonitrile, water, and phosphoric acid (50/44/6). In order to identify the proteins, the flow through of the TiO_2 microcolumns was dried, resuspended in 2 μ L of DHB matrix, and spotted onto the MALDI target.

All mass spectra were recorded in the reflector mode on an UltraFlex II MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Automatic annotation of monoisotopic masses was performed using Bruker's SNAPTM procedure. Protein identification was achieved using the Mascot search engine (v. 2.2.04; Matrix Science, London, UK) to query locally the UniProt-SwissProt database (release July 2011). For PMF identification, the following parameters were used: *Homo sapiens* for the taxonomy, 100 ppm mass accuracy in MS, trypsin as enzyme, one missed cleavage allowed, carbamidomethylation of Cysteine as fixed modification and acetylation of N-term protein, deamidation of N or Q, and oxidation of Methionines as variable modification. For the analysis of protein modifications (PMF and MS/MS), mass accuracy was set to 0.5 Da in MS/MS and the following variable modifications were allowed: acetylation of lysines, Pyro-Glutamylation of N-term E or Q, and methylation of D or E. In PMF, protein was validated once they showed identity with p -value <0.05 . After MS/MS, peptides were validated once they showed identity or extensive homology ($p <0.05$) or manually checked for validation and assignment of modified sites.

2.8 Nano LC-MS/MS analysis

When low-abundant spots could not be identified by PMF, LC-MS/MS analysis was conducted. The sample preparation was done as above and protein digests were analyzed using a High Capacity ion trap mass spectrometer (Esquire HCT; Bruker Daltonik), interfaced with a nano-HPLC Chip-Cube system (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). The chips contained both the precolumn and the column (Zorbax 300SB-C18; Agilent Technologies). Samples were first loaded onto the 4 mm enrichment cartridge at a flow rate of 4 μ L/min using 0.1% formic acid. After preconcentration, peptides were separated on the column (75 μ m diameter, 43 mm length) at a flow rate of 0.3 μ L/min using a 15 min linear gradient from 3% to 80% acetonitrile in 0.1% formic acid, and eluted into the mass spectrometer. A capillary voltage of 1.8–2.1 kV in the positive ion mode was used together with a dry gas flow rate of 4.5 L/min at 250°C. A first full-scan mass spectrum was measured in the 310 m/z to 1800 m/z range, followed by a second scan at higher resolution to measure precisely the mass of the three major ions in the previous scan. Finally, a third scan was performed to acquire the collision-induced MS/MS spectra of the selected ions. MS/MS raw

data were analyzed using Data Analysis software (Bruker Daltonik) to generate the peak lists. The UniProt-SwissProt database (release July 2011) database was queried locally using the Mascot search engine (v. 2.2.04; Matrix Science) and the following parameters: *H. sapiens* for the taxonomy, mass accuracy of 0.6 Da in MS and MS/MS, trypsin as enzyme, one missed cleavage allowed, carbamidomethylation of Cysteine as fixed modification and acetylation of N-term protein, deamidation of N or Q, and oxidation of Methionine as variable modifications. Proteins were validated once they showed at least one peptide with identity or extensive homology ($p <0.05$).

2.9 1D and 2D Western blotting analysis

For 1D Western blotting analysis, prestained standards (See Blue 2, Invitrogen) and protein samples were separated by NuPAGE Novex Bis-Tris gels with MOPS (3-(*N*-morpholino)propane sulfonic acid) SDS running buffer on 4–12% separating gels (Invitrogen). For 2D Western blotting analysis, proteins were separated as previously described in the Section 2.4, with some technical adjustments. Briefly, 20 μ g of protein was first separated with 7 cm pI 3–10 NL precast strips (GE Healthcare) and then separated on a 12% acrylamide SDS-polyacrylamide gel, using the Protean 3 electrophoresis unit (Bio-Rad). Following 1D or 2D gel separation, proteins were transferred onto PVDF membrane (GE Healthcare) and blocked with 5% skim milk powder in TBS-T (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 0.05% Tween-20) for 45 min at 20°C. Blots were incubated with anti-CyPA antibody (1:1000, ref 07–313, Millipore) in TBS-T with 1% skim milk powder overnight at 4°C and were washed 3 \times for 10 min with TBS-T. The blots were then incubated with secondary antibodies: HRP-conjugated goat antirabbit antibody (1:10 000, GE Healthcare) in TBS-T with 1% skim milk powder for 45 min at 20°C and were washed with TBS-T. Blots were treated with ECL EZ chemiluminescence reagent (ATGC) for 1 min before exposure to Hyperfilms (GE Healthcare) from 1 to 2 min. Films were developed and scanned as JPEGs using a GS 800 Bio-Rad scanner.

2.10 RNA extraction and quantitative real-time RT-PCR

RNA extraction was performed as previously described [15] by Taqman assays (Applied Biosystems, France). The primers: Hs99999904_m1 (CyPA), Hs99999905_m1 (GAPDH), and Hs99999903_m1 (ACTG1/ β -actin) were from Applied Biosciences. Gene expression was estimated as previously described [15].

3 Results and discussion

3.1 Proteomic comparison between conditioned media and control samples

To analyse T47D conditioned medium of irradiated cells, the choice of protein extraction and control samples was fundamental. To explore this proteome, we employed the TCA–NLS protein precipitation protocol by Chevallet et al. [2] for the enrichment of secreted proteins in conditioned medium from control or irradiated T47D cells. This protocol appears to reproducibly provide high recovery rates while maintaining compatibility with 2DE analysis.

