



Université de Montréal

# **L'adénosine et CD73 dans le potentiel métastatique et le métabolisme cellulaire**

par Vincent Delisle

Axe Découvertes et Validation de Cibles Thérapeutiques

Faculté de Pharmacie

Mémoire présenté

en vue de l'obtention du grade de Maître

en Sciences Pharmaceutiques

option Pharmacologie

Août 2017

© Vincent Delisle, 2017



## Résumé

Introduction : CD73 est une protéine membranaire impliquée dans la génération de l'adénosine extracellulaire. L'adénosine extracellulaire est connue pour exercer des fonctions diverses dans un contexte physiologique et pathologique. Dans un contexte tumoral, ceux-ci sont généralement liés à l'immunosuppression et la progression tumorale.

Objectif : Démontrer un potentiel rôle de CD73 et de la signalisation de l'adénosine dans le phénotype mésenchymateux et évaluer l'impact de CD73 sur le métabolisme des cellules cancéreuses, principalement en ce qui concerne la phosphorylation oxydative.

Méthodologie : Pour ce faire, principalement deux modèles cellulaires ont été employés, soit les HMLE-Twist-ER et les MDA-MB-231. L'expression de CD73 fut observée lors de la modulation de l'EMT. Ensuite, le retrait de CD73 a été effectué dans les cellules par CRISPR-Cas9 et des expériences se sont déroulées afin de déterminer si l'absence de CD73 influence le procédé de l'EMT. Un Micro Array a été effectué sur les MDA-MB-231 déficientes pour CD73, suivi par la mesure du métabolisme cellulaire par le SeaHorse analyzer.

Résultats : Il semble y avoir modulation de l'expression de CD73 dans les cellules au phénotype mésenchymateux. Cependant, la présence de CD73 affecte peu les marqueurs de l'EMT dans les deux modèles employés. Or, l'absence de CD73 semble diminuer la consommation d'oxygène des cellules.

Conclusion : Malgré le manque d'expériences pour affirmer des changements dans le phénotype cellulaire, CD73 semble avoir une expression plus élevée dans les cellules mésenchymateuses et les cellules cancéreuses n'exprimant plus CD73 ont une diminution de leur consommation d'oxygène. Ainsi, la confirmation de ces résultats pourrait apporter une nouvelle facette à CD73 dans un contexte tumoral et aider à mieux comprendre le micro-environnement tumoral.

**Mots-clés** : CD73, adénosine, EMT, métastase, phosphorylation oxydative, cancer du sein

# Abstract

Introduction: CD73 is a membrane bound protein implicated in the generation of extracellular adenosine. The adenosine is known to act in many aspects of health and disease, including cancer. In a tumor context, adenosine and CD73 are considered as immunosuppressive protumorigenic.

Objectives: In this work, I tried to shed light on the possible role of CD73 in cancer metastasis, using the EMT model, as well as its possible implication in cancer metabolism, especially oxidative phosphorylation.

Methodology: In this study two cellular models were primarily used, the HMLE-Twist-ER model and the MDA-MB-231 cell line. We examined the expression of CD73 upon stimulation or inhibition of the EMT. To see if CD73 had an impact on EMT, it was removed from cells with CRISPR-Cas9. EMT cell marker were assessed on both cell expressing or not CD73. A MicroArray was done on the MDA-MB-231 cells deficient for CD73. The cellular metabolism was also measured on those cells with the Seahorse analyzer.

Results: Expression of CD73 seemed higher in cells with a mesenchymal phenotype, even though the absence of CD73 didn't seem to affect EMT marker in the cellular models used. On the other hand, CD73 deficient cells had a lower rate of oxygen consumption compared to their control.

Conclusion: Even with the lack of results to confirm a phenotype change, some interesting observation have been made, such as what seems like an higher expression of CD73 in mesenchymal cells and a lower oxygen consumption rate in cell lacking CD73 expression. If confirmed, these results could give us more insight into CD73's function and his impact on tumor microenvironment.

**Keywords :** CD73, adenosine, EMT, metastasis, oxidative phosphorylation, breast cancer

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures .....	vii
Liste des abréviations.....	viii
Remerciements.....	x
Chapitre 1 - Introduction.....	11
1.1    Le cancer du sein .....	11
1.1.1 Classement des cancers du sein .....	11
1.1.2 Traitement par immunothérapie.....	12
1.2    CD73 et l'adénosine extracellulaire.....	14
1.2.1 Le rôle et la signalisation de l'adénosine et CD73 .....	14
1.2.2 CD73 et l'hypoxie.....	16
1.2.3 CD73 dans le cancer .....	16
1.3 « Epithelial-Mesenchymal Transition ».....	17
1.3.1 La formation de métastases et le modèle de l'EMT .....	17
1.3.2 Un changement dans le programme cellulaire.....	18
1.4 Métabolisme cellulaire.....	21
1.4.1 Le métabolisme cellulaire dans le cancer .....	21
Chapitre 2 - Hypothèses et objectifs .....	23
2.1 Hypothèse .....	23
2.2 Objectif .....	23
Chapitre 3 – Matériel et méthodes .....	25
3.1 Modèles cellulaires .....	25
3.1.1 CRISPR-Cas9 ciblant CD73, modifications cellulaires et traitements .....	25
3.2 Cytométrie en flux .....	26

3.3 PCR quantitative et transcriptase inverse .....	27
3.4 Mesure de la respiration cellulaire .....	27
3.4 MicroArray .....	28
Chapitre 4 – Résultats .....	29
4.1 L’expression de CD73 dans les cellules mésenchymateuses.....	29
4.1.1 Le modèle des HMLE-Twist-ER.....	29
4.1.2 CD73 dans les HMLE-Twist-ER.....	30
4.1.3 CD73 dans les MDA-MB-231 .....	31
4.2 CD73 et l’EMT .....	33
4.2.1 L’EMT des HMLE-Twist-ER est peu affecté par l’absence de CD73 .....	33
4.2.2 CD73 affecte peu l’expression des principaux marqueurs de l’EMT.....	36
4.3 MicroArray des MDA-MB-231 .....	38
4.3.1 Changement dans les gènes liés à l’EMT .....	40
4.3.2 Changement des gènes lié à la phosphorylation oxydative .....	40
4.4 Altération de la phosphorylation oxydative en absence de CD73 .....	41
Chapitre 5 – Discussion .....	43
5.1 CD73 et les cellules mésenchymateuses.....	43
5.1.1 CD73 est exprimé dans les cellules mésenchymateuses.....	43
5.1.2 CD73 semble associé à une signature mésenchymateuse dans le cancer du sein....	44
5.1.3 La voie du TGF- $\beta$ .....	47
5.2 CD73 et la phosphorylation oxydative .....	48
5.3 Conclusion .....	50
Bibliographie.....	i
Annexe 1 - Tri des HMLE-Twist-ER .....	i
Annexe 2 - Traitement des SKOV3 au TGF- $\beta$ 1 .....	ii
Annexe 3 – CRISPR-Cas9 ciblant CD73, HMLE-Twist-ER et MDA-MB-231 .....	iii
Annexe 4 – Groupe de gènes associés à l’EMT .....	iv
Annexe 5 – Groupe de gènes associés à la phosphorylation oxydative.....	v
Annexe 6 – Consommation d’oxygène dans des modèle murins .....	vi





## Liste des tableaux

Tableau I. Proportion des cellules Mésenchymateuses lors du traitement des HMLE-Twist-ER au 4-OHT. ....	36
Tableau II. Gènes liés à l'EMT semblant être co-exprimé avec CD73 dans l'étude de Ciriello, G., et al.[170] suite à l'analyse effectuée sur le cBioPortal .....	44

## Liste des figures

Figure 1. Les cellules exprimant de haut niveau de CD44 ont un schéma d'expression plus près des cellules mésenchymateuses.....	30
Figure 2. L'expression de CD73 est augmentée dans les HMLE-Twist-ER considérées mésenchymateuses.....	31
Figure 3. L'expression de CD73 est diminuée dans les MDA-MB-231 suite à une diminution de l'expression de ZEB1.....	32
Figure 4. L'inhibition enzymatique de CD73 par l'APCP n'affecte pas le modèle des HMLE-Twist-ER.....	34
Figure 5. L'absence de CD73 dans les HMLE-Twist-ER n'affecte pas la vitesse de la transition et l'expression de CD44. ....	35
Figure 6. L'expression des principaux facteurs de transcription de l'EMT est peu affectée par la présence de CD73. ....	37
Figure 7. La présence de CD73 affecte peu l'expression des marqueurs de l'EMT.....	38
Figure 8. Analyse des résultats du MicroArray effectué sur l'ARN des MDA-MB-231. ...	39
Figure 9. CD73 influence l'utilisation d'oxygène destiné à la production d'ATP.....	42

## Liste des abréviations

4-OHT : 4-Hydroxy-Tamoxifen

AC : Adénylyl Cyclase

ADP : Adénosine diphosphate

AK : Adénosine kinase

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

APCP : Adenosine 5'-( $\alpha,\beta$ -methylene)diphosphate

ARN : Acide ribonucléique

ATCC : American Type Culture Collection

ATP : Adénosine triphosphate

CD : Cluster of Differentiation

cDNA : « copy DNA »

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

EMT : « Epithelial-Mesenchymal Transition » - Transition épithélio-mésenchymateuse

etOH : Éthanol

FCCP : Carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone

FBS : Fetal Bovine Serum

GFP : Green Fluorescent Protein

MEMG : Mammary Epithelial Cell Growth Medium

MMP : Métalloprotéinase Matricielle

PCR : « Polymerase Chain Reaction »

PKA : protéine kinase A

PLC : Phospholipase C

RT-qPCR : « Quantitative Reverse Transcriptase PCR »

shRNA : Small hairpin RNA

TNBC : « Triple Negative Breast Cancer » – Cancer du sein triple négatif

*À mes parents, qui m'ont toujours soutenu et qui m'ont encouragé à me dépasser*

## **Remerciements**

Je remercie sincèrement le Docteur John Stagg pour son accueil dans le laboratoire et son aide précieuse tout au long de mon cheminement.

De plus, je tiens remercier mon comité consultatif de maîtrise, composé de Dr Francis Rodier et Dre Josie Ursini-Siegel pour leur précieux conseils.

Je remercie également tous les membres du laboratoire qui ont grandement aidé à la réalisation de ce travail et ont permis l'établissement d'un milieu de travail menant à la réussite.

Finalement, un grand merci à toute ma famille et mes amis qui, de près ou de loin, m'ont encouragé dans la réalisation de ce travail.

# Chapitre 1 - Introduction

## 1.1 Le cancer du sein

Le cancer du sein est un type de cancer très répandu chez la femme au Canada. Selon les statistiques de la Société canadienne du cancer, il est estimé qu'environ 26% des nouveaux cas de cancer en 2016 sont des cancers du sein, et ceux-ci représentent environ 13% des décès par cancer dans la même année [1]. Ces décès sont ainsi le résultat de la difficulté de traiter certains de ces cancers. Afin d'assurer une meilleure estimation du pronostic et des traitements plus adaptés aux patientes, il a été proposé de diviser le cancer du sein en plusieurs sous-types moléculaires [2-5]. Une des méthodes qui a été utilisée en recherche pour déterminer ces sous-types et ainsi les caractériser est le « gene expression microarray », soit la mesure de l'expression relative d'un grand nombre de gènes, qui ont ensuite pu être comparés pour regrouper les nombreuses tumeurs étudiées. Par cette technique, il a été établi que cinq principaux groupes pouvaient être créés. Ceux-ci ont été nommés Luminal-A, Luminal-B, Basal-Like, HER2 positif et Normal Breast-like [2-5]. Chaque groupe possède des caractéristiques propres à chacun, permettant de mieux adapter le traitement, de donner un pronostic plus précis et d'estimer le risque de développer des métastases. En clinique, le récepteur à l'estrogène, à la progestérone et HER2 sont les principaux marqueurs utilisés pour estimer l'appartenance à certains de ces groupes et de mieux adapter le traitement. Dans un contexte de recherche, de nombreux critères moléculaires peuvent être évalués pour classifier ces cancers.

### 1.1.1 Classement des cancers du sein

Dans ces groupes, le Luminal-A est le sous-type présentant le meilleur pronostic [3]. Ces tumeurs sont caractérisées par la présence du récepteur à l'estrogène, l'absence de HER2 et une faible expression de Ki67 [6]. Le sous-type Luminal-B est donc caractérisé par l'expression du récepteur à l'estrogène, une expression élevée de Ki67 et la possible expression de HER2 [7]. Ce type de tumeur présente un risque plus élevé de rechutes et un pronostic inférieurs aux tumeurs de type luminal-A [8, 9]. Dans le cas des tumeurs HER2 positif, ils présentent une expression plus élevée de ce récepteur, l'amplification du gène ou une expression importante des gènes en aval de HER2 [4]. Cependant, la classification dans ce groupe peut être

complexe, ainsi la confirmation des cancers de types HER2 est faite par la vérification de l'expression génique par microarray [10, 11]. Le traitement favorisé est le ciblage de HER2 et une sensibilité accrue à certains agents cytotoxiques est connue [12-15]. Les deux sous-types qui suivront sont plus nébuleux dû à un manque de consensus scientifique et une grande hétérogénéité de ces cancers. Le sous-type « Normal Breast-Like » présente un réseau d'expression génique semblable aux tissus adipeux, ne présentant pas l'expression des récepteurs à l'estrogène, à la progestérone et HER2 [4]. Il est ainsi considéré par certains comme artéfact lors des expérimentations, dû à la contamination du tissu environnant [16]. Dans le cas des cancers « Basal-like », il s'agit d'un sous-type de cancer du sein très agressif et possédant un potentiel métastatique important [17]. Or, ces cancers ont un mauvais pronostic, dû à leur comportement très invasif et la difficulté à traiter ces tumeurs. Parmi ces cancers, certains sont dénommés triples négatifs dans un contexte clinique, puisqu'ils n'expriment généralement ni le récepteur à l'estrogène, ni à la progestérone, ni HER2 [18]. Il est connu que ce type de cancer est plus fréquent chez les femmes d'origine afro-américaine et hispanique et qu'il atteint habituellement des femmes plus jeunes [2, 19, 20]. Il n'y a actuellement aucun traitement ciblé pour ces cancers, ils sont généralement très agressifs et résistants à plusieurs traitements conventionnels, ce qui en fait des tumeurs difficiles à traiter [20-24] et crée, par ce fait, un besoin important de développer un traitement efficace afin d'améliorer la survie des patientes. Une des méthodes de traitement qui aurait un potentiel de réussir serait l'utilisation d'immunothérapies.

### **1.1.2 Traitement par immunothérapie**

Au courant des dernières années, plusieurs traitements ont été proposés, mais une des potentielles solutions qui a entraîné beaucoup d'engouement est le traitement par immunothérapie des cancers solides. Ceux-ci consistent à stimuler la réponse immunitaire contre les cellules cancéreuses par l'utilisation d'anticorps. Ces anticorps ayant des cibles précises, vise à activer le système immunitaire en désactivant la suppression par des cellules régulatrices ou en stimulant directement la réponse immunitaire contre les cellules cancéreuses. En d'autres mots, le but est d'utiliser la réponse immunitaire naturelle contre les tumeurs pour combattre la maladie. Au cours des dernières années, certaines cibles sont étudiées pour leur fort potentiel de réussite en clinique, c'est le cas de CTLA-4 et l'axe PD-1/PDL-1 [25, 26]. Ces deux récepteurs ont en commun leur expression qui tend à augmenter lors d'activation chronique

du système immunitaire [27-29]. CTLA-4 est un récepteur qui se lie à CD80 et CD86, faisant ainsi la compétition à CD28 lors de l'activation des lymphocytes T, limitant l'activation des lymphocyte T naif et causant l'anergie chez les lymphocytes T activés [27, 30]. Dans le cas du récepteur PD-1, il est exprimé à la surface des lymphocytes T et aura pour effet l'immunosuppression lors de la liaison avec ses ligands, notamment PD-L1 et PD-L2 [31]. L'utilisation d'anticorps monoclonaux ciblant PD-1 et PD-L1 ont eu des succès impressionnants en clinique [26]. Il en est aussi le cas pour le traitement à l'anti-CTLA-4 [32]. Les immunothérapies ont ainsi généré un intérêt considérable en recherche et de nombreuses cibles potentielles sont maintenant étudiées, particulièrement dans cette classe d'immunothérapie visant à bloquer des « points de contrôle » du système immunitaire. C'est par exemple le cas de BTLA, OX-40 et 4-1BB, qui en bloquant ou en activant ces protéines amplifieront potentiellement la réponse immunitaire antitumorale [27].

Les succès cliniques des immunothérapies dans certains types de cancers ont mené à se questionner sur leur potentiel intégration au traitement des TNBCs. En effet, plusieurs indices mènent à croire que ces immunothérapies pourraient s'intégrer aux traitements de certains d'entre eux [33]. Une des données encourageantes pour le traitement par immunothérapie des cancers de types TNBC est la présence importante de lymphocytes dans la tumeur [34], ainsi que l'expression plus élevée de PD-L1 [35-38] dans ce sous-type de cancer. Des associations ont donc été faites entre la présence de lymphocytes intratumorales et le résultat des traitements par chimiothérapies. Plusieurs études sont arrivées à la conclusion qu'une infiltration immunitaire importante était associée à des risques diminués de rechutes ou de décès dû à la maladie [34, 37, 39-48]. Or, il est important de noter que la présence du système immunitaire diverge entre les cas de ce sous-type, ce qui n'est pas surprenant, prenant en considération l'hétérogénéité de ce groupe de tumeur [33, 49]. Or, des résultats récents ont permis de mieux évaluer le potentiel du traitement anti-PD-1 dans les TNBCs. L'étude clinique de phase 2 KEYNOTE-086 a rassemblé des patientes affectées par un cancer de type TNBC et ayant déjà reçu au moins un traitement, afin de traiter les tumeurs avec le pembrolizumab, un anticorps monoclonal ciblant PD-1. L'étude a décrit un « overall response rate » de 5% lors du traitement avec le pembrolizumab, ne prenant pas en compte l'expression de PD-L1 [50].

Puisque les immunothérapies visent généralement à relancer la réponse immunitaire contre les cellules cancéreuses, l'inhibition d'un signal de suppression du système immunitaire



est une stratégie qui a fait ces preuves, c'est le cas de PD-1 et CTLA-4 discuté précédemment. Or, une voie immunosuppressive qui pourrait être ciblée dans le traitement du cancer est l'adénosine extracellulaire, et plus précisément CD73, qui joue un rôle important dans la formation de celle-ci.

## **1.2 CD73 et l'adénosine extracellulaire**

L'adénosine est un nucléoside qui est la base de molécules très importantes dans différentes voies cellulaires, entre autres, dans l'énergie cellulaire lorsqu'elle est retrouvée sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) et d'adénosine diphosphate (ADP), ou dans la signalisation cellulaire sous forme d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Or, l'adénosine seule peut aussi agir comme ligand à des récepteurs membranaires. En effet, dans un contexte extracellulaire, l'adénosine agit directement sur l'un de ses quatre récepteurs couplés aux protéines G et exerce plusieurs fonctions physiologiques [51, 52]. La présence d'adénosine dans le milieu extracellulaire est possible suite à la dégradation de l'ATP, l'ADP et l'adénosine monophosphate (AMP) en adénosine par CD39 et CD73 [53]. Ces deux protéines membranaires coopèrent afin de générer de l'adénosine. CD39, aussi connu sous le nom d'ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (ENTPD1), dégrade l'ATP en ADP et l'ADP en AMP. Pour ce qui est de CD73, aussi dénommé ecto-5'-nucleotidase (NT5E), elle permet de dégrader l'AMP en adénosine. Il est intéressant de noter que la transformation d'ATP et d'ADP en AMP est un procédé réversible [54], tandis que la conversion d'AMP en adénosine est irréversible dans le milieu extracellulaire, ce qui fait de CD73 une des protéines clés dans la production d'adénosine extracellulaire [55]. La concentration d'adénosine peut cependant être contrôlée par l'internalisation de celle-ci, qui peut ensuite être phosphorylé en AMP par l'adénosine kinase (AK) [55].

