

**Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie**

## **RÔLE DE LA CONNEXINE 43 DANS LE CANCER DU SEIN**

**Julie Salagnad**

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
Maître ès Sciences (M.Sc.)

Maîtrise en sciences expérimentales de la santé de l'INRS  
Master en Ingénierie de la santé de l'UCA

### **Jury d'évaluation**

Président du jury et  
examineur interne

Jacques Bernier  
INRS- Centre Armand-Frappier Santé  
Biotechnologie

Examineur externe

Eric Rassart  
Université du Québec à Montréal  
(UQAM)

Directrice de recherche

Isabelle Plante  
INRS- Centre Armand-Frappier Santé  
Biotechnologie



## REMERCIEMENTS

---

Tout d'abord je tiens à remercier ma directrice de recherche, Isabelle Plante, pour m'avoir accueilli dans son équipe et pour m'avoir confié ce projet. Merci pour ta gentillesse, pour tes conseils et tes encouragements lors de la rédaction de ce mémoire. Je remercie aussi Mahchid Bamdad, responsable du master Ingénierie de la Santé à l'UCA, pour m'avoir proposé de participer à ce programme en double diplomation. Je remercie également Louis Gaboury pour avoir mis à ma disposition les équipements indispensables à la réalisation des TMA. J'en profite pour remercier chaleureusement Julie et Micheline. Ce fût un réel plaisir de travailler avec vous dans la joie et la bonne humeur. Merci également à Denis Flipo pour ses précieux conseils en microscopie confocal.

Un grand, un immense merci à l'ensemble des membres de mon équipe : Rita, Bélinda, Melany, Alex pour votre gentillesse, votre bienveillance, et vos conseils avisés. Merci pour m'avoir aidé tout au long de ce projet et jusqu'à la dernière minute. Merci pour votre soutien, pour avoir partagé mes joies, mes peines, mes grandes victoires et mes petits échecs. Vous formez une équipe exceptionnelle, une équipe dont tout le monde rêve : une équipe sur laquelle on peut compter. Je suis réellement très heureuse de vous avoir rencontrés, vous êtes formidables ! Plus que des collègues, vous êtes devenu ma seconde famille. Je n'oublie pas non plus les autres étudiants qui ont partagé mon bureau, notamment Josiane et Linda qui ont, elles aussi, largement participé à rendre mes journées agréables.

Un encore plus grand et un encore plus immense merci aux deux personnes qui m'ont soutenue quotidiennement sur tous les plans, sans relâche et qui m'ont permis de participer à la belle aventure que fût cette maîtrise : mes parents. Je vous suis très reconnaissante.



## RESUME

---

Les connexines, des protéines transmembranaires, forment des canaux permettant le passage d'ions et de petites molécules entre cellules adjacentes. La connexine 43 (Cx43) a longtemps été considérée comme un suppresseur de tumeurs. Cependant certaines études montrent le contraire. Récemment, nos analyses bio-informatiques ont suggéré que son rôle serait sous-type dépendant dans le cancer du sein. Nos travaux antérieurs ont montré qu'une diminution de l'expression de la Cx43 chez des souris mutantes entraîne une hyperplasie des glandes mammaires et une augmentation des métastases pulmonaires. Le but de ce projet est de déterminer quels sous-types de tumeurs sont liés à une baisse de Cx43. Pour se faire, des souris mutantes pour la Cx43 ont été croisées avec des souris surexprimant Her2 ou des souris témoins. Les tumeurs ont été développées spontanément ou induites par ingestion de DMBA. Elles ont été prélevées et enrobées en paraffine afin de réaliser des micro-réseaux tissulaires (TMA). Des marquages en immunofluorescence de la Cx43 et des marqueurs des différents sous-types : récepteurs aux œstrogènes, Her2 et cytokératines 5 et 14, ont été réalisés et sont en cours d'analyse. Ces résultats nous permettront de mieux comprendre le rôle sous-type dépendant de la Cx43 dans le cancer du sein.

Mot-clés : Cancer, connexine 43, TMA, glande mammaire



## TABLE DES MATIERES

---

REMERCIEMENTS .....	iii
RESUME.....	v
TABLE DES MATIERES.....	vii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES ABREVIATIONS.....	xiii
MISE EN CONTEXTE.....	xv
1. REVUE DE LITTERATURE .....	1
1.1. La glande mammaire : physiologie et cancer.....	1
1.1.1 Morphologie et développement de la glande mammaire.....	1
1.1.2 Le cancer du sein : épidémiologie et développement.....	4
1.1.3 Les sous-types de cancer du sein.....	8
1.2. La connexine 43 : rôle dans la communication intercellulaire et le cancer.....	12
1.2.1 Les connexines, des protéines jonctionnelles.....	12
1.2.2 Rôle de la connexine 43 dans le cancer du sein.....	14
2. HYPOTHESE ET OBJECTIFS .....	16
3. MATERIEL ET METHODES .....	16
3.1. Animaux.....	16
3.2. Microréseaux tissulaires ou tissue microarrays (TMA) : .....	18
3.3. Immunofluorescence : .....	18
3.4. Imagerie.....	20
4. RESULTATS .....	20
4.1. Confection des TMA.....	20
4.2. Confirmation des échantillons.....	21
4.3. Spécificité des marquages immunofluorescents.....	22
4.4. Caractérisation des tumeurs.....	25

5. DISSCUSSION .....	26
LISTE DES REFERENCES .....	33



## LISTE DES FIGURES

---

Figure 1. Structure de la glande mammaire.....	1
Figure 2. Schéma d'une coupe transversale de canal mammaire .....	2
Figure 3. Développement de la glande mammaire.....	4
Figure 4. Evolution du cancer du sein.....	6
Figure 5. Récepteurs ErbB et activation de la voie Ras/MAPK.....	11
Figure 6. Génotype des souris .....	17
Figure 7. TMA marqué à l'éosine et hématoxyline .....	20
Figure 8. Scan au grossissement 10x d'un TMA permettant de vérifier la présence des tissus.....	21
Figure 9. Marquage par immunofluorescence des marqueurs basaux et de la Cx43 .....	22
Figure 10. Marquage par immunofluorescence de Her2.....	23
Figure 11. Marquage par immunofluorescence de ER $\alpha$ et ER $\beta$ .....	24
Figure 12. Scan au grossissement 10x d'un TMA marqué par immunofluorescence .....	25



## **LISTE DES TABLEAUX**

---

Tableau 1. Classification TNM simplifiée du cancer du sein.....	7
Tableau 2. Détermination du stade du cancer du sein selon la classification TNM. ....	7
Tableau 3. Effectif des souris par génotype et par traitement .....	17
Tableau 4. Anticorps utilisés pour marquer les TMA et conditions d'utilisation .....	19



## LISTE DES ABREVIATIONS

---

ADN : acide désoxyribonucélique

ARNm : acide ribonucélique messenger

Cx43 : connexine 43

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMBA : 7,12 diméthylbenz[ $\alpha$ ]anthracène

EBCTG : Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group

EGF : facteur de croissance épidermique

EGFR : récepteur de l'EGF

EMT : transition épithélio mésenchymateuse

ERE : élément de réponse aux œstrogènes

ERK : extracellular signal-regulated kinase

ER : récepteur aux oestrogènes

FISH : hybridation in situ en fluorescence

GDP : guanosine diphosphate

GTP : guanosine triphosphate

HER2 : récepteur 2 au facteur de croissance épidermique humain

HER2e : sous-type tumorale surexpression de Her2

IGF1 : insulin-like growth factor 1

K14 : cytokératine 14

K5 : cytokératine 5

kDA : kilodalton

PR : récepteur à la progestérone

TEB : bourgeons terminaux

TMA : microréseaux tissulaires ou tissue microarrays

WT : sauvage



## MISE EN CONTEXTE

---

Le cancer du sein est le cancer féminin le plus fréquent. Différents sous-types de cancer du sein ont été identifiés et permettent une meilleure prise en charge des patients. Principalement trois sous-types se dégagent : le sous-type luminal dans lequel les cellules tumorales expriment les récepteurs aux œstrogènes et/ou le récepteur à la progestérone, le sous-type Her2e dans lequel les cellules tumorales surexpriment le récepteur 2 au facteur de croissance épidermique humain (Her2) et le sous-type triple négatif dans lequel les cellules tumorales n'expriment pas les récepteurs hormonaux et ne surexpriment pas non plus Her2.

Les connexines sont des protéines transmembranaires impliquées dans la communication intercellulaire. En effet, les connexines s'associent par 6 pour former un connexon un niveau de la membrane plasmique des cellules. La liaison de deux connexons de cellules adjacentes forme un canal intercellulaire permettant les échanges directs d'ions et de petites molécules entre les cellules. Les canaux se regroupent pour former une plaque jonctionnelle (ou jonction gap). Il existe un grand nombre de types de connexines. Chez la souris, les connexines exprimées au niveau de la glande mammaire sont les connexines 43 (Cx43), 26, 30 et 32.

Dans le cancer du sein, le rôle de la Cx43 est controversé. Certaines études suggèrent un rôle suppresseur de tumeurs alors que d'autres montrent son implication dans la promotion de métastases. En effet, dans la majorité des tumeurs, la Cx43 est sous-exprimée ce qui a amené à penser qu'elle aurait un effet suppresseur de tumeurs. En revanche, dans certaines tumeurs, la Cx43 est surexprimée. Des études bioinformatiques récentes de notre laboratoire ont montré que l'expression de la Cx43 dépendait en fait du sous-type de cancer du sein. En effet, une grande variabilité existe au sein des tumeurs lumineales avec des tumeurs surexprimant Cx43 et des tumeurs pour lesquelles l'expression de Cx43 est inhibée par rapport aux tissus sains. Par contre, les tumeurs Her2e et basales expriment en moyenne moins la Cx43 que les tumeurs lumineales. Ces études ont également montré que le pronostic des patients présentant une tumeur sous-exprimant la Cx43 dépendait également du sous-type de la tumeur. Une expression élevée de Cx43 est associée à un bon pronostic dans les tumeurs lumineales, mais à un mauvais pronostic dans les tumeurs Her2e et basales. Ces études suggèrent donc que le rôle de la Cx43 dans la progression du cancer du sein serait sous-type dépendant.

Lors d'une étude précédente, nous avons croisé des souris mutantes montrant une diminution de l'expression de la Cx43 avec des souris surexprimant Her2, et analysé la formation de tumeurs induites ou non par ingestion d'un initiateur de tumeurs. Nos résultats ont démontré qu'une diminution de l'expression de la Cx43 était liée à de l'hyperplasie au niveau de l'épithélium mammaire et à une augmentation du nombre de métastases aux poumons, suggérant un rôle important de Cx43 dans la progression des tumeurs. Les glandes mammaires des animaux ont été prélevées et enrobées en paraffine. Le projet présenté ici avait pour but de caractériser les tumeurs de ces animaux. Pour cela,

des microréseaux tissulaires ou tissue microarrays (TMA) ont été réalisés, coupés et l'expression et la localisation de marqueurs des différents sous-types de cancer du sein et de la Cx43 ont été analysées par immunofluorescence. La mise au point du marquage immunofluorescent permettant de localiser la Cx43, Her2, les marqueurs basaux K5 et K14 et les marqueurs luminaux ER $\alpha$  et ER $\beta$  a été réalisée, et les TMA marqués. L'analyse des résultats est en cours et permettra de déterminer quels sous-types de tumeurs se développent en fonction du génotype des souris et de leur traitement.



# 1. REVUE DE LITTERATURE

---

## 1.1. La glande mammaire : physiologie et cancer

### 1.1.1 Morphologie et développement de la glande mammaire

La glande mammaire est formée d'un épithélium où est produit le lait, entouré d'un stroma principalement constitué d'adipocytes, mais aussi de fibroblastes et de cellules immunitaires. L'épithélium mammaire est constitué d'un canal qui part du mamelon et se ramifie en une multitude de canaux à l'extrémité desquels on trouve des lobes, eux-mêmes composés de lobules formés d'acini (Figure 1).

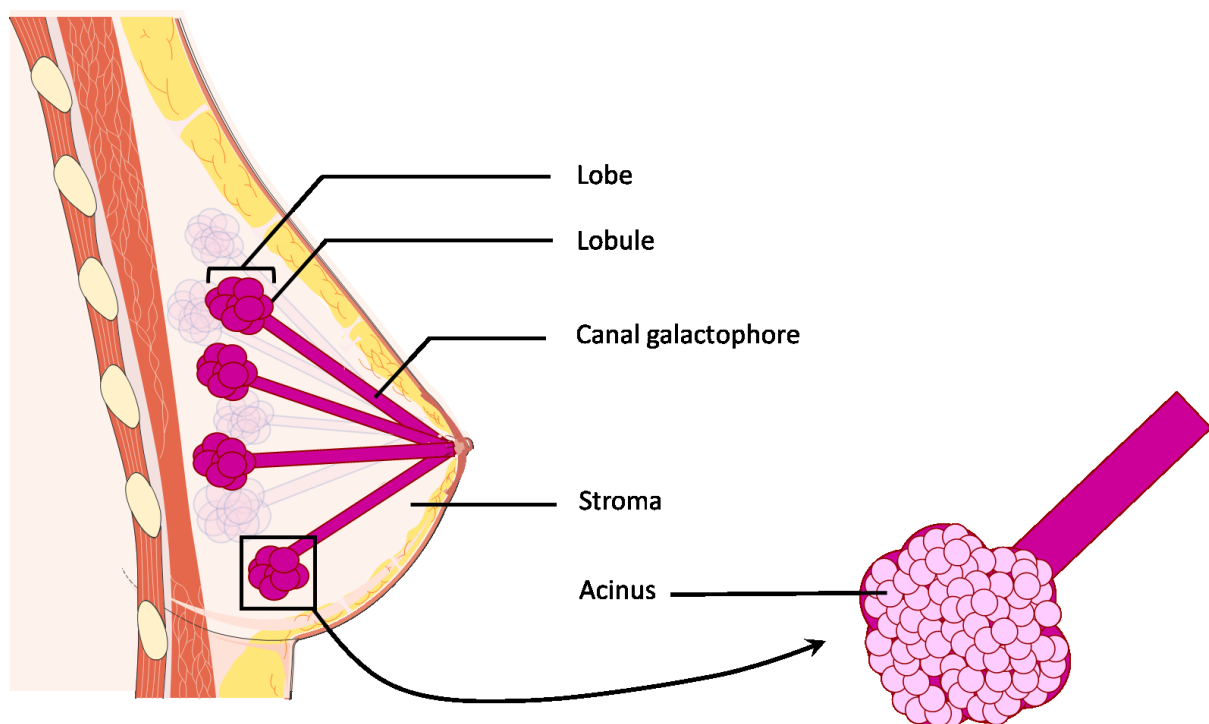
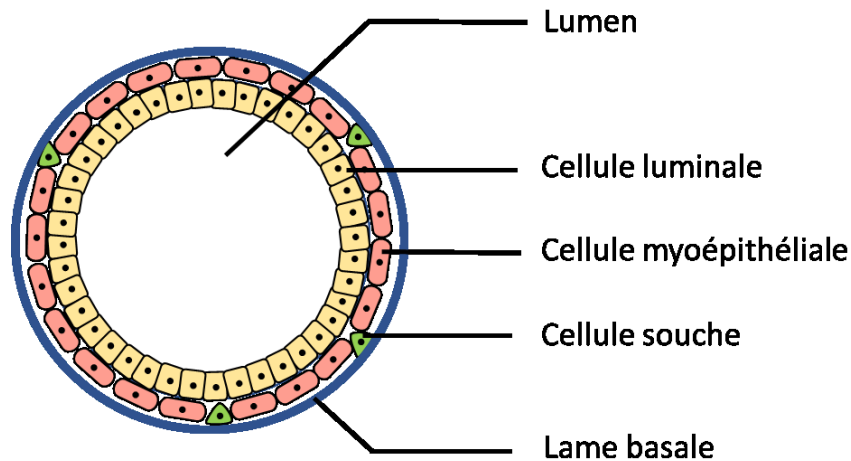


Figure 1. Structure de la glande mammaire

**La glande mammaire est constituée d'une ramification de canaux galactophores à l'extrémité desquels on trouve des lobes composés de lobules, eux-mêmes constitués d'acini.**

Les acini constituent l'unité fonctionnelle de la glande mammaire. C'est à ce niveau qu'est produit le lait. L'épithélium mammaire est composé de deux couches de cellules : une couche de cellules luminales qui entourent la lumière du canal et une couche de cellules basales. Les cellules basales sont essentiellement constituées de cellules myoépithéliales mais aussi de quelques cellules souches permettant le renouvellement des cellules luminales et myoépithéliales (Macias et Hinck, 2012). L'ensemble est ceinturé par une lame basale (Figure 2).