To investigate the characteristic secretome of cells following irradiation, conditioned media were analyzed by 2DE in 3–10 nonlinear pH gradient strips. Special care was given to limit contamination by cellular proteins and serum albumin. Indeed, conditioned media were collected during the last 18 h of growth period, when cells were grown with SFM (Fig. 1). Media with secreted proteins were collected and submitted to a centrifugation step before protein precipitation to reduce contamination by floating cells or cell debris. In addition, to demonstrate specificity of findings, respective total and cytosolic cell extracts were analyzed in parallel as proposed previously [21] to limit false positive secreted proteins.

Two-dimensional gel analysis was performed with adequate control samples to highlight specifically secreted proteins following cell irradiation. In a first time, gel pictures of conditioned medium from irradiated cells (Si) were compared with gel pictures of conditioned medium from control cells (Sc) and spots significantly modulated were correspondingly tagged. The same analyses were performed independently with gels of total extract proteins from irradiated cells (Ti) compared with gels of total extract proteins from control cells (Tc); or gels of cytoplasmic extract proteins from irradiated cells (Ci) compared with gels of cytoplasmic extract proteins from control cells (Cc). A set of spots tagged as modulated by cell irradiation on secreted samples was extracted. On this basis, spots specifically modulated in secreted samples were highlighted, and spots common between secreted and total or cytosolic fractions were speculated to come from total cell or cytosolic protein contamination of secretome.

Approximately 1000 distinct protein spots were detected on each of the silver-stained gels, for a total of 1447 spots. The overall spot pattern derived from total protein extract and cytosolic extract of T47D-control cells was very similar. A careful examination of replicate gels for both group samples revealed some significant differences between total extract samples (Tc vs. Ti) and between cytosolic samples (Cc vs. Ci) with 233 spots and 122 spots modulated, respectively. But such differentially expressed spots were used as false positive when differences were shared with the comparison between conditioned medium samples (Sc vs. Si). All differentially expressed spots were grouped as a function of analyzed samples and were visualized using a Venn diagram (Fig. 2).

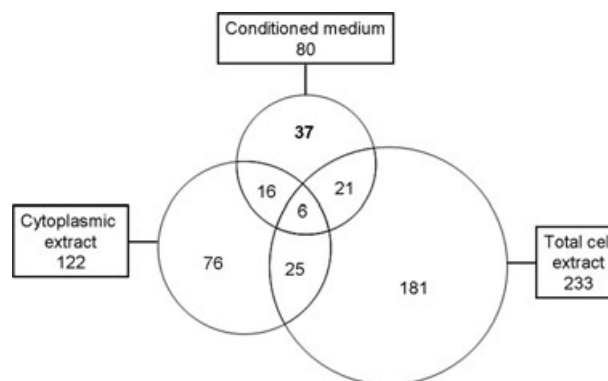


Figure 2. Venn diagram of spots differentially expressed in response to irradiation of T47D cells in conditioned media (Sc vs. Si), cytoplasmic extracts (Cc vs. Ci), and total cell extracts (Tc vs. Ti). Spots in bold were selected as specific.

According to the global analysis of 1447 spots, 80 spots (5.5%) were differentially expressed ($p < 0.05$) between secreted samples of controls and irradiated cells. Among these modulated spots, 37 spots (4.7%) were finally selected as specifically differentially expressed in conditioned medium (Fig. 2). Indeed, more than half of spots were eliminated from the analysis as possible contamination, because they were as well differentially expressed with total extract analysis (Tc vs. Ti) and cytosolic extract analysis (Cc vs. Ci).

Preparative gels, stained with Coomassie blue, were finally performed and 24 spots were effectively visible, picked off, and analyzed using MS (Table 1). From these, 19 spots were over-expressed in Si samples and five over-expressed in Sc samples.

According to MS identification, modulated spots were related to 17 distinct protein accessions. The gel location of these spots was depicted (Fig. 3).

Spots 51 and 101 were increased in Sc samples and corresponded to bovine dextrin and BSA. As T47D cells derived from a human ductal breast epithelial tumor, these bovine proteins were considered without any doubt as a contamination from FCS used for in vitro cell growth. Additionally, serum albumin is well known to be a highly cell-sticky and abundant serum protein, and very difficult to eliminate completely. According to our protocol to generate conditioned media, cells were washed three times with PBS before a short growth period without serum to remove as much as possible of such serum protein. Nevertheless, some proteins of bovine origin remained, these contaminant spots were highlighted by MS. When asking databases for protein identification, “mammalia” or “all entries” were selected as taxonomy parameter to include contaminant proteins from other species as well as human proteins from the cell line.

Spots 23, 72, 106, and 113, corresponding to pyruvate kinase isozymes M1/M2, cofilin-1, calreticulin, and ribonucleoprotein K were observed as over-expressed in Sc samples. These proteins were not described as secreted, but belonged