### **1.2.1 Le rôle et la signalisation de l'adénosine et CD73**

Tout d'abord, l'activité de l'adénosine extracellulaire exerce ses principaux effets sur les cellules par la liaison à un de ses récepteurs. Les principaux rôles connus de l'adénosine et ces récepteurs interviennent dans la suppression de l'immunité, la protection des tissus exposés à

l'ischémie, son action protectrice sur le système cardio-vasculaire et quelques autres fonctions physiologiques, généralement liés à l'immunité et la protection des tissus [52, 56-58].

À ce jour, quatre récepteurs de l'adénosine sont connus. Malgré leur point commun à lier l'adénosine, chacun présente une affinité de liaison différente, des fonctions divergentes et une expression distincte selon le type cellulaire [52, 59]. Trois des quatre récepteurs à l'adénosine ont une affinité similaire pour l'adénosine, soit les récepteurs A1, A2A et A3, contrairement au récepteur A2B qui possède une affinité plus basse et n'est donc activé que lorsque la concentration d'adénosine dans le milieu extracellulaire sera augmentée [59, 60]. Les fonctions précédemment mentionnées seront donc le résultat de la signalisation de ces différents récepteurs. Ceux-ci sont membranaires et appartiennent au grand groupe des récepteurs couplés aux protéines G [59]. Bien que leur signalisation soit principalement par les protéines G, d'autres fonctions indépendantes à celles-ci ont été observées [61, 62]. Tout d'abord, le récepteur à l'adénosine A1 est couplé aux protéines Gi/Go, inhibant l'adénylyl cyclase (AC) [63], mais également lié à l'activation de la protéine kinase C, la phosphoinositide-3 kinase et les « mitogen-activated protein » kinases, et peut agir directement sur l'activation ou l'inhibition de certain canaux ioniques [61]. Le récepteur de l'adénosine A2A serait le principal responsable de l'effet anti-inflammatoire de l'adénosine [64]. Il est couplé à la protéine Gs qui active l'adénylyl cyclase, formant l'AMP cyclique, qui à son tour activera la protéine kinase A (PKA) [62]. Dans certains contextes, la PKA activera CREB, un facteur de transcription qui compétitionne avec NF- $\kappa$ B, un facteur de transcription ayant un large spectre d'activité, intervenant notamment dans la signalisation de l'immunité [65, 66]. Le récepteur A2B de son côté, activera l'AC et la phospholipase C (PLC) par l'entremise des protéines Gs et Gq respectivement [67]. Finalement, le récepteur A3 inhibe l'AC par l'activation de la protéine Gi, mais activera la PLC dû à la stimulation de Gq [68].

Des études ont également démontré de potentiels rôles de CD73 qui ne sont pas liés à son rôle dans la génération d'adénosine extracellulaire. Celles-ci font le lien entre CD73 et l'adhésion à des composantes de la matrice extracellulaire, l'adhésion des lymphocytes à l'endothélium vasculaire et l'adhésion aux cellules dendritiques folliculaires [69-75].

## 1.2.2 CD73 et l'hypoxie

Dans certaines conditions telles que l'hypoxie, il est possible d'observer une augmentation de la concentration d'adénosine extracellulaire et cette modulation est généralement locale [59]. En effet, il a été observé par Eltzschig, et al. [76], que l'expression de CD39, A2A et A2B était augmentée en situation d'hypoxie. De plus, lorsque des cellules sont exposées à un environnement hypoxique, il y a stabilisation du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$ , qui pourra agir sur les promoteurs associés à ce facteur de transcription [77, 78]. Or, la région promoteur de CD73 contient un de ces « HIF response element » ce qui entrainera une augmentation de la transcription de CD73 [79]. Finalement, l'activité d'HIF-1 $\alpha$  aura aussi pour effet d'inhiber l'AK, ralentissant la transformation de l'adénosine en AMP et augmentant, de ce fait, la quantité d'adénosine disponible [80, 81]. D'autres résultats ont également permis d'observer la diminution du transport de l'adénosine vers le compartiment intracellulaire [82]

## 1.2.3 CD73 dans le cancer

Dans le contexte du cancer, l'expression de CD73 s'avère être liée à un mauvais pronostic dans certains types de cancer [83-85]. Cela dit, CD73 a également été associé à la résistance à la chimiothérapie et à l'augmentation des risques de métastases [84, 86, 87]. Pour soutenir ces résultats, plusieurs études chez la souris ont été menées. Dans celle-ci, l'expression et la fonction de CD73 sont décrites comme un facteur ayant un impact sur la progression de cette pathologie [88-93]. Des résultats similaires ont pu être obtenus par l'étude de CD39 dans des modèles murins, confirmant les résultats concernant CD73 [94-97]. Il est spéculé que la principale raison permettant d'expliquer l'effet de CD73 sur la progression du cancer est son effet immunosuppresseur via la production d'adénosine [51, 55]. En addition, des résultats obtenus sur des lignées humaines de cancer du sein ont révélé une corrélation inverse entre l'expression de CD73 et du récepteur à l'estrogène [98]. Il a aussi été décrit que l'adénosine est impliquée dans l'angiogenèse du cancer, ajoutant à CD73 et l'adénosine une autre fonction associée à la progression tumorale [99].

En bref, considérant l'impact de CD73 et de l'adénosine sur le microenvironnement tumoral, principalement sur le système immunitaire [51, 52], cibler la formation ou la signalisation de l'adénosine pourrait avoir un potentiel pour le traitement de certains cancers,

notamment le cancer du sein triple négatif. En effet, une réponse positive a été observée lors du traitement chez la souris dans plusieurs modèles murins de cancer [84, 90, 91, 100]. Or, CD73 a été associé au procédé métastatique dans les TNBC [101, 102]. Le procédé métastatique est complexe et certains modèles tentent d'illustrer les étapes de celui-ci et cerner les mécanismes derrière ce complexe trait du cancer. C'est le cas du modèle « Epithelial-Mesenchymal Transition », ou EMT, décrite dans la récente littérature pour expliquer le gain de caractéristiques invasives des cellules cancéreuses.

## **1.3 « Epithelial-Mesenchymal Transition »**

### **1.3.1 La formation de métastases et le modèle de l'EMT**

Un aspect qui est important de prendre en compte dans le développement du cancer du sein est la formation de métastases. En effet, ce ne sont pas les tumeurs primaires, mais les métastases qui sont les principaux responsables de la mortalité des cancers [103-106]. Ainsi, limiter la formation de métastase est une autre approche afin d'augmenter le taux de succès des traitements. Suite aux efforts incessants de la recherche, la cascade métastatique et l'installation des métastases dans un tissu distant est de mieux en mieux compris. Or, la convergence de nombreuses découvertes a mené à l'émergence de plusieurs modèles tentant d'expliquer ce phénomène. Un des modèles, le plus courant dans la littérature scientifique pour expliquer la progression métastatique des carcinomes, est la transition des cellules cancéreuses d'un état épithélial vers un état mésenchymateux [107]. Ce modèle a été nommé « Epithelial-Mesenchymal Transition », ou EMT, et ces hypothèses sont employées pour mener de nombreuses recherches au sein de la communauté scientifique.

La formation de métastases est un processus complexe en plusieurs étapes, qui requiert, entre autres, l'acquisition de propriété invasive des cellules cancéreuses. Selon le modèle proposé, les cellules adoptent un comportement différent suite à une transition d'un phénotype épithéliale vers un phénotype mésenchymateux. Cette progression vers un nouveau phénotype est due à de complexes changements dans l'expression, ou l'activité de nombreuses protéines. Ces changements, qualifiés de transition, pourront être observés par la perte de certains traits,

telles que l'adhésion entre les cellules et la polarité baso-apicale [108, 109] et, d'un autre côté, ces cellules feront l'acquisition d'une plus grande motilité, d'une augmentation du potentiel invasif et le gain de certaines caractéristiques des cellules souches [110-112]. Pour obtenir ces caractéristiques, quatre principaux groupes de protéines seront influencés, soit des facteurs de transcription, des molécules d'adhésion cellulaire, des protéines du cytosquelette et des protéines de dégradation de la matrice extracellulaire [108].

Tout d'abord, les facteurs de transcription sont des plus importants dans cette transition, puisqu'ils seront les principaux acteurs dans l'altération d'expressions de la majorité des protéines impliquées dans l'EMT. Ces changements sont effectués de diverses façons, soit par interaction directe avec les gènes d'intérêts ou par interaction indirecte, principalement à l'aide de changements épigénétiques. Ces facteurs de transcription seront donc en mesure de pousser la cellule dans ce programme cellulaire qu'est l'EMT [113]. De ces facteurs de transcription, certains ressortent du lot, dû à leurs actions d'envergures lors de la transition et du maintien du phénotype mésenchymateux. Parmi ces facteurs de transcription, nous pourrions retrouver TWIST (TWIST1), SNAIL (SNAIL1), SLUG (SNAIL2), ZEB1 et ZEB2 [108]. En effet, ceux-ci ont des conséquences importantes sur le phénotype cellulaire lorsque leur expression est induite dans des modèles cellulaires de carcinomes [114]. Pour mieux comprendre l'action de ces derniers, il vaut mieux comprendre les changements que cause l'EMT.

### **1.3.2 Un changement dans le programme cellulaire**

Tout d'abord, cette transition vers un phénotype mésenchymateux causera un changement marqué dans les molécules d'adhésion et la polarité des cellules. Ainsi, les cellules perdront l'expression des protéines d'adhésion considérées comme épithéliales et distribuées selon une polarité baso-apical [115]. C'est le cas de la E-cadhérine, dont l'expression sera fortement réprimée lors de la transition vers un état mésenchymateux. Cette répression est importante dans l'EMT puisque la perte de la E-cadhérine causera la perte de la localisation membranaire de la  $\beta$ -Catenin et permettra à celle-ci, en condition favorable, d'être stabilisé et d'exercer des fonctions transcriptionnelles [116]. Lors de ce processus, il y aura déstabilisation de plusieurs autres molécules et complexes d'adhésion cellule-cellule, par exemple les jonctions serrées (zonula occludens), les desmosomes et les jonctions GAP [115, 117, 118]. Les jonctions

serrées seront effectivement déstabilisées par la diminution de l'expression de la claudine et l'occludine [115]. De façon générale, l'adhésion de type épithéliale est diminuée et les cellules feront l'acquisition de l'expression de la N-cadherine. Ce passage de l'expression de la E-cadhérine vers l'expression de la N-cadhérine est reconnue sous le nom de « Cadherin Switch » [117, 119].

Finalement, un des changements importants lors de l'EMT est le réarrangement du cytosquelette. En effet, il y aura adaptation du cytosquelette pour acquérir des caractéristiques plus appropriées à un phénotype mésenchymateux [117]. Pour ce faire, il y aura diminution ou augmentation de l'expression de certaines protéines constituant le cytosquelette, notamment certaines cytokératines et la vimentine, mais surtout des changements dans la dynamique de celui-ci [115, 117]. Par conséquent, ces changements en addition avec la déstabilisation des complexes d'adhésion cellules-cellules participeront au changement dans la polarité cellulaire, passant d'un état de polarité baso-apical, vers une polarité typique d'une cellule en migration [108, 117].

Il est également important de mentionner que l'expression de certaines protéinases est un autre facteur observé lors la transition. Ce changement dans les cellules permet à celles-ci de dégrader la matrice extracellulaire. Par exemple, les « Matrix metalloproteinases » (MMP) sont connues comme ayant une expression augmentée lors de l'EMT et sont associées à une augmentation de l'invasion des cellules cancéreuses [110, 120-122].

Le TGF- $\beta$ 1 joue un rôle majeur dans l'EMT. En effet, le TGF- $\beta$ 1 peut agir sur les cellules épithéliales et promouvoir l'EMT [108, 123, 124]. Malgré son rôle très important pour la transition, il n'est pas suffisant lorsque seule cette voie est active dans les cellules épithéliales. Plusieurs autres signaux peuvent donc coopérer pour assurer la promotion de l'EMT, par exemple la famille de protéines WNT, les divers facteurs de croissance et NOTCH [108]. Ainsi, la coopération de plusieurs voies de signalisation et leurs effecteurs pourront amorcer ce processus à l'aide des facteurs de transcription, certains précédemment mentionnés, qui exerceront leurs activités pour permettre les changements d'expression associée à l'EMT. Tout d'abord, la famille des facteurs de transcription SNAIL a deux membres impliqués dans l'EMT, soit SNAIL1, généralement appelé SNAIL, et SNAIL2, souvent appelé SLUG [125]. Ils agissent par la liaison, à l'aide de domaines « zinc-finger », à des séquences E-box et font la répression

de gènes épithéliaux [113, 123]. La diminution d'expression des gènes par SNAIL se fait par l'entremise de l'épigénétique, soit de l'acétylation et la méthylation des histones, principalement l'histone trois sur la lysine 4, la lysine 9 et la lysine 27. Ce facteur de transcription accomplit son rôle par le recrutement de protéines capables d'effectuer ces modifications, par exemple ils recrutent le « Polycomb repressive complex 2 » pour médier la répression de l'E-cadhérine [126-131]. Dans le cas de SNAIL1, il active l'expression de la MMP-9 en coopération avec ETS1 [132].

TWIST va également diminuer l'expression de gènes épithéliaux, et stimuler l'expression de gènes mésenchymateux [123]. Il recrute entre autres la protéine SETD8 qui effectuera la méthylation de la lysine 20 de l'histone 4 [133]. Telle que décrit dans la littérature, l'action de TWIST sur l'expression de l'E-cadhérine et la N-cadhérine est indépendante de l'activité de SNAIL [123, 133-135]. Pour ce qui est des deux facteurs de transcriptions ZEB1 et ZEB2, ils vont, eux, aussi se lier à l'ADN à l'aide de structures E-box et effectuer l'activation et la répression des gènes par le recrutement de coactivateurs et corépresseur [113, 123, 136, 137]. Il a également été décrit que ZEB1 pouvait recruter LSD1, une déméthylase, impliquant une fois de plus la modification épigénétique au tableau [138].

Tel que décrit rapidement pour chacun des facteurs de transcription, il est intéressant de relever qu'une grande proportion des changements d'expression se produisent grâce à des modifications au niveau de l'épigénétique des cellules cancéreuses [109]. Il est connu que ces modifications épigénétiques sont réversibles. Cette caractéristique de l'épigénétique est en accord avec ce modèle d'EMT qui est considéré comme un changement progressif et réversible du programme cellulaire. En effet, l'effet inverse a été déjà observé dans un contexte de métastase [139, 140], et celle-ci serait cruciale pour l'étape selon laquelle certaines cellules doivent reprendre un phénotype épithélial pour coloniser un tissu, c'est-à-dire former une tumeur dans un nouvel environnement.

## **1.4 Métabolisme cellulaire**

### **1.4.1 Le métabolisme cellulaire dans le cancer**

Au courant des dernières années, de nombreuses études se sont ajoutées à la littérature scientifique pour démontrer l'importance du métabolisme cellulaire dans le cancer. Tel que discuté dans un méta revue de la littérature, Cairns et Mak [141], exposent rapidement ce que nous connaissons maintenant sur le métabolisme du cancer, démontrant de ce fait les nombreuses avancées qui ont été faites depuis la découverte pionnière du Dr. Otto Warburg concernant le principe de glycolyse aérobie [142]. La glycolyse aérobie a été ainsi nommée dû à la caractéristique de certaines cellules cancéreuses à employer de façon aberrante la glycolyse, même en présence suffisante d'oxygène. Récemment, plusieurs découvertes concernant le métabolisme du cancer ont ravivé l'engouement de cibler certaines de ces voies pour le traitement du cancer et ont permis de mieux comprendre le rôle crucial que joue cet aspect du cancer sur la croissance tumorale. Par exemple, il est maintenant évident que, malgré l'augmentation de l'utilisation de la glycolyse, cette voie n'est pas la seule source d'énergie d'une cellule cancéreuse. En effet, la phosphorylation oxydative subsiste, malgré une activité généralement diminuée [143]. Plus encore, il est clair que de nombreux combustibles peuvent intervenir dans la production d'énergie telle que l'acétate et la glutamine, et que certaines de ces voies vont également fournir des métabolites nécessaires pour la survie et la croissance des cellules cancéreuses [144, 145]. Cette meilleure compréhension a permis de déterminer que le métabolisme cellulaire est un réseau complexe et capable de s'adapter selon la composition du microenvironnement [146]. En bref, le microenvironnement tumoral peut influencer le métabolisme des cellules cancéreuses, mais également celui des autres cellules présente dans la tumeur [147]. Or, ces deux types de cellules peuvent, à leur tour, influencer la composition du milieu tumoral, tel que la relâche de certains métabolites qui pourront à leur tour être utilisés par d'autres cellules. C'est par exemple le cas des fibroblastes présents dans le milieu tumoral qui sont en mesure de relâcher des métabolites pouvant être utilisés dans les cellules cancéreuses, dont le lactate, des corps cétoniques et le pyruvate [148, 149]. En bref, le milieu extracellulaire tumoral pourra influencer le métabolisme des cellules et ce milieu sera également modulé par



les cellules présentes. En effet, la composition en métabolites du milieu extracellulaire sera le résultat de la coopération entre les cellules tumorales et les cellules du stroma [146].

Plus précisément, en ce qui concerne la phosphorylation oxydative dans le cancer, elle continue à produire une fraction de l'ATP en coopération avec la glycolyse [143]. Par exemple, dans le modèle de cellules de carcinome mammaire MCF la phosphorylation oxydative produit 91% de l'ATP, qui est diminuée à 36% en condition d'hypoxie [150]. Sur une note intéressante, l'étude de LeBleu, et al. [151] a observé une augmentation importante de la phosphorylation oxydative dans les cellules cancéreuses circulantes dans un modèle de cancer du sein murin, soit des cellules 4T1 porteuses de GFP. Ainsi cette signature de l'augmentation de la phosphorylation oxydative proposerait que cette voie soit employée pour répondre à la haute demande énergétique que constitue la cascade métastatique [151]. Pour compléter, l'observation des cellules qui passeront l'EMT a permis de déterminer que, de façon générale, ces cellules présenteront un métabolisme dirigé vers le catabolisme avec une augmentation de la phosphorylation oxydative [151, 152]. Il est aussi intéressant de noter que certaines observations ont lié l'épigénétique au changement métabolique [153]. Or, connaissant l'implication des principaux facteurs de transcription de l'EMT dans la modification épigénétique [109], il n'est pas impossible de penser que ceux-ci pourraient jouer un rôle dans le contrôle du métabolisme lors de l'EMT.

Un autre facteur pouvant influencer le métabolisme cellulaire est l'hypoxie. Dans un milieu tumoral, l'hypoxie est une réalité à laquelle doivent faire face les cellules cancéreuses et les cellules du stroma [147]. Ainsi, des changements dans le métabolisme cellulaire seront visibles. Les cellules en milieu hypoxique privilégieront la glycolyse et la relâche du lactate dans le micro-environnement tumorale [154]. Ce lactate pourra ensuite être employé par les cellules ayant des quantités suffisantes d'oxygène pour la production d'ATP [155]. Il est à noter que le facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  sera activé en hypoxie et influencera l'expression de protéines telles que l'hexokinase 2 et la pyruvate déshydrogénase kinase 1 pour diriger le métabolisme des cellules vers la glycolyse [156-158].

## **Chapitre 2 - Hypothèses et objectifs**

### **2.1 Hypothèse**

Étant donné que CD73 démontre des propriétés pro-tumorigéniques et prométastatiques dans le cancer du sein de type triple négatif, et qu'elles ne semblent pas limitées à son action sur le système immunitaire, nous suggérons que cette protéine candidate puisse agir sur des événements biologiques clés nécessaires au processus de la progression du cancer du sein tel que le phénomène de la transition épithélio-mésenchymateuse et le métabolisme cellulaire.