**Figure 2. Schéma d'une coupe transversale de canal mammaire**

La formation de la glande mammaire commence au 10<sup>e</sup> jour de la vie embryonnaire chez la souris et lors du premier trimestre chez l'Homme (Macias et Hinck, 2012). A la naissance, l'épithélium mammaire est constitué d'un arbre primitif peu développé et ne comportant que quelques branches (Figure 3A). A la puberté, des structures particulières se forment à l'extrémité des canaux : les bourgeons terminaux (TEB) (Mallepell *et al.*, 2006). Ces bourgeons sont composés de plusieurs couches de cellules et sont à l'origine de l'élongation des canaux (Figure 3B). Plusieurs hormones et facteurs de croissance sont nécessaires à la maturation de l'épithélium mammaire. Gallego *et al.* (2001) ont montré que chez les souris, la perte du récepteur à l'hormone de croissance induit un retard de développement de la glande mammaire à la puberté et que la formation de nouveaux embranchements est limitée. Les auteurs ont également montré que la perte de ce récepteur au niveau de l'épithélium mammaire seul ne modifie pas le développement de l'épithélium ni la différenciation et la prolifération des cellules alvéolaire ce qui suggère que l'hormone de croissance n'agit pas directement sur l'épithélium (Gallego *et al.*, 2001). Par ailleurs, Zhou *et al.* (1997) ont montré que la perte du récepteur à l'hormone de croissance chez des souris mutantes entraîne une diminution de la concentration sanguine en insulin-like growth factor 1 (IGF1). Or, Ruan et Kleinberg (1999) ont montré que chez des souris déficientes en IGF1, le nombre de TEB, la surface de l'épithélium par rapport au stroma et le nombre de canaux étaient diminués. Ceci suggère que l'hormone de croissance induirait la production d'IGF1 qui permettrait le développement de l'épithélium mammaire. A la puberté, les œstrogènes produits par les ovaires se fixent sur les cellules de la glande mammaire exprimant leurs récepteurs. Comme il sera détaillé plus loin, il existe deux récepteurs aux œstrogènes (ER) :  $\alpha$  et  $\beta$ . Le récepteur  $\alpha$  est particulièrement important pour le développement de la glande mammaire à la puberté (Mallepell *et al.*, 2006). En effet, en l'absence d'expression de ER $\alpha$  dans l'épithélium mammaire, les TEB ne se forment pas et l'on n'observe pas d'élongation des canaux à la puberté (Mallepell *et al.*, 2006). Seule une partie des cellules épithéliales expriment ER $\alpha$  (Clarke *et al.*, 1997; Zeps *et al.*, 1998). Les travaux de Zeps *et al.* (1998) ont montré que parmi les cellules luminales qui entrent en prolifération à la puberté, une majorité n'exprime pas ER $\alpha$ .

L'étude de Mallepell *et al.* (2006) a montré qu'en présence de cellules luminales exprimant ER $\alpha$ , les cellules luminales n'exprimant pas ER $\alpha$  sont capables de participer à la formation des TEB et de proliférer, participant ainsi à l'élongation des TEB en engendrant à la fois des cellules luminales et des cellules myoépithéliales. Ceci suggère que la fixation des œstrogènes à ER $\alpha$  induit le développement de la glande mammaire à la puberté par voie paracrine (Mallepell *et al.*, 2006). La fixation des œstrogènes au récepteur  $\alpha$  sur les cellules qui l'expriment entraîne un signal paracrine via la sécrétion d'amphiréguline, une protéine de la famille des facteurs de croissance épidermique (EGF) (Ciarloni *et al.*, 2007). A la puberté, l'amphiréguline est indispensable au développement de la glande mammaire (Ciarloni *et al.*, 2007).

Comme montré chez la souris par Fata *et al.* (2001), à l'âge adulte, la glande mammaire alterne entre des phases de prolifération et d'apoptose à chaque cycle menstruel. De nouveaux embranchements se développent en fin de cycle puis régressent (Fata *et al.*, 2001). Lors de la gestation, les canaux se ramifient et des alvéoles se forment (Figure 3D) (Briskin *et al.*, 1998). La progestérone est indispensable à ce processus (Briskin *et al.*, 1998). En fin de gestation, les cellules alvéolaires se différencient en cellules sécrétrices de lait. Ce phénomène est majoritairement dû à l'action de la prolactine (Briskin *et al.*, 1999), une hormone synthétisée par l'hypophyse et l'épithélium mammaire. Lors de la lactation, sous l'effet de la succion du nourrisson, de l'ocytocine est libérée. Cette hormone entraîne la contraction des cellules myoépithéliales permettant ainsi l'expulsion du lait jusqu'au mamelon (Cross et Silver, 1956). Lors du sevrage, la diminution de la stimulation du nourrisson entraîne l'accumulation de lait dans l'épithélium ce qui déclenche un processus d'involution de l'épithélium mammaire (Figure 3E) (Quarrie *et al.*, 1996). Le remodelage de l'épithélium inclut l'apoptose des cellules alvéolaires productrices de lait et le retour à un arbre de canaux moins ramifié (Quarrie *et al.*, 1996).

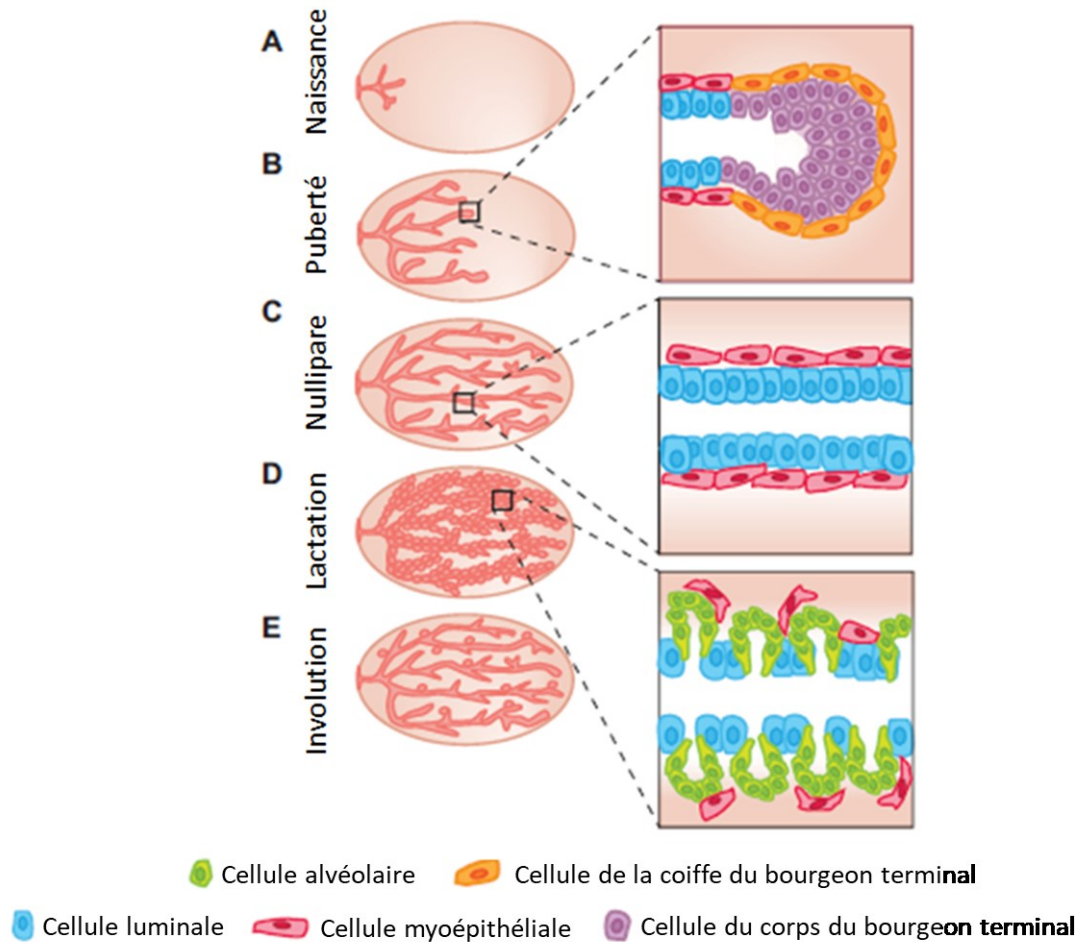


Figure 3. Développement de la glande mammaire

(A) A la naissance, l'arbre épithélial est très peu développé. (B) A la puberté, des bourgeons terminaux (encart B) se développent à l'extrémité des canaux (encart C) et permettent leur élongation. (C) A l'âge adulte, les canaux sont constitués majoritairement de deux types de cellules : les cellules luminales (bleu) et les cellules myoépithéliales (rouge). (D) Lors de la grossesse de nouveaux embranchements se forment ainsi que des alvéoles (encart D). Les cellules alvéolaires sécrètent le lait pendant la période de lactation. (E) Après le sevrage, la glande mammaire involue pour retrouver une structure proche de celle qu'elle avait avant la grossesse. Figure adaptée de Inman *et al.* (2015).

La glande mammaire subit des changements tout au long de la vie d'une femme. Ces changements sont principalement dépendants des hormones stéroïdiennes que sont les œstrogènes et la progestérone. Cette évolution continue de la glande mammaire avec ces phases de forte prolifération, de différenciation et d'apoptose la rend particulièrement sensible au développement de tumeurs.

### 1.1.2 Le cancer du sein : épidémiologie et développement

Le cancer du sein est le cancer féminin le plus fréquent. En effet, avec 2 088 849 nouveaux cas en 2018 dans le monde, le cancer du sein se place en première position en termes d'incidence chez les femmes, loin devant le cancer colorectal qui a été diagnostiqué chez 823 303 nouvelles patientes la même année (GLOBOCAN 2018). Au niveau de la population globale, le cancer du sein se place juste

derrière le cancer du poumon et ses 2 093 876 nouveaux cas diagnostiqués en 2018. Malgré les progrès thérapeutiques des dernières années, le cancer du sein reste la principale cause de décès par cancer chez les femmes. En 2018, le cancer a fait 626 679 victimes à travers le monde. (GLOBOCAN 2018)

L'accumulation de mutations au sein d'une même cellule lui conférant un avantage sélectif et entraînant sa multiplication incontrôlée est à l'origine du cancer. Dans un premier temps, les cellules cancéreuses vont former une nouvelle couche de cellules épithéliales : on parle alors d'hyperplasie (Figure 4). Le tissu présente alors une anomalie car il est constitué de plus des deux couches de cellules épithéliales, mais il est encore relativement organisé. Par la suite, les cellules cancéreuses vont envahir la lumière de l'épithélium (Figure 4). On parle alors de carcinome *in situ*. L'une des caractéristiques des cellules cancéreuses est l'instabilité génomique (Hanahan et Weinberg, 2011). Les cellules cancéreuses accumulent donc sans cesse de nouvelles mutations ce qui leur donne de nouvelles propriétés. Ainsi les cellules peuvent acquérir la capacité à traverser l'épithélium et la lame basale. Au cours de la progression du cancer, les cellules cancéreuses vont perdre peu à peu leurs caractéristiques épithéliales pour acquérir des caractéristiques de cellules du mésenchyme : c'est la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) (Thiery, 2002). Les cellules vont alors pouvoir envahir les tissus voisins et atteindre les vaisseaux sanguins ou lymphatiques. Le phénomène d'entrée des cellules tumorales dans les vaisseaux est appelé intravasation (Thiery, 2002). Une fois dans la circulation sanguine, certaines cellules particulièrement résistantes peuvent sortir des vaisseaux. Ce phénomène est appelé extravasation (Thiery, 2002). Les cellules tumorales peuvent alors former une nouvelle tumeur dans un organe éloigné du lieu de formation de la tumeur primaire. On parle alors de métastase. Même si ce mécanisme est mal connu, il a été observé que les métastases se développent préférentiellement dans certains tissus en fonction de leur origine. Ainsi, les tumeurs mammaires forment principalement des métastases dans les os, le foie, les poumons, le cerveau et la plèvre (Onitilo *et al.*, 2009; Soni *et al.*, 2015).

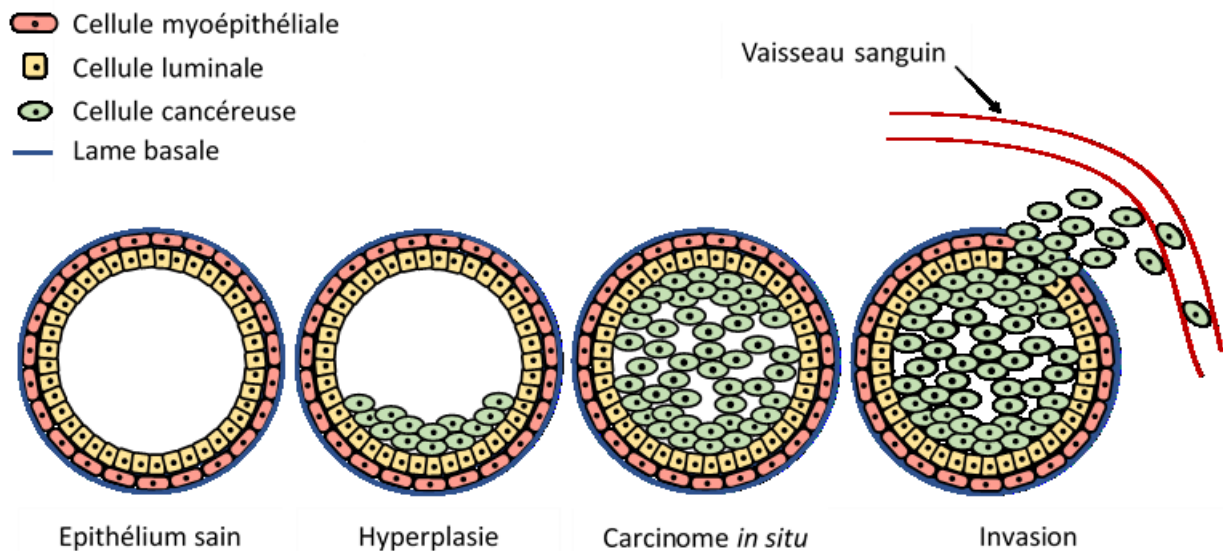


Figure 4. Evolution du cancer du sein

La cellule mutante à l'origine de la tumeur commence par proliférer de manière anarchique dans le lumen, on parle d'hyperplasie. Les cellules envahissent peu à peu le lumen formant ainsi un carcinome *in situ*. Les cellules cancéreuses franchissent ensuite la lame basale puis envahissent les tissus avoisinants et peuvent atteindre les vaisseaux sanguins ou lymphatiques. L'entrée des cellules dans les vaisseaux est appelée intravasation. Les cellules sont transportées par le flux sanguin et peuvent ainsi atteindre des organes éloignés de la tumeur primaire.

Lors du diagnostic et afin d'adapter les traitements, les tumeurs sont classées en fonction de leur stade et de leur grade. Le stade correspond à l'étendue du cancer, tandis que le grade est une mesure de son agressivité. Le stade est déterminé par la classification TNM pour Tumeur Node Metastasis qui, dans le cas du cancer du sein, prend en compte la taille de la tumeur, l'atteinte ou non des ganglions lymphatiques et la présence ou non de métastases (Tableau 1)(Taherian-Fard *et al.*, 2015). Un score est attribué à chaque item et la combinaison des trois scores détermine le stade (Tableau 2)(Taherian-Fard *et al.*, 2015). La taille de la tumeur est classée de T0 à T4. Dans le cancer du sein, T0 correspond à une tumeur non palpable et T3 à une tumeur mesurant plus de 5 cm dans sa plus grande dimension (Haute Autorité de Santé, 2010). T4 correspond à un cas particulier dans lequel la tumeur atteint la paroi thoracique ou la peau (Haute Autorité de Santé, 2010). L'envahissement ganglionnaire est classé de N0 à N3 selon le nombre de ganglions touchés (Haute Autorité de Santé, 2010; Taherian-Fard *et al.*, 2015). L'absence de métastase est notée M0 et la présence M1 (Tableau 1) (Haute Autorité de Santé, 2010; Taherian-Fard *et al.*, 2015).

**Tableau 1. Classification TNM simplifiée du cancer du sein.**

Inspiré de Haute Autorité de Santé (2010)

Classification TNM	Signification
<b>Taille de la tumeur primaire</b>	
<b>T0</b>	Tumeur <b>non palpable</b>
<b>T1</b>	Tumeur <b>inférieure ou égale à 2 cm</b> dans sa plus grande dimension
<b>T2</b>	Tumeur comprise <b>entre 2 et 5 cm</b> dans sa plus grande dimension
<b>T3</b>	Tumeur <b>strictement supérieure à 5 cm</b> dans sa plus grande dimension
<b>T4</b>	Extension à la paroi thoracique ou à la peau quelle que soit la taille de la tumeur
<b>Envahissement des ganglions lymphatiques</b>	
<b>N0</b>	<b>Pas</b> de ganglion atteint
<b>N1</b>	Envahissement de <b>1 à 3 ganglions</b>
<b>N2</b>	Envahissement de <b>4 à 9 ganglions</b>
<b>N3</b>	Envahissement d' <b>au moins 10 ganglions</b>
<b>Métastases</b>	
<b>M0</b>	<b>Absence</b> de métastase
<b>M1</b>	<b>Présence</b> de métastase(s)

**Tableau 2. Détermination du stade du cancer du sein selon la classification TNM.**

Inspiré de Haute Autorité de Santé (2010)

Stade	Score TNM
<b>I</b>	T1 N0 M0
<b>IIA</b>	T0 N1 M0 ; T1 N1 M0 ; T2 N0 M0
<b>IIB</b>	T2 N1 M0 ; T3 N0 M0
<b>IIIA</b>	T0 N2 M0 ; T1 N2 M0 ; T2 N2 M0 ; T3 N1 M0 ; T3 N2 M0
<b>IIIB</b>	T4 N0 M0 ; T4 N1 M0 ; T4 N2 M0
<b>IIIC</b>	Tous T N3 M0
<b>IV</b>	Tous T Tous N M1

Le grade est déterminé par l'analyse anatomopathologique de la tumeur et prend en compte trois critères : l'état de différenciation des cellules cancéreuses, la taille et la forme de leur noyau, ainsi que le nombre de figures mitotiques (Bloom et Richardson, 1957). En effet, comme cité plus haut, les cellules cancéreuses perdent peu à peu leurs caractéristiques, elle se différencient. Leur noyau peut changer de forme. Les cellules envahissent leur environnement par des mitoses incontrôlées et particulièrement rapides. Ainsi les tumeurs dont les cellules sont encore bien différenciées, qui ont de

petits noyaux uniformes et qui présentent peu de mitoses sont les moins agressives. En revanche, si les cellules sont indifférenciées, c'est-à-dire qu'elles ont perdu les caractéristiques de leur tissu d'origine, ou si leurs noyaux ne sont pas tous de la même taille et plus gros que la normale, ou si l'on observe un grand nombre de cellules en mitoses, le cancer a plus de chance de se propager rapidement (Bloom et Richardson, 1957). On classe les tumeurs selon trois grades, 1 étant le moins agressif et 3 le plus agressif (Bloom et Richardson, 1957).