Table 1. Proteins modulated in T47D cells following irradiation

Spot	Protein name ^{a)}	Si/Sc ^{b)}	Fold	ANOVA (p)	q value	Power	Identification score ^{c)}	Accession	Matched peptides	% coverage	Theoric p/	Observed p/	Theoric MW	Observed MW
2	Coatamer protein complex	Si	4.3	3.07×10^{-06}	1.62×10^{-04}	1.00	66	P61923	1	5	4.8	4.4	20.3	19.3
5	Cellular retinoic acid-binding protein 2	Si	3.6	6.00×10^{-06}	2.08×10^{-04}	1.00	133	P29373	4	28	5.4	6.5	15.7	14.4
6	Gamma-glutamyl-cyclotransferase	Si	3.4	5.08×10^{-08}	3.18×10^{-05}	1.00	324	O75223	6	33	8.5	4.5	12.9	21
8	TRAPPC3	Si	3	3.64×10^{-06}	1.62×10^{-04}	1.00	41	O43617	1	4	4.85	4.5	20.2	18.3
11	Myosin regulatory light chain 12B	Si	2.9	3.62×10^{-06}	1.62×10^{-04}	1.00	157	O14950	3	18	4.69	4.4	19.6	18.1
18	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 10	Si	2.6	1.65×10^{-06}	1.03×10^{-04}	1.00	55	O75832	1	3	5.7	7.1	24.4	24.4
19	Cyclophilin A	Si	2.5	5.95×10^{-04}	2.32×10^{-03}	0.99	108*	P62937	13	66	7.7	6.7	18	15.8
21	Gamma-glutamyl-cyclotransferase	Si	2.5	3.02×10^{-04}	1.45×10^{-03}	1.00	271	O75223	5	28	5.1	4.5	21.0	21
23	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	Sc	2.4	3.34×10^{-04}	1.59×10^{-03}	1.00	178	P14618	4	8	7.95	6.4	57.8	64.4
28	Proteasome subunit beta type-2	Si	2.3	4.84×10^{-04}	2.09×10^{-03}	1.00	54	P49721	1	4	6.2	6.1	22.3	23.4
32	60S acidic ribosomal protein P0	Si	2.1	1.26×10^{-03}	3.83×10^{-03}	0.98	303	Q8NHW5	7	23	5.7	6.2	34.3	36
38	Glutathione S-transferase Mu 2	Si	2	1.88×10^{-05}	3.39×10^{-04}	1.00	115	Q03013	2	11	6	7	25.7	25.2
51	Dextrin (bovine)	Sc	1.8	4.08×10^{-03}	8.83×10^{-03}	0.91	133	P60981	5	21	8.1	7.6	18.5	17.3
72	Cofilin-1	Sc	1.6	1.90×10^{-03}	4.92×10^{-03}	0.96	84*	P23528	8	51	8.2	7.2	18.5	17.5
84	Triosephosphate isomerase	Si	1.5	8.34×10^{-07}	7.26×10^{-05}	1.00	147*	P60174	15	72	6.5	7	26.6	26.3
87	Cellular retinoic acid-binding protein 2	Si	1.5	5.20×10^{-03}	1.03×10^{-02}	0.89	133	P29373	4	28	5.4	5.4	15.6	14.9
89	Cyclophilin A	Si	1.5	2.86×10^{-02}	3.64×10^{-02}	0.84	136*	P62937	17	78	7.7	7.4	18	16.5
92	Cyclophilin A	Si	1.5	7.44×10^{-06}	2.15×10^{-04}	1.00	137*	P62937	17	78	7.7	6.7	18	16.5
97	Cyclophilin A	Si	1.4	2.87×10^{-03}	6.22×10^{-03}	0.94	127*	P62937	14	71	7.7	6.1	18	16.6
101	Serum albumin (bovine)	Sc	1.4	9.16×10^{-04}	3.17×10^{-03}	0.99	161	P02768	4	5	5.7	6	66.5	74
106	Calreticulin variant	Sc	1.3	1.77×10^{-03}	4.78×10^{-03}	0.97	89*	Q53G71	17	52	4.3	4.1	46.9	76.3
113	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	Sc	1.6	8.96×10^{-05}	6.98×10^{-04}	1.00	469	P61978	9	21	5.2	4.9	51	68.6
132	Protein DJ-1	Si	1.4	7.68×10^{-05}	6.31×10^{-04}	1.00	248	Q99497	7	31	6.3	5.8	19.9	23.9
159	Cyclophilin A	Si	1.4	4.22×10^{-03}	9.13×10^{-03}	0.91	159*	P62938	20	86	7.7	7.2	18	16.5

ANOVA, q value, and power were obtained from image analysis with the Samespots software using the statistical package. The observed MW and pI of the differentially expressed protein spots and the theoretical values of identified proteins are also listed

a) For each spot, only the protein with the highest score is shown.

b) Si: Spots increased in the conditioned media of irradiated cells, Sc: spots increased in the conditioned media of control (nonirradiated) cells.

c) Scores with asterisks (*) referred to PMF MALDI-TOF identification of proteins; scores without asterisks referred to low-abundant spots, identified with nano-LC-MS/MS.

to structural or cellular metabolism protein families on sub-cellular compartments and could be release through secretion of exosomes [22, 23].

The 18 other spots appeared as specifically over-expressed in Si samples. According to the ExPASy Proteomics Server (<http://expasy.org/sprot/>), most of the identified proteins were situated in the cytoplasm and/or extra-cellular compartments. Of course, many proteins were counted in more than one cellular compartment. For example, cellular retinoic acid-binding protein 2 is described as involved in the transports of retinoic acid from the cytoplasm to the nucleus. Upon ligand binding, a conformation change exposes a nuclear localization motif and the protein is transported into the nucleus.

Several proteins described as cytoplasmic were involved in intracellular bio-molecule transport (coatomer protein complex; cellular retinoic acid-binding protein 2), in glutathione biosynthetic process (gamma-glutamylcyclotransferase), in intracellular signal transduction (glutathione S-transferase Mu 2; PAK 2, triosephosphate isomerase), in intracellular chaperone or oxidative stress defence (DJ1), and in extracellular signal transduction (CyPA).

3.2 Comparison of spots identified as CyPA in conditioned media

We decided to focus our interest and perform further protein validation on CyPA. This later was previously described as secreted by colorectal cancer cells using a gel-based secretomic strategy [24] and by breast tumor using a capillary ultrafiltration probe implanted into the central part of tumor [25].