### **2.2 Objectif**

Démontrer un potentiel rôle de CD73 et de la signalisation de l'adénosine dans le phénotype mésenchymateux et évaluer l'impact de CD73 sur le métabolisme des cellules cancéreuses, principalement en ce qui concerne la phosphorylation oxydative.

Pour mieux comprendre si l'activité de CD73 peut influencer l'EMT, un modèle cellulaire permettant d'observer la transition sera utilisé. Le modèle des HMLE-Twist-ER sera employé et rapidement caractérisé selon son expression de CD73 et différent marqueur de l'EMT. Ce modèle reproduit une EMT par l'expression induite de la protéine TWIST. Afin de déterminer l'influence de l'activité enzymatique de CD73 sur l'EMT, des essais seront effectués à l'aide de l'APCP inhibant la production d'adénosine par CD73. Par la suite, le retrait de CD73 par la technologie de CRISPR-Cas9 permettra de vérifier si CD73 pourrait affecter l'EMT par une activité non-enzymatique dans ce modèle.

Une seconde lignée cellulaire sera utilisée, soit les MDA-MB-231. Ces cellules provenant d'un adénocarcinome humain sont connues comme possédant un phénotype mésenchymateux. L'expression de CD73 sera également observée dans cette lignée et le retrait de CD73 sera effectué pour comparer l'expression des marqueurs de l'EMT par rapport au contrôle, afin d'évaluer l'impact de cette protéine dans une cellule mésenchymateuse. Un MicroArray sera ensuite effectué pour mieux caractériser les changements qu'entraîne l'absence de CD73 sur ces cellules. À l'aide de ce MicroArray, nous pourrons également observer l'expression des ARN messagers pouvant avoir une influence sur la phosphorylation oxydative.

Ensuite, des essais fonctionnelle pourront être effectués afin d'évaluer la consommation d'oxygène dans les MDA-MB-231 modifiées à l'aide de la technologie CRISPR-Cas9 pour déterminer s'il la présence de CD73 peut influencer dans la phosphorylation oxydative. Pour ce faire, un Seahorse XF24 Analyzer (Agilent) sera employé, un appareil permettant la mesure de concentration d'oxygène et de pH dans un milieu contrôlé.

## Chapitre 3 – Matériel et méthodes

### 3.1 Modèles cellulaires

Les modèles cellulaires principalement employés pour la génération de résultat sont les HMLE-Twist-ER et les MDA-MB-231. Pour débiter, les MDA-MB-231 sont des cellules humaines d'un adénocarcinome (ATCC). Ce modèle est largement employé dans l'étude du cancer du sein et présente les caractéristiques d'un cancer du sein triple négatif. Ces cellules ont été cultivées en milieu DMEM avec 5% de FBS. Les HMLE-Twist-ER nous ont été envoyées par le Dr Robert Weinberg [114]. Ce sont des cellules épithéliales de tissu mammaire immortalisés [159] et conservé dans du milieu MEGM (Lonza). Elles ont ensuite été modifiées pour exprimer la protéine de fusion Twist-ER, consistant du facteur de transcription Twist et un récepteur modifié de l'œstrogène[160]. Twist sera activé lors de la liaison du 4-hydroxy-tamoxifen au récepteur. Le traitement est effectué selon le protocole précédemment employé [114].

D'autres lignées cellulaires ont été employées, quoique moins présentes dans les résultats. C'est le cas des SKOV-3, lors d'un traitement au TGF- $\beta$ , ainsi que les 4T1 et les SM1LWT1, lors de la mesure de la phosphorylation oxydative. Les SKOV3 sont des cellules du cancer de l'ovaire humain, tandis que les cellules 4T1 servent de modèle murin de cancer du sein et les SM1LWT1 sont un dérivé métastatique des SM1, un modèle murin de mélanome.

#### 3.1.1 CRISPR-Cas9 ciblant CD73, modifications cellulaires et traitements

Les HMLE-Twist-ER, ainsi que les MDA-MB-231 et certaines des autres lignées mentionnées ont été modifiées à l'aide de plasmide pour retirer l'expression de CD73. Ces plasmides proviennent du laboratoire du Dr Micheal Hoelzel. Pour effectuer leur rôle, ces plasmides ont été créés à partir d'un vecteur incluant tous les acteurs pour effectuer une délétion par CRISPR-Cas9. Ce vecteur est le pX330, de son nom complet pX330-U6-Chimeric\_BB-CBh-hSpCas9 [161]. Les plasmides nous ayant été généreusement envoyés, par la Dr Micheal Hoelzel contenait déjà les guides nécessaires pour cibler CD73. Les quatre plasmides employés dans le présent projet sont constitués de quatre guides différents, deux ciblant le gène humain et

deux ciblant le gène murin. Ces guides ont été nommées R3 et L3 dans le cas du gène humain et 2.1 et 4.1 pour les gènes de souris. Les séquences guides employés sont :

R3: GACGCCGGCGACCAGTACCA

L3: GCAGCACGTTGGGTTCGGCG

2.1: GCAGGATCGTGAGCTCCC

4.1: GCGCAAACATTAAGGCAC

Afin d'assurer la modification des cellules, la transfection de ces plasmides a été effectué à l'aide du FuGENE HD (Promega), selon les protocoles recommandés. Les cellules sont ensuite cultivées 5 à 7 jours et l'expression de CD73 est vérifiée par cytométrie en flux. Si la transfection est un succès, des cellules négatives pour CD73 seront observées. Celles-ci sont triées en condition stérile par FACS suite au marquage de CD73 et remises en culture en présence d'antibiotiques. La fraction positive pour CD73 est aussi conservée pour être utilisée comme contrôle. Ces tris ont été effectués en coopération avec la plateforme de cytométrie du CRCHUM. Suite à leur remise en culture, nous confirmons la modification des cellules par cytométrie en flux, souvent suivi de différentes autres techniques pour confirmer l'absence de CD73 (Western Blot ou RT-qPCR) ou l'absence d'activité enzymatique.

Les MDA-MB-231 ont également été modifiés à l'aide d'un plasmide PLKO.1 contenant un shRNA ciblant ZEB1. Il s'agit d'un vecteur pour l'insertion d'un shRNA par infection au lentivirus et contenant une résistance à la puromycine [162].

Lors du traitement des HMLE-Twist-ER avec l'APCP, les cellules étaient mises en présence de 10uM d'APCP.

### **3.2 Cytométrie en flux**

Une des méthodes d'analyses employées fréquemment dans le laboratoire est la cytométrie en flux. Cette technique permet de recueillir beaucoup d'information sur un nombre important de cellules très rapidement. De façon générale, les cellules sont détachées et rincées puis marquer avec un ou plusieurs anticorps aux choix déjà couplés à un fluorochrome. Suivant une incubation d'environ 30 minutes, cette suspension était rincée et resuspendu pour être

analysée. Dans le cas des HMLE-Twist-ER, le marquage de CD73, CD44 et CD24 a été effectué. Les fluorochromes employés sont BV421 pour CD73, APC pour CD44 et FITC pour CD24. Pour les MDA-MB-231, le même anticorps est utilisé pour marquer CD73, c'est également le cas lors du tri des cellules humaines suite au CRISPR-Cas9 ciblant CD73. Dans le cas des lignées murines, un blocage des récepteurs Fc est effectué avant le marquage et CD73 est marqué à l'aide d'un anticorps couplé avec un fluorochrome PE-Cy7.

### **3.3 PCR quantitative et transcriptase inverse**

L'extraction d'ARN a été effectuée à l'aide du RNeasy kit acheté de Qiagen. Les extractions sont effectuées sur des culots cellulaires, frais ou préalablement congelés à -80°C, à l'aide de la solution tampon RLT (Qiagen) additionné de  $\beta$ -Mercaptoéthanol. Les conditions de lyse et les procédures suivant la lyse ont été effectuées selon les recommandations du manufacturier. La quantité d'ARN extraite a été mesurée à l'aide d'un instrument de mesure de type « NanoDrop », mesurant la concentration d'ARN à partir de petit volume de la solution. Ensuite, 1  $\mu$ g d'ARN est utilisé pour effectuer une transcriptase inverse afin d'obtenir les cDNA correspondant pour la PCR quantitative. La transcriptase inverse employée étant la SuperScript VILO (Thermo Fisher) et utilisée selon les directives du fabricant. Les cDNA sont ensuite analysés par PCR quantitative à l'aide de sonde de type « TaqMan » obtenue pour les gènes d'intérêts. La PCR quantitative a été effectuée sur quarante cycles alternants entre une seconde à 95°C et 20 secondes à 60°C, ainsi qu'une phase initiale de deux minutes à 50°C et 20 secondes à 95°C.

### **3.4 Mesure de la respiration cellulaire**

L'acquisition de la phosphorylation oxydative a été effectuée en collaboration avec la plateforme de spectrométrie de masse et résonance plasmonique de surface du CRCHUM lors de l'utilisation du Seahorse XF24 Analyzer (Agilent). L'utilisation de cet appareil permet de mesurer par intervalle programmé la saturation en oxygène et le pH du milieu de culture des puits contenant des cellules d'intérêts. De plus, il permet d'ajouter des solutions pendant la prise de données pour effectuer la mesure de différents paramètres. Par exemple, dans le cas présent,

l'ajout d'inhibiteurs agissant à différent point de la phosphorylation oxydative nous permettant d'observer des changements potentiels de cette voie.

Pour ce qui est de la procédure, les cellules sont mises en culture la veille dans la plaque à 24 puits spécifique à l'appareil et la plaque de lecture est mise dans l'appareil avec une solution, XF Calibrant (Agilent). Le lendemain, les cellules sont mises en DMEM sans FBS et sans tampon carbonate, à 5mM de glucose avec l'ajout de glutamate. Le milieu est ajusté à un pH de 7,4. Ensuite, les différentes solutions contenant les agents actifs ciblant la phosphorylation oxydative sont faites à concentration plus élevée pour obtenir une concentration optimale lorsqu'injectées dans les puits. Ces composés sont l'oligomycine, bloquant l'ATP synthase, le FCCP, un ionophore permettant la diffusion des protons, et le combo roténone et Antimycine A, bloquant la chaîne de transport des électrons plus précisément le complexe I et le complexe III. De plus, une solution de glucose est préparée pour augmenter la quantité de glucose dans le milieu à 25mM au début de l'expérience. Des mesures de saturation en oxygène et la mesure du pH sont présent entre l'ajout de chaque composé et permettent la mesure de certaines caractéristiques de la respiration cellulaire dans les échantillons.

### **3.4 MicroArray**

Suite à la modification des MDA-MB-231 à l'aide du CRISPR-Cas9, nous avons en notre possession des cellules stables n'exprimant plus CD73. Dans le but d'effectuer un MicroArray et ainsi avoir une image plus globale, nous avons procédé à l'extraction de l'ARN messager de ces cellules. Pour ce faire, nous avons utilisé trois pétries de MDA-MB-231 n'exprimant plus CD73 provenant d'un même protocole décrit dans la section 3.1.1 et de trois pétrie de MDA-MB-231 parentales, provenant d'une même congélation. Suivant la décongélation et un passage en culture, l'ARN a été extrait selon les méthodes employées lors des extractions pour la RT-qPCR (voir section 3.2). Dès l'extraction de l'ARN effectué, l'échantillon a été entreposé à -80°C. L'ARN a ensuite été envoyé au Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill pour être analysé sur une micropuce Affymetrix (GeneChip Human Gene 2.0 ST array). Une fois les données normalisées, elles sont analysées et comparées. Un « Fold change » est calculé pour chaque échantillon et peuvent ensuite être

réunie par schéma d'expression (Clustering). Afin de déterminer les gènes exprimés différemment, un test ANNOVA est employé.

## **Chapitre 4 – Résultats**

### **4.1 L'expression de CD73 dans les cellules mésenchymateuses**

#### **4.1.1 Le modèle des HMLE-Twist-ER**

Suite au traitement avec le 4-hydroxy-tamoxifen (4-OHT), les HMLE-Twist-ER expriment TWIST de façon à entrainer les cellules vers un phénotype mésenchymateux. L'expression forcée de TWIST dans ce modèle a pour effet de promouvoir l'entrer en EMT dans ces cellules. Par conséquent, il y aura un changement d'expression de plusieurs protéines reflétant un phénotype typique à l'EMT, soit une augmentation des marqueurs de cellules mésenchymateuses. De plus, tel que discuté dans l'introduction, les cellules mésenchymateuses acquièrent des traits semblables aux cellules souches. C'est le cas de l'expression de CD44 qui est augmentée dans les cellules exprimant TWIST. En effet, CD44 est une molécule d'adhésion, surtout connue pour sa fonction de récepteur de l'acide hyaluronique, et est employé comme marqueur de cellules souches cancéreuses dans le cancer du sein [163]. Nous considérons les cellules à haute expression de CD44 et l'expression diminuée de CD24 comme mésenchymateuses [114]. Nous avons tout de même tenu à confirmer l'état des cellules exprimant de haut taux de CD44, qui devrait se déplacer vers un phénotype mésenchymateux. Pour ce faire, nous avons fait l'analyse de l'ARN des HMLE-Twist-ER trié selon leur expression de CD44 (tri semblable illustré en annexe 1). En comparant les deux fractions cellulaires obtenues, Il est possible de confirmer l'état des cellules avec une plus haute expression de CD44 est plus près d'un état mésenchymateux que les cellules ayant de plus bas niveaux d'expression de CD44. Cette conclusion a été tirée par l'observation d'une nette diminution de la E-cadhérine, 25 fois plus basse dans les cellules exprimant de hauts niveaux de CD44, ainsi qu'une augmentation de la vimentine, prêt de 6 fois plus élevée, et une augmentation d'environ 12 et 26 fois plus élevé pour la N-cadhérine et ZEB1 respectivement (Figure 1).



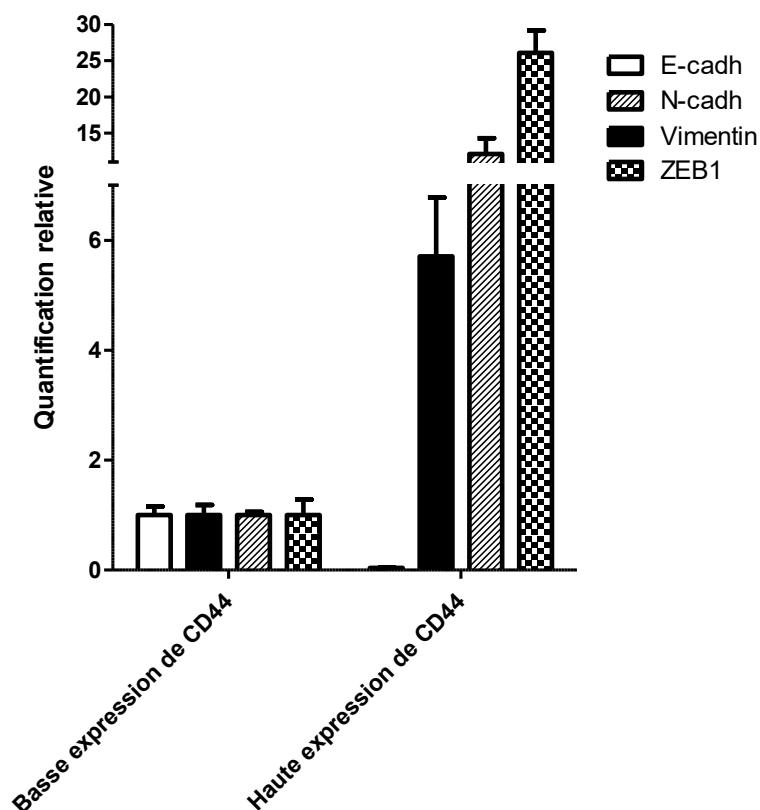


Figure 1. Les cellules exprimant de haut niveau de CD44 ont un schéma d'expression plus près des cellules mésenchymateuses. Les HMLE-Twist-ER ont été exposé à 20ng/ml de 4-OHT pendant 12 jours et ensuite triées selon leur expression de CD44 et CD24. Une extraction d'ARN a été effectuée sur les deux populations récupérées, suivi d'une PCR avec une rétro-transcriptase puis d'une analyse par qPCR. Les gènes observés sont l'E-cadhérine (E-cadh), la N-cadhérine (N-cadh), la Vimentine et ZEB2. La quantification est relative à la fraction cellulaire avec une basse expression de CD44. Les gènes contrôles employés sont la GAPDH et la  $\beta$ -actine.

#### 4.1.2 CD73 dans les HMLE-Twist-ER

Dans la grande majorité des expériences effectuées, l'expression de CD73 a été acquise par différentes méthodes d'analyse. Or, lors de ces nombreuses expériences, il a été possible de remarquer que l'expression de CD73 semble liée au phénotype des cellules. En effet, l'expression de CD73 dans les cellules épithéliales semble être plus basse que l'expression des cellules considérées comme mésenchymateuses. Ce phénomène a d'ailleurs été observé lors de l'utilisation des HMLE-Twist-ER et leur analyse de cytométrie en flux. Ainsi, lors de

l'acquisition des cellules par cytométrie en flux suite au traitement au 4-OHT, nous avons remarqué que l'expression de CD73 est plus élevée dans les cellules exprimant de hauts niveaux de CD44 (figure 2A). Cette observation, en plus d'être répétée par la même méthode de multiple fois, a également été observée par RT-qPCR, suivant le tri de ceux-ci selon leur expression de CD44 suite au traitement par le 4-OHT pendant 14 jours. L'extraction de l'ARN et l'analyse par RT-qPCR a révélé que l'expression de CD73 était également augmentée au niveau de l'ARN messenger dans les cellules exprimant de hauts niveaux de CD44 (Figure 2B), soit environ 2,15 fois plus élevée.

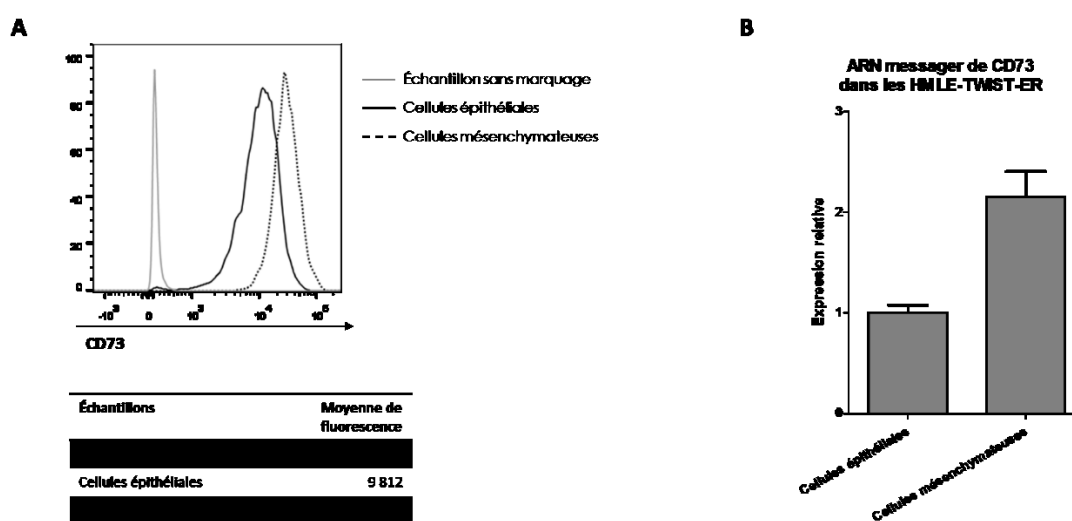


Figure 2. L'expression de CD73 est augmentée dans les HMLE-Twist-ER considérées mésenchymateuses. (A) Histogramme normalisé de l'expression de CD73 par cytométrie en flux comparant des cellules non marquées, la population mésenchymateuse et la population épithéliale d'un même échantillon (voir la figure 4 pour un exemple de la séparation des population). Cet échantillon est constitué de HMLE-Twist-ER traité au 4-OHT. Le fluorochrome employé est le BV421 directement conjugué à l'anticorps primaire. La moyenne géométrique de fluorescence des populations sont indiqués dans le tableau sous l'histogramme. (B) Expression de l'ARN messager de CD73 suite au traitement des HMLE-Twist-ER au 4-OHT et la séparation par tri des deux population.