La classification des tumeurs selon le grade et le stade aide l'équipe médicale à prendre une décision quant au traitement à administrer. En prenant en compte l'état général du patient et les caractéristiques tumorales, le protocole thérapeutique sera adapté. Le traitement principal du cancer est encore la chirurgie (Harbeck et Gnant, 2017). Dans le cas du cancer du sein, il peut s'agir d'une mastectomie, c'est-à-dire une ablation totale de la glande mammaire, ou d'une tumorectomie qui consiste à éliminer le foyer tumoral tout en conservant une grande partie des tissus sains. Dans le cas de tumeurs très invasives, une chimiothérapie avant la chirurgie peut être nécessaire pour faire diminuer la taille de la tumeur (Harbeck et Gnant, 2017) et ainsi permettre son ablation. On parle alors de chimiothérapie néoadjuvante. Dans la plupart des cas la chirurgie a lieu après la chimiothérapie. On parle alors de chimiothérapie adjuvante. La chimiothérapie est un traitement systémique qui agit sur les mécanismes de la mitose et entraîne ainsi la mort des cellules en divisions. Ce traitement permet d'éliminer les cellules cancéreuses qui n'auraient pas été retirées lors de la chirurgie ou qui se seraient propagées dans le reste du corps. La radiothérapie permet également de s'assurer de la mort de toutes les cellules tumorales au niveau du site primaire (Harbeck et Gnant, 2017).

Dans le cancer du sein, l'établissement du stade et du grade n'est pas suffisant pour prendre en charge les patients de manière optimale. En effet, le cancer du sein peut être divisé en plusieurs sous-types.

### **1.1.3 Les sous-types de cancer du sein**

Les tumeurs mammaires forment une famille hétérogène. En effet, en fonction des mutations qu'elles portent, elles n'expriment pas toutes les mêmes protéines et ne répondent pas de la même façon à un même traitement. L'équipe de Perou (Perou *et al.*, 2000; Sorlie *et al.*, 2001) est la première à avoir proposé une classification des tumeurs mammaires en sous-types. En 2001, Sorlie *et al.* (2001) ont établi une classification des cancers du sein en 6 sous-types : Luminal A, Luminal B, Luminal C, Her2+, normal breast like et basal like. Chacun de ces sous-types est relié à un pronostic différent (Sorlie *et al.*, 2001). On peut regrouper ces sous-types en 3 sous-types principaux : luminal, Her2e et triple négatif. Les tumeurs lumineuses sont caractérisées par l'expression de récepteurs hormonaux : récepteurs aux œstrogènes (ER) et/ou récepteur à la progestérone (PR). Les tumeurs Her2e surexpriment le récepteur 2 au facteur de croissance épidermique humain (Her2) et peuvent exprimer ER et/ou PR. Les tumeurs triples négatives n'expriment aucun des récepteurs mentionnés. Parmi les tumeurs triples négatives, on



peut distinguer les tumeurs de type basal qui n'expriment ni ER, ni PR, ni Her2 mais expriment des protéines caractéristiques des cellules basales du tissu sain telles que la P-cadhérine et les cytokératine 5 (K5) et 14 (K14). Les cancers Her2+ et surtout les cancers triples négatifs ont un pronostic bien plus sombre que les cancers luminaux (Dent *et al.*, 2007; Qiu *et al.*, 2016; Sorlie *et al.*, 2001). Des thérapies ont été développées spécifiquement pour les tumeurs exprimant les récepteurs hormonaux et pour les tumeurs surexprimant Her2.

### 1.1.3.1. Les cancers du sein hormonaux dépendants

Les tumeurs hormonodépendantes, c'est-à-dire exprimant ER et/ou PR, représentent environ 85 % des cancer du sein (Ellingjord-Dale *et al.*, 2017; Howlader *et al.*, 2014). Les récepteurs hormonaux ER et PR sont des récepteurs nucléaires. PR possède deux isoformes : PRA et PRB. Ces deux protéines sont codées par le même gène, mais transcrites par l'intermédiaire de deux promoteurs distincts (Kastner *et al.*, 1990). PR est exprimé dans 12 % des cellules luminales de la glande mammaire adulte saine (Clarke *et al.*, 1997). ER possède également deux isoformes : ER $\alpha$  et ER $\beta$  qui sont codées par des gènes distincts sur deux chromosomes distincts. Le gène codant ER $\alpha$  est situé sur le chromosome 6 (Menasce *et al.*, 1993) tandis que le gène codant ER $\beta$  est situé sur le chromosome 14 chez l'homme (Enmark *et al.*, 1997). Dans le tissu sain, seulement 10 à 15 % des cellules luminales expriment ER $\alpha$  (Clarke *et al.*, 1997). De même ER $\beta$  n'est pas exprimé dans toutes les cellules luminales (Jia *et al.*, 2015). Les ER sont composés de trois domaines : le domaine N-terminal, le domaine de liaison à l'ADN et le domaine C-terminal de fixation au ligand (Jia *et al.*, 2015). La liaison de ER à son ligand, entraîne sa translocation du cytoplasme vers le noyau et sa dimérisation (Kumar et Chambon, 1988; Pettersson *et al.*, 1997) . ER se lie alors à l'ADN sur un motif appelé élément de réponse aux œstrogènes (ERE) (Kumar et Chambon, 1988; Pettersson *et al.*, 1997) et régule la transcription des gènes en aval en recrutant des co-activateurs ou des co-répresseurs (Jia *et al.*, 2015). De manière similaire, la liaison de PR à son ligand entraîne sa translocation vers le noyau où il se lie à des motifs spécifiques de l'ADN ce qui entraîne le recrutement de complexes protéiques co-régulateurs qui activent ou répriment les gènes cibles comme décrit dans la revue de Grimm *et al.* (2016).

Ainsi, l'hormonothérapie sera proposée aux patientes souffrant d'un cancer hormonodépendant. Cette thérapie est administrée pendant les 5 à 10 ans suivant la chirurgie (Harbeck et Gnant, 2017). Deux molécules sont couramment utilisées : le tamoxifène et un inhibiteur de l'aromatase (Harbeck et Gnant, 2017). Le tamoxifène est un antagoniste des œstrogènes dans la glande mammaire. C'est le traitement de référence pour les femmes préménopausées souffrant de cancer ER+ (Harbeck et Gnant, 2017). Le tamoxifène peut être remplacé par un inhibiteur de l'aromatase. Les inhibiteurs de l'aromatase inhibent la conversion des androgènes en estradiol. Chez les patientes ménopausées, l'hormonothérapie comprend 5 ans de tamoxifène ou d'inhibiteur de l'aromatase (Harbeck et Gnant, 2017). Ces deux produits peuvent également être administrés l'un après l'autre (Harbeck et Gnant, 2017). Le traitement par inhibiteur de l'aromatase améliore la survie en comparaison au tamoxifène seul (Early Breast Cancer

Trialists' Collaborative Group (EBCTG), 2015). Le tamoxifène a l'inconvénient d'agir également comme un agoniste des œstrogènes dans l'endomètre et d'ainsi favoriser l'apparition de cancer dans ce tissu. D'après EBCTG (2015), l'incidence sur 10 ans de cancer de l'endomètre après prise de tamoxifène est de 1,2 % contre 0,4 % pour l'inhibiteur de l'aromatase. En revanche ce dernier favorise l'ostéoporose (8,5 % de fracture à 5 ans contre 5,5 % avec le tamoxifène) (EBCTG, 2015).

### 1.1.3.2. Les cancers du sein Her2e

Les tumeurs Her2e représentent 13 % des tumeurs mammaires (Ellingjord-Dale *et al.*, 2017; Howlader *et al.*, 2014). Elles présentent une amplification ou une surexpression du récepteur Her2. Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire de 185 kDa faisant partie de la famille ErbB. Cette famille regroupe 4 récepteurs membranaires à tyrosine kinase : ErbB1, plus connu sous le nom de récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR), ErbB2 aussi appelé Her2, ErbB3 (Her3) et ErbB4 (Her4). La liaison de EGFR, Her3 ou Her4 à leur ligand entraîne leur homodimérisation ou leur dimérisation avec un autre récepteur de la même famille (Tzahar *et al.*, 1996). Her2 est le récepteur ErbB qui est préférentiellement recruté lors d'une hétérodimérisation (Tzahar *et al.*, 1996). Comme décrit dans la revue de Olayioye *et al.* (2000), la dimérisation des récepteurs entraîne l'activation de leur domaine tyrosine kinase et l'autophosphorylation de tyrosines situées sur l'extrémité C-terminale. Ces tyrosines phosphorylées permettent la liaison à des protéines à domaine SH2 (Src homology 2) ou PTB (Phosphotyrosin Binding) (Olayioye *et al.*, 2000). Ces protéines peuvent être des protéines adaptatrices telles que Shc, Crk, Grb2, Grb7 et Gab1, des protéines kinases (Scr, Chk, PI3K) ou des tyrosines phosphatases (SHP1 et 2) (Olayioye *et al.*, 2000). Plusieurs voies de signalisation peuvent donc être activées et notamment la voie des Ras/MAPK. En effet, tous les récepteurs ErbB sont capables de lier Shc et/ou Grb2 (Olayioye *et al.*, 2000). Or Shc peut recruter Grb2 qui recrute à son tour le facteur SOS à la membrane (Figure 5) (Frémin et Meloche, 2010; Voskas *et al.*, 2014). Ce dernier active Ras en catalysant le détachement du GDP lié à Ras et qui est alors remplacé par le GTP (Frémin et Meloche, 2010; Voskas *et al.*, 2014). Ras recrute des Raf kinases à la membrane. L'activation de Raf entraîne une cascade de phosphorylation de MEK1/2 puis ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinase) (Frémin et Meloche, 2010). ERK peut activer des protéines cytoplasmiques ou nucléaires impliquées dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (Frémin et Meloche, 2010). Ainsi, une surexpression de Her2 est liée à une croissance excessive et à la tumorigénèse.

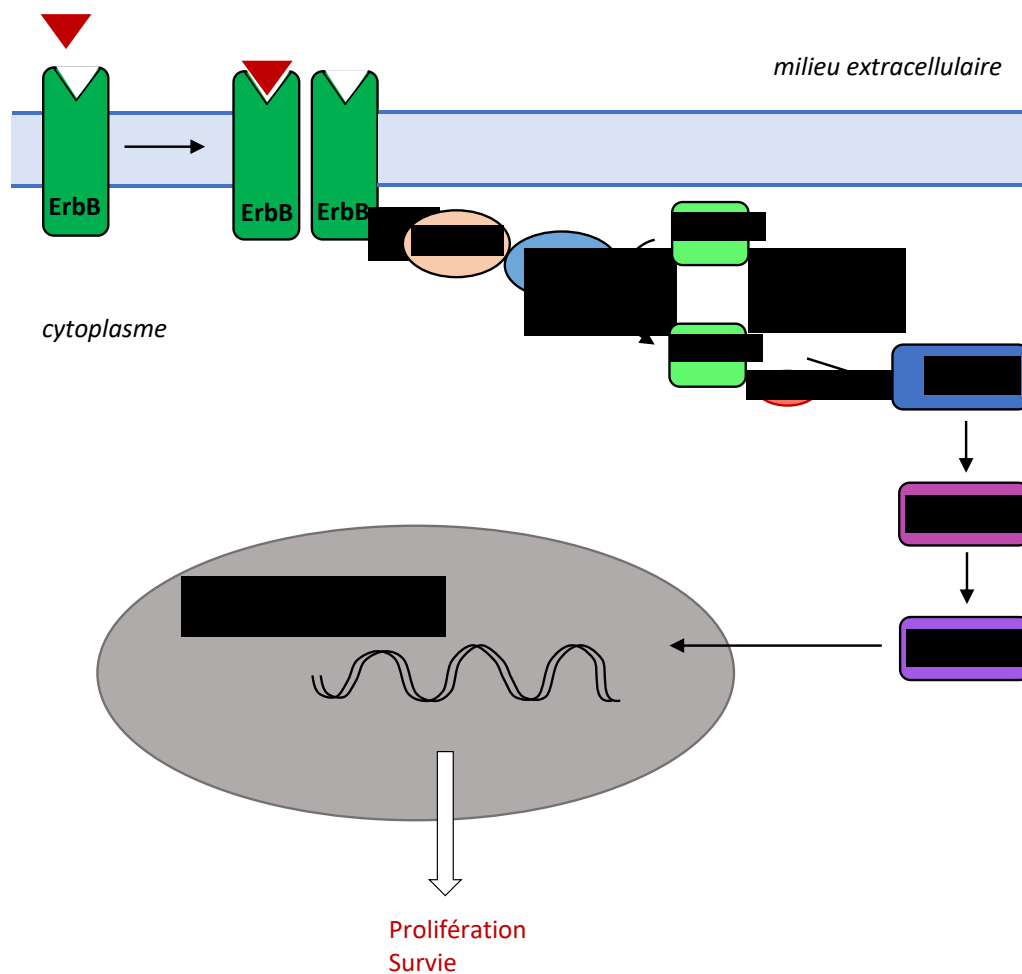


Figure 5. Récepteurs ErbB et activation de la voie Ras/MAPK

La liaison du récepteur ErbB à son ligand entraîne sa dimérisation. Celle-ci entraîne l'autophosphorylation de tyrosines situées sur la partie C-terminale du récepteur. Shc peut alors se fixer sur le récepteur ErbB2 et recruter Grb2 qui lui-même recrute SOS. Ce dernier catalyse le remplacement GDP en GTP sur la protéine Ras. Ceci permet le recrutement de Raf kinase. L'activation de Raf entraîne une cascade de phosphorylation de MEK puis ERK. Ce dernier active des protéines cytoplasmiques ou nucléaires impliquées dans la prolifération, la différenciation et la survie. Figure inspirée de Frémin et Meloche (2010)

Le trastuzumab (Herceptin®), un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le récepteur Her2 a été développé en 1998 (Greenblatt et Khaddour, 2019). La combinaison du trastuzumab avec la chimiothérapie augmente de 23 % la survie globale par rapport à la chimiothérapie seule lorsqu'il est administré en traitement de première intention chez des femmes présentant un cancer métastatique de sous-type Her2e (Slamon *et al.*, 2001). Des études cliniques montrent également qu'à un stade plus précoce, l'utilisation du trastuzumab en combinaison avec les chimiothérapies classiques améliore la survie globale des patients (Piccart-Gebhart *et al.*, 2005; Romond *et al.*, 2005). L'inconvénient du trastuzumab est l'augmentation du risque de lésions cardiaques lorsqu'il est associé à des chimiothérapies de type anthracycline (Slamon *et al.*, 2001).

### 1.1.3.3. Les cancers du sein triples négatifs

Les tumeurs triples négatives représentent 12 % des cancers du sein (Ellingjord-Dale *et al.*, 2017; Howlader *et al.*, 2014). Ce sous-type de tumeurs est caractérisé par la non-expression des récepteurs aux œstrogènes et du récepteur à la progestérone et la non-amplification ou surexpression de Her2. Comme décrit dans la revue de Gluz *et al.* (2009), les termes triples négatifs et basal-like sont souvent utilisés indifféremment alors que ces deux groupes ne se recoupent pas entièrement. En effet, le sous-type triple négatif comporte lui-même différents types de tumeurs, dont les tumeurs basal-like caractérisées par l'expression de marqueurs de cellules basales (Gluz *et al.*, 2009). Ces marqueurs exprimés par les cellules myoépithéliales dans les tissus sains sont notamment les cytokératines 5 (K5) et 14 (K14) et la P-cadhérine (Gluz *et al.*, 2009). Pour les tumeurs triples négatives, la seule option thérapeutique est la chimiothérapie ce qui explique, en partie, le pronostic sombre de ces cancers.