According to picture analysis of secreted, total, and cytosolic extracts, five spots isoforms of CyPA were identified as specifically over-expressed in the secretome of irradiated cells (Fig. 4). These spots were not modulated following cell irradiation in total protein extract (Tc vs. Ti) and in cytosolic extracts (Cc vs. Ci), but were systematically increased in conditioned media of irradiated cells (Fig. 4A and B).

CyPA is an abundant intracellular protein, considered to be the main target of the immunosuppressive drug cyclosporine A [26]; but it is as well secreted from smooth muscle cells, head, and neck cancer cell line [27] and macrophages in response to oxidative stress and lipopolysaccharide, suggesting a cytokine role for CyPA in inflammation and stress response [28]. Moreover, the protein was previously described for being involved in proliferation rate of stem and progenitor cells in mouse subventricular zone after IR [29]. Consequently, further experiments were performed with this protein and CyPA levels were estimated by Western blotting using conditioned media.

The differential expression of CyPA was further confirmed by 1D and 2D Western blot analysis (Figs. 4C and 5A). According to the 1D Western blotting signal intensity, (Fig. 5A), a band near 14 kDa, corresponding to CyPA appeared up-regulated 1.8 times in Si. Using total cell extract as reference,

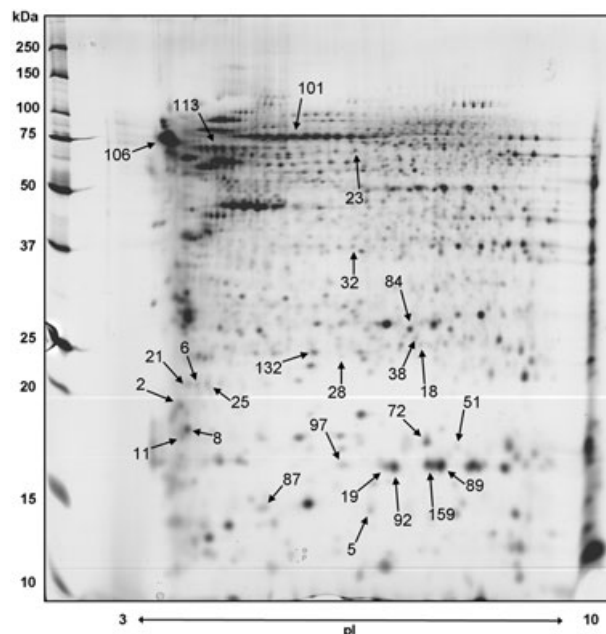


Figure 3. 2DE of proteins from conditioned media of irradiated T47D cells. Fifty micrograms proteins were separated using 18-cm pH 3–10 pI range strips for the first dimension, and 12% acrylamide gels for the second dimension. Spots differentially expressed in response to irradiated treatment as indicated by arrows and identified by mass spectrometry (Table 1).

a faint contamination of conditioned media with cytosolic proteins was observed using actin antibody against secreted proteins (Fig. 5A). It was interesting to observe that cytosolic contamination was almost stable between control and irradiated samples, showing the secretion specificity of CyPA and the relevance of protein modulation in conditioned media following irradiation.

A 2DE–Western blotting analysis was performed too with secretory samples to estimate the differential over-expression of CyPA spot isoforms (Fig. 4C). In agreement with 1D Western blotting, the spots over-expressed in Si samples (spots 19, 89, 92, 97, and 159) and identified by MS as CyPA following the secretomic analysis were all observed over-expressed in Si according to the 2D Western blotting analysis. Additionally, new spots recognized by the CyPA antibody appeared at the same molecular weight (spots 139 and 140), but their amount was not modulated by irradiation according to picture analysis of secreted samples. As these spots appeared to be at the same molecular weights of others CyPA spots, they were likely more alkaline CyPA spots isoforms. It is interesting to observe that in one hand, the level of most acidic isoforms of CyPA was the most increased by irradiation treatment, and in the other hand, the level of the most alkaline isoforms of CyPA was not influenced by treatment (Fig. 4C).