### 4.1.3 CD73 dans les MDA-MB-231

Dans le modèle des HMLE-Twist-ER, l'entrée forcée en EMT par l'expression de TWIST augmentait ainsi l'expression de CD73. Or, pour déterminer si un effet similaire pouvait être observé dans MDA-MB-231, c'est cellules reconnues comme mésenchymateuses, ont été soumis au traitement inverse, c'est-à-dire, la diminution de l'expression d'un facteur de

transcription faisant la promotion de l'EMT. Lors de cette expérience, afin de reproduire des résultats similaires obtenus à l'ai d'un MicroArray par Mock, et al. [164], l'expression de ZEB1 a été réprimée dans les MDA-MB-231 à l'aide d'un small hairpin RNA (shRNA). Le résultat obtenu est des plus intéressant, puisqu'il montre effectivement le changement de l'expression de l'ARN messager de CD73. L'analyse par RT-qPCR révèle que l'expression de ce dernier est diminuée de plus de deux fois dans les cellules ayant une expression réduite de ZEB1 (Figure 3). Ainsi la combinaison des résultats obtenus à l'aide des HMLE-Twist-ER et la confirmation des résultats de Mock, Preca [164] dans les MDA-MB-231 semble indiquer qu'une relation existe entre les principaux facteurs de transcription de l'EMT et l'expression de CD73. D'autres résultats similaires ont été obtenus dans des lignées cellulaires appartenant à d'autres types de carcinomes. C'est par exemple le cas dans le modèle de cancer de l'ovaire humain SKOV3, lorsque ces dernières ont été traitées au TGF- $\beta$ 1. En effet, dans ce modèle cellulaire, en plus des changements attendus indiquant une transition vers un phénotype mésenchymateux, l'expression de CD73 est augmentée (voir annexe 2). Des résultats ont également été obtenus sur des lignées cellulaires de carcinomes murins, suite au traitement avec le TGF- $\beta$ 1 et la comparaison avec leur contrôle par cytométrie en flux (Résultats non illustrés). Il est donc intéressant de voir qu'un lien entre un état cellulaire mésenchymateux et CD73 ne serait peut-être pas restreint aux modèles de cancer du sein humain employés.

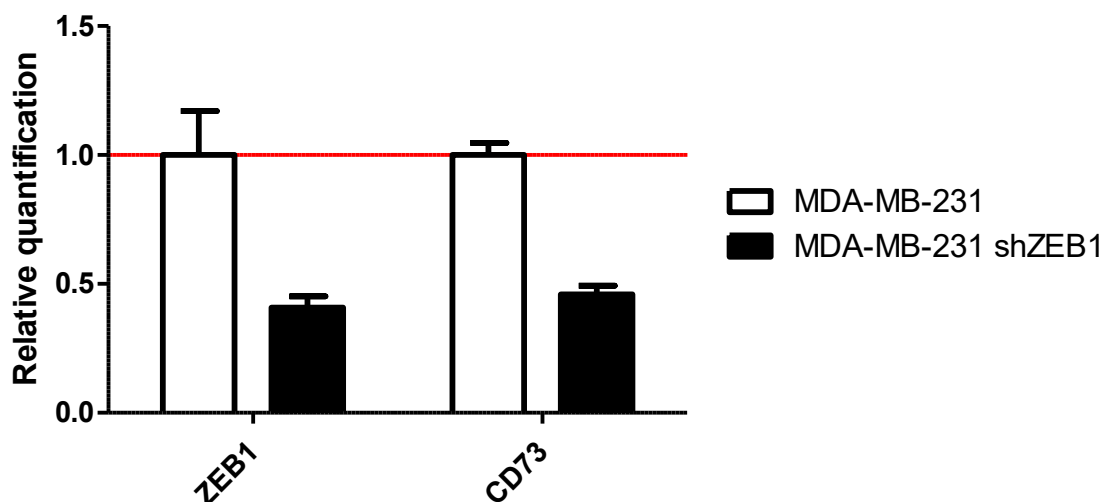


Figure 3. L'expression de CD73 est diminuée dans les MDA-MB-231 suite à une diminution de l'expression de ZEB1. Suivant l'introduction du shZEB1 et la sélection des

cellules, l'ARN a été extraite des cellules et analysé par RT-qPCR. Les gènes observés sont ZEB1 et CD73. Les gènes contrôles employés sont la  $\beta$ -actine et la GAPDH.

Il est donc intéressant d'observer cette première interaction entre l'état cellulaire et la variation d'expression de CD73. Malgré que les preuves soient insuffisantes pour affirmer définitivement qu'un lien concret existe entre ces phénomènes, il semble y avoir modulation de CD73 dans l'EMT. Or, pour répondre à l'hypothèse, il ne suffit pas d'observer l'effet que l'EMT aura sur l'expression de CD73, mais plutôt si CD73 a un effet sur le processus cellulaire qu'est l'EMT. Il est donc primordial de déterminer si CD73 a un rôle à jouer dans la régulation ou les fonctions de l'EMT.

## **4.2 CD73 et l'EMT**

### **4.2.1 L'EMT des HMLE-Twist-ER est peu affectée par l'absence de CD73**

Dans le cas où CD73 semble être régulé lors de l'EMT, il est plausible de penser que cette protéine pourra avoir un effet sur ce programme cellulaire. Pour répondre à cette hypothèse, nous avons tout d'abord étudié l'impact de l'inhibition enzymatique de CD73, à l'aide du modèle des HMLE-Twist-ER. L'inhibition de CD73 à l'aide de l'APCP lors du traitement au 4-OHT a ainsi été effectué en parallèle à un contrôle (Figure 4). L'APCP est un inhibiteur compétitif de l'AMP, empêchant la liaison de ce dernier à la région catalytique de CD73. Cette molécule permet ainsi de bloquer uniquement la fonction catalytique de CD73, et ce de façon efficace lorsqu'employer à concentration adéquate. Or, l'analyse des populations par cytométrie en flux n'a pas révélé de différence dans la proportion de cellules ayant de hauts niveaux de CD44 par rapport au contrôle. Ainsi, un nombre équivalent de cellules a atteint un état mésenchymateux avec ou sans l'activité de CD73 lors de l'expression forcée de TWIST dans les cellules. Par contre, dans la présente expérience, aucun contrôle sur l'action de l'APCP n'a été effectué. Il est donc impossible d'affirmer que, dans les cellules traitées avec l'APCP, CD73 était entièrement inhibé et que les cellules étaient en présence d'une plus petite concentration d'adénosine.

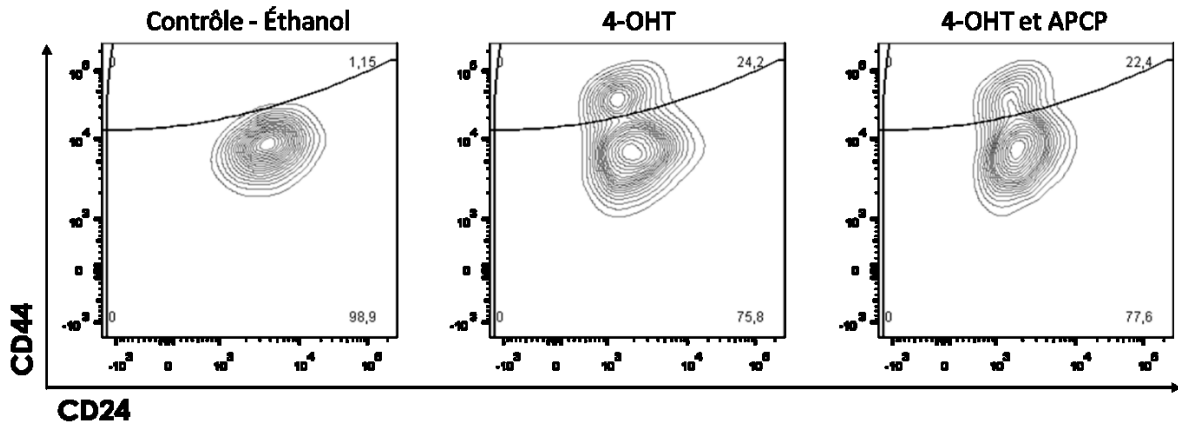
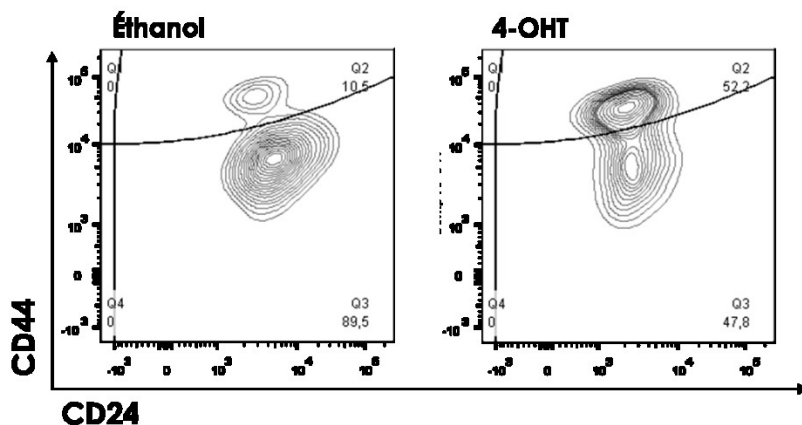


Figure 4. L'inhibition enzymatique de CD73 par l'APCP n'affecte pas le modèle des HMLE-Twist-ER. Les traitements des HMLE-Twist-ER au 4-OHT et son contrôle à l'éthanol ont été effectués selon les conditions préalablement mentionnées. Un échantillon a été induit en présence de 10  $\mu$ M d'APCP, depuis le début du traitement. Les populations ont été analysées par cytométrie en flux selon leur expression de CD44 et CD24.

Or, il est connu, que CD73 pourrait avoir, dans certaines circonstances des fonctions qui ne sont pas liées à la dégradation de l'AMP. Ainsi, bien que l'APCP soit un inhibiteur efficace de l'activité enzymatique, il n'affecterait pas les fonctions non-catalytiques. Dans le but de répéter cette expérience sans la présence de CD73, pour être certains de l'absence de toute fonction catalytique ou non-catalytique, nous avons généré des cellules n'exprimant plus CD73. Ces cellules ont été générées à l'aide de la technologie CRISPR-Cas9. Les plasmides envoyés par le Dr Michael Hoelzel ont été employés afin de retirer l'expression de CD73 des HMLE-Twist-ER. Ainsi, suite à la transfection du plasmide, les cellules ne possédant plus l'expression de CD73 ont été triées par FACS. La remise en culture de ces cellules a permis de générer des lignées stables n'exprimant plus la protéine en question. La population de cellules exprimant encore CD73 a été conservée pour agir comme contrôle. Suite à la modification des HMLE-Twist-ER et l'obtention d'une culture stable, les cellules ont été exposées au 4-OHT pour induire l'expression de TWIST. Dans ce cas, CD73 est complètement absent et ne devrait pas être en mesure d'exercer ces fonctions (voir annexe 3). Tel qu'attendu, le résultat est un résultat similaire à l'utilisation de l'APCP (Figure 5). Nous avons ainsi complété nos observations en faisant l'acquisition d'un échantillon de la culture par cytométrie en flux tous les deux à trois jours pendant 9 jours. Ces données ont permis de confirmer qu'il ne semble pas y avoir d'influence de CD73 sur la vitesse d'entrée en EMT lors de l'expression de TWIST dans ce

modèle (Tableau 1). Ce modèle n'exploitant que l'utilisation de TWIST pour initier la transition, il n'est pas possible d'affirmer complètement que CD73 n'affecte pas la transition vers un état mésenchymateux.

### A. HMLE-TWIST-ER CD73+



### B. HMLE-TWIST-ER CD73-

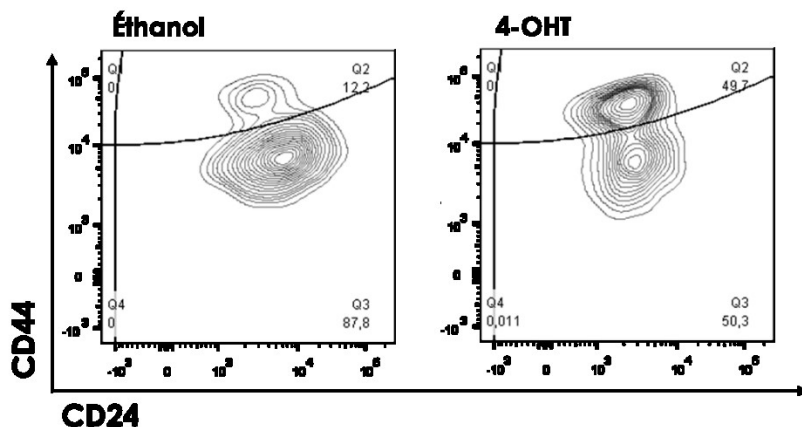


Figure 5. L'absence de CD73 dans les HMLE-Twist-ER n'affecte pas la vitesse de la transition et l'expression de CD44. Représentation de l'analyse des données obtenues par cytométrie en flux suite à 12 jours de traitement avec le de l'éthanol ou le 4-OHT. L'expérience a pour but de comparer la transition des cellules exprimant CD73 (A) ou n'exprimant plus CD73, suite à la modification à l'aide de la technologie du CRISPR-Cas9 (B). Cette figure consiste en un exemple typique de la technique employé pour la discrimination de la population mésenchymateuse (CD44<sup>hi</sup>) et la population épithéliale (CD44<sup>low</sup>).

Tableau I. Proportion des cellules Mésenchymateuses lors du traitement des HMLE-Twist-ER au 4-OHT. Les cellules employées sont ceux modifié par CRISPR-Cas9 exprimant ou non CD73. L'acquisition des populations est effectuer par FACS tel qu'illustré dans la figure 5.

Jours depuis le début du traitement	Cellules Mésenchymateuses CD73 positives	Cellules Mésenchymateuses CD73 négatives
2	5,9 %	7,2 %
5	27,3 %	22,6 %
7	49,0 %	43,9 %
9	45,2 %	54,8 %

#### 4.2.2 CD73 affecte peu l'expression des principaux marqueurs de l'EMT

Afin de déterminer si CD73 pouvait affecter le niveau d'expression des protéines lié au phénotype mésenchymateux ou épithélial, l'évaluation par PCR de l'expression de différents marqueurs de l'EMT a été effectué. La différence d'expression de ces protéines clefs pourrait indiquer un potentiel à modifier le comportement des cellules en question. Dans ce cas-ci, deux modèles ont été employés pour tenter de répondre à cette question. Premièrement, les HMLE-Twist-ER déficientes pour CD73 modifiées par CRISPR-Cas9 et leur contrôle ont été traitées avec le 4-OHT et triées selon leur expression de CD44 (voir annexe 1). L'ARN a été extrait des populations triées et analysé par RT-qPCR (Figure 6). L'expression de l'ARN messager de certains des principaux facteurs de transcription de l'EMT a été acquise. Nous avons donc comparé cette expression dans les cellules considérées mésenchymateuses exprimant CD73 à ceux n'expriment pas CD73, ayant comme contrôle les cellules épithéliales pour la quantification. De ces résultats, il est possible de remarquer que SNAIL n'est pas changé dans les deux lignées. Dans le cas de TWIST, l'expression de l'ARN messager est semblable, soit une augmentation d'environ 2,8 et 3,8 fois par rapport au contrôle dans les cellules exprimant CD73 ou ne l'exprimant plus, respectivement. Or, le changement d'expression de ZEB1 semble légèrement plus élevé dans les cellules n'exprimant plus CD73, soit une augmentation de 36,1 fois l'expression, par rapport à 17.8 fois pour les cellules exprimant CD73. Malheureusement, la plupart des PCR quantitatives affichées dans ce mémoire n'ont été effectuées qu'une seule fois. Ainsi, malgré une confiance dans les méthodes utilisées, il est difficile d'affirmer que les résultats sont reproductibles et des tests statistiques fiables n'ont pas pu être appliqués.

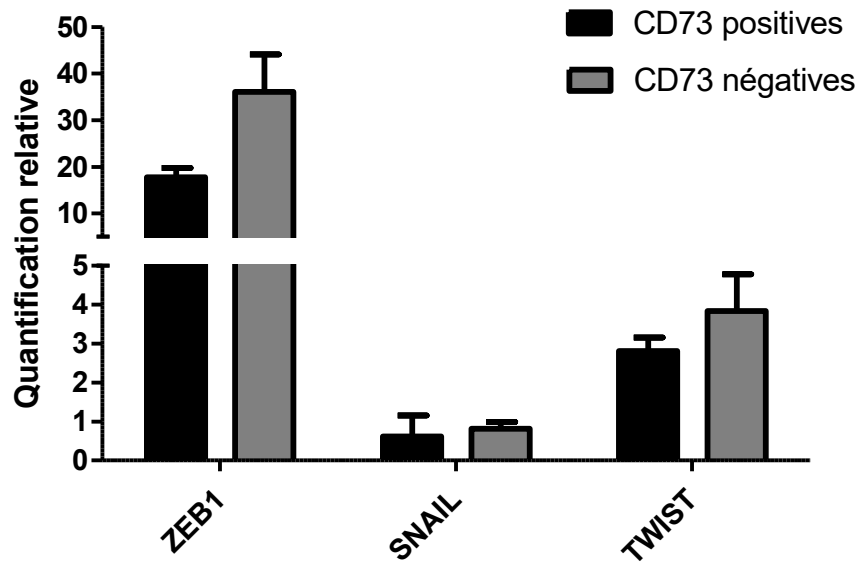


Figure 6. L'expression des principaux facteurs de transcription de l'EMT est peu affectée par la présence de CD73. La PCR quantitative compare l'expression de trois facteurs de transcription liés à l'EMT dans la population mésenchymateuses, suite au traitement avec le 4-OHT, des HMLE-Twist-ER exprimant ou non CD73. La quantification relative est basée sur l'expression de la fraction épithéliale des HMLE-Twist-ER triées. Les gènes contrôles employés sont GAPDH et la  $\beta$ -actin

Les MDA-MB-231 ont également été utilisées pour une expérience semblable. L'expression de CD73 a été altérée par la même technique que celle employée avec les HMLE-Twist-ER. Ensuite, les cellules, dont l'expression ou l'absence de CD73 a été confirmée (voir annexe 3), ont été lysé et l'ARN extrait. Les échantillons ont ensuite été analysé par RT-qPCR (Figure 7).



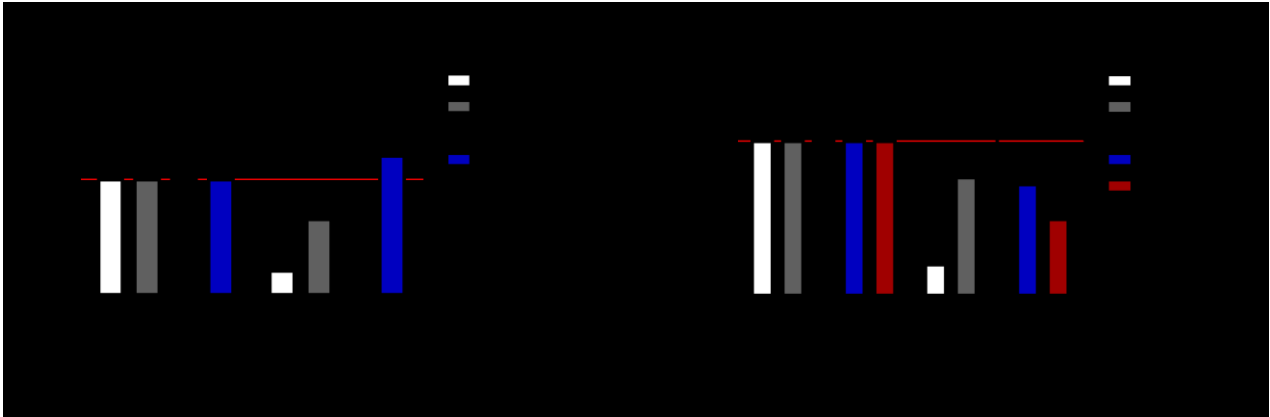


Figure 7. La présence de CD73 affecte peu l'expression des marqueurs de l'EMT. Résultat de deux PCR quantitative de l'ARN des MDA-MB-231 comparant les cellules exprimant ou non CD73 à la suite du CRISPR-Cas9 pour les deux guides employés. Le gène contrôle employé est le GAPDH.