## 1.2. La connexine 43 : rôle dans la communication intercellulaire et le cancer

### 1.2.1 Les connexines, des protéines jonctionnelles

Les connexines sont des protéines transmembranaires. Elles sont constituées de quatre domaines transmembranaires, de deux boucles extracellulaires et d'une boucle intracellulaire (Nicholson, 2003). Les extrémités N-terminale et C-terminale sont également intracellulaires (Nicholson, 2003). Il existe 20 membres dans la famille des connexines chez l'Homme et chez la souris (Beyer et Berthoud, 2018). Dans la nomenclature, les connexines sont différenciées par un chiffre correspondant à leur poids moléculaire. Ainsi la connexine 43 (Cx43) est une connexine de 43 kDa. Elle est codée par le gène *GJA1* présent sur le chromosome 10 chez la souris et sur le chromosome 6 chez l'Homme. Les connexines s'associent par six pour former des connexons. Ces hexamères peuvent être constitués d'un seul type de connexines ou de plusieurs. La liaison entre deux connexons de cellules adjacentes forme un canal intercellulaire permettant le passage d'ions et de petites molécules dont le poids moléculaire est inférieur à 1kD (Paznekas *et al.*, 2009). L'ensemble des canaux intercellulaires regroupés à certains endroits de la membrane plasmique forme une plaque jonctionnelle. Comme décrit dans la revue de Paznekas *et al.* (2009), de nombreux paramètres peuvent influencer la perméabilité de ces canaux dont le type de connexines les formant mais aussi, la phosphorylation de celles-ci. Plusieurs types de connexines sont exprimés au niveau de la glande mammaire. Comme décrit dans la revue de McLachlan *et al.* (2007), chez l'Homme, les connexines 43 et 26 sont exprimées dans la glande mammaire tandis que chez la souris on retrouve les connexines 26, 30, 32 et 43. Les auteurs insistent cependant sur le fait que la présence d'autres types de connexines n'est pas à exclure complètement. Chez la souris, la Cx43 est exprimée principalement entre les cellules myoépithéliales de la glande mammaire (Dianati *et al.*, 2016; Pozzi *et al.*, 1995). Dianati *et al.* (2016) ont également identifié la présence de Cx43 à la jonction entre les cellules luminales et entre les cellules luminales et myoépithéliales. Les connexines 26, 30 et 32 sont

localisées uniquement entre les cellules luminales chez les rongeurs (Dianati *et al.*, 2016; Pozzi *et al.*, 1995). Le niveau d'expression de ces différentes connexines dépend du stade de développement de la glande mammaire (Dianati *et al.*, 2016).

Si certaines connexines ne sont exprimées que dans quelques tissus, la Cx43, en revanche, est exprimée par un grand nombre de tissus. C'est par conséquent la connexine la plus étudiée. La Cx43 est synthétisée dans le réticulum endoplasmique, puis l'oligomérisation en connexons a lieu dans l'appareil de Golgi avant leur export dans des vésicules vers la membrane plasmique (Leithe *et al.*, 2018). La communication intercellulaire médiée par les connexines est essentielle à la fonctionnalité du tissu. En effet, les mutations de plusieurs connexines sont associées à diverses pathologies comme des neuropathies, des surdités héréditaires ou encore des pathologies cardiaques (Srinivas *et al.*, 2018). Des mutations de la Cx43 ont notamment été associées à la mort subite du nourrisson (Van Norstrand *et al.*, 2012) et à la dysplasie oculodentodigitale (Paznekas *et al.*, 2003). Cette dernière est une maladie autosomale dominante caractérisée notamment par une microcéphalie, des petites dents, une syndactylie pouvant toucher les doigts ou les orteils et des anomalies oculaires. En 2005, Flenniken *et al.* décrivent un modèle murin de dysplasie oculodentodigitale. Dans ce modèle, les souris présentent une mutation faux-sens sur l'un des allèles du gène *GJA1* codant la Cx43 (Flenniken *et al.*, 2005). Cette mutation entraîne la substitution d'une glycine par une sérine en position 60 (G60S). Elle affecte le premier segment extracellulaire de la Cx43 (Flenniken *et al.*, 2005). Chez les souris G60S, la Cx43 est bien transportée à la membrane et forme des jonctions mais celles-ci ne sont pas fonctionnelles et ne permettent pas de communication intercellulaire (Flenniken *et al.*, 2005).

Au niveau de la glande mammaire, Plante et Laird (2008) ont montré une diminution de l'expression de la protéine de 50 % chez les souris G60S par rapport aux souris sauvages (WT). De manière intéressante, ce sont les formes phosphorylées de Cx43 qui sont drastiquement diminuées alors que la forme non-phosphorylée n'est pas affectée de manière significative (Plante et Laird, 2008). Le marquage par immunofluorescence a confirmé la diminution des plaques jonctionnelles chez les souris mutantes par rapport aux souris WT (Plante et Laird, 2008). La communication intercellulaire via les jonctions gap est également diminuée dans la glande mammaire des souris G60S (Plante et Laird, 2008). Au niveau de l'ARNm, en revanche, aucune différence d'expression de Cx43 entre les souris G60S et les souris WT n'a été observée. De plus, aucune différence n'a été observée pour les autres connexines mammaires (Cx26, 30 et 32), tant au niveau transcriptomique que protéique ; il semble donc ne pas y avoir de compensation de la diminution de la Cx43 par la surexpression d'autres types de connexines (Plante et Laird, 2008).

De manière intéressante pour le projet faisant l'objet de ce mémoire, l'étude de Plante et Laird (2008) montre également l'absence de variation d'expression des récepteurs aux œstrogènes ER $\alpha$  et ER $\beta$ . En effet, dans le projet présenté dans ce mémoire, la présence de ces récepteurs sur des tumeurs développées par des animaux portant la mutation G60S a été étudiée afin de déterminer le sous-type de

chaque tumeur. Il est donc important de savoir que les glandes mammaires saines de ces souris expriment ER $\alpha$  et  $\beta$  au même niveau que celles des souris témoins. Ainsi une éventuelle augmentation ou diminution de l'expression de ces récepteurs sera due au processus tumoral et non uniquement au génotype de ces souris.

D'autre part, Tong *et al.* (2009) ont montré que la fertilité des femelles G60S était diminuée. Elles ont moins de petits par portée et le taux de mortalité des souriceaux est très élevé (Tong *et al.*, 2009). En effet, seulement 16 % des petits survivent plus d'une journée (Tong *et al.*, 2009). Ce faible taux de survie serait dû à des problèmes d'éjection du lait chez les mères G60S (Plante et Laird, 2008; Plante *et al.*, 2010). En revanche, le croisement d'un mâle G60S avec une femelle WT n'affecte ni la taille des portés, ni la survie des souriceaux en comparaison avec le croisement de deux animaux WT (Tong *et al.*, 2009). C'est pourquoi, dans notre étude les souris proviennent du croisement de mâle G60S et non de femelles G60S.

### 1.2.2 Rôle de la connexine 43 dans le cancer du sein

Le rôle de la Cx43 dans le cancer du sein est controversé. La Cx43 a longtemps été considérée comme un suppresseur de tumeurs bien que certaines études suggèrent le contraire.

En effet les premières études sur des lignées cellulaires suggèrent que la Cx43 a un rôle suppresseur de tumeurs dans le cancer du sein. Par exemple, les études de Hirschi *et al.* (1996) ont montré que la surexpression de la Cx43 dans des cellules mammaires cancéreuses de lignée MDA-MB-435 diminue leur taux de croissance. Les auteurs montrent aussi que, lorsqu'elles sont injectées chez la souris, ces cellules produisent des tumeurs moins grosses que les cellules de la même lignée ne surexprimant pas la Cx43 (Hirschi *et al.*, 1996). D'autre part, Laird *et al.* (1999) montrent que l'expression de Cx43 est diminuée dans la plupart des tumeurs mammaires provenant de patients. Ces résultats ont été confirmés dans d'autres études.

Certaines études suggèrent au contraire que la Cx43 aurait un rôle promoteur de tumeurs. Stoletov *et al.* (2013) suggèrent que la Cx43 a un rôle promoteur de tumeurs dans les métastases cérébrales de cancer du sein. Les auteurs ont d'abord étudié des coupes de quatre métastases humaines. Le marquage par immunofluorescence de Cx43 a montré que bien que la majorité des cellules tumorales n'exprimaient pas Cx43, une partie des cellules tumorales en contact avec les vaisseaux sanguins expriment la Cx43 (Stoletov *et al.*, 2013). La co-culture de cellules tumorales mammaires de souris de la lignée 4T-1 avec des cellules endothéliales humaines donne des résultats intéressants. La diminution de l'expression de Cx43 dans les cellules 4T-1 diminue la communication par les jonctions gap entre les deux types cellulaires et perturbe la formation de sphéroïdes (Stoletov *et al.*, 2013). Les cellules 4T-1 dont l'expression de la Cx43 a été diminuée ont plus de difficultés à former des microtumeurs cérébrales quelques jours après leur injection dans l'artère carotide des souris que les cellules 4T-1 exprimant Cx43 (Stoletov *et al.*, 2013). Les auteurs montrent également que lorsque les cellules 4T-1 exprimant Cx43

sont injectées dans des poissons zèbres, elles ont la capacité à sortir des vaisseaux et à coloniser le tissu avoisinant alors que les cellules 4T-1 dont l'expression de Cx43 a été diminuée, ont plus de mal à accomplir cette extravasation (Stoletov *et al.*, 2013). Des résultats similaires ont été obtenus avec un modèle d'embryon de poulet. Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggèrent que la Cx43 faciliterait l'extravasation et donc la formation des métastases dans le cancer du sein.

En revanche, les études de Plante *et al.* (2011) suggèrent au contraire que la Cx43 inhiberait la progression des tumeurs dans le cancer du sein. En effet, afin de mieux comprendre le rôle de Cx43 dans le cancer du sein, Plante *et al.* (2011) ont croisé des souris G60S avec des souris ErBb2 ou FVB, et les ont exposées, ou non, à un initiateur de tumeurs. Ils ont démontré que chez les souris portant la mutation G60S, la baisse de l'expression de Cx43 était associée à de l'hyperplasie au niveau mammaire et que, bien qu'elles présentent moins de tumeurs palpables que les autres, ces souris développent des métastases pulmonaires rapidement (Plante *et al.*, 2011). Ces résultats suggèrent que la Cx43 pourrait jouer un rôle de suppresseur de métastases dans le cancer du sein.

Plus récemment, les travaux de notre laboratoire ont suggéré que le rôle de la Cx43 dans le cancer du sein dépendrait du sous-type des tumeurs (Busby *et al.*, 2018). En analysant les colorations en immunohistochimie de la Cx43 d'un grand nombre de tissus sains et de tumeurs mammaires disponibles dans la base de données Human Protein Atlas, Busby *et al.* (2018) notent que plusieurs des tissus tumoraux présentent une sous-expression de Cx43 ou une localisation cytoplasmique de celle-ci. *A contrario* certains tissus tumoraux, principalement des tumeurs bien différenciées de type luminal, présentent une surexpression de la Cx43. De plus, l'analyse des données de The Cancer Genome Atlas sur l'expression de l'ARNm et de la protéine au niveau tumoral et au niveau du tissu sain adjacent, a montré que la dérégulation de l'expression de Cx43 s'effectue à la fois au niveau de l'ARNm et au niveau protéique (Busby *et al.*, 2018). De façon intéressante, lorsque les tumeurs ont été analysées par sous-type moléculaire, les analyses ont démontré que les tumeurs lumineuses A présentent un niveau d'expression de *GJAI* en moyenne identique au tissu sain mais hautement variable, avec des tumeurs surexprimant Cx43 et d'autres sous-exprimant Cx43 (Busby *et al.*, 2018). Dans les tumeurs lumineuses B, l'expression de *GJAI* est aussi variable, mais globalement diminuée par rapport au tissu sain. Enfin, dans les tumeurs basales et Her2e, l'expression de Cx43 est diminuée. L'analyse de la survie des patients en fonction de l'expression de l'ARNm *GJAI* a également été investiguée (Busby *et al.*, 2018). De manière très intéressante, les diagrammes de Kaplan-Meier montrent que si l'on considère l'ensemble des cancers du sein, le pronostic a tendance à être plus favorable lorsque l'ARNm *GJAI* est fortement exprimé. En revanche, on remarque que si l'on observe chaque sous-type individuellement, la tendance est la même pour les deux sous-types lumineux (meilleur pronostic avec une forte expression de *GJAI*) alors qu'elle est inversée pour les sous-types basal et Her2e (meilleur pronostic lorsque *GJAI* est faiblement exprimé). Ceci suggère que le rôle de la Cx43 serait différent suivant le sous-type de cancer du sein.

## 2. HYPOTHESE ET OBJECTIFS

---

À la lecture de la section précédente, plusieurs constats peuvent être faits. Premièrement, la glande mammaire est un organe qui se développe en différentes phases majoritairement sous l'action d'hormones. Ce constant remodelage hormonodépendant la rend particulièrement sensible au développement de tumeurs. Deuxièmement, différents sous-types de cancer du sein ont été identifiés en se basant notamment sur l'expression de récepteurs tels que ER, PR et Her2. Ces sous-types sont reliés à différents pronostics. Des thérapies spécifiques ont ainsi pu être développées pour certains sous-types, permettant une meilleure prise en charge des patients et améliorant l'efficacité des traitements. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans chacun des sous-types est donc nécessaire afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de pouvoir traiter efficacement l'ensemble des tumeurs mammaires. Troisièmement, la Cx43, une protéine jonctionnelle impliquée dans la communication intercellulaire, a d'abord été identifiée comme un suppresseur de tumeurs. Cependant, d'autres études ont montré que la Cx43 était surexprimée dans certaines tumeurs et pouvait promouvoir la formation de métastases. Des études récentes de notre laboratoire suggèrent que le rôle de la Cx43 serait sous-type dépendant ce qui réconcilierait les deux hypothèses précédentes. ***Notre hypothèse est donc que la diminution de l'expression de la Cx43 favoriserait l'apparition de sous-types particuliers de cancer du sein.*** L'objectif de ce projet est de caractériser les tumeurs développées par des souris mutantes, ou non, pour la Cx43 et surexprimant, ou non, Her2.

## 3. MATERIEL ET METHODES

---

### 3.1. Animaux

Les souris mâles  $Gjal^{Jrt/+}$  hétérozygotes pour la mutation G60S sur le gène  $GJAI$  codant pour la Cx43 proviennent du laboratoire de Janet Rosant (Flenniken *et al.*, 2005; Plante *et al.*, 2011). Les souris FVB/N-Tg(MMTVneu)202Mul/J qui seront appelées ici Her2 par souci de simplification, proviennent de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA). Les glandes mammaires utilisées proviennent de souris issues de différents croisements (Figure 6) : des mâles  $Gjal^{Jrt/+}$  ou des mâles WT ont été croisés avec des femelles surexprimant Her2 ou des femelles FVB (Plante *et al.*, 2011). Par ces croisements, quatre génotypes sont obtenus : G60S-Her2, G60S-FVB, WT-Her2 et WT-FVB. Les souris G60S-Her2 sont mutantes pour la Cx43 et surexpriment Her2, les souris G60S-FVB sont mutantes pour la Cx43 mais ne surexpriment pas Her2, les souris WT-Her2 expriment la Cx43 WT et surexpriment Her2 et les souris WT-FVB expriment la Cx43 WT mais ne surexpriment pas Her2. Les femelles G60S-FVB et WT-FVB ont été divisées en deux groupes : un groupe qui a été traité au 7,12-diméthylbenz[ $\alpha$ ]anthracène (DMBA), un initiateur de tumeurs fréquemment utilisé pour le cancer du sein (Medina, 2007), et un groupe contrôle qui a été traité à l'huile de coton (Tableau 4) (Plante *et al.*, 2011). Les souris G60S-Her2 et WT-Her2 ont été divisées en trois groupes : deux groupes qui ont



reçu l'un des deux traitements précédents et un groupe qui n'a reçu aucun traitement (Tableau 4) (Plante *et al.*, 2011). Les souris traitées ont reçu 1 mg de DMBA par 25 g de poids corporel par gavage à partir de l'âge de 7 semaines et ce hebdomadairement pendant 5 semaines (Plante *et al.*, 2011). Les souris ont été euthanasiées lorsque leur plus grosse tumeur a atteint 1 cm<sup>3</sup> ou lorsqu'elles ont montré des signes de détresse (Plante *et al.*, 2011). Les glandes mammaires ont été prélevées, fixées dans 10 % de formaldéhyde et enrobées en paraffine (Plante *et al.*, 2011). Les blocs de paraffine ont été coupés (7 µm). Pour chaque animal, une coupe a été marquée à l'éosine et hématoxyline (Plante *et al.*, 2011).