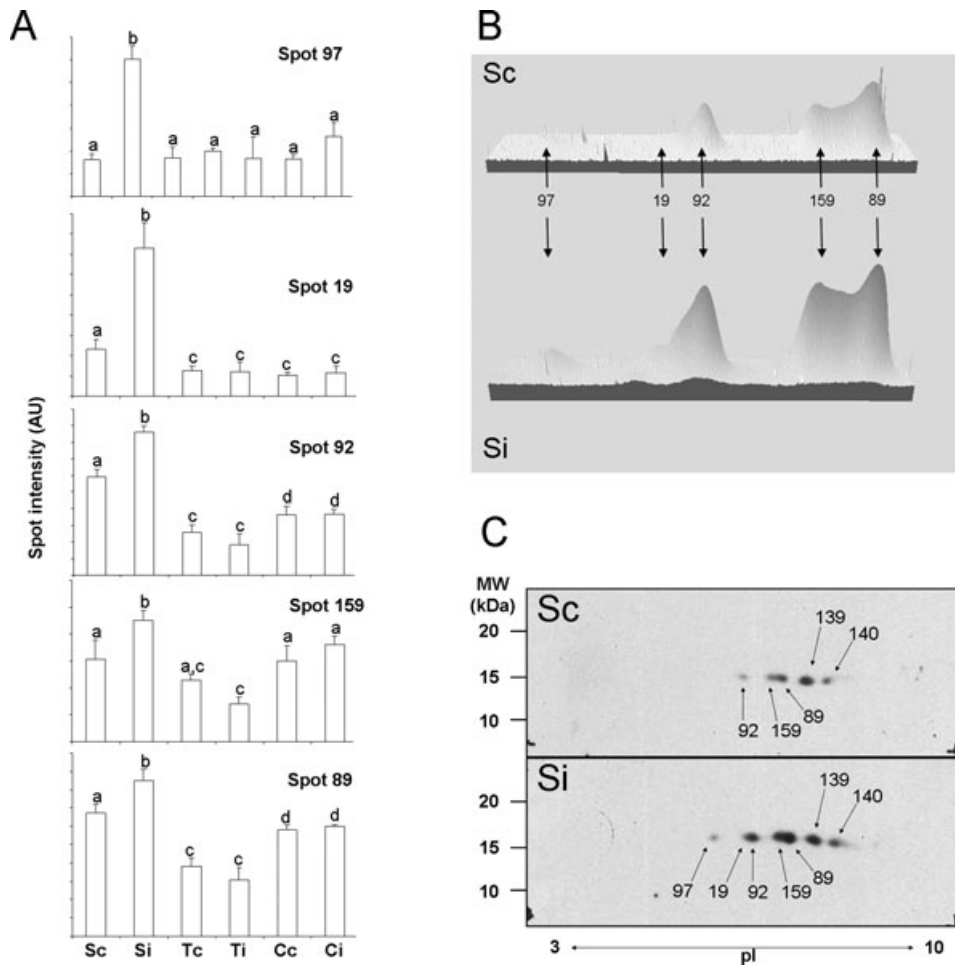


Figure 4. Quantitative comparison of spots 19, 89, 92, 97, and 159, identified as cyclophilin A; (A) amounts in conditioned medium of control cells (Sc), conditioned medium of irradiated cells (Si), total protein extract of control cells (Tc), total protein extract of irradiated cells (Ti), cytoplasmic protein extract of control cells (Cc), and cytoplasmic protein extract of irradiated cells (Ci). Letters represent significantly different groups ($p < 0.05$) on basis of spot intensity; (B) three-dimensional view of spots in Sc (top) and Si (bottom); (C) 2D Western blotting analysis of CyPA, using 7-cm pH 3–10 pI range strips for the first dimension, and 12% acrylamide gels for the second dimension.

3.3 CyPA displayed a complex pattern of PTMs

CyPA was described with a lot of potential post-translational modifications. Seven potential N6-acetyllysine were proposed on amino acids 28, 44, 49, 76, 82, 125, and 131 [30]. By similarity, one phosphoserine (position 21) and one phosphothreonine (position 157) were suggested too [31].

Phosphorylations were researched on spots 139 and 159, identified as CyPA and corresponding to respectively unaffected and increased isoforms following irradiation (Fig. 4C) using a titanium dioxide enrichment strategy. No phosphorylated peptide was observed in the binding fraction, but the analysis of the flow through fraction revealed a complex pattern of maturation and post-translational modifications. Indeed, an alternating removal of N-terminal methionine was observed (Supporting Information Table S1). This N-terminal amino acid was detected as partially acetylated (acetyl N-term-Met or acetyl N-term-Val). Moreover, several lysine acetylation (four locations) and methylations of acidic groups (eight locations) were observed for the first time. Most of these forms were validated with MALDI-TOF/TOF MS/MS peptide fragmentation (Supporting Information data).

The initiator amino acid is not systematically processed by methionine aminopeptidase but it depends of the penultimate amino acid [32]. For example, the initiator methionine was cleaved when the penultimate amino acid was serine or alanine, but in contrast, when valine was in such position, the initiator methionine was not systematically removed [33]. In our case, the penultimate amino acid is a valine and we demonstrated the presence of both species (with or without the initiator methionine), in association with acetyl N-terminal modification.

Acetylations and methylations, in association with an alternative removal of initiator methionine, can induce pI shifts matching with the 2D spot pattern of CypA (Fig. 3). As at least seven spots were revealed by 2D Western blotting analysis (Fig. 4C), it is likely that a complex combination of such modifications occurred.

Initiator methionine processing and amino acid acetylation/methylation were major modifications of proteins implicated in protein activation and targeting [30]. It can be reasonably hypothesized that CyPA structure/activity was modified by such protein maturation/ post-translational modifications as a consequence of

irradiation treatment, leading to an increased secretion of the protein.

3.4 What is the function of CyPA secretion following cell irradiation?

CyPA is an abundant cytosolic protein, participating in the processes of intracellular protein transport, and acting as an ubiquitinous protein with cis-trans-isomerase activity [34]. Moreover, CyPA participates in the signal transduction from T-cell receptor [35], in regulation of inflammatory responses [36], and is a ligand for cyclosporin A, thus determining its immunosuppressing properties [37, 38]. A recent proteomic study revealed that CyPA could be a potential prognostic factor and therapeutic target in endometrial carcinoma [39]. In our system, the cytosolic form of CyPA was not modulated following irradiation. Indeed, according to 1D Western blotting analysis, CyPA amount was not significantly affected following irradiation, using actin as reference (Fig. 5A). Moreover, an RT-PCR analysis of CyPA mRNA did not show significant variation between control and irradiated proteins (results not shown).

In addition to this well-studied cytosolic form, a secretory form of CyPA also exists. Indeed, activated macrophages were able to secrete this protein into the environment [40]. The secretory form of CyPA has been detected in human milk too [41]. Extracellular CyPA acts as a chemotactic agent regulating the migration of monocytes, neutrophils, eosinophils, and T-cells [42]. This protein possesses immunomodulating activity by stimulation of maturation and antigenic presentation in dendritic cells [43]. Following CyPA secretion in response to inflammatory stimuli, CD147 was described as its surface receptor and as an essential component in the CyPA-initiated signaling cascade that culminates in ERK activation [44] and ERK-induced apoptosis [45].