En bref, dans ce modèle de cancer métastatique, CD73 ne modifie pas de façon importante la plupart des marqueurs de l'EMT observé. Malgré tout, il semble y avoir une légère tendance à la diminution des marqueurs de cellules mésenchymateuses dans les MDA-MB-231 n'exprimant pas CD73 (Figure 7). Or, la seule différence importante entre les cellules exprimant CD73 ou les cellules déficientes pour CD73 est l'expression de TWIST, qui est diminué dans les cellules déficientes.

### 4.3 MicroArray des MDA-MB-231

Pour poursuivre les recherches concernant CD73 nous avons opté pour un MicroArray sur puce Affymetrix. Ces résultats très riches en données permettent d'évaluer le niveau d'expression de plusieurs voies cellulaire rapidement. Six échantillons d'ARN des MDA-MB-231 ont donc été envoyées au Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill pour être mesuré par MicroArray. De ces six échantillons, trois des extraits d'ARN proviennent de cellules parentales et trois autres des cellules n'exprimant plus CD73 suite à la modification par CRISPR-Cas9. L'analyse de ces résultats a permis de discerner des différences dans l'expression des deux types d'échantillons. Nous avons ainsi concentré l'analyse sur certaines voies d'intérêt, soit l'EMT et la phosphorylation oxydative.

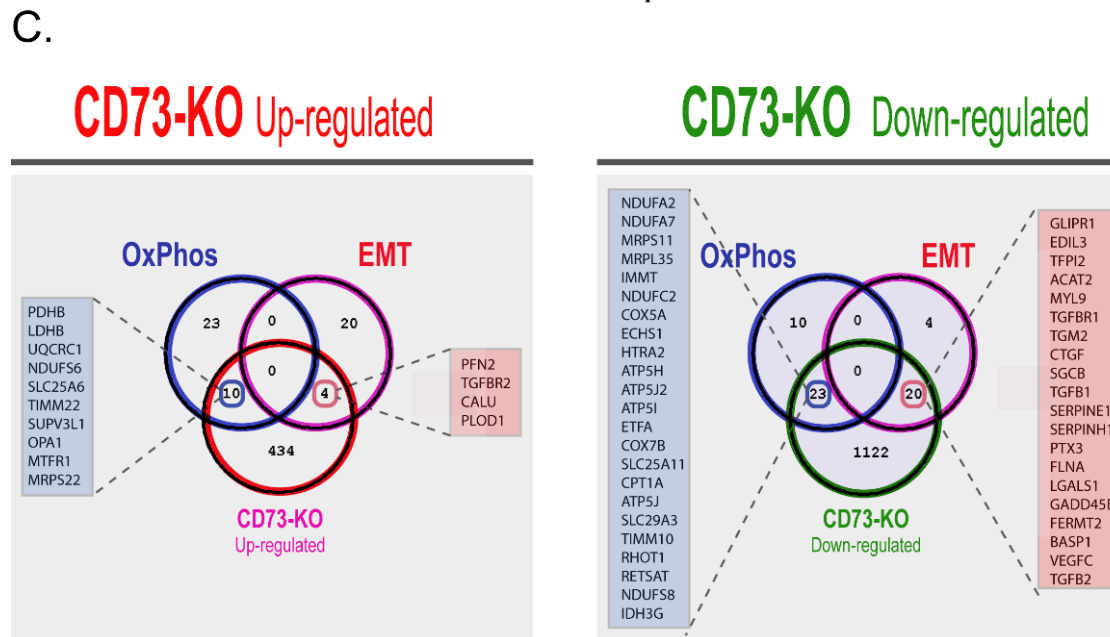
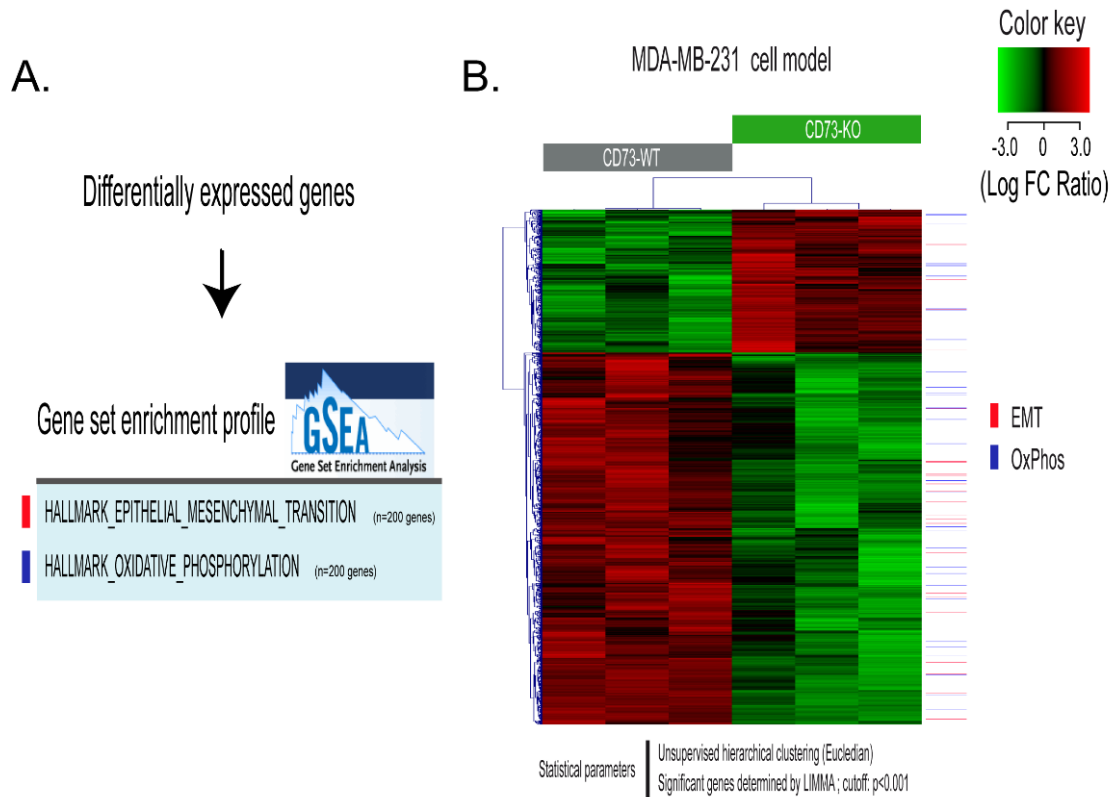


Figure 8. Analyse des résultats du MicroArray effectué sur l'ARN des MDA-MB-231. (A-B) L'EMT et la phosphorylation oxydative ont été sélectionnés lors de l'utilisation de l'outil GSEA, nous permettant de rapidement identifier les gènes d'intérêt parmi les multiples gènes différemment exprimés. (C) De ces gènes, il est possible d'approfondir l'analyse en déterminant quelle sont les ARN dont l'expression est augmentée, et ceux dont l'expression est diminuée de façon significative dans les cellules déficientes pour

CD73. Les résultats affichés sont ceux spécifiques aux voies observées, soit l'EMT et la phosphorylation oxydative.

### **4.3.1 Changement dans les gènes liés à l'EMT**

Pour déterminer les gènes à comparer, des listes de gènes d'intérêt ont été utilisées. Ces listes proviennent de l'outil en ligne Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) (Figure 8A). Dans le cas de l'EMT, la liste utilisée contient 200 gènes liés à l'EMT (voir annexe 4). Ainsi, certains gènes de cette liste sont exprimés différemment de façon significative au niveau de l'ARN (Figure 8B). En bref, quatre gènes ont une expression augmentée et 20 autres ont une expression diminuée dans les MDA-MB-231 n'exprimant plus CD73 (Figure 8C). Dans ceux-ci, certains ont particulièrement retenu notre attention. C'est le cas du récepteur TGF $\beta$ R2 dont l'expression est augmentée, contrairement au TGF- $\beta$ 1, le TGF- $\beta$ 2 et le TGF $\beta$ R1 qui sont diminués dans les cellules déficientes pour CD73. Telle que mentionné plus tôt, la signalisation du TGF- $\beta$  est importante dans le processus d'EMT. Une dérégulation de cet axe dans les cellules déficientes pour CD73 pourrait indiquer des interactions entre ces deux voies. Une autre voie intéressante qui est diminuée chez les cellules déficientes pour CD73, est le VEGFC. En effet, en plus de son action dans la formation de vaisseaux lymphatiques, la signalisation du VEGFC pourrait jouer un rôle dans le potentiel métastatique des cellules cancéreuses exprimant son récepteur, le VEGFR-3 [165, 166].

### **4.3.2 Changement des gènes lié à la phosphorylation oxydative**

Dans le cas de la phosphorylation oxydative, la liste de gènes employés provient également de GSEA et est également constituée de 200 gènes impliqués dans ce procédé (voir annexe 5). Dans cette facette du métabolisme cellulaire, 33 gènes sont exprimés différemment (Figure 8B). L'expression de l'ARN de 10 gènes est augmentée, tandis que l'expression de 23 gènes est diminuée dans les cellules n'exprimant plus CD73 comparé aux cellules parentales (Figure 8C). De ces nombreuses protéines, plusieurs pourraient avoir des impacts majeurs sur la respiration mitochondriale, notamment au niveau de la chaîne de transport des électrons. Par exemple, dans les gènes ayant une expression diminuée, on y retrouve entre autres, des sous-unités de la NADH déshydrogénase, soit le NDUFS8, le NDUFA2, le NDUFA7 et le NDUFC2. La NADH déshydrogénase est aussi connue en tant que premier complexe de la chaîne de

transport des électrons, un acteur important de la phosphorylation oxydative. De plus, d'autres protéines impliquées dans la chaîne de transport des électrons sont altérées, tel que l'expression des sous-unités 5 et 7B du cytochrome c oxydase, le quatrième complexe de la chaîne de transport des électrons. Différentes fonctions pourraient également être affectées dû à des changements d'expression de sous-unités importantes dans le métabolisme cellulaire. C'est le cas de protéines impliquées dans le transport de la mitochondrie (RHOT1), la Beta-oxydation des lipides (ETFFA) et le cycle du citrate (IDH3). De plus, l'expression de plusieurs sous-unités de l'ATP synthase est diminuée (ATP5H, ATP5J2, ATP5I, ATP5J). En prenant en compte tous les changements d'expression, ici mentionnés, un fort changement dans la phosphorylation oxydative des cellules n'exprimant pas CD73 devrait être visible.

#### **4.4 Altération de la phosphorylation oxydative en absence de CD73**

Tel que mentionné, la comparaison de l'ARN extraite des cellules n'exprimant plus CD73 et leurs contrôles ont permis de déterminer une différence dans les gènes qui contrôlent l'utilisation de l'oxygène pour la production d'ATP des cellules en cultures. À l'aide des données obtenues par le SeaHorse analyzer (Figure 9A), il est possible de déduire la quantité d'oxygène utilisé pour la formation d'ATP. Pour ce faire, il faut retirer l'utilisation d'oxygène pour d'autres fonctions que la production d'ATP à la mesure de consommation d'oxygène des cellules à l'état de « repos ». Dans ce cas, l'oligomycine est utilisée pour inhiber l'ATP synthase et permettre de calculer l'utilisation d'oxygène qui n'est pas directement lié à la production d'ATP par la phosphorylation oxydative (Figure 9A). Ainsi, les cellules exprimant CD73 utilisent près de deux fois plus d'oxygène que les cellules déficientes à l'état de repos. Or, en comparant les données de consommation d'oxygène destiné à la production d'ATP, les cellules exprimant CD73 emploient plus de trois fois l'oxygène que leurs semblables ne possédant plus l'expression de CD73. Ces résultats ont également été reproduits dans des modèles de lignées cellulaires murines, où l'expression de CD73 a également été retirée par CRISPR-Cas9 (voir annexe 6). Pour conclure, les observations obtenues à l'aide du Seahorse analyzer concordent avec ceux du MicroArray selon lesquelles il y aurait diminution dans l'expression des protéines impliquées dans la chaîne de transport des électrons et l'ATP synthase. En effet, l'analyse les

résultats obtenus à l'aide du Seahorse analyzer suggère une différence dans la consommation d'oxygène pour la production d'ATP entre les cellules exprimant CD73 et les cellules déficientes (Figure 9 et annexe 6).

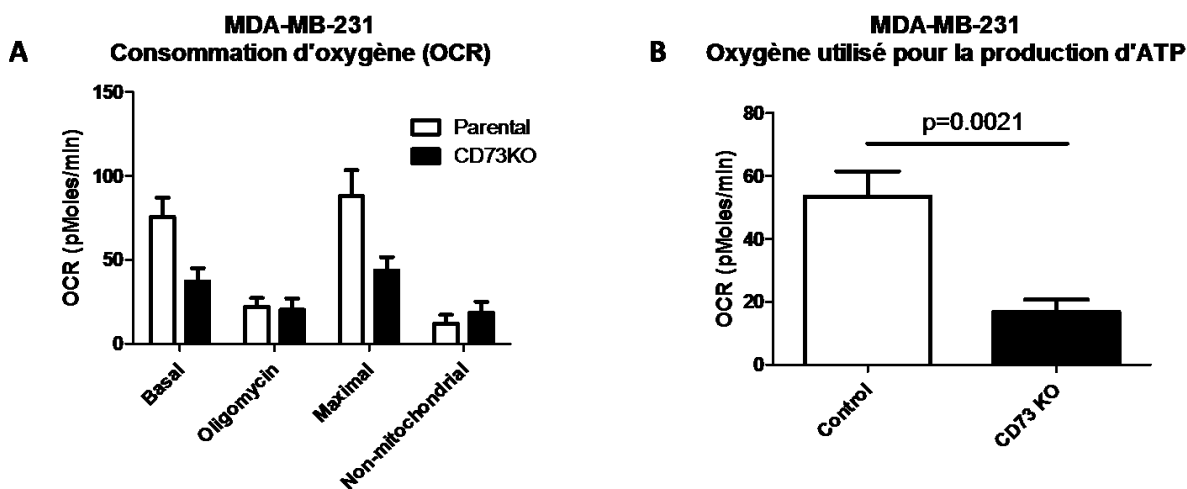


Figure 9. CD73 influence l'utilisation d'oxygène destiné à la production d'ATP. Données des taux de consommation d'oxygène des MDA-MB-231, telle que mesuré par le Seahorse Analyzer. (A) La consommation d'oxygène moyenne des MDA-MB-231 selon l'ajout des composés affectant la respiration cellulaire, comparant les cellules parentales aux cellules ayant reçu le CRISPR-Cas9 ciblant CD73. Le niveau basal est calculé lors de l'ajout de glucose à 25mM dans le milieu de culture. (B) La consommation d'oxygène employé pour la production d'ATP des deux lignées cellulaires a été calculé en retirant la consommation d'oxygène non lié à l'ATP synthase (lorsque les cellules sont exposé à l'olygomycine) au niveau de consommation d'oxygène basal.

## Chapitre 5 – Discussion

### 5.1 CD73 et les cellules mésenchymateuses

#### 5.1.1 CD73 est exprimé dans les cellules mésenchymateuses

Les résultats obtenus au courant des dernières années semblent indiquer que l'expression de CD73 est augmentée dans les cellules au phénotype mésenchymateux. Or, malgré que les résultats soient insuffisants pour conclure que cette augmentation d'expression est reproductible dans tous les cas où les cellules de carcinomes progressent vers un phénotype mésenchymateux, certaines évidences extérieures au présent travail nous laissent croire que l'expression de CD73 serait bel et bien associée à un phénotype mésenchymateux.

Prenons pour débiter l'exemple de l'étude de Mock, Preca [164] dont nous avons effectué une expérience similaire pour confirmer la diminution de l'ARN messager de CD73 dans les MDA-MB-231 suite à un « small hairpin RNA » ciblant ZEB1. Effectivement, CD73 se retrouve dans la liste des 350 gènes diminués dans les cellules ayant un shZEB1. Dans cette étude il regarde également le profil d'expression de ces gènes selon la situation des métastases. CD73 figure au 12e rang dans la liste des 110 gènes qui sont plus exprimés dans les métastases osseuses en comparaison aux métastases aux poumons et au cerveau [164]. Il semblerait donc que le milieu où s'installent les métastases puisse influencer l'expression de CD73, ou au contraire, que CD73 influence le lieu où pourront s'installer les cellules métastatiques. Ainsi, peut-être qu'un signal normalement présent dans ce milieu permet d'exprimer de façon plus importante CD73, ou celui-ci présente un avantage de sélection. D'autres indices nous permettant de penser que CD73 aurait un rôle à jouer dans l'EMT, est son ajout à la liste de gènes des « Hallmark epithelial mesenchymal transition » par le Dr Arthur Liberzon de Broad Institute disponible sur l'outil en ligne GSEA (Annexe 4). Cet ajout est sûrement en lien avec son implication connue dans la fibrose (voir section 5.1.2). De plus l'expression de CD73 est aussi employée pour identifier et isoler les cellules souches mésenchymateuses (mesenchymal stem cells – MSC) [167]. Cette caractéristique de CD73 pourrait indiquer que CD73 est effectivement plus exprimé sur des cellules au phénotype mésenchymateux ou aux cellules possédant des propriétés de cellules souches.

## 5.1.2 CD73 semble associé à une signature mésenchymateuse dans le cancer du sein

À l'aide de base de données provenant du cBioPortal, il est possible d'accéder avec cet outil à plusieurs études dont certaines ont effectué des analyses d'ARN messenger par MicroArray [168, 169]. Dans le cas présent, l'étude de Ciriello, et al. [170] a été employé. Tous les sous-types de cancer ont été inclus lors de l'analyse de ces données. Il a ensuite été possible de comparer l'expression de gènes d'intérêts avec l'expression de CD73. Pour ce faire, une liste provenant de l'outil GSEA a été utilisée. Cette liste comparant les gènes associés à l'EMT, soit la liste nommée Hallmark, également utilisée pour l'analyse du MicroArray des MDA-MB-231, et précédemment mentionnée, comme liste de gènes incluant CD73 dans le phénotype mésenchymateux (voir annexe 4). À partir de cette liste et l'application à ces données, il est possible de déterminer si CD73 tend à être co-exprimé avec certains de ces gènes, s'il n'y a aucune corrélation ou s'ils sont mutuellement exclusifs, c'est-à-dire exprimé lorsque l'expression d'un autre l'ARN messenger est diminué et vice-versa.