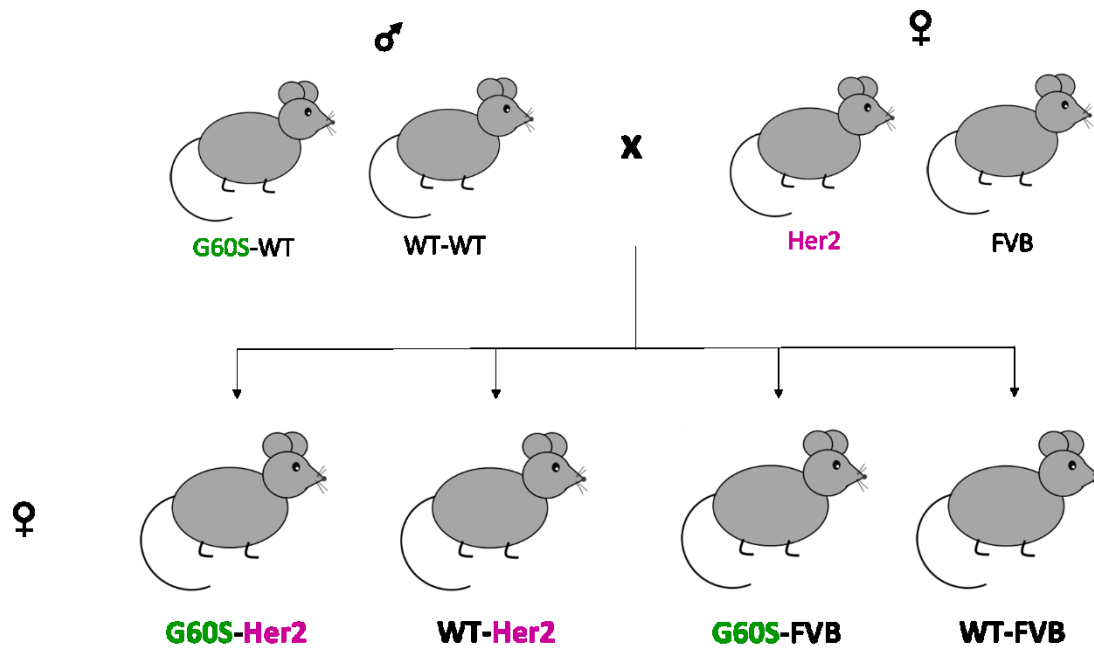


Figure 6. Génotype des souris

Des mâles hétérozygotes portant la mutation G60S sur le gène *GJA1* codant pour la Cx43 et des mâles WT, ont été croisés avec des femelles FVB ou des femelles surexprimant Her2. Les souris utilisées pour cette étude sont les femelles descendant de ces croisements : les souris G60S-Her2 sont mutantes pour la Cx43 et surexpriment Her2, les G60S-FVB sont mutantes pour la Cx43 mais ne surexpriment pas Her2, les WT-Her2 expriment la Cx43 WT et surexpriment Her2 et les WT-FVB expriment la Cx43 WT et ne surexpriment pas Her2.

Tableau 3. Effectif des souris par génotype et par traitement

	G60S-FVB	G60S-ErbB2	WT-FVB	WT-ErbB2
<b>Protocole 1 : Développement de tumeurs induites par le DMBA</b>				
<b>DMBA</b>	8	5	6	11
<b>Huile</b>	8	9	8	8
<b>Protocole 2 : Tumeurs « spontanées »</b>				
<b>∅</b>		19		22

Dans le protocole 1 des tumeurs mammaires ont été induites chez les souris par ingestion de DMBA. Un groupe ayant reçu de l'huile de coton sert de témoin. Dans le protocole 2, les souris n'ont reçu aucun traitement, mais elles surexpriment Her2 ce qui induit des tumeurs mammaires.

### **3.2. Microréseaux tissulaires ou tissu microarrays (TMA) :**

Pour chaque TMA, un bloc de paraffine, appelé bloc receveur, a été coulé puis les emplacements des échantillons (1 mm de diamètre) ont été creusés à l'aide d'un TMA arrayer. Pour chaque glande mammaire enrobée en paraffine, 3 carottes de 1 mm de diamètre ont été prélevées. Les emplacements des carottes ont été préalablement repérés sur les lames marquées à l'éosine et hématoxyline afin de prélever des régions montrant des tumeurs, de l'hyperplasie ou du tissu sain, selon les groupes de traitement. Les carottes ont été déposées dans le bloc receveur. Le plan des TMA a été pensé de façon à répartir les trois carottes de chaque glande mammaire sur l'ensemble du bloc. Une fois le TMA terminé, le bloc a été recouvert d'une fine couche de paraffine. Il a ensuite été placé face vers le bas sur une lame et à l'étuve à 40°C pendant toute la nuit. Des coupes de 4 µm d'épaisseurs ont été réalisées. Pour les TMA 1 et 2, la première lame a été marquée à l'éosine et l'hématoxyline. Au total, quatre TMA ont été réalisés. Les TMA 1 et 2 contiennent les tissus des animaux non traités dont les tumeurs ont été induites seulement par la surexpression de Her2. Les TMA 3 et 4 contiennent les tissus des animaux traités au DMBA ou à l'huile de coton. Afin d'avoir un témoin positif pour les différents marqueurs, des tissus témoins ont été ajoutés dans chaque TMA. Une glande mammaire de souris WT-FVB traitée à l'huile de coton a été utilisée comme témoin positif de l'expression de la Cx43, de K5 et de K14. Un placenta de rat a servi de témoin positif de l'expression de la P-cadhérine. Une glande mammaire de souris surexprimant Her2 a été utilisée comme témoin positif de l'expression de Her2. Un utérus de souris a été utilisé comme témoin positif de l'expression des récepteurs ER $\alpha$ , ER $\beta$  et PR. Pour chaque TMA, trois carottes ont été prélevées dans chacun des tissus témoins. De la même manière que pour les glandes mammaires à analyser, les trois carottes de chaque tissu témoin ont été réparties sur l'ensemble de la lame.

### **3.3. Immunofluorescence :**

Dans un premier temps, la mise au point des différents marquages a été réalisée avec des tissus de souris FVB non traitées, puis dans un deuxième temps, les TMA ont été marqués. Les lames ont été déparaffinées dans deux bains de xylène successifs pendant 5 minutes chacun. Les tissus ont ensuite été réhydratés dans des bains successifs d'éthanol 100 %, éthanol 95 %, éthanol 70 % et éthanol 50 %. Les lames ont été placées dans chaque bain d'éthanol pendant 2 minutes. Les lames ont ensuite été placées dans du PBS ou 2 min dans de l'eau distillée. Pour le co-marquage Cx43-K14, les tissus ont subi une étape de démasquage (Tableau 4) avec la solution de Vector Laboratories à base de Tris (VECTH3301250, 1:100). Pour le marquage de K5 et Her2, les tissus ont subi un démasquage au Tris (10mM)-EDTA (1mM), pH 9 (Tableau 4). Pour le marquage ER $\alpha$  et ER $\beta$ , les tissus ont subi une étape de démasquage avec la solution de Vector Laboratories à base de citrate (VECTH3300, 1:100) (Tableau 4). Dans tous les cas, la solution de démasquage a été portée à ébullition, puis les tissus ont été plongés dans la solution maintenue à 95°C pendant 30 min. Les lames ont été laissées à refroidir pendant

20 minutes à température ambiante. Les tissus ont été bloqués dans du PBS-BSA 2 %-Triton 0,1 % pendant 1 heure à température ambiante ou toute la nuit à 4°C dans une chambre humide. Les sections ont été mises à incuber avec l'anticorps primaire dilué dans la solution de blocage. Les conditions d'utilisation de chacun des anticorps sont décrites dans le tableau 4. Les tissus ont été rincés 2 fois 5 minutes au PBS avant d'être mis à incuber avec l'anticorps secondaire dilué dans la solution de blocage : anti-IgG de lapin couplé à Alexa Fluor 568 (ThermoFisher, A10042, 1/1 000, âne), anti-IgG de souris couplé à Alexa Fluor 488 (ThermoFisher, A11001, 1/1 000, chèvre) ou anti-IgG de lapin couplé à DyLight 488 (ThermoFisher, #35552, 1/1 000, chèvre). Les tissus ont été rincés 2 fois 5 minutes au PBS. Les noyaux ont ensuite été marqués au 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Thermo Scientific). Les tissus ont été rincés à l'eau distillée pendant 5 minutes puis les lames ont été montées dans du Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, USA), Pour chaque marquage, un témoin négatif a été réalisé en remplaçant le ou les anticorps primaire(s) par la solution du blocage seule.

**Tableau 4. Anticorps utilisés pour marquer les TMA et conditions d'utilisation**

Anticorps	Isotype	Fournisseur	Numéro catalogue	Dilution	Démasquage
<b>Connexine 43</b>	Lapin	Sigma	C6219	1/500	Vector Laboratories Tris
<b>Cytokératine 14</b>	Souris	ThermoFisher	ms-155-P1	1/200	Vector Laboratories Tris
<b>Cytokératine 5</b>	Lapin	Cedarlane	CLPRB-160P	1/200	Tris-EDTA
<b>Her2</b>	Lapin	Cell Signaling	#2165	1/200	Tris-EDTA
<b>ER<math>\alpha</math></b>	Lapin	Bioss antibodies	bs-0122R	1/100	Vector Laboratories Citrate
<b>ER<math>\beta</math></b>	Lapin	Bioss antibodies	bs-0116R	1/100	Vector Laboratories Citrate

L'anticorps anti-Cx43 (Sigma, C6219, 1/500, lapin) a également été testé avec succès sans démasquage. Bien que les résultats ne soient pas présentés ici, de nombreux autres anticorps et protocoles ont été testés, sans succès, dans le cadre de ce projet de maîtrise. En effet, les anticorps suivants ont été testés sans démasquage mais sans succès : anti-PR (Abcam, ab16661, 1/100, lapin), anti-P-cadhérine (Santa Cruz, sc-7893, 1/100, lapin), anti-ER $\alpha$  (ThermoFisher, MA5-13304, 1/100, souris) et anti-Her2 (Cell Signaling, 29D8, #2165, 1/200, lapin). Les anticorps suivants ont été testés avec démasquage Tris-EDTA mais sans succès : anti-PR (Abcam, ab16661, 1/100, lapin), anti-P-cadhérine (Santa Cruz, sc-7893, 1/100, lapin), anti-ER $\alpha$  (ThermoFisher, MA5-13304, 1/100, souris), anti-ER $\beta$  (ThermoFisher, PA1-310B, 1/200, lapin) et anti-cytokératine 14 (ThermoFisher, ms-115-P1, 1/800, souris). Les anticorps suivants ont été testés, sans succès, avec démasquage avec les solutions de Vector Laboratories à base de Tris et celle à base de citrate et chauffage au micro-onde pendant 2 min puis 30 s : anti-ER $\beta$  (ThermoFisher, PA1-310B, 1/200, lapin), anti-ER $\alpha$  (ThermoFisher, MA5-13304, 1/100, souris), anti-P-cadhérine (Santa Cruz, sc-7893, 1/100, lapin), anti-PR (Abcam, ab16661, 1/100, lapin) et anti-cytokératine 14 (ThermoFisher, ms-115-P1, 1/800, souris). Les anticorps suivants ont été testés, sans succès, avec démasquage avec les solutions Vector Laboratories à base de Tris chauffée pendant 30 min à 95°C : anti-ER $\alpha$  (ThermoFisher, MA5-13304, 1/100, souris), anti-ER $\beta$

(ThermoFisher, PA1-310B, 1/200, lapin), anti-P-cadhérine (Santa Cruz, sc-7893, 1/100, lapin) et anti-PR (Abcam, ab16661, 1/100, lapin). Les anticorps suivants ont été testés, sans succès, avec démasquage avec les solutions Vector Laboratories à base de citrate chauffée pendant 30 min à 95°C : anti-ER $\beta$  (ThermoFisher, PA1-310B, 1/200, lapin), anti-P-cadhérine (Santa Cruz, sc-7893, 1/100 et 1/50, lapin), anti-PR (Abcam, ab16661, 1/100, lapin), anti-P-cadhérine (ThermoFisher, MA1-2003, 1/100, souris), anti-ER $\alpha$  (Bioss, bs-2098R, 1/100, lapin) et anti-PR (Bioss, bs-0111R, 1/100 et 1/50, lapin).

### 3.4. Imagerie

Les lames ont été observées au microscope confocal (NIKON AIR+) et les images ont été analysées avec le logiciel NIS-elements. Les lames de TMA ont été scannées avec le microscope confocal au grossissement 10x grâce au logiciel NIS-Element. L'analyse de chaque tissu présent sur chaque lame de TMA à l'aide du logiciel NIS-Element est en cours.

## 4. RESULTATS

### 4.1. Confection des TMA

Les quatre TMA ont été effectués, ce qui permet de regrouper les 175 glandes mammaires à analyser sur seulement quatre blocs de paraffine. Les quatre blocs ont été coupés (4  $\mu$ m) pour pouvoir être analysés au niveau histologique et également pour vérifier l'expression et la localisation de marqueurs de cancérogenèse. Un marquage à l'éosine et hématoxyline a d'abord été réalisé afin de confirmer la présence de canaux ou de tissu tumoral dans les échantillons prélevés. Ce marquage permet de constater que dans la plupart des cas, les tissus échantillonnés présentent bien des canaux, de l'hyperplasie ou du tissu tumoral (Figure 7).

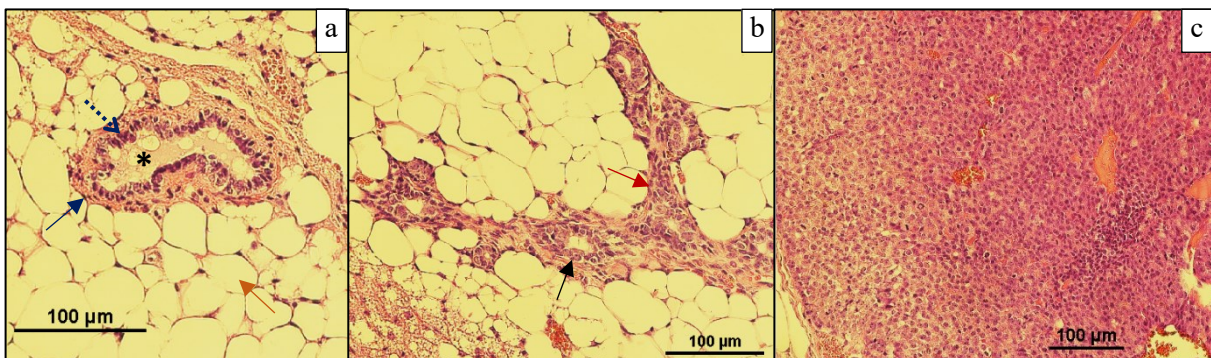
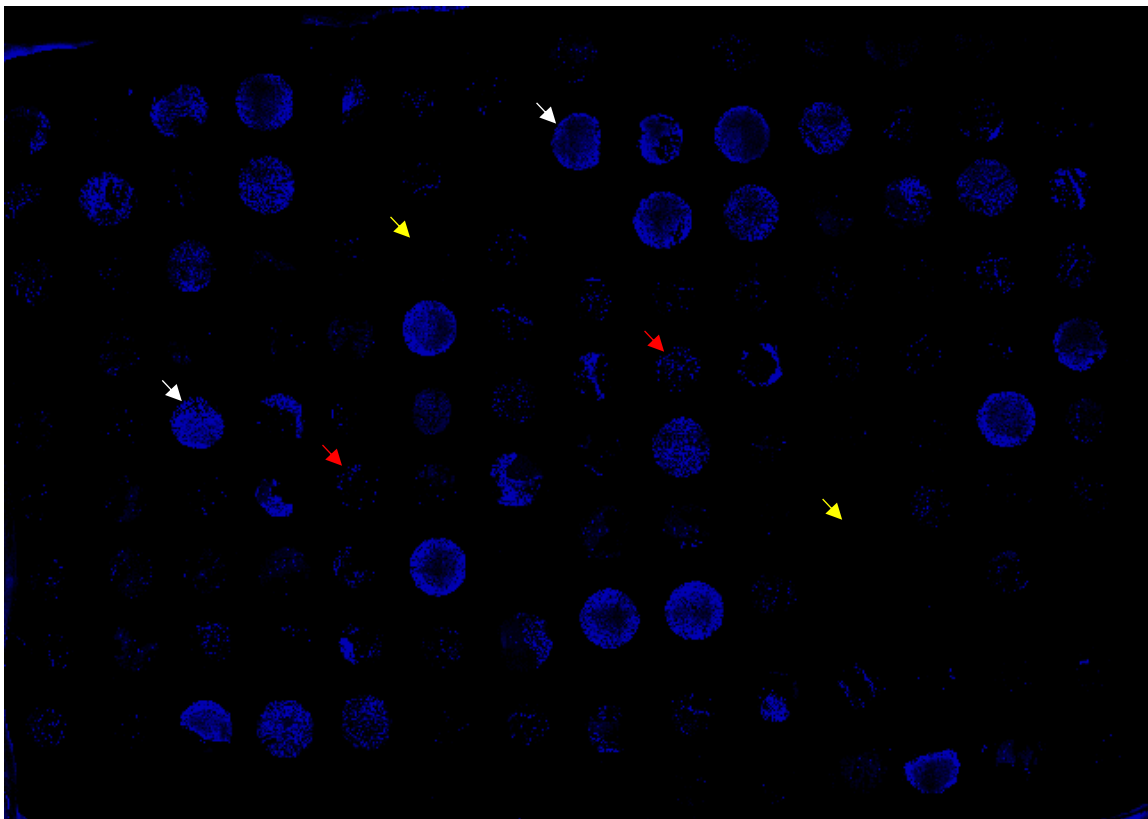


Figure 7. TMA marqué à l'éosine et hématoxyline

L'observation au grossissement 20x d'un TMA marqué à l'éosine et hématoxyline permet de constater que parmi les échantillons présents sur le TMA, certains comportent des canaux lactifères sains (a), d'autres des canaux présentant une hyperplasie (b) et enfin certains sont constitués de tissus tumoraux (c). La flèche bleu pointillée désigne une cellule luminaire et la flèche bleu pleine une cellule myoépithéliale. La flèche marron montre un adipocyte constitutif du stroma. L'astérisque montre le lumen. La flèche noire désigne un canal et la flèche rouge de l'hyperplasie.