In our model, we have previously showed that 10-Gy irradiation induced an increased secretion of CyPA (Fig. 5A) and an almost fully inhibition of proliferative capacity with only few cell clones ($\sim 1/10^{-4}$) appearing in culture 3–4 wks after irradiation [15]. To investigate a potential link between CyPA secretion and radiosensitivity phenotype, we have studied the amount of cellular and secreted CyPA from six mammary tumor cell lines displaying various level of radiosensitivity (% of dead cells, 7 days after 10-Gy irradiation). These cell lines were not irradiated, only the basal level of CyPA was estimated and quantification was performed by 1D Western blotting (Fig. 5B). For cellular CyPA expression, no significant variation was observed. In contrast, a strong heterogeneity of expression was observed for secreted CyPA analysis. Spontaneous level of secreted CyPA appeared to be related with intrinsic radiosensitivity of studied cell lines. The highest level of secreted CyPA was observed in MDA-MB-157 cells, i.e. the most radiosensitive cell line. Moreover, the lowest level of expression was observed for the most radioresistant cells (MCF7 and MDA-MB-231) and cells displaying an intermediate ra-

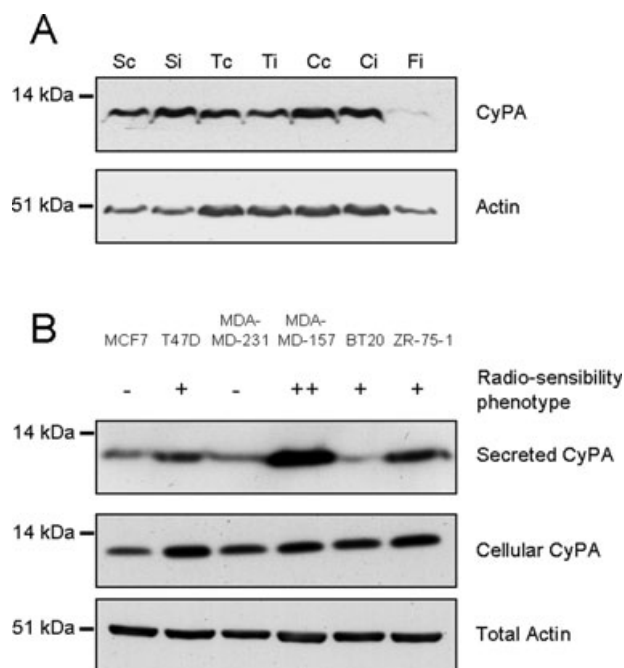


Figure 5. 1D Western blotting analysis of cyclophilin A with actin as loading control; (A) CyPA analysis in conditioned media (S), total cell extract (T), cytosolic extract (C), and floating cells (F), with (i) or without (c) irradiation treatment; (B) secreted and cellular CyPA analysis in several cell lines. (1) MCF7, (2) T47D, (3) MBA-MB-231, (4) MBA-MB-157, (5) BT20, (6) ZR-75-1. The radiosensitivity phenotype is defined according to the percentage of death cells following irradiation treatment: - < 50%; + 50% < + < 60%; ++ > 60%.

diorsensitivity, showed an intermediate amount of secreted CyPA, with the exception of BT20 cells. These results suggest that level of secreted CyPA was related to intrinsic radiosensitivity of mammary cell lines. It is interesting to notice that in accordance with results observed by RT-PCR and 1D Western blotting analysis, the amount of total protein is constant in all the cell lines studied. This could indicate that the level of secreted CyPA was essentially regulated by post-translational mechanisms.

4 Concluding remarks

In the present study, we used the T47D human breast cancer cells as a model to analyze proteins that are released by the cells following IR treatment. Using high-resolution 2DE, protein differences were observed in conditioned media of irradiated cells using conditioned media of nontreated cells and others intracellular extracts as controls. Several spots of CyPA were observed as up-regulated in conditioned media of irradiated cells. Initiator methionine processing and amino acid acetylation/methylation were identified by MS and can be related to the complex spot pattern of CyPA. Additionally, cells sensitive to irradiation displayed an increased level of secreted

CyPA. Taken together, these results showed that this protein could be defined as a cytokine, post-translationally regulated and potentially implicated in the radioinduced apoptotic response in mammary tumor cells. More generally, our results showed the capacity of our approach to select and identify proteins released in conditioned medium, the gel-based proteomic was as usual of a great interest to reveal differences between spots isoforms and discrete modifications of proteomes [3,46].