Tableau II. Gènes liés à l'EMT semblant être co-exprimé avec CD73 dans l'étude de Ciriello, G., et al.[170] suite à l'analyse effectuer sur le cBioPortal

Gène A	Gène B	p-Value	Log Odds Ratio	Association
CADM1	NT5E	0.00537981	1.964259288	Tendency towards co-occurrence(Significant)
CDH11	NT5E	0.00419289	2.043814364	Tendency towards co-occurrence(Significant)
COL11A1	NT5E	0.00010022	2.429196043	Tendency towards co-occurrence(Significant)
COL12A1	NT5E	0.0017489	2.012285218	Tendency towards co-occurrence(Significant)
COL1A1	NT5E	0.04977665	1.439538876	Tendency towards co-occurrence(Significant)
COL4A1	NT5E	1.60E-05	2.555100723	Tendency towards co-occurrence(Significant)
COL4A2	NT5E	0.00029107	2.203816559	Tendency towards co-occurrence(Significant)
COL5A1	NT5E	0.00276884	2.175526215	Tendency towards co-occurrence(Significant)
COL5A2	NT5E	0.00419289	2.043814364	Tendency towards co-occurrence(Significant)
COL5A3	NT5E	0.0054521	3.381246595	Tendency towards co-occurrence(Significant)
COL6A3	NT5E	0.00058557	2.290979547	Tendency towards co-occurrence(Significant)
COL8A2	NT5E	0.00677602	1.890199542	Tendency towards co-occurrence(Significant)
CXCL12	NT5E	0.00605076	1.926592098	Tendency towards co-occurrence(Significant)
CXCL8	NT5E	0.00042236	2.37361293	Tendency towards co-occurrence(Significant)
ECM2	NT5E	0.00677602	1.890199542	Tendency towards co-occurrence(Significant)
FOXC2	NT5E	0.01097599	2.09147952	Tendency towards co-occurrence(Significant)
MMP1	NT5E	0.02781037	1.69550767	Tendency towards co-occurrence(Significant)
MMP14	NT5E	0.00049891	2.331496436	Tendency towards co-occurrence(Significant)

MMP2	NT5E	0.00319885	2.129783297	Tendency towards co-occurrence(Significant)
PDGFRB	NT5E	0.00079256	2.214274171	Tendency towards co-occurrence(Significant)
SNAI2	NT5E	0.00058557	2.290979547	Tendency towards co-occurrence(Significant)
TGFBI	NT5E	0.01097599	2.09147952	Tendency towards co-occurrence(Significant)
VIM	NT5E	1.12E-08	3.271554523	Tendency towards co-occurrence(Significant)

Parmi les protéines qui sont exprimées en parallèle avec CD73 (Tableau II), on y retrouve plusieurs sous-unités de collagènes, soit les COL11A1, COL12A1, COL1A1, COL4A1, COL4A2, COL5A1, COL5A2, COL5A3, COL6A3 et COL8A2. Dans ces protéines de la matrice extracellulaire, nous retrouvons également l'ECM2. La composition de la matrice extracellulaire est une caractéristique connue comme pouvant influencer l'EMT [171]. Il y a, en outre, la présence de molécules d'adhésion, telle que CADM1 et CDH11, et de signaux chimiotactiques, par exemple CXCL8 et CXCL12, des facteurs importants lors du processus de migration. Ce qui est aussi très intéressant est la corrélation entre l'expression de CD73 et des métalloprotéinase MMP1, MMP2 et MMP14, qui dégrade la matrice extracellulaire pour permettre une migration efficace. L'expression de la Vimentine (VIM) suit cette corrélation, une protéine du cytosquelette surexprimée dans les cellules mésenchymateuses par rapport aux cellules épithéliales. De plus, il y a co-expression de CD73 avec des signaux pouvant pousser les cellules cancéreuses vers l'EMT, soit PDGFRB et TGF- $\beta$ 1. Finalement, des facteurs de transcription faisant la promotion de l'EMT ont également une expression associée à CD73, c'est le cas de SNAIL et de FOXC2.

Avec ces évidences, il semblerait que CD73 soit augmenté dans les cellules au phénotype mésenchymateux. Cependant, avec les résultats présents, il est impossible d'affirmer si CD73 est exprimé dû à la stimulation de son expression dans le phénomène de l'EMT, ou s'il joue un rôle dans l'activation ou la régulation de ce phénomène. Or, des études ont démontré que CD73 joue un rôle dans la fibrose tissulaire[172, 173]. Il est aussi déterminé que l'EMT est un acteur important dans la fibrose [174]. Cependant, il est important de noter que dans les études liant CD73 à la fibrose, les principaux acteurs qui semblent ciblés par l'action de l'adénosine sont les cellules immunitaires. Ce qui mène à réfléchir sur l'action de l'adénosine dans un contexte tumoral. En effet, les expériences ont été entièrement pratiquées *In vitro*. Ceci dit, la complexité du milieu physiologique et du micro-environnement ne peut être ignorée. Les conditions



d'expérimentation sont très différentes que ceux présents dans un milieu tumoral. Par exemple, il est connu que CD73 entretient un lien étroit avec l'expression de HIF-1 $\alpha$ . Or, les cellules en culture ne sont pas sous quantité d'oxygène contrôlé, et n'expérimente donc pas l'hypoxie à laquelle une cellule tumorale est souvent exposée. De plus, il n'y a que des cellules cancéreuses, impliquant qu'aucun échange avec d'autres types cellulaires sont effectués. Tel que déjà mentionné, les cellules sont en mesure de communiquer et de changer la constitution du milieu extracellulaire pour modifier le métabolisme cellulaire [147]. Un autre type d'interaction pourrait être la sécrétion de facteur de croissance, ou autres, influençant le phénotype des cellules environnantes. Finalement, cette voie pourrait être insuffisante pour influencer cette transformation vers un phénotype mésenchymateux, mais pourrait aider à le maintenir. Ainsi, pour tenter d'obtenir des résultats se rapprochant un peu plus d'un contexte pathologique, certaines expériences pourraient être effectuées. Par exemple, la co-culture des cellules observées avec des fibroblastes, ou l'utilisation de milieux conditionnés aurait permis d'exposer les cellules à un environnement extracellulaire plus près de la réalité. Ainsi, les différents facteurs présents dans le milieu auraient pu influencer de façon différentielle les cellules exprimant ou non CD73. Dans le même ordre de pensée, il aurait été possible d'effectuer des expériences *in vivo*. Certains modèles de cancers du sein murins auraient pu être employés suite au retrait de CD73. L'injection des cellules et la croissance des tumeurs *in vivo* serait effectué et les tumeurs analysées. Ces analyses permettraient de quantifier certains marqueurs de l'EMT ou de cellules souches dans les cellules ayant été exposé à un environnement plus près de l'environnement tumorale humaine. Ces expériences permettraient de voir si CD73 pourrait influencer l'EMT dans un environnement plus complexe, qui n'est pas basé sur la signalisation d'une seule voie.

Un autre élément qui aurait été pertinent d'approfondir est le potentiel biais provenant de la concentration d'oxygène lors de la génération des résultats. Tel que mentionné. L'expression de CD73 est souvent associée avec l'hypoxie. Ainsi, le contrôle de la concentration d'oxygène pendant la culture des cellules aurait pu influencer les résultats lors de l'acquisition de l'expression de CD73. De plus, il aurait pu être intéressant d'exposer les cellules épithéliales et mésenchymateuses à des périodes d'hypoxies et de comparer les changements en expression de différentes protéines, dont CD73 et CD39. À partir de ces résultats, il aurait été possible de

déterminer si la modulation de l'expression de ceux est plus sensible, ou l'inverse, dans les cellules possédant un phénotype mésenchymateux.

La majorité des résultats obtenus nous portent à croire que CD73 n'a que très peu d'influence sur le procédé de l'EMT. Effectivement, la présence de CD73 ne semble pas affecter le modèle des HMLE-Twist-ER et très peu les MDA-MB-231. Or, il serait possible que la signalisation de l'adénosine et la présence de CD73 affectent d'autres fonctions cellulaires lors de l'EMT que ceux observés dans ces expériences. Ce pourrait être le cas d'expression de certains gènes qui n'ont pas été inclus lors des RT-qPCR. Par exemple, SLUG (SNAIL2) dont l'expression semble associé à CD73 dans l'analyse des données de l'étude de Ciriello, Gatz [170]. Dans le cas des HMLE-Twist-ER, il est possible de penser que l'induction forcée de TWIST pourrait camoufler le potentiel effet qu'aurait CD73 et l'adénosine sur ce dernier. Afin de vérifier si un lien existe entre CD73 et Twist, ou tout autre facteur de transcription de l'EMT, des essais semblables à ceux effectués dans le présent mémoire pourrait être répétés avec des HMLE exprimant d'autres facteurs de transcription tels que la famille SNAIL ou ZEB. Il est aussi probable que l'expression directe d'un des facteurs de transcription activant l'EMT est un signal trop fort pour permettre d'observer une régulation plus fine du phénomène.

La dégradation de la matrice extracellulaire est un autre aspect qui n'a pas été observé dans le présent projet, mais qui demeure un aspect important de l'EMT. En effet, celle-ci est un procédé primordial pour la migration cellulaire dans un contexte physiologique. L'utilisation de certains tests de dégradation protéique aurait permis de déterminer le niveau d'activité des métalloprotéases matricielles dans différentes conditions modulant l'activité de CD73 et les récepteurs à l'adénosine.

### **5.1.3 La voie du TGF- $\beta$**

Dans les résultats observés, la voie du TGF- $\beta$  semblait être affecté par la présence de CD73, mais modulait également l'expression de CD73 dans les modèles cellulaires employés. En effet, Il y a augmentation de l'expression de CD73 dans plusieurs lignées cellulaires lorsque nous traitons ceux-ci au TGF- $\beta$ 1 (Tel qu'illustré chez les SKOV3 en annexe 2). De plus, lors de l'analyse du MicroArray, et l'observation des données obtenues sur le cBioPortal, l'expression du TGF- $\beta$ 1 semble être exprimé en parallèle avec CD73. Dans le MicroArray, il y a diminution

de l'expression du TGF- $\beta$ 2 et du TGF $\beta$ R1 (Figure 8), malgré une augmentation du TGF $\beta$ R2 dans les cellules n'exprimant plus CD73. De plus, il a été proposé que la signalisation du TGF- $\beta$  est non seulement employé pour initier l'EMT, mais aussi la maintenir [114]. Prenant en compte l'augmentation de CD73 dans les cellules exprimant de hauts niveaux de CD44, il serait possible de penser que l'observation de l'expression de CD73 augmentée pourrait être due à la stimulation accrue de la voie du TGF- $\beta$ . L'expression de ces deux protéines pourrait donc être liée dans le contexte de l'EMT. De plus, l'augmentation de l'expression de CD73 dans les lymphocytes T CD8 suite à la stimulation au TGF- $\beta$ 1 et l'IL-2 a été confirmée [175]. Ces évidences portent à croire qu'un lien entre la voie TGF- $\beta$  et CD73 est plausible en contexte d'EMT. Cependant, les résultats restent insuffisants pour l'affirmer. Il pourrait s'agir d'une simple expression de CD73 lors de la stimulation de l'EMT et vice versa.

Dans l'espoir d'éclaircir ce phénomène, des expériences tentant de séparer les deux phénomènes pourraient être effectuées. Par exemple, l'EMT pourrait être forcé par la stimulation des facteurs de transcription pouvant entraîner la transition tout en inhibant la signalisation du TGF- $\beta$  et vérifier l'expression de CD73. Un exercice semblable pourrait être effectué en stimulant les récepteurs au TGF- $\beta$ , tout en bloquant d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase dans le but de ralentir le passage en EMT. Nous pourrions également inverser les conditions et vérifier si CD73 ou la signalisation de l'adénosine affecte directement la sécrétion de TGF- $\beta$ . Pour ce faire, un test ELISA serait effectué sur le milieu de culture de cellules exprimant ou non CD73, ou suite au traitement avec de l'AMP ou de l'adénosine.

Pour pousser plus loin dans les recherches, il serait possible d'effectuer un test de type ChIP-seq. Dans cette expérience, la co-immuno précipitation des effecteurs de la voie TGF- $\beta$ , capable de lier l'ADN, serait effectué. Ensuite, le séquençage des fragments d'ADN est effectué et il est alors possible de déterminer s'il y a liaison d'un effecteur direct de la voie TGF- $\beta$  sur le promoteur de CD73.

## **5.2 CD73 et la phosphorylation oxydative**

Selon les présentes expériences, il semble fort probable que le retrait de CD73 influence le métabolisme cellulaire. Effectivement, dans les résultats obtenus, les cellules n'exprimant plus CD73 présentaient une consommation d'oxygène réduite et, de ce fait, une consommation

d'oxygène lié à la production d'ATP plus faible que leurs contrôles (Figure 9 et annexe 6). Il est intéressant de noter que ces résultats sont en accord avec ceux obtenus lors du MicroArray des MDA-MB-231, selon lesquels plusieurs protéines impliquées dans la chaîne de transport des électrons, et la synthèse d'ATP ont une expression diminuée au niveau de l'ARN messenger.

Un des potentiels responsables de ces changements serait les « Hypoxia-inducible factors » ou HIF, mais principalement le HIF-1 $\alpha$ . Tel que mentionné précédemment, ce facteur de transcription est en mesure d'augmenter l'expression de différentes protéines liées à l'adénosine extracellulaire et sa régulation [76, 79-82]. Cependant, il a été décrit que l'activation des récepteurs à l'adénosine en condition hypoxique pouvait causer l'accumulation de HIF-1 $\alpha$  dans les cellules spumeuses [176]. Il est décrit que le HIF-1 $\alpha$  est en mesure de modifier le métabolisme cellulaire pour s'adapter à un environnement hypoxique, notamment en diminuant l'utilisation de la phosphorylation oxydative [158]. Il serait ainsi possible de penser que la présence de CD73 et la signalisation par l'adénosine pourraient augmenter la signalisation d'HIF-1 $\alpha$  dans nos cellules en culture et diminuer la contribution de la phosphorylation oxydative pour la production d'ATP. Or, le contraire est observé, peut-être dû au changement d'expression de certaines protéines, tel que vu dans le MicroArray. Une autre hypothèse est le possible rôle de CD73 dans la production de certains métabolites pouvant participer au métabolisme cellulaire. Une étude de Grozio, et al. [177] a découvert que CD73 était en mesure de dégrader la nicotinamide mononucléotide en nicotinamide riboside, un précurseur dans la synthèse de NAD<sup>+</sup>. Ainsi, CD73 a le pouvoir de moduler le contenu de certains métabolites dans l'environnement extracellulaire cellulaire. Finalement, il est connu que la présence de précurseur augmentera la biosynthèse de NAD<sup>+</sup>, qui pourrait ensuite influencer le métabolisme cellulaire [178-180].

Dans un contexte de métabolisme cellulaire, il est important de rappeler que ces expériences ont été effectuées en culture cellulaire, soit en présence abondante d'oxygène. De plus, les lectures de consommation d'oxygène ont été effectuées en milieu contrôlé et en présence d'une concentration suffisante de glucose. Ces conditions de culture ne reflètent pas nécessairement les conditions habituelles retrouvées dans une tumeur, où l'hypoxie et une basse concentration de glucose sont une réalité à laquelle les cellules cancéreuses font face.

Le métabolisme cellulaire est un réseau complexe pouvant employer plusieurs métabolites et possédant de nombreuses régulations. Ainsi, dans le but de mieux comprendre ces changements observés dans la consommation d'oxygène, il serait bon d'obtenir une vue d'ensemble sur les cellules d'intérêts. Un moyen efficace d'acquérir une large quantité d'informations permettant d'orienter les recherches serait d'utiliser la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse. Ces informations sur la quantité des différents métabolites pourront potentiellement donner des indices sur la source de ces changements. L'acquisition de plusieurs métabolites permettrait d'avoir une vue d'ensemble et de déterminer si d'autres voies sont affectées par CD73.

### **5.3 Conclusion**

Ainsi, dans le cadre de ces recherches il est impossible d'affirmer avec certitude un lien direct entre CD73 et l'EMT ou la phosphorylation oxydative. Cependant, certaines observations effectuées sont intéressantes et tenter de mieux comprendre le résultat obtenu pourrait apporter une nouvelle facette aux fonctions de CD73, dans le cas où les observations sont confirmées et le mécanisme derrière celles-ci démystifié. Effectivement, l'augmentation de l'expression de CD73 qui semble être liée au phénotype mésenchymateux, ainsi que la modulation de la consommation d'oxygène lors du retrait de CD73 pourrait s'avérer être une caractéristique ou fonction intéressante de CD73. Cependant, un point faible imminent de ces résultats est le manque de contrôle par rapport aux cellules modifiées par la technologie CRISPR-Cas9. Effectivement, il aurait été nécessaire d'effectuer une réexpression de CD73 dans les cellules modifiées. Pour ce faire, nous possédons des plasmides exprimant CD73 et des formes mutantes aux fonctions enzymatiques inactives (dégradation de l'AMP en adénosine). Ainsi, il aurait été possible de déterminer si le retrait CD73 était bien la cause de ces observations et, le cas échéant, si son activité enzymatique jouait un rôle important dans ce contexte. Il est aussi important de mentionner que seulement deux modèles cellulaires ont principalement été utilisés. Ainsi, il reste difficile de savoir si les observations sont reproductibles dans différent type de cancer, ou encore entre différent modèle cellulaire.

## Bibliographie

1. Société Canadienne du Cancer. *Cancer du sein*. 2017 [cited 2017; Available from: <http://www.cancer.ca>.
2. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
3. Sorlie, T., et al., *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(19): p. 10869-74.
4. Yersal, O. and S. Barutca, *Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications*. World J Clin Oncol, 2014. **5**(3): p. 412-24.
5. Sorlie, T., et al., *Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8418-23.
6. Carey, L.A., et al., *Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study*. JAMA, 2006. **295**(21): p. 2492-502.
7. Nishimura, R., et al., *Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer subtype and a predictor of recurrence time in primary breast cancer*. Exp Ther Med, 2010. **1**(5): p. 747-754.
8. Creighton, C.J., *The molecular profile of luminal B breast cancer*. Biologics, 2012. **6**: p. 289-97.
9. Ellis, M.J., et al., *Outcome prediction for estrogen receptor-positive breast cancer based on postneoadjuvant endocrine therapy tumor characteristics*. J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(19): p. 1380-8.
10. de Ronde, J.J., et al., *Concordance of clinical and molecular breast cancer subtyping in the context of preoperative chemotherapy response*. Breast Cancer Res Treat, 2010. **119**(1): p. 119-26.
11. Prat, A. and C.M. Perou, *Deconstructing the molecular portraits of breast cancer*. Mol Oncol, 2011. **5**(1): p. 5-23.
12. Hainsworth, J.D., H.A. Burris, 3rd, and F.A. Greco, *Paclitaxel-based three-drug combinations for the treatment of small cell lung cancer: a review of the Sarah Cannon Cancer Center experience*. Semin Oncol, 2001. **28**(2 Suppl 4): p. 43-7.
13. Ligibel, J.A. and E.P. Winer, *Trastuzumab/chemotherapy combinations in metastatic breast cancer*. Semin Oncol, 2002. **29**(3 Suppl 11): p. 38-43.
14. McKeage, K. and C.M. Perry, *Trastuzumab: a review of its use in the treatment of metastatic breast cancer overexpressing HER2*. Drugs, 2002. **62**(1): p. 209-43.
15. Ross, J.S., et al., *The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy*. Oncologist, 2003. **8**(4): p. 307-25.
16. Weigelt, B., et al., *Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis*. Lancet Oncol, 2010. **11**(4): p. 339-49.
17. Heitz, F., et al., *Triple-negative and HER2-overexpressing breast cancers exhibit an elevated risk and an earlier occurrence of cerebral metastases*. Eur J Cancer, 2009. **45**(16): p. 2792-8.