## 4.2. Confirmation des échantillons

La présence de tissus a d'abord été confirmée à l'aide du marquage des noyaux cellulaires au DAPI (bleu). Une fois les lames scannées, une image telle que présentée (Figure 8) est obtenue. Chaque cercle correspond à un échantillon de tissu. Certains cercles sont pleins, alors que d'autres paraissent vides ou parsemés. Les cercles pleins correspondent à des tissus comportant une grande densité de cellules, caractéristique des tumeurs ou des tissus hyperplasiques, tandis que les espaces vides correspondent à des tissus manquants. Enfin dans certains cercles, le marquage des noyaux semble parsemé. Cela est dû à la forte proportion d'adipocytes par rapport à l'épithélium mammaire, typique des tissus mammaires sains. En effet, les adipocytes sont des cellules de grande taille comportant une grande proportion de cytoplasme par rapport à la taille de leur noyau. Ces analyses, combinées aux analyses histologiques, ont permis de confirmer que les échantillons déposés sur les lames sont bien représentatifs des animaux de l'étude.



**Figure 8. Scan au grossissement 10x d'un TMA permettant de vérifier la présence des tissus**

Les noyaux cellulaires ont été marqués au DAPI (bleu) ce qui permet de vérifier la présence de chacun des tissus sur le TMA. Les emplacements des tissus sont circulaires. Certains tissus présentent une forte densité cellulaire (flèches blanches), d'autres présentent des cellules plus parsemées (flèches rouges) et enfin certains tissus sont manquants (flèches jaunes).

### 4.3. Spécificité des marquages immunofluorescents

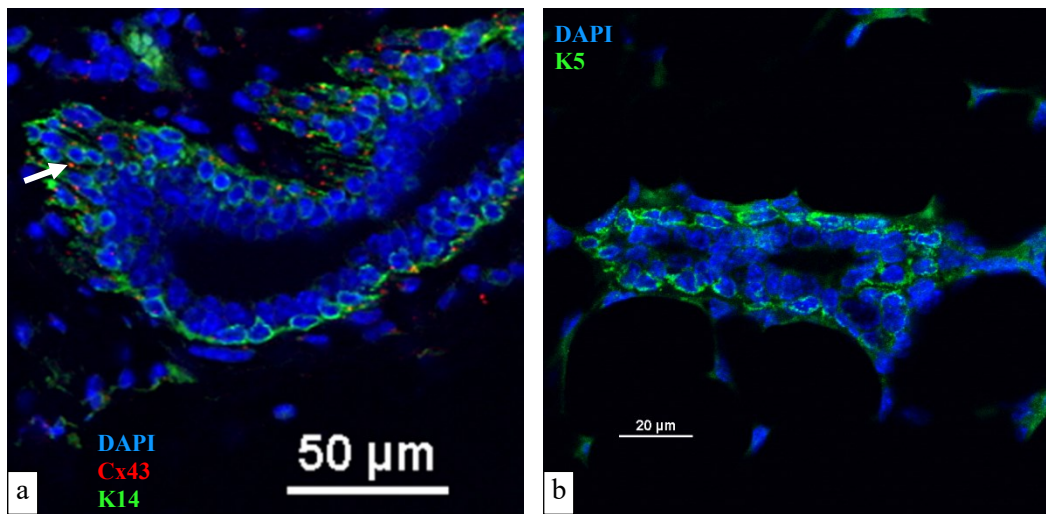


Figure 9. Marquage par immunofluorescence des marqueurs basaux et de la Cx43

Les glandes mammaires de souris enrobées en paraffine ont été coupées et marquées avec des anticorps primaires dirigés contre Cx43 et les marqueurs basaux K14 et K5. Les anticorps secondaires couplés avec Alexa 488 (a) ou DyLight 488 (b) permettent de visualiser le marquage en vert et l'anticorps secondaire couplé avec Alexa 568 permet de visualiser le marquage en rouge (a). Les noyaux sont marqués au DAPI (bleu). La K14 (a) et la K5 (b) sont marquées en vert alors que la Cx43 est marquée en rouge (a) (flèches). Les marquages de K14, K15 et Cx43 sont spécifiques.

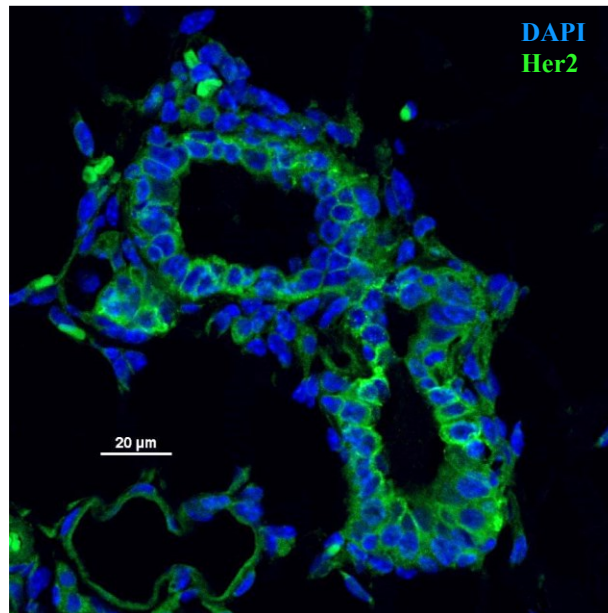
L'expression et la localisation des différents marqueurs des sous-types de tumeurs du sein et de la Cx43 ont d'abord été évaluées sur des coupes de glandes mammaires afin d'en vérifier la spécificité. La figure 9a montre un canal lactifère avec les noyaux des cellules colorés en bleu par le DAPI, ainsi que la Cx43 et K14, marqués en rouge et en vert, respectivement. Comme attendu, seules les cellules de la couche externe du canal sont marquées par K14. En effet, K14 étant un marqueur des cellules basales de la glande mammaire, seules les cellules de la couche externe du canal expriment ce marqueur. De plus, le marquage est typique d'une protéine du cytosquelette, K14 étant un constituant des filaments intermédiaires. Aucun marquage n'a été observé pour le contrôle négatif (résultat non présenté). Le marquage de K14 est donc bien spécifique, la mise au point du protocole d'immunofluorescence pour cet anticorps a donc été réalisé avec succès.

La figure 9a, montre également de petits points rouges correspondant au marquage de Cx43. Il s'agit d'une protéine jonctionnelle qui s'associe en plaques. Le marquage en petits points rouges localisés à la membrane plasmique à la jonction de deux cellules adjacentes est donc caractéristique des jonctions gap. De plus, le marquage est présent majoritairement dans la couche basale (Figure 9a), et n'était pas présent dans le contrôle négatif (résultats non montrés). L'ensemble de ces résultats confirment que la mise au point du marquage de Cx43 a été effectuée avec succès.

La figure 9b montre le marquage correspondant à K5 (vert). Comme pour K14, un marquage cytoplasmique des cellules de la couche externe de l'épithélium canalaire est observé. Ce marquage était attendu puisque tout comme K14, K5 est une protéine des filaments intermédiaires des cellules basales de l'épithélium mammaire. Là encore, aucun marquage n'a été observé avec le contrôle négatif, ce qui



permet de conclure que le protocole de marquage par immunofluorescence de K5 a été mis en point avec succès.



**Figure 10. Marquage par immunofluorescence de Her2**

**Les tissus mammaires murins enrobés en paraffine ont été coupés et marqués avec l'anticorps primaire anti-Her2. L'anticorps secondaire couplé avec DyLight 488 permet de visualiser le marquage en vert. Les noyaux sont marqués au DAPI (bleu). Ainsi le récepteur membranaire Her2 est marqué en vert. Le marquage de Her2 est spécifique.**

La figure 10 montre le marquage obtenu à l'aide d'un anticorps spécifique pour Her2. Sur cette image, on observe deux canaux lactifères avec les noyaux des cellules colorés en bleu par le DAPI. Contrairement à ce qu'on peut voir sur les figures 9a et b, ici ce sont les cellules de la couche interne de l'épithélium mammaire qui sont marquées en vert (Figure 10). Le marquage délimite bien chaque cellule, il s'agit donc d'un marquage à la membrane plasmique, tel qu'attendu pour un récepteur transmembranaire. La localisation du marquage et l'absence de marquage dans le contrôle négatif (résultats non montrés) confirment que le marquage est bien spécifique du récepteur membranaire Her2.

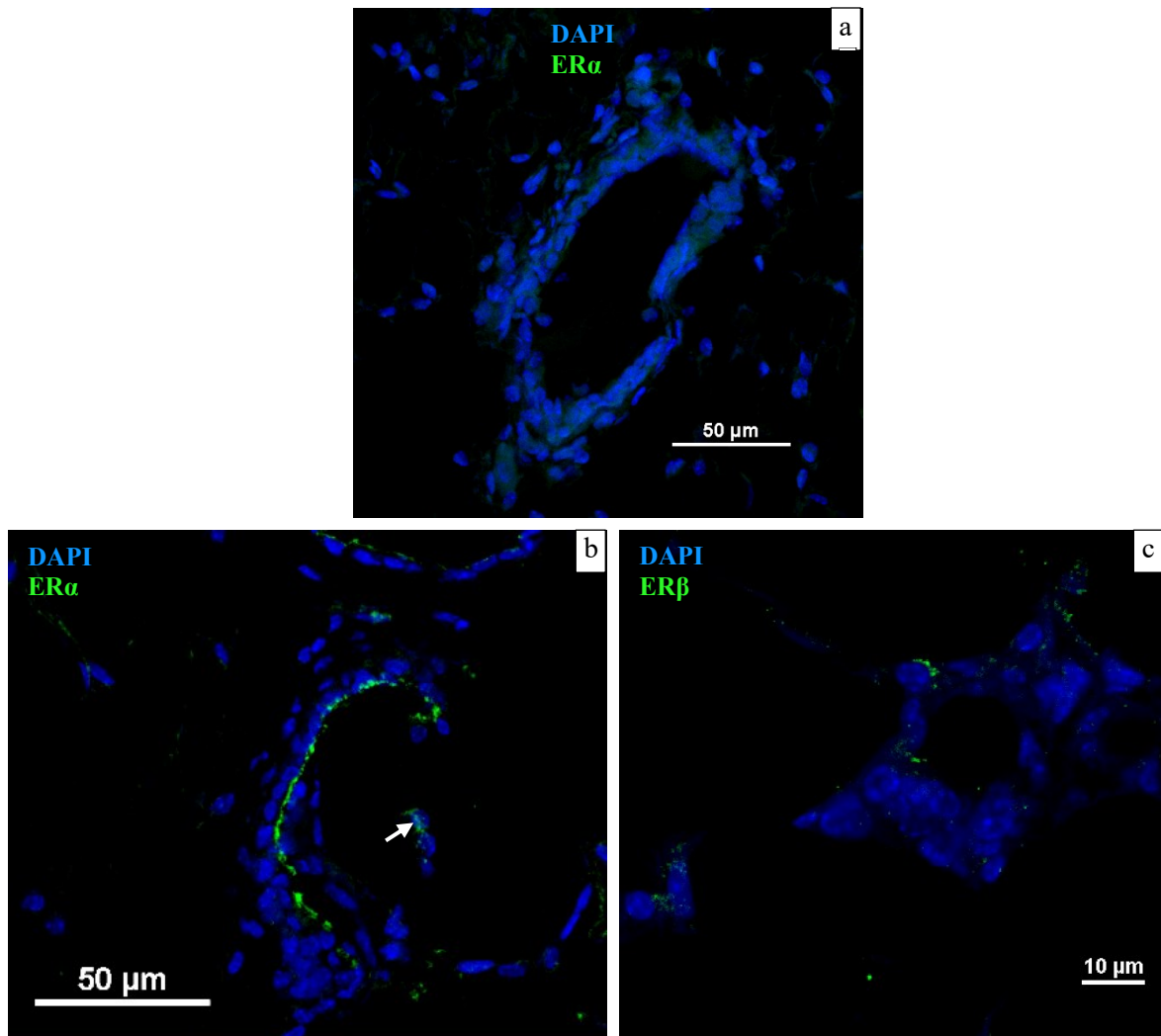


Figure 11. Marquage par immunofluorescence de ER $\alpha$  et ER $\beta$

(a) Contrôle négatif. (b) Marquage de ER $\alpha$  (vert) sur une coupe de glande mammaire de souris FVB (6 semaines). Le marquage est parfois nucléaire (flèche), mais le plus souvent cytoplasmique. (c) Marquage de ER $\beta$  (vert) sur une coupe de glande mammaire de souris FVB (6 semaines). Les noyaux sont colorés au DAPI (bleu).

La mise au point du marquage de ER $\alpha$  a été effectuée sur des coupes de glandes mammaires de souris FVB âgées de 6 semaines, stade pour lequel un marquage plus important est attendu dû à la croissance des canaux lactifères. Un contrôle négatif a également été fait afin de s'assurer de la spécificité de l'anticorps secondaire pour l'anticorps primaire (Figure 11a). En l'absence d'anticorps primaire, l'anticorps secondaire se fixe peu de manière aspécifique au niveau du canal lactifère entraînant un léger bruit de fond. En revanche, un marquage est observé au niveau d'un canal lactifère lorsque l'anticorps primaire dirigé contre ER $\alpha$  est présent (Figure 11b). Dans de rares cellules, ce marquage est nucléaire alors que dans la plupart des cas le marquage semble cytoplasmique. ER $\alpha$  est un récepteur nucléaire qui se situe dans le cytosol des cellules et migre dans le noyau seulement lorsqu'il est activé par la fixation à son ligand. De plus, une partie seulement des cellules luminales expriment ce récepteur (cf.1.2.1). Les deux localisations observées sur la figure 11b sont donc cohérentes.



De façon similaire, un marquage cytoplasmique est observé pour ER $\beta$  (Figure 11c). Tout comme ER $\alpha$ , ER $\beta$  est cytosolique et migre dans le noyau lors de son activation et il n'est pas exprimé par la totalité des cellules luminales. La localisation du marquage n'est donc pas aberrante, cependant très peu de cellules sont marquées et on n'observe aucun marquage nucléaire.

#### 4.4. Caractérisation des tumeurs

Le co-marquage de Cx43 et K14 a été effectué sur l'ensemble des TMA, ainsi que les marquages de K5, Her2, ER $\alpha$  et ER $\beta$  (Figures 7-9 et 11). Les lames de TMA marquées avec les différents anticorps ont été scannées au microscope confocal au grossissement 10x et analysées grâce au logiciel NIS-Element (Figure 12). L'analyse de chaque tissu présent sur chaque TMA est en cours. Cette analyse consiste à quantifier, dans un premier temps, l'expression des différents marqueurs des sous-types de cancer du sein pour chacun des échantillons. Ce signal sera normalisé sur le signal des noyaux marqués au DAPI afin de prendre en compte la quantité de tissu épithélial ou cancéreux présent dans l'échantillon par rapport au stroma. Dans un deuxième temps, une analyse statistique permettra de déterminer si certains marqueurs sont exprimés de façon préférentielle chez certains groupes de souris, et si les traitements et/ou modifications génétiques des souris mènent à la formation de sous-types de cancer du sein spécifiques.

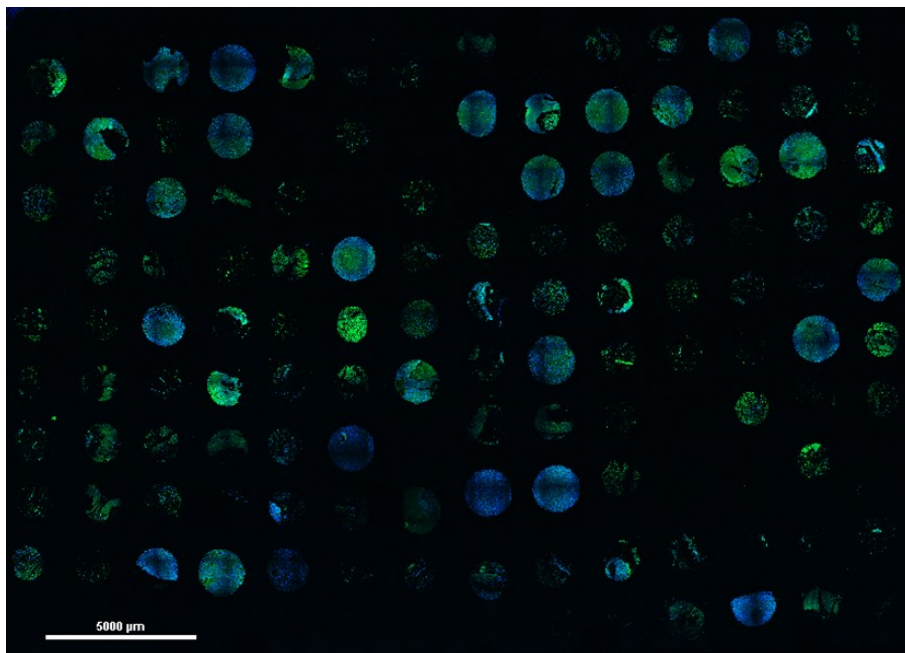


Figure 12. Scan au grossissement 10x d'un TMA marqué par immunofluorescence

TMA comportant les tissus de souris traitées au DMBA ou à l'huile de coton. Les noyaux sont marqués au DAPI (bleu). Le récepteur Her2 est marqué en vert.