This work was supported by the Institute of Cellular and Molecular Radiobiology (DSV, CEA) and the Proteomic Platform of Montpellier-LR Genopole.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J. D., Bron, S. et al., Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000, *64*, 515–547.
- [2] Chevallet, M., Diemer, H., Van Dorssealer, A., Villiers, C. et al., Toward a better analysis of secreted proteins: the example of the myeloid cells secretome. *Proteomics* 2007, *7*, 1757–1770.
- [3] Chevalier, F., Highlights on the capacities of “gel-based” proteomics. *Proteome Sci.* 2010, *8*, 1–10.
- [4] Rabilloud, T., Chevallet, M., Luche, S., Lelong, C., Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: past, present and future. *J. Proteomics* 2010, *73*, 2064–2077.
- [5] Hirtz, C., Chevalier, F., Centeno, D., Rofidal, V. et al., MS characterization of multiple forms of alpha-amylase in human saliva. *Proteomics* 2005, *5*, 4597–4607.
- [6] Dowling, P., Clynes, M., Conditioned media from cell lines: a complementary model to clinical specimens for the discovery of disease-specific biomarkers. *Proteomics* 2011, *11*, 794–804.
- [7] Skalnikova, H., Motlik, J., Gadher, S. J., Kovarova, H., Mapping of the secretome of primary isolates of mammalian cells, stem cells and derived cell lines. *Proteomics* 2011, *11*, 691–708.
- [8] Gromov, P., Gromova, I., Bunkenborg, J., Cabezon, T. et al., Up-regulated proteins in the fluid bathing the tumour cell microenvironment as potential serological markers for early detection of cancer of the breast. *Mol. Oncol.* 2010, *4*, 65–89.
- [9] Sowa Resat, M. B., Morgan, W. F., Radiation-induced genomic instability: a role for secreted soluble factors in communicating the radiation response to non-irradiated cells. *J. Cell. Biochem.* 2004, *92*, 1013–1019.
- [10] Watson, G. E., Lorimore, S. A., Macdonald, D. A., Wright, E. G., Chromosomal instability in unirradiated cells induced in vivo by a bystander effect of ionizing radiation. *Cancer Res.* 2000, *60*, 5608–5611.
- [11] Xue, L. Y., Butler, N. J., Makrigiorgos, G. M., Adelstein, S. J. et al., Bystander effect produced by radiolabeled tumor cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, *99*, 13765–13770.
- [12] Roninson, I. B., Broude, E. V., Chang, B.-D., If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resistance Updates* 2001, *4*, 303–313.
- [13] Hei, T. K., Zhou, H., Chai, Y., Ponnaiya, B. et al., Radiation induced non-targeted response: mechanism and potential clinical implications. *Curr. Mol. Pharmacol.* 2011, *4*, 96–105.
- [14] Shao, C., Folkard, M., Prise, K. M., Role of TGF-beta1 and nitric oxide in the bystander response of irradiated glioma cells. *Oncogene* 2008, *27*, 434–440.
- [15] Luce, A., Courtin, A., Levalois, C., Altmeyer-Morel, S. et al., Death receptor pathways mediate targeted and non-targeted effects of ionizing radiations in breast cancer cells. *Carcinogenesis* 2009, *30*, 432–439.
- [16] Chevalier, F., Martin, O., Rofidal, V., Devauchelle, A. D. et al., Proteomic investigation of natural variation between Arabidopsis ecotypes. *Proteomics* 2004, *4*, 1372–1381.
- [17] Chevalier, F., Centeno, D., Rofidal, V., Tausin, M. et al., Different impact of staining procedures using visible stains and fluorescent dyes for large-scale investigation of proteomes by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 2006, *5*, 512–520.
- [18] Imanishi, S. Y., Kochin, V., Ferraris, S. E., de Thonel, A. et al., Reference-facilitated phosphoproteomics: fast and reliable phosphopeptide validation by microLC-ESI-Q-TOF MS/MS. *Mol. Cell Proteomics* 2007, *6*, 1380–1391.
- [19] Hem, S., Rofidal, V., Sommerer, N., Rossignol, M., Novel subsets of the Arabidopsis plasmalemma phosphoproteome identify phosphorylation sites in secondary active transporters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007, *363*, 375–380.
- [20] Larsen, M. R., Thingholm, T. E., Jensen, O. N., Roepstorff, P. et al., Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Mol. Cell Proteomics* 2005, *4*, 873–886.
- [21] Zwickl, H., Traxler, E., Staettner, S., Parzefall, W. et al., A novel technique to specifically analyze the secretome of cells and tissues. *Electrophoresis* 2005, *26*, 2779–2785.
- [22] Volmer, M. W., Stühler, K., Zapatka, M., Schöneck, A. et al., Differential proteome analysis of conditioned media to detect Smad4 regulated secreted biomarkers in colon cancer. *Proteomics* 2005, *5*, 2587–2601.
- [23] Raimondo, F., Morosi, L., Chinello, C., Magni, F. et al., Advances in membranous vesicle and exosome proteomics improving biological understanding and biomarker discovery. *Proteomics* 2011, *11*, 709–720.
- [24] Diehl, H. C., Stühler, K., Klein-Scory, S., Volmer, M. W. et al., A catalogue of proteins released by colorectal cancer cells in vitro as an alternative source for biomarker discovery. *Proteomics – Clin. Appl.* 2007, *1*, 47–61.
- [25] Chen, S.-T., Pan, T.-L., Juan, H.-F., Chen, T.-Y. et al., Breast tumor microenvironment: proteomics highlights the treatments targeting secretome. *J. Proteome Res.* 2008, *7*, 1379–1387.
- [26] Obchoei, S., Wongkhan, S., Wongkham, C., Li, M. et al., Cyclophilin A: potential functions and therapeutic target