18. Kreike, B., et al., *Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas*. Breast Cancer Res, 2007. **9**(5): p. R65.
19. Carey, L., et al., *Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience?* Nat Rev Clin Oncol, 2010. **7**(12): p. 683-92.
20. Foulkes, W.D., I.E. Smith, and J.S. Reis-Filho, *Triple-negative breast cancer*. N Engl J Med, 2010. **363**(20): p. 1938-48.
21. Masuda, H., et al., *Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(19): p. 5533-40.
22. Liedtke, C., et al., *Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer*. J Clin Oncol, 2008. **26**(8): p. 1275-81.
23. Masuda, H., et al., *Predictive factors for the effectiveness of neoadjuvant chemotherapy and prognosis in triple-negative breast cancer patients*. Cancer Chemother Pharmacol, 2011. **67**(4): p. 911-7.
24. Podo, F., et al., *Triple-negative breast cancer: present challenges and new perspectives*. Mol Oncol, 2010. **4**(3): p. 209-29.
25. Couzin-Frankel, J., *Cancer Immunotherapy*. Science, 2013. **342**(6165): p. 1432-1433.
26. Sharma, P. and J.P. Allison, *The future of immune checkpoint therapy*. Science, 2015. **348**(6230): p. 56-61.
27. Stagg, J., R.W. Johnstone, and M.J. Smyth, *From cancer immunosurveillance to cancer immunotherapy*. Immunol Rev, 2007. **220**: p. 82-101.
28. Barber, D.L., et al., *Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection*. Nature, 2006. **439**(7077): p. 682-7.
29. Sharpe, A.H., E.J. Wherry, R. Ahmed, and G.J. Freeman, *The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection*. Nat Immunol, 2007. **8**(3): p. 239-45.
30. Chambers, C.A., M.S. Kuhns, J.G. Egen, and J.P. Allison, *CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 565-94.
31. Topalian, S.L., et al., *Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer*. New England Journal of Medicine, 2012. **366**(26): p. 2443-2454.
32. Ascierto, P.A., F.M. Marincola, and A. Ribas, *Anti-CTLA4 monoclonal antibodies: the past and the future in clinical application*. J Transl Med, 2011. **9**: p. 196.
33. Bianchini, G., et al., *Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease*. Nat Rev Clin Oncol, 2016. **13**(11): p. 674-90.
34. Loi, S., et al., *Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98*. J Clin Oncol, 2013. **31**(7): p. 860-7.
35. Ali, H.R., et al., *PD-L1 protein expression in breast cancer is rare, enriched in basal-like tumours and associated with infiltrating lymphocytes*. Ann Oncol, 2015. **26**(7): p. 1488-93.
36. Mittendorf, E.A., et al., *PD-L1 expression in triple-negative breast cancer*. Cancer Immunol Res, 2014. **2**(4): p. 361-70.
37. Sabatier, R., et al., *Prognostic and predictive value of PDL1 expression in breast cancer*. Oncotarget, 2015. **6**(7): p. 5449-64.

38. Wimberly, H., et al., *PD-L1 Expression Correlates with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer*. *Cancer Immunol Res*, 2015. **3**(4): p. 326-32.
39. Callari, M., et al., *Subtype-Specific Metagene-Based Prediction of Outcome after Neoadjuvant and Adjuvant Treatment in Breast Cancer*. *Clin Cancer Res*, 2016. **22**(2): p. 337-45.
40. Dieci, M.V., et al., *Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in two phase III randomized adjuvant breast cancer trials*. *Ann Oncol*, 2015. **26**(8): p. 1698-704.
41. Teschendorff, A.E., et al., *An immune response gene expression module identifies a good prognosis subtype in estrogen receptor negative breast cancer*. *Genome Biol*, 2007. **8**(8): p. R157.
42. Rody, A., et al., *T-cell metagene predicts a favorable prognosis in estrogen receptor-negative and HER2-positive breast cancers*. *Breast Cancer Res*, 2009. **11**(2): p. R15.
43. Staaf, J., et al., *Identification of subtypes in human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer reveals a gene signature prognostic of outcome*. *J Clin Oncol*, 2010. **28**(11): p. 1813-20.
44. Sabatier, R., et al., *A gene expression signature identifies two prognostic subgroups of basal breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2011. **126**(2): p. 407-20.
45. Rody, A., et al., *A clinically relevant gene signature in triple negative and basal-like breast cancer*. *Breast Cancer Res*, 2011. **13**(5): p. R97.
46. Nagalla, S., et al., *Interactions between immunity, proliferation and molecular subtype in breast cancer prognosis*. *Genome Biol*, 2013. **14**(4): p. R34.
47. Loi, S., et al., *Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial*. *Ann Oncol*, 2014. **25**(8): p. 1544-50.
48. Adams, S., et al., *Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199*. *J Clin Oncol*, 2014. **32**(27): p. 2959-66.
49. Shah, S.P., et al., *The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers*. *Nature*, 2012. **486**(7403): p. 395-9.
50. Adams, S., et al., *Phase 2 study of pembrolizumab (pembro) monotherapy for previously treated metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC): KEYNOTE-086 cohort A*. *Journal of Clinical Oncology*, 2017. **35**(15\_suppl): p. 1008-1008.
51. Allard, B., M. Turcotte, and J. Stagg, *Targeting CD73 and downstream adenosine receptor signaling in triple-negative breast cancer*. *Expert Opin Ther Targets*, 2014. **18**(8): p. 863-81.
52. Gessi, S., et al., *Adenosine receptor targeting in health and disease*. *Expert Opin Investig Drugs*, 2011. **20**(12): p. 1591-609.
53. Colgan, S.P., H.K. Eltzschig, T. Eckle, and L.F. Thompson, *Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73)*. *Purinergic Signalling*, 2006. **2**(2): p. 351.
54. Yegutkin, G.G., *Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1783**(5): p. 673-94.
55. Beavis, P.A., J. Stagg, P.K. Darcy, and M.J. Smyth, *CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses*. *Trends Immunol*, 2012. **33**(5): p. 231-7.



56. Shirley, D.G., R.M. Vekaria, and J. Sevigny, *Ectonucleotidases in the kidney*. Purinergic Signal, 2009. **5**(4): p. 501-11.
57. Henttinen, T., S. Jalkanen, and G.G. Yegutkin, *Adherent leukocytes prevent adenosine formation and impair endothelial barrier function by Ecto-5'-nucleotidase/CD73-dependent mechanism*. J Biol Chem, 2003. **278**(27): p. 24888-95.
58. Eckle, T., et al., *Cardioprotection by ecto-5'-nucleotidase (CD73) and A2B adenosine receptors*. Circulation, 2007. **115**(12): p. 1581-90.
59. Fredholm, B.B., et al., *International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors*. Pharmacol Rev, 2001. **53**(4): p. 527-52.
60. Koeppen, M., T. Eckle, and H.K. Eltzschig, *Interplay of hypoxia and A2B adenosine receptors in tissue protection*. Adv Pharmacol, 2011. **61**: p. 145-86.
61. Haskó, G., J. Linden, B. Cronstein, and P. Pacher, *Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases*. Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(9): p. 759-70.
62. Fredholm, B.B., Y. Chern, R. Franco, and M. Sitkovsky, *Aspects of the general biology of adenosine A2A signaling*. Prog Neurobiol, 2007. **83**(5): p. 263-76.
63. Calker, D.v., M. Müller, and B. Hamprecht, *ADENOSINE REGULATES VIA TWO DIFFERENT TYPES OF RECEPTORS, THE ACCUMULATION OF CYCLIC AMP IN CULTURED BRAIN CELLS*. Journal of Neurochemistry, 1979. **33**(5): p. 999-1005.
64. Hasko, G. and P. Pacher, *A2A receptors in inflammation and injury: lessons learned from transgenic animals*. J Leukoc Biol, 2008. **83**(3): p. 447-55.
65. Nemeth, Z.H., et al., *Adenosine stimulates CREB activation in macrophages via a p38 MAPK-mediated mechanism*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **312**(4): p. 883-8.
66. Begalli, F., et al., *Unlocking the NF-kappaB Conundrum: Embracing Complexity to Achieve Specificity*. Biomedicines, 2017. **5**(3).
67. Feoktistov, I. and I. Biaggioni, *Adenosine A2B receptors*. Pharmacol Rev, 1997. **49**(4): p. 381-402.
68. Gessi, S., et al., *The A3 adenosine receptor: an enigmatic player in cell biology*. Pharmacol Ther, 2008. **117**(1): p. 123-40.
69. Airas, L., et al., *CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73*. J Exp Med, 1995. **182**(5): p. 1603-8.
70. Airas, L. and S. Jalkanen, *CD73 mediates adhesion of B cells to follicular dendritic cells*. Blood, 1996. **88**(5): p. 1755-64.
71. Airas, L., J. Niemela, and S. Jalkanen, *CD73 engagement promotes lymphocyte binding to endothelial cells via a lymphocyte function-associated antigen-1-dependent mechanism*. J Immunol, 2000. **165**(10): p. 5411-7.
72. Flocke, K., et al., *Monoclonal antibodies against 5'-nucleotidase from a human pancreatic tumor cell line: their characterization and inhibitory capacity on tumor cell adhesion to fibronectin substratum*. Eur J Cell Biol, 1992. **58**(1): p. 62-70.
73. Olmo, N., et al., *Modulation of 5'-nucleotidase activity in plasma membranes and intact cells by the extracellular matrix proteins laminin and fibronectin*. Biochem J, 1992. **282** ( Pt 1): p. 181-8.
74. Sadej, R., et al., *Tenascin C interacts with ecto-5'-nucleotidase (eN) and regulates adenosine generation in cancer cells*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1782**(1): p. 35-40.

75. Sadej, R. and A.C. Skladanowski, *Dual, enzymatic and non-enzymatic, function of ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in migration and invasion of A375 melanoma cells*. Acta Biochim Pol, 2012. **59**(4): p. 647-52.
76. Eltzschig, H.K., et al., *Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors*. J Exp Med, 2003. **198**(5): p. 783-96.
77. Huang, L.E., Z. Arany, D.M. Livingston, and H.F. Bunn, *Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit*. J Biol Chem, 1996. **271**(50): p. 32253-9.
78. Kallio, P.J., et al., *Activation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ : Posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(11): p. 5667-72.
79. Synnestvedt, K., et al., *Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia*. J Clin Invest, 2002. **110**(7): p. 993-1002.
80. Decking, U.K., G. Schlieper, K. Kroll, and J. Schrader, *Hypoxia-induced inhibition of adenosine kinase potentiates cardiac adenosine release*. Circ Res, 1997. **81**(2): p. 154-64.
81. Morote-Garcia, J.C., P. Rosenberger, J. Kuhlicke, and H.K. Eltzschig, *HIF-1-dependent repression of adenosine kinase attenuates hypoxia-induced vascular leak*. Blood, 2008. **111**(12): p. 5571-80.
82. Eltzschig, H.K., et al., *HIF-1-dependent repression of equilibrative nucleoside transporter (ENT) in hypoxia*. J Exp Med, 2005. **202**(11): p. 1493-505.
83. Wu, X.R., et al., *High expression of CD73 as a poor prognostic biomarker in human colorectal cancer*. J Surg Oncol, 2012. **106**(2): p. 130-7.
84. Loi, S., et al., *CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(27): p. 11091-6.
85. Turcotte, M., et al., *CD73 Is Associated with Poor Prognosis in High-Grade Serous Ovarian Cancer*. Cancer Research, 2015. **75**(21): p. 4494-4503.
86. Serra, S., et al., *CD73-generated extracellular adenosine in chronic lymphocytic leukemia creates local conditions counteracting drug-induced cell death*. Blood, 2011. **118**(23): p. 6141-52.
87. Leth-Larsen, R., et al., *Metastasis-related plasma membrane proteins of human breast cancer cells identified by comparative quantitative mass spectrometry*. Mol Cell Proteomics, 2009. **8**(6): p. 1436-49.
88. Jin, D., et al., *CD73 on tumor cells impairs antitumor T-cell responses: a novel mechanism of tumor-induced immune suppression*. Cancer Res, 2010. **70**(6): p. 2245-55.
89. Stagg, J., et al., *CD73-deficient mice are resistant to carcinogenesis*. Cancer Res, 2012. **72**(9): p. 2190-6.
90. Stagg, J., et al., *CD73-deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis*. Cancer Res, 2011. **71**(8): p. 2892-900.
91. Stagg, J., et al., *Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(4): p. 1547-52.
92. Wang, L., et al., *CD73 has distinct roles in nonhematopoietic and hematopoietic cells to promote tumor growth in mice*. J Clin Invest, 2011. **121**(6): p. 2371-82.

93. Yegutkin, G.G., et al., *Altered purinergic signaling in CD73-deficient mice inhibits tumor progression*. Eur J Immunol, 2011. **41**(5): p. 1231-41.
94. Feng, L., et al., *Vascular CD39/ENTPDI directly promotes tumor cell growth by scavenging extracellular adenosine triphosphate*. Neoplasia, 2011. **13**(3): p. 206-16.
95. Jackson, S.W., et al., *Disordered purinergic signaling inhibits pathological angiogenesis in cd39/Entpd1-null mice*. Am J Pathol, 2007. **171**(4): p. 1395-404.
96. Kunzli, B.M., et al., *Impact of CD39 and purinergic signalling on the growth and metastasis of colorectal cancer*. Purinergic Signal, 2011. **7**(2): p. 231-41.
97. Sun, X., et al., *CD39/ENTPDI expression by CD4+Foxp3+ regulatory T cells promotes hepatic metastatic tumor growth in mice*. Gastroenterology, 2010. **139**(3): p. 1030-40.
98. Spychala, J., et al., *Role of estrogen receptor in the regulation of ecto-5'-nucleotidase and adenosine in breast cancer*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(2): p. 708-17.
99. Allard, B., et al., *Anti-CD73 therapy impairs tumor angiogenesis*. Int J Cancer, 2014. **134**(6): p. 1466-73.
100. Forte, G., et al., *Inhibition of CD73 improves B cell-mediated anti-tumor immunity in a mouse model of melanoma*. J Immunol, 2012. **189**(5): p. 2226-33.
101. Ntantie, E., et al., *An adenosine-mediated signaling pathway suppresses prenylation of the GTPase Rap1B and promotes cell scattering*. Sci Signal, 2013. **6**(277): p. ra39.
102. Desmet, C.J., et al., *Identification of a pharmacologically tractable Fra-1/ADORA2B axis promoting breast cancer metastasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(13): p. 5139-44.
103. Scully, O.J., B.H. Bay, G. Yip, and Y. Yu, *Breast cancer metastasis*. Cancer Genomics Proteomics, 2012. **9**(5): p. 311-20.
104. Redig, A.J. and S.S. McAllister, *Breast cancer as a systemic disease: a view of metastasis*. J Intern Med, 2013. **274**(2): p. 113-26.
105. Mehlen, P. and A. Puisieux, *Metastasis: a question of life or death*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(6): p. 449-458.
106. Weigelt, B., J.L. Peterse, and L.J. van 't Veer, *Breast cancer metastasis: markers and models*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(8): p. 591-602.
107. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
108. Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck, *Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(3): p. 178-196.
109. Tam, W.L. and R.A. Weinberg, *The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer*. Nat Med, 2013. **19**(11): p. 1438-1449.
110. Polyak, K. and R.A. Weinberg, *Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(4): p. 265-73.
111. Thiery, J.P., H. Acloque, R.Y. Huang, and M.A. Nieto, *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. Cell, 2009. **139**(5): p. 871-90.
112. Mani, S.A., et al., *The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells*. Cell, 2008. **133**(4): p. 704-15.
113. Peinado, H., D. Olmeda, and A. Cano, *Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?* Nat Rev Cancer, 2007. **7**(6): p. 415-28.
114. Scheel, C., et al., *Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast*. Cell, 2011. **145**(6): p. 926-40.

115. Huang, R.Y., P. Guilford, and J.P. Thiery, *Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 19): p. 4417-22.
116. Niehrs, C., *The complex world of WNT receptor signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(12): p. 767-79.
117. Yilmaz, M. and G. Christofori, *EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion*. Cancer Metastasis Rev, 2009. **28**(1-2): p. 15-33.
118. Bax, N.A., et al., *Epithelial-to-mesenchymal transformation alters electrical conductivity of human epicardial cells*. J Cell Mol Med, 2011. **15**(12): p. 2675-83.
119. Wheelock, M.J., et al., *Cadherin switching*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 6): p. 727-35.
120. Noel, A., M. Jost, and E. Maquoi, *Matrix metalloproteinases at cancer tumor-host interface*. Semin Cell Dev Biol, 2008. **19**(1): p. 52-60.
121. Egeblad, M. and Z. Werb, *New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(3): p. 161-74.
122. Maretzky, T., et al., *ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(26): p. 9182-7.
123. Xu, J., S. Lamouille, and R. Derynck, *TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition*. Cell Res, 2009. **19**(2): p. 156-72.
124. Zavadil, J. and E.P. Bottinger, *TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions*. Oncogene, 2005. **24**(37): p. 5764-74.
125. Barrallo-Gimeno, A. and M.A. Nieto, *The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer*. Development, 2005. **132**(14): p. 3151-61.
126. Dong, C., et al., *Interaction with Suv39H1 is critical for Snail-mediated E-cadherin repression in breast cancer*. Oncogene, 2013. **32**(11): p. 1351-62.
127. Dong, C., et al., *G9a interacts with Snail and is critical for Snail-mediated E-cadherin repression in human breast cancer*. J Clin Invest, 2012. **122**(4): p. 1469-86.
128. Herranz, N., et al., *Polycomb complex 2 is required for E-cadherin repression by the Snail1 transcription factor*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(15): p. 4772-81.
129. Lin, T., et al., *Requirement of the histone demethylase LSD1 in Snail-mediated transcriptional repression during epithelial-mesenchymal transition*. Oncogene, 2010. **29**(35): p. 4896-904.
130. Peinado, H., E. Ballestar, M. Esteller, and A. Cano, *Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(1): p. 306-19.
131. Tong, Z.T., et al., *EZH2 supports nasopharyngeal carcinoma cell aggressiveness by forming a co-repressor complex with HDAC1/HDAC2 and Snail to inhibit E-cadherin*. Oncogene, 2012. **31**(5): p. 583-94.
132. Jorda, M., et al., *Upregulation of MMP-9 in MDCK epithelial cell line in response to expression of the Snail transcription factor*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 15): p. 3371-85.
133. Yang, F., et al., *SET8 promotes epithelial-mesenchymal transition and confers TWIST dual transcriptional activities*. EMBO J, 2012. **31**(1): p. 110-23.
134. Yang, M.H., et al., *Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(10): p. 982-92.
135. Yang, M.H., et al., *Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(3): p. 295-305.

136. Sanchez-Tillo, E., et al., *ZEB1 represses E-cadherin and induces an EMT by recruiting the SWI/SNF chromatin-remodeling protein BRG1*. *Oncogene*, 2010. **29**(24): p. 3490-500.
137. Postigo, A.A., J.L. Depp, J.J. Taylor, and K.L. Kroll, *Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins*. *EMBO J*, 2003. **22**(10): p. 2453-62.
138. Wang, J., et al., *Opposing LSD1 complexes function in developmental gene activation and repression programmes*. *Nature*, 2007. **446**(7138): p. 882-7.
139. Ocana, O.H., et al., *Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1*. *Cancer Cell*, 2012. **22**(6): p. 709-24.
140. Tsai, J.H., et al., *Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis*. *Cancer Cell*, 2012. **22**(6): p. 725-36.
141. Cairns, R.A. and T.W. Mak, *The current state of cancer metabolism*. *Nat Rev Cancer*, 2016. **16**(10): p. 613-614.
142. Warburg, O. and S. Minami, *Versuche an Überlebendem Carcinom-gewebe*. *Klinische Wochenschrift*, 1923. **2**(17): p. 776-777.
143. Moreno-Sanchez, R., S. Rodriguez-Enriquez, A. Marin-Hernandez, and E. Saavedra, *Energy metabolism in tumor cells*. *FEBS J*, 2007. **274**(6): p. 1393-418.
144. Schug, Z.T., J. Vande Voorde, and E. Gottlieb, *The metabolic fate of acetate in cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2016. **16**(11): p. 708-717.
145. Altman, B.J., Z.E. Stine, and C.V. Dang, *From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy*. *Nat Rev Cancer*, 2016. **16**(10): p. 619-34.
146. Zheng, J., *Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review)*. *Oncol Lett*, 2012. **4**(6): p. 1151-1157.
147. Lyssiotis, C.A. and A.C. Kimmelman, *Metabolic Interactions in the Tumor Microenvironment*. *Trends Cell Biol*, 2017.
148. Bonuccelli, G., et al., *Ketones and lactate "fuel" tumor growth and metastasis: Evidence that epithelial cancer cells use oxidative mitochondrial metabolism*. *Cell Cycle*, 2010. **9**(17): p. 3506-14.
149. Pavlides, S., et al., *The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma*. *Cell Cycle*, 2009. **8**(23): p. 3984-4001.
150. Rodriguez-Enriquez, S., et al., *Oxidative phosphorylation is impaired by prolonged hypoxia in breast and possibly in cervix carcinoma*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010. **42**(10): p. 1744-51.
151. LeBleu, V.S., et al., *PGC-1alpha mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis*. *Nat Cell Biol*, 2014. **16**(10): p. 992-1003, 1-15.
152. Cha, Y.H., J.I. Yook, H.S. Kim, and N.H. Kim, *Catabolic metabolism during cancer EMT*. *Arch Pharm Res*, 2015. **38**(3): p. 313-20.
153. Kinnaird, A., S. Zhao, K.E. Wellen, and E.D. Michelakis, *Metabolic control of epigenetics in cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2016. **16**(11): p. 694-707.
154. Guillaumond, F., et al., *Strengthened glycolysis under hypoxia supports tumor symbiosis and hexosamine biosynthesis in pancreatic adenocarcinoma*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(10): p. 3919-24.
155. Allen, E., et al., *Metabolic Symbiosis Enables Adaptive Resistance to Anti-angiogenic Therapy that Is Dependent on mTOR Signaling*. *Cell Rep*, 2016. **15**(6): p. 1144-60.