## 5. DISSCUSSION

---

Ce projet avait pour but de caractériser des tumeurs mammaires de souris mutantes, ou non, pour la Cx43 et surexprimant, ou non, Her2 afin de déterminer si la diminution de l'expression de Cx43 entraînait l'apparition préférentielle d'un sous-type particulier. Pour ce faire, les glandes mammaires de ces souris ont été marquées à l'aide de marqueurs caractéristiques de chacun des sous-types, soit ER $\alpha$  et ER $\beta$  (luminal), Her2 (Her2e) et K5 et K14 (basal), les tumeurs négatives pour ER $\alpha$ , ER $\beta$  et Her2 étant considérées comme faisant partie du sous-type triple-négatif. L'expression de Cx43 a également été évaluée. En tout, 104 animaux ont servi à cette étude et 175 glandes mammaires enrobées en paraffine ont été utilisées (Tableau 3). Afin d'optimiser le temps et le coût de l'expérimentation, une approche par TMA a été préconisée. Ce projet de recherche a permis de mettre au point les TMA, de leur design, afin d'avoir des animaux représentatifs de chacun des groupes sur chacun des TMA, à leur réalisation. L'optimisation des principaux anticorps nécessaires à l'identification des différents sous-types de tumeurs du sein a également été réalisée. Enfin, les TMA ont été marqués avec les anticorps mentionnés ci-dessus. Malheureusement, suite à un bris au niveau du confocal, l'analyse des résultats a été retardée et est en cours. L'analyse finale ne fait donc pas partie de ce mémoire, mais sera incorporée dans un article portant sur le rôle de la Cx43 dans le cancer du sein, tout comme les résultats obtenus dans le cadre de ce mémoire.

### **Avantages et défis liés à la technique des TMA**

La technique du TMA a été préconisée pour cette étude puisqu'elle permet d'analyser de nombreux tissus en même temps. Dans notre cas, 175 glandes mammaires devaient être analysées, provenant de 10 groupes de traitements différents (Tableau 3). De plus, puisque les échantillons sont tous sur la même lame, cette technique réduit la variabilité technique. Par contre, puisque seule une partie de la glande mammaire est prélevée, cette technique ne tient pas compte de l'hétérogénéité du tissu (stroma vs épithélium) ou de la tumeur. Une façon de pallier cet inconvénient est tout d'abord de prélever plusieurs échantillons de chaque glande mammaire à différents endroits dans le tissu. En effet, ainsi on augmente la surface de tissu analysée par glande. De plus, lorsqu'il s'agit de tumeurs, le fait de prendre trois échantillons de chaque tumeur permet de prendre en compte l'hétérogénéité des tumeurs. Il est à noter que la taille des tumeurs murines était souvent assez restreinte et la prise de trois échantillons couvre dans la plupart des cas la totalité de la tumeur. Une deuxième façon de contourner ce biais est de se servir de sections histologiques afin d'identifier des structures particulières à analyser. Ainsi, trois échantillons de chacune des 175 glandes mammaires ont été regroupés dans 4 blocs de paraffine.

### **Absence d'échantillon sur les TMA**

La numérisation des coupes de TMA marquées en immunofluorescence révèle que certains tissus sont absents (Figure 8) dont des tissus témoins. Deux causes sont possibles : soit les tissus se sont décollés

lors de l'étape de démasquage qui nécessite de chauffer la lame, soit le tissu n'était pas à l'affleurement sur cette coupe. Pour ce deuxième point, deux explications sont possibles : soit la carotte prélevée a été enfoncée trop profondément dans le bloc receveur, soit le tissu été enrobée trop profondément dans la paraffine. Néanmoins, la perte de ces tissus ne devrait pas affecter nos résultats. En effet, lors de l'élaboration des TMA, pour chaque tissu enrobé en paraffine, trois carottes ont été prélevées. Les risques de perdre les trois échantillons du même tissu lors du démasquage sont faibles. Ceci diminue donc le risque de perdre totalement l'information pour un animal ou tissu témoin lors de l'étape de démasquage. D'autre part, un grand nombre d'animaux par groupe ont été utilisés pour ce projet, la perte totale d'information pour un animal d'un groupe n'est donc pas dramatique.

### **Marquages immunofluorescents et alternatives possibles**

Les marquages par immunofluorescence de PR et de la P-cadhérine n'ont pas pu être réalisés sur les TMA. En effet, malgré l'essai de plusieurs anticorps, de différentes solutions de démasquages et de différents protocoles (c.f. 3.3.), la mise au point de ces marquages n'a pas donné de résultats satisfaisants. Le marquage de PR est primordial à la classification des tumeurs selon les trois sous-types principaux : luminal, Her2e ou triple négatif puisque cette classification s'appuie sur l'expression ou non du récepteur Her2 et des récepteurs hormonaux, dont PR (cf. 1.1.3). Afin de déterminer si les glandes mammaires des animaux utilisés dans ce projet expriment PR, une quantification de cette expression par immunobuvardage de type western est envisageable sur les tissus cryopréservés. La quantification de la P-cadhérine pourra également être réalisée avec cette technique.

La spécificité des marquages de ER $\alpha$  et ER $\beta$  est discutable, bien que l'on observe une nette différence avec le témoin négatif. En effet, le marquage de coupe de glande mammaire de souris FVB de 6 semaines montre que toutes les cellules luminales semblent exprimer ER $\alpha$  et *a contrario* très peu de cellules semblent exprimer ER $\beta$ . Or d'après la revue de Jia *et al.* (2015), dans une glande mammaire saine, ER $\alpha$  ne serait exprimé que par 10 % des cellules épithéliales, tandis que ER $\beta$  serait exprimé par 80 % des cellules et cette répartition serait modifiée en cas de cancer avec une augmentation de l'expression de ER $\alpha$  et une diminution de l'expression de ER $\beta$ . D'autre part, ces deux récepteurs sont des récepteurs nucléaires qui se situent dans le cytoplasme et dont l'activation par son ligand entraîne la translocation vers le noyau (cf. 1.1.3.1). On s'attend donc à obtenir un marquage cytoplasmique et nucléaire or on ne visualise pas de marquage nucléaire pour ER $\beta$  et peu pour ER $\alpha$ . Le marquage de ER $\alpha$  semble marquer les cellules luminales uniquement sur la face en contact avec le lumen. D'autre part, tant pour ER $\alpha$  que pour ER $\beta$ , le marquage cytoplasmique semble périnucléaire. Cette localisation ne correspond pas à ce qui est attendu. L'utilisation d'un autre anticorps pourrait sûrement confirmer ou infirmer ces résultats.

Comme il a été montré précédemment, les marquages en immunofluorescence des marqueurs basaux K14 et K5, du marqueur Her2, de la Cx43 ont été mis au point avec succès. En effet, la localisation de K14 au niveau des cellules basales est cohérente avec ce qui a été observé dans d'autres études (Plante

*et al.*, 2010). Le marquage en point de la Cx43 est également caractéristique de cette protéine (Dianati *et al.*, 2016; Plante et Laird, 2008). De plus ce marquage est apparu principalement entre les cellules myoépithéliales ce qui est en cohérence avec la littérature (Dianati *et al.*, 2016; Pozzi *et al.*, 1995). Le marquage de Her2 est caractéristique d'un marquage membranaire or Her2 est un récepteur membranaire, le marquage est donc bien spécifique. Enfin le marquage de K5 ressemble beaucoup à celui de K14 ce qui est cohérent puisque ces deux protéines sont des protéines du cytosquelette et des marqueurs des cellules basales (Gluz *et al.*, 2009).

De manière générale, les difficultés rencontrées lors de la mise au point des marquages par immunofluorescence pourraient être expliquées par l'âge des échantillons. En effet, les glandes mammaires de souris utilisées dans ce projet ont été conservées dans la paraffine pendant plusieurs années. Cela a pu diminuer la qualité des tissus. L'altération d'épitopes expliquerait le manque de spécificité de certains anticorps pour les protéines que nous souhaitons marquer.

### **Caractérisation des tumeurs par sous-types**

L'analyse des TMA marquées par immunofluorescence va permettre de caractériser chaque tissu. On s'attend à voir une tendance se dégager pour chaque groupe de souris. Les tissus provenant d'animaux de même génotype et ayant subi le même traitement seront comparés à ceux avec des génotypes différents et/ou ayant reçu des traitements différents. Ainsi, les quatre groupes de souris traitées au DMBA ou à l'huile de coton seront comparés entre eux. La comparaison des souris G60S-FVB et des souris WT-FVB permettra de voir l'effet de la mutation de Cx43 sur la tumorigénèse induite par le DMBA. La comparaison des souris WT-Her2 et des souris WT-FVB permettra de connaître l'influence de l'amplification de *Her2* sur le développement de tumeurs induites par le DMBA. Enfin la comparaison des souris G60S-Her2 avec les souris G60S-FVB et les souris WT-Her2 permettra de voir si 1) l'effet de G60S et l'effet de Her2 peuvent être synergiques ou antagoniste, et 2) si le sous-type obtenu dépend uniquement de la mutation de Cx43 ou de l'amplification de *Her2* dans le cas où l'on obtient un sous-type différent avec la mutation de Cx43 et avec l'amplification de *Her2*. D'autre part, les deux groupes de souris non traitées (G60S-Her2 et WT-Her2) seront comparés d'abord entre eux afin de voir les effets de la mutation de Cx43 sur le développement de tumeurs induit par l'amplification de *Her2* seule. Dans un deuxième temps, ces souris seront comparées aux souris de même génotype, mais traitées au DMBA ou à l'huile de coton afin de discriminer les effets attribuables à la mutation de Cx43 des effets attribuables au DMBA. Les souris traitées à l'huile de coton servent déjà à voir cet effet, mais la comparaison des animaux traités au DMBA ou à l'huile de coton avec les animaux non traités permet de s'affranchir de l'effet du stress du gavage sur le développement tumoral.

### **Perspectives**

Plusieurs études pourraient être réalisées afin de compléter les résultats obtenus dans le cadre de ce mémoire. D'une part, une fois l'analyse de l'expression des différents marqueurs réalisés à partir des

images en immunofluorescence des TMA, la présence de ces protéines sera vérifiée par immunobuvardage de type western. L'inconvénient est que l'extraction protéique se fait sur l'ensemble de la glande et non uniquement sur l'épithélium. Par conséquent, les variations d'expression protéique au niveau tumoral ou même épithélial seront éventuellement plus difficiles à observer. Par contre, ce type d'analyse permet une meilleure quantification du niveau protéique que l'immunofluorescence. De plus, il est également prévu que d'autres marqueurs impliqués dans la progression tumorale, entre autres les protéines impliquées dans l'EMT, soient étudiés à partir des TMA réalisés dans ce projet. L'hypothèse est que la Cx43 retarde l'expression des gènes de l'EMT dans certains sous-types, mais pourrait en augmenter l'expression dans d'autres. Les marquages de la cadhérine E et la cadhérine N seraient intéressants puisqu'un changement d'expression à lieu entre ces deux protéines lors de l'EMT. Comme pour les marqueurs des différents sous-types, une confirmation de la présence de ces protéines et une quantification seraient effectuées par immunobuvardage de type western. De plus l'évaluation de l'expression et l'activité des métalloprotéases, enzymes favorisant l'invasion des cellules tumorales (MacDougall et Matrisian, 1995) pourra être envisagée. Pour ce faire, une extraction d'ARNm sur les glandes cryopréservées pourrait être réalisée afin d'effectuer une PCR en temps réel. Ceci permettrait d'évaluer le niveau de transcription des métalloprotéases. Cependant, les échantillons étant cryopréservés depuis plusieurs années, il se pourrait que la qualité de l'ARNm ne soit pas suffisante pour cette expérience. Dans un deuxième temps, le niveau d'expression protéique de ces enzymes pourrait être évalué par immunofluorescence et par immunobuvardage de type western. En complément, l'activité enzymatique des métalloprotéases par zymographie pourrait être investiguée. L'ensemble de ces résultats permettrait de déterminer si la mutation de la Cx43 promeut la formation de métastases par une activation de l'EMT induisant une perte de la cadhérine E et une expression de la cadhérine N ainsi que l'expression et l'activation de métalloprotéases. En effet, étant donné, que les souris mutantes pour Cx43 ont développé des métastases rapidement, il serait intéressant de voir si l'épithélium mammaire exprime encore la cadhérine E ou si, au contraire, il s'est mis à exprimer la cadhérine N et des métalloprotéases qui caractérisent l'EMT. Par la suite, il faudrait déterminer quels sont les mécanismes qui au contraire augmentent l'activité des gènes de l'EMT en présence de Cx43. Pour cela il faudrait étudier par co-immunoprécipitation les interactions de Cx43 avec d'autres protéines.

De plus, l'expression de plusieurs gènes a également été corrélée avec l'expression de Cx43 de façon sous-type dépendante lors d'une analyse bioinformatique de bases de données publiques (Busby *et al.*, 2018 ; Busby *et al.*, article en préparation). Les TMA générés par ce projet permettront donc de vérifier si ces gènes sont également corrélés avec l'expression de Cx43 dans les tissus murins, et ainsi de mieux comprendre le rôle de la Cx43 dans la progression du cancer du sein et les mécanismes impliqués.

Enfin, dans le but de confirmer ou non la possibilité d'extrapoler ces résultats chez l'humain, une étude similaire est envisagée chez l'homme. De la même manière, des échantillons de tumeurs de patients représentant les différents sous-types de tumeurs seront inclus sur des TMA afin de pouvoir en analyser

un grand nombre. Ceux-ci seront marqués afin de déterminer la présence des marqueurs utilisés dans cette étude. Afin de se rapprocher de ce qui est fait en clinique, le marquage de ER $\alpha$ , PR et Her2 pourrait être réalisé par immunohistochimie au lieu de l'immunofluorescence. Toujours dans le but d'utiliser les mêmes méthodes de classification tumorale que les cliniciens, l'amplification du gène *Her2* pourrait être déterminée par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH). Les résultats de ces deux études parallèles chez l'humain et chez la souris seront comparés afin de conclure sur le rôle de la Cx43 dans les différents sous-types.

D'autre part, comme décrit par Plante *et al.* (2011), les souris G60S ont dû être euthanasiées rapidement après le début de l'expérience car elles présentaient une détresse respiratoire due à la présence de métastases pulmonaires. Les tissus pulmonaires ont été recueillis et enrobés en paraffine. Il serait intéressant d'analyser ces métastases. Il conviendrait de caractériser ces tumeurs et de les comparer à la caractérisation de la tumeur primaire ou du tissu hyperplasique d'où les cellules tumorales sont originaires. Il serait particulièrement intéressant d'évaluer le statut de la Cx43 dans ces métastases. En effet, Stoletov *et al.* (2013) suggèrent un rôle promoteur de métastase dans le cancer du sein. Il serait intéressant de voir si les métastases pulmonaires des souris G60S expriment ou non la Cx43. Pour ce faire, il serait possible de couper les blocs de paraffine contenant les tissus pulmonaires des souris, de marquer la Cx43 par immunofluorescence avec un marquage des noyaux au DAPI et un marquage membranaire. Ceci permettra de localiser la Cx43 au sein des cellules tumorales. En parallèle, une extraction protéique sur les tissus pulmonaires cryopréservés pourra être réalisée et l'expression de Cx43 évaluée par immunobuvardage de type western afin de déterminer si les métastases expriment la Cx43. Cependant, la quantité relative de tissu pulmonaire sain par rapport au tissu tumoral pourrait masquer les variations d'expression protéiques au niveau du tissu tumoral. Afin de pallier ce désavantage, une microdissection des tumeurs pulmonaire pourra être réalisée afin d'extraire les protéines uniquement du tissu tumoral.

Dans le projet présenté ici, les souris G60S ont une mutation de la Cx43 dans l'ensemble de leurs tissus. Ainsi, la formation de métastases pulmonaires observée chez ces souris peut être due à la mutation de la Cx43 dans les cellules cancéreuses mammaires qui rendrait ces cellules plus agressives, mais la possibilité de former des métastases dans les poumons pourrait aussi être facilitée par cette mutation au niveau des cellules stromales ou encore des cellules pulmonaires. Ainsi, afin d'améliorer ce modèle et afin de discriminer le rôle de la mutation de la Cx43 dans les cellules cancéreuses mammaires et le rôle de la mutation de Cx43 dans l'ensemble des autres tissus dont le stroma et les poumons, l'expérience suivante pourrait être envisagée. En s'inspirant des travaux de Gallego *et al.* (2001) et de Mallepell *et al.* (2006), une expérience de transplantation d'épithélium mammaire de souris G60S dans le stroma de souris WT serait intéressante. Pour ce faire, l'épithélium mammaire de souris WT de 3 semaines serait retiré chirurgicalement. Des cellules de l'épithélium mammaire de souris G60S seraient implantées dans le stroma des souris WT. Comme pour les souris utilisées dans le projet faisant l'objet de ce mémoire,

une induction de tumeur mammaire serait réalisée par ingestion de DMBA hebdomadairement pendant 5 semaines à partir de l'âge de 7 semaines (Plante *et al.*, 2011). L'absence de formation de métastases pulmonaires montrerait que l'expression de la Cx43 dans les tissus environnants de la tumeur ou dans le tissu pulmonaire a également un rôle dans la suppression du développement métastatique. Une expérience similaire de transplantation pourra ensuite être réalisée en injectant des cellules épithéliales de souris G60S-ErbB2 ou WT-ErbB2 ou G60S-FVB ou WT-FVB dans le stroma de souris WT, puis en induisant la tumorigénèse mammaire par ingestion de DMBA ou en laissant les tumeurs se développer spontanément comme cela a été fait pour les souris étudiées dans ce projet (cf.3.1). Les tumeurs développées par les souris de ce nouveau modèle pourront être caractérisées comme décrit dans ce projet. La comparaison des résultats obtenus avec ce nouveau modèle et de ceux qui seront obtenus avec le modèle de Plante *et al.* (2011) permettra de déterminer avec plus de précision le rôle de la Cx43 dans la progression du cancer du sein et selon les sous-types.