- for human cancer. *Med. Sci. Monit* 2009, 15, RA221–RA232.
- [27] Ralhan, R., Masui, O., DeSouza, L. V., Matta, A. et al., Identification of proteins secreted by head and neck cancer cell lines using LC-MS/MS: strategy for discovery of candidate serological biomarkers. *Proteomics* 2011, 11, 2363–2376.
- [28] Jin, Z.-G., Lungu, A. O., Xie, L., Wang, M. et al., Cyclophilin A is a proinflammatory cytokine that activates endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 2004, 24, 1186–1191.
- [29] Osato, K., Sato, Y., Ochiishi, T., Osato, A. et al., Apoptosis-inducing factor deficiency decreases the proliferation rate and protects the subventricular zone against ionizing radiation. *Cell Death Dis.* 2010, 1, e84.
- [30] Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M. L. et al., Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* 2009, 325, 834–840.
- [31] Gevaert, K., Staes, A., Van Damme, J., De Groot, S. et al., Global phosphoproteome analysis on human HepG2 hepatocytes using reversed-phase diagonal LC. *Proteomics* 2005, 5, 3589–3599.
- [32] Link, A. J., Robison, K., Church, G. M., Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of *Escherichia coli* K-12. *Electrophoresis* 1997, 18, 1259–1313.
- [33] Frotin, F., Martinez, A., Peynot, P., Mitra, S. et al., The proteomics of N-terminal methionine cleavage. *Mol. Cell. Proteomics* 2006, 5, 2336–2349.
- [34] Fischer, G., Bang, H., Mech, C., Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides. *Biomed. Biochim. Acta.* 1984, 43, 1101–1111.
- [35] Colgan, J., Asmal, M., Neagu, M., Yu, B. et al., Cyclophilin A regulates TCR signal strength in CD4+ T cells via a proline-directed conformational switch in Itk. *Immunity* 2004, 21, 189–201.
- [36] Arora, K., Gwinn, W. M., Bower, M. A., Watson, A. et al., Extracellular cyclophilins contribute to the regulation of inflammatory responses. *J. Immunol.* 2005, 175, 517–522.
- [37] Fruman, D. A., Burakoff, S. J., Bierer, B. E., Immunophilins in protein folding and immunosuppression. *FASEB J.* 1994, 8, 391–400.
- [38] Colgan, J., Asmal, M., Yu, B., Luban, J., Cyclophilin A-deficient mice are resistant to immunosuppression by cyclosporine. *J. Immunol.* 2005, 174, 6030–6038.
- [39] Li, Z., Zhao, X., Bai, S., Wang, Z. et al., Proteomics identification of cyclophilin A as a potential prognostic factor and therapeutic target in endometrial carcinoma. *Mol. Cell. Proteomics* 2008, 7, 1810–1823.
- [40] Sherry, B., Yarlott, N., Strupp, A., Cerami, A., Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89, 3511–3515.
- [41] Spik, G., Haendler, B., Delmas, O., Mariller, C. et al., A novel secreted cyclophilin-like protein (SCYLP). *J. Biol. Chem.* 1991, 266, 10735–10738.
- [42] Xu, Q., Leiva, M. C., Fischkoff, S. A., Handschumacher, R. E. et al., Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin. *J. Biol. Chem.* 1992, 267, 11968–11971.
- [43] Bharadwaj, U., Zhang, R., Yang, H., Li, M. et al., Effects of cyclophilin A on myeloblastic cell line KG-1 derived dendritic like cells (DLC) through p38 MAP kinase activation. *J. Surg. Res.* 2005, 127, 29–38.
- [44] Yurchenko, V., Zybarth, G., O'Connor, M., Dai, W. W. et al., Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 22959–22965.
- [45] Zhuang, S., Schnellmann, R. G., A death-promoting role for extracellular signal-regulated kinase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006, 319, 991–997.
- [46] Rabilloud, T., Vaezzadeh, A. R., Potier, N., Lelong, C. et al., Power and limitations of electrophoretic separations in proteomics strategies. *Mass. Spectrom. Rev.* 2009, 28, 816–843.

Radiorésistance des cancers du sein : rôle majeur du marqueur de cellules souches cancéreuses CD24

Ce travail de thèse s'inscrit dans la caractérisation des cellules radiorésistantes des cancers du sein, à l'origine des rechutes après traitement par radiothérapie. La théorie des « Cellules Souches Cancéreuses » (CSC) place une sous-population cellulaire présentant une capacité accrue à induire des tumeurs et à proliférer au centre de la résistance à l'irradiation. Au cours de ce travail, nous avons montré que seul le marqueur de CSC CD24^{-low} permettait de définir une sous population radiorésistante, capable de transmettre une « mémoire » de l'irradiation se traduisant par une instabilité génétique persistante dans la descendance des cellules irradiées. En outre, nous avons montré que CD24 n'est pas uniquement un marqueur, mais bien un acteur de la réponse à l'irradiation. Ainsi, CD24 contrôle la prolifération cellulaire *in vitro* et *in vivo*, ainsi que les niveaux de ROS avant et après irradiation. L'ensemble de ces propriétés aboutit à une sensibilité réduite des cellules CD24^{-low} à l'irradiation γ , ainsi qu'à une baisse de l'instabilité génétique. Ces résultats permettent pour la première fois d'attribuer un rôle aux CSC CD24^{-low} dans la transmission de l'instabilité chromosomique. De plus, en apportant des informations pour évaluer la radiorésistance intrinsèque des tumeurs mammaires, le marquage CD24 pourrait contribuer à l'amélioration des protocoles de radiothérapie.

Mots clés : cancer du sein, cellules souches cancéreuses, radiorésistance, instabilité génomique, stress oxydant

Breast cancers radiation-resistance: key role of the cancer stem cells marker CD24

This work focuses on the characterization of radiation-resistant breast cancer cells, responsible for relapse after radiotherapy. The “Cancer Stem Cells” (CSC) theory describes a radiation-resistant cellular sub-population, with enhanced capacity to induce tumors and proliferate. In this work, we show that only the CSC marker CD24^{-low} defines a radiation-resistant cell population, able to transmit the “memory” of irradiation, expressed as long term genomic instability in the progeny of irradiated cells. We show that CD24 is not only a marker, but is an actor of radiation-response. So, CD24 expression controls cell proliferation *in vitro* and *in vivo*, and ROS level before and after irradiation. As a result, CD24^{-low} cells display enhanced radiation-resistance and genomic stability. For the first time, our results attribute a role to CD24^{-low} CSCs in the transmission of genomic instability. Moreover, by providing informations on tumor intrinsic radiation-sensitivity, CD24⁻ marker could help to design new radiotherapy protocols.

Key words: breast cancer, cancer stem cells, radiation-resistance, genomic instability, oxidative stress