### **Conclusion**

En conclusion, le projet présenté ici avait pour but de caractériser des tumeurs mammaires de souris mutantes, ou non, pour la Cx43 et surexprimant, ou non, Her2 afin de déterminer si la diminution de l'expression de Cx43 entraînait l'apparition préférentielle d'un sous-type particulier. Pour ce faire des TMA ont été réalisés afin de regrouper les 175 glandes mammaires à analyser dans 4 blocs de paraffine. Ces blocs ont été coupés et les marqueurs des différents sous-types ainsi que la Cx43 ont été marqués par immunofluorescence. La mise au point des différents marquages a occupé la plus grande partie de ce projet. Néanmoins, les marquages de la Cx43, de K14, de K5, de Her2 et, dans une moindre mesure, de ER $\alpha$  et ER $\beta$  ont été réalisés sur les TMA avec succès. Les images des TMA sont en cours d'analyse. Cette étude permettra de conclure sur le rôle de la Cx43 dans l'apparition de certains sous-types. Plus largement, cette étude pourra être poursuivie chez l'humain. Les mécanismes impliquant la Cx43 et qui pourraient être reliés à l'EMT seront également étudiés. Ainsi, cette étude aboutira à une meilleure connaissance de l'expression protéique des différents sous-types de cancer du sein et à une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la progression tumorale. Dans un futur plus lointain, ces résultats pourraient permettre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et l'élaboration de nouveaux traitements. Ceci constituerait une avancée majeure pour les cancers triples négatifs pour lesquels la chimiothérapie, un traitement lourd et pas suffisamment efficace, est la seule thérapie disponible.





## LISTE DES REFERENCES

---

- Beyer E. C. et Berthoud V. M. (2018). Gap junction gene and protein families: Connexins, innexins, and pannexins. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1860(1), 5-8.
- Bloom M. J. et Richardson W. W. (1957). Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *British journal of cancer*, 11(3), 359-377.
- Brisken C., Kaur S., Chavarria T. E., Binart N., Sutherland R. L., Weinberg R. A., Kelly P. A. et Ormandy C. J. (1999). Prolactin controls mammary gland development via direct and indirect mechanisms. *Dev Biol*, 210(1), 96-106.
- Brisken C., Park S., Vass T., Lydon J. P., O'Malley B. W. et Weinberg R. A. (1998). A paracrine role for the epithelial progesterone receptor in mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(9), 5076-5081.
- Busby M., Hallett M. T. et Plante I. (2018). The Complex Subtype-Dependent Role of Connexin 43 (GJA1) in Breast Cancer. *Int J Mol Sci*, 19(3).
- Ciarloni L., Mallepell S. et Brisken C. (2007). Amphiregulin is an essential mediator of estrogen receptor alpha function in mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(13), 5455-5460.
- Clarke R. B., Howell A., Potten C. S. et Anderson E. (1997). Dissociation between steroid receptor expression and cell proliferation in the human breast. *Cancer Res*, 57(22), 4987-4991.
- Cross B. A. et Silver I. A. (1956). Milk ejection and mammary engorgement. *Proc R Soc Med*, 49(12), 978-979.
- Dent R., Trudeau M., Pritchard K. I., Hanna W. M., Kahn H. K., Sawka C. A., Lickley L. A., Rawlinson E., Sun P. et Narod S. A. (2007). Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*, 13(15 Pt 1), 4429-4434.
- Dianati E., Poiraud J., Weber-Ouellette A. et Plante I. (2016). Connexins, E-cadherin, Claudin-7 and beta-catenin transiently form junctional nexuses during the post-natal mammary gland development. *Dev Biol*, 416(1), 52-68.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTG). (2015). Aromatase inhibitors versus tamoxifen in early breast cancer: patient-level meta-analysis of the randomised trials. *Lancet*, 386(10001), 1341-1352.
- Ellingjord-Dale M., Vos L., Hjerkind K. V., Hjartaker A., Russnes H. G., Tretli S., Hofvind S., Dos-Santos-Silva I. et Ursin G. (2017). Alcohol, Physical Activity, Smoking, and Breast Cancer Subtypes in a Large, Nested Case-Control Study from the Norwegian Breast Cancer Screening Program. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 26(12), 1736-1744.
- Enmark E., Pelto-Huikko M., Grandien K., Lagercrantz S., Lagercrantz J., Fried G., Nordenskjold M. et Gustafsson J. A. (1997). Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab*, 82(12), 4258-4265.
- Fata J. E., Chaudhary V. et Khokha R. (2001). Cellular turnover in the mammary gland is correlated with systemic levels of progesterone and not 17-beta-estradiol during the estrous cycle. *Biology of reproduction*, 65(3), 680-688.
- Flenniken A. M., Osborne L. R., Anderson N., Ciliberti N., Fleming C., Gittens J. E., Gong X.-Q., Kelsey L. B., Lounsbury C., Moreno L., Nieman B. J., Peterson K., Qu D., Roscoe W., Shao Q., Tong D., Veitch G. I., Voronina I., Vukobradovic I., Wood G. A., Zhu Y., Zirngibl R. A., Aubin J. E., Bai D., Bruneau B. G., Grynepas M., Henderson J. E., Henkelman R. M., McKerlie C., Sled J. G., Stanford W. L., Laird D. W., Kidder G. M., Adamson S. L. et Rossant J. (2005). A Gjal missense mutation in a mouse model of oculodentodigital dysplasia. *Development*, 132(19), 4375-4386.

- Frémin C. et Meloche S. (2010). From basic research to clinical development of MEK1/2 inhibitors for cancer therapy. *J Hematol Oncol*, 3, 8.
- Gallego M. I., Binart N., Robinson G. W., Okagaki R., Coschigano K. T., Perry J., Kopchick J. J., Oka T., Kelly P. A. et Hennighausen L. (2001). Prolactin, growth hormone, and epidermal growth factor activate Stat5 in different compartments of mammary tissue and exert different and overlapping developmental effects. *Dev Biol*, 229(1), 163-175.
- Gluz O., Liedtke C., Gottschalk N., Pusztai L., Nitz U. et Harbeck N. (2009). Triple-negative breast cancer--current status and future directions. *Ann Oncol*, 20(12), 1913-1927.
- Greenblatt K. et Khaddour K. (2019). Trastuzumab. In *StatPearls [Internet]*: StatPearls Publishing.
- Grimm S. L., Hartig S. M. et Edwards D. P. (2016). Progesterone Receptor Signaling Mechanisms. *J Mol Biol*, 428(19), 3831-3849.
- Hanahan D. et Weinberg R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Harbeck N. et Gnant M. (2017). Breast cancer. *Lancet*, 389(10074), 1134-1150.
- Haute Autorité de Santé. (2010). Guide ALD 30 "Cancer du sein". 51 pages.
- Hirschi K. K., Xu C. E., Tsukamoto T. et R. S. (1996). Gap junction genes Cx26 and Cx43 individually suppress the cancer phenotype of human mammary carcinoma cells and restore differentiation potential. *Cell Growth Differ*, 7(7), 861-870.
- Howlander N., Altekruze S. F., Li C. I., Chen V. W., Clarke C. A., Ries L. A. et Cronin K. A. (2014). US incidence of breast cancer subtypes defined by joint hormone receptor and HER2 status. *J Natl Cancer Inst*, 106(5).
- Inman J. L., Robertson C., Mott J. D. et Bissell M. J. (2015). Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment. *Development*, 142(6), 1028-1042.
- Jia M., Dahlman-Wright K. et Gustafsson J. A. (2015). Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 29(4), 557-568.
- Kastner P., Krust A., Turcotte B., Stropp U., Tora L., Gronemeyer H. et Chambon P. (1990). Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J*, 9(5), 1603-1614.
- Kumar V. et Chambon P. (1988). The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell*, 55(1), 145-156.
- Laird D. W., Fistouris P., Batist G., Alpert L., Huynh H. T., Carystinos G. D. et Alaoui-Jamali M. A. (1999). Deficiency of connexin43 gap junctions is an independent marker for breast tumors. *Cancer Research*, 59(16), 4104-4110.
- Leithe E., Mesnil M. et Aasen T. (2018). The connexin 43 C-terminus: A tail of many tales. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1860(1), 48-64.
- MacDougall J. R. et Matrisian L. M. (1995). Contributions of tumor and stromal matrix metalloproteinases to tumor progression, invasion and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 14(4), 351-362.
- Macias H. et Hinck L. (2012). Mammary gland development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 1(4), 533-557.
- Mallepell S., Krust A., Chambon P. et Briskin C. (2006). Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor alpha is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(7), 2196-2201.
- McLachlan E., Shao Q. et Laird D. W. (2007). Connexins and gap junctions in mammary gland development and breast cancer progression. *J Membrane Biol*, 218(1-3), 107-121.
- Medina D. (2007). Chemical carcinogenesis of rat and mouse mammary glands. *Breast Dis*, 28, 63-68.

- Menasce L. P., White G. R. M., Harrison C. J. et Boyle J. M. (1993). Localization of the estrogen receptor locus (ESR) to chromosome 6q25.1 by FISH and a simple post-FISH banding technique. *Genomics; (United States)*, 17(1), 263-265.
- Nicholson B. J. (2003). Gap junctions - from cell to molecule. *J Cell Sci*, 116(Pt 22), 4479-4481.
- Olayioye M. A., Neve R. M., Lane H. A. et Hynes N. E. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *The EMBO journal*, 19(13), 3159-3167.
- Onitilo A. A., Engel J. M., Greenlee R. T. et Mukesh B. N. (2009). Breast cancer subtypes based on ER/PR and Her2 expression: comparison of clinicopathologic features and survival. *Clin Med Res*, 7(1-2), 4-13.
- Paznekas W. A., Boyadjiev S. A., Shapiro R. E., Daniels O., Wollnik B., Keegan C. E., Innis J. W., Dinulos M. B., Christian C., Hannibal M. C. et Jabs E. W. (2003). Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia. *Am J Hum Genet*, 72(2), 408-418.
- Paznekas W. A., Karczeski B., Vermeer S., Lowry R. B., Delatycki M., Laurence F., Koivisto P. A., Van Maldergem L., Boyadjiev S. A., Bodurtha J. N. et Jabs E. W. (2009). GJA1 mutations, variants, and connexin 43 dysfunction as it relates to the oculodentodigital dysplasia phenotype. *Hum Mutat*, 30(5), 724-733.
- Perou C. M., Sorlie T., Eisen M. B., van de Rijn M., Jeffrey S. S., Rees C. A., Pollack J. R., Ross D. T., Johnsen H., Akslen L. A., Fluge O., Pergamenschikov A., Williams C., Zhu S. X., Lonning P. E., Borresen-Dale A. L., Brown P. O. et Botstein D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747-752.
- Pettersson K., Grandien K., Kuiper G. G. et Gustafsson J. A. (1997). Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol*, 11(10), 1486-1496.
- Piccart-Gebhart M. J., Procter M., Leyland-Jones B., Goldhirsch A., Untch M., Smith I., Gianni L., Baselga J., Bell R., Jackisch C., Cameron D., Dowsett M., Barrios C. H., Steger G., Huang C. S., Andersson M., Inbar M., Lichinitser M., Lang I., Nitz U., Iwata H., Thomssen C., Lohrisch C., Suter T. M., Ruschoff J., Suto T., Giatromanolaki S., Ward C., Straehle C., McFadden E., Dolci M. S., Gelber R. D. et Herceptin Adjuvant (HERA) Trial Study Team. (2005). Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*, 353(16), 1659-1672.
- Plante I. et Laird D. W. (2008). Decreased levels of connexin43 result in impaired development of the mammary gland in a mouse model of oculodentodigital dysplasia. *Dev Biol*, 318(2), 312-322.
- Plante I., Stewart M. K., Barr K., Allan A. L. et Laird D. W. (2011). Cx43 suppresses mammary tumor metastasis to the lung in a Cx43 mutant mouse model of human disease. *Oncogene*, 30(14), 1681-1692.
- Plante I., Wallis A., Shao Q. et Laird D. W. (2010). Milk secretion and ejection are impaired in the mammary gland of mice harboring a Cx43 mutant while expression and localization of tight and adherens junction proteins remain unchanged. *Biol Reprod*, 82(5), 837-847.
- Pozzi A., Risek B., T. K. D., B. G. N. et M. K. N. (1995). Analysis of multiple gap junction gene products in the rodent and human mammary gland. *Experimental Cell Research*, 220(1), 212-219.
- Qiu J., Xue X., Hu C., Xu H., Kou D., Li R. et Li M. (2016). Comparison of Clinicopathological Features and Prognosis in Triple-Negative and Non-Triple Negative Breast Cancer. *J Cancer*, 7(2), 167-173.
- Quarrie L. H., Addey C. V. P. et Wilde C. J. (1996). Programmed cell death during mammary tissue involution induced by weaning, litter removal, and milk stasis. *Journal of cellular physiology*, 168(3), 559-569.
- Romond E. H., Perez E. A., Bryant J., Suman V. J., Geyer C. E., Jr., Davidson N. E., Tan-Chiu E., Martino S., Paik S., Kaufman P. A., Swain S. M., Pisansky T. M., Fehrenbacher L., Kutteh L.

- A., Vogel V. G., Visscher D. W., Yothers G., Jenkins R. B., Brown A. M., Dakhil S. R., Mamounas E. P., Lingle W. L., Klein P. M., Ingle J. N. et Wolmark N. (2005). Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*, 353(16), 1673-1684.
- Ruan W. et Kleinberg D. L. (1999). Insulin-like growth factor 1 is essential for terminal end bud formation and ductal morphogenesis during mammary development. *Endocrinology*, 140(11), 5075-5081.
- Slamon D. J., Leyland-Jones B., Shak S., Fuchs H., Paton V., Bajamonde A., Fleming T., Eiermann W., Wolter J., Pegram M., Baselga J. et Norton L. (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*, 344(11), 783-792.
- Soni A., Ren Z., Hameed O., Chanda D., Morgan C. J., Siegal G. P. et Wei S. (2015). Breast cancer subtypes predispose the site of distant metastases. *Am J Clin Pathol*, 143(4), 471-478.
- Sorlie T., Perou C. M., Tibshirani R., Aas T., Geisler S., Johnsen H., Hastie T., Eisen M. B., van de Rijn M., Jeffrey S. S., Thorsen T., Quist H., Matese J. C., Brown P. O., Botstein D., Lonning P. E. et Borresen-Dale A. L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(19), 10869-10874.
- Srinivas M., Verselis V. K. et White T. W. (2018). Human diseases associated with connexin mutations. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1860(1), 192-201.
- Stoletov K., Strnadel J., Zardoujian E., Momiyama M., Park F. D., Kelber J. A., Pizzo D. P., Hoffman R., VandenBerg S. R. et Klemke R. L. (2013). Role of connexins in metastatic breast cancer and melanoma brain colonization. *J Cell Sci*, 126(Pt 4), 904-913.
- Taherian-Fard A., Srihari S. et Ragan M. A. (2015). Breast cancer classification: linking molecular mechanisms to disease prognosis. *Brief Bioinform*, 16(3), 461-474.
- Thiery J. P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2(6), 442-454.
- Tong D., Colley D., Thoo R., Li T. Y., Plante I., Laird D. W., Bai D. et Kidder G. M. (2009). Oogenesis defects in a mutant mouse model of oculodentodigital dysplasia. *Dis Model Mech*, 2(3-4), 157-167.
- Tzahar E., Waterman H., Chen X., Levkowitz G., Karunakaran D., Lavi S., Ratzkin B. J. et Yarden Y. (1996). A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol*, 16(10), 5276-5287.
- Van Norstrand D. W., Asimaki A., Rubinos C., Dolmatova E., Srinivas M., Tester D. J., Saffitz J. E., Duffy H. S. et Ackerman M. J. (2012). Connexin43 mutation causes heterogeneous gap junction loss and sudden infant death. *Circulation*, 125(3), 474-481.
- Voskas D., Ling L. S. et Woodgett J. R. (2014). Signals controlling un-differentiated states in embryonic stem and cancer cells: role of the phosphatidylinositol 3' kinase pathway. *J Cell Physiol*, 229(10), 1312-1322.
- Zeps N., Bentel J. M., Papadimitriou J. M., D'Antuono M. F. et Dawkins H. J. S. (1998). Estrogen receptor-negative epithelial cells in mouse mammary gland development and growth. *Differentiation*, 62(5), 221-226.
- Zhou Y., Xu B. C., Maheshwari H. G., Reed M., Lozykowski M., Okada S., Cataldo L., Coschigamo K., Wagner T. E., Baumann G. et Kopchick J. J. (1997). A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (the Laron mouse). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(24), 13215-13220.