156. Wolf, A., S. Agnihotri, D. Munoz, and A. Guha, *Developmental profile and regulation of the glycolytic enzyme hexokinase 2 in normal brain and glioblastoma multiforme*. Neurobiol Dis, 2011. **44**(1): p. 84-91.
157. Wolf, A., et al., *Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme*. J Exp Med, 2011. **208**(2): p. 313-26.
158. Kim, J.W., I. Tchernyshyov, G.L. Semenza, and C.V. Dang, *HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia*. Cell Metab, 2006. **3**(3): p. 177-85.
159. Elenbaas, B., et al., *Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells*. Genes Dev, 2001. **15**(1): p. 50-65.
160. Casas, E., et al., *Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition and metastasis*. Cancer Res, 2011. **71**(1): p. 245-54.
161. Cong, L., et al., *Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems*. Science, 2013. **339**(6121): p. 819-23.
162. Moffat, J., et al., *A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen*. Cell, 2006. **124**(6): p. 1283-98.
163. Ricardo, S., et al., *Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype*. Journal of Clinical Pathology, 2011. **64**(11): p. 937-946.
164. Mock, K., et al., *The EMT-activator ZEB1 induces bone metastasis associated genes including BMP-inhibitors*. Oncotarget, 2015. **6**(16): p. 14399-412.
165. Su, J., et al., *The role of the VEGF-C/VEGFR-3 axis in cancer progression*. Br J Cancer, 2007. **96**(4): p. 541-5.
166. Su, J.L., et al., *The VEGF-C/Flt-4 axis promotes invasion and metastasis of cancer cells*. Cancer Cell, 2006. **9**(3): p. 209-23.
167. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
168. Cerami, E., et al., *The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data*. Cancer Discovery, 2012. **2**(5): p. 401-404.
169. Gao, J., et al., *Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal*. Sci Signal, 2013. **6**(269): p. p11.
170. Ciriello, G., et al., *Comprehensive Molecular Portraits of Invasive Lobular Breast Cancer*. Cell, 2015. **163**(2): p. 506-19.
171. Frantz, C., K.M. Stewart, and V.M. Weaver, *The extracellular matrix at a glance*. J Cell Sci, 2010. **123**(24): p. 4195-4200.
172. Wirsdörfer, F., et al., *Extracellular adenosine production by ecto-5'-nucleotidase (CD73) enhances radiation-induced lung fibrosis*. Cancer Res, 2016. **76**(10): p. 3045-56.
173. Fernández, P., et al., *Extracellular Generation of Adenosine by the Ectonucleotidases CD39 and CD73 Promotes Dermal Fibrosis*. Am J Pathol, 2013. **183**(6): p. 1740-6.
174. Kalluri, R. and E.G. Neilson, *Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1776-84.
175. Sim, G.C., et al., *IL-2 therapy promotes suppressive ICOS+ Treg expansion in melanoma patients*. J Clin Invest, 2014. **124**(1): p. 99-110.

176. Gessi, S., et al., *Adenosine modulates HIF-1 $\alpha$ , VEGF, IL-8, and foam cell formation in a human model of hypoxic foam cells*. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2010. **30**(1): p. 90-97.
177. Grozio, A., et al., *CD73 Protein as a Source of Extracellular Precursors for Sustained NAD(+) Biosynthesis in FK866-treated Tumor Cells*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(36): p. 25938-49.
178. Cantó, C., et al., *The NAD(+) precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet induced obesity*. *Cell Metab*, 2012. **15**(6): p. 838-47.
179. Gomes, A.P., et al., *Declining NAD(+) induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging*. *Cell*, 2013. **155**(7): p. 1624-38.
180. Wang, B., et al., *NAMPT overexpression in prostate cancer and its contribution to tumor cell survival and stress response*. *Oncogene*, 2011. **30**(8): p. 907-21.

# Annexe 1 - Tri des HMLE-Twist-ER

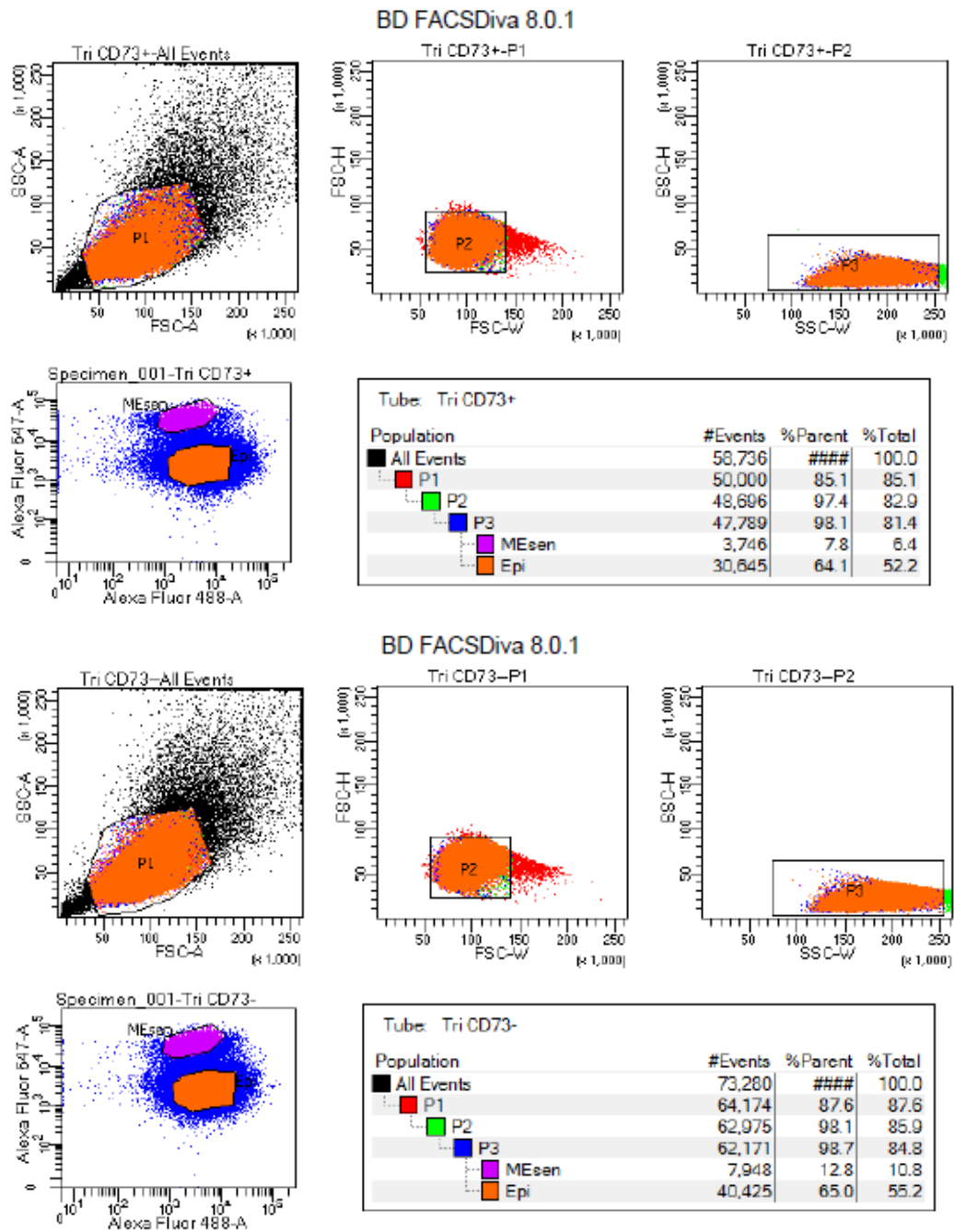
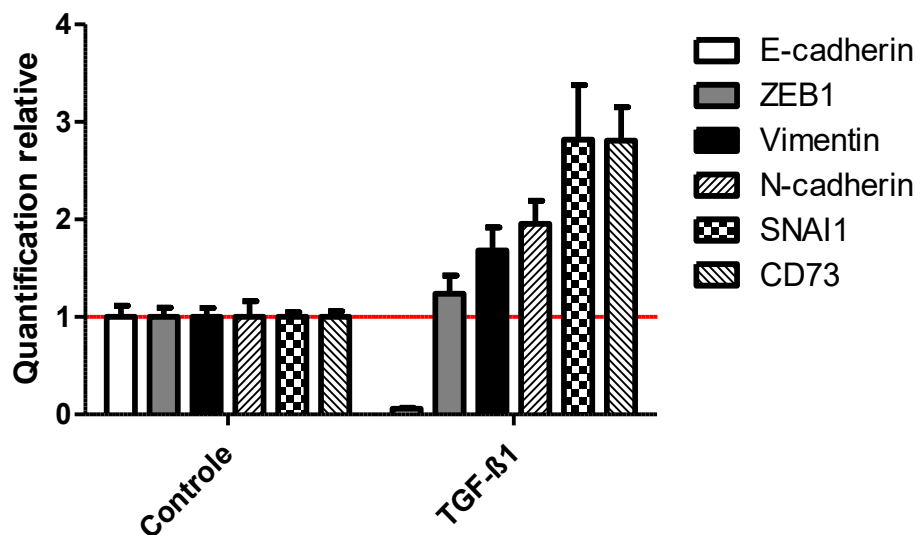


Figure représentant la stratégie de discrimination lors du tri des HMLE-Twist-ER suite au traitement avec le 4-OHT.

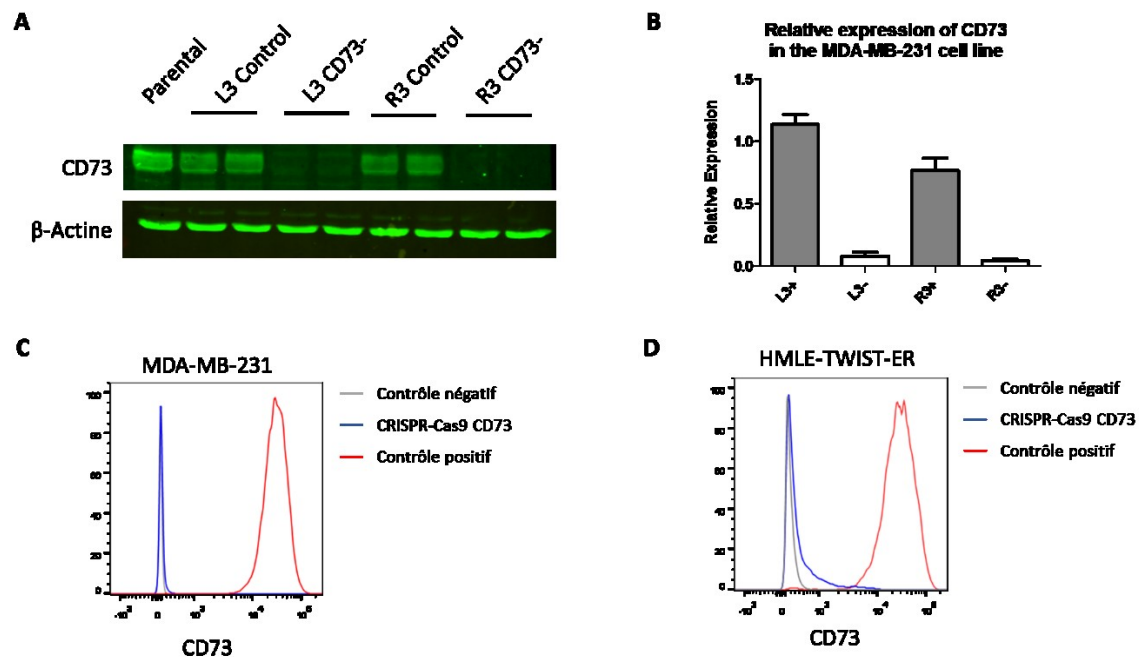


## Annexe 2 - Traitement des SKOV3 au TGF- $\beta$ 1



RT-qPCR des SKOV3 suite à dix jours de traitement au TGF- $\beta$ 1 (20ng/ml) en culture cellulaire. Les cellules sont cultivées en milieu OSE, avec 10% FBS.

## Annexe 3 – CRISPR-Cas9 ciblant CD73, HMLE-Twist-ER et MDA-MB-231



(A,B) Dans les MDA-MB-231, l'expression de CD73 a été révélée et quantifiée par Western Blot pour les deux ARN guides, soit R3 et L3. Cette baisse d'expression a également été relevée par le marquage de CD73 avec un anticorps conjugué à BV421 par cytométrie en flux pour les MDA-MB-231 (C) et les HMLE-Twist-ER (D).

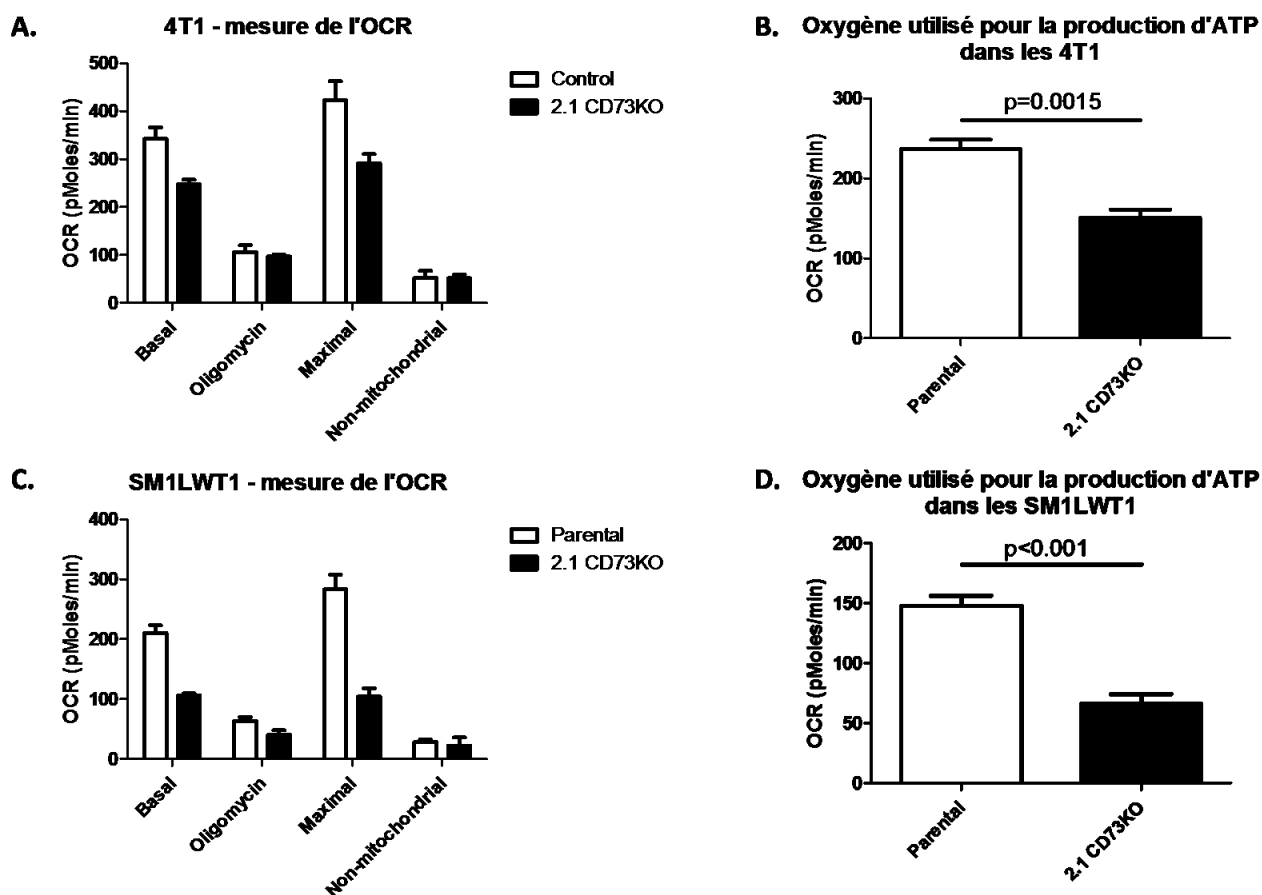
## Annexe 4 – Groupe de gènes associés à l'EMT

Gènes composant le "Gene set" :				
HALLMARK_EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION				
ABI3BP	CXCL1	GPC1	MMP1	SERPINE2
ACTA2	CXCL12	GPX7	MMP14	SERPINH1
ADAM12	CXCL6	GREM1	MMP2	SFRP1
ANPEP	CYR61	HTRA1	MMP3	SFRP4
APLP1	DAB2	ID2	MSX1	SGCB
AREG	DCN	IGFBP2	MXRA5	SGCD
BASP1	DKK1	IGFBP3	MYL9	SGCG
BDNF	DPYSL3	IGFBP4	MYLK	SLC6A8
BGN	DST	IL15	NID2	SLIT2
BMP1	ECM1	IL32	NNMT	SLIT3
CADM1	ECM2	IL6	NOTCH2	SNAI2
CALD1	EDIL3	IL8	NT5E	SNTB1
CALU	EFEMP2	INHBA	NTM	SPARC
CAP2	ELN	ITGA2	OXTR	SPOCK1
CAPG	EMP3	ITGA5	PCOLCE	SPP1
CD44	ENO2	ITGAV	PCOLCE2	TAGLN
CD59	FAP	ITGB1	PDGFRB	TFPI2
CDH11	FAS	ITGB3	PDLIM4	TGFB1
CDH2	FBLN1	ITGB5	PFN2	TGFB1
CDH6	FBLN2	JUN	PLAUR	TGFBR3
COL11A1	FBLN5	LAMA1	PLOD1	TGM2
COL12A1	FBN1	LAMA2	PLOD2	THBS1
COL16A1	FBN2	LAMA3	PLOD3	THBS2
COL1A1	FERMT2	LAMC1	PMEPA1	THY1
COL1A2	FGF2	LAMC2	PMP22	TIMP1
COL3A1	FLNA	LEPRE1	POSTN	TIMP3
COL4A1	FMOD	LGALS1	PPIB	TNC
COL4A2	FN1	LOX	PRRX1	TNFAIP3
COL5A1	FOXC2	LOXL1	PRSS2	TNFRSF11B
COL5A2	FSTL1	LOXL2	PTHLH	TNFRSF12A
COL5A3	FSTL3	LRP1	PTX3	TPM1
COL6A2	FUCA1	LRRC15	PVR	TPM2
COL6A3	FZD8	LUM	QSOX1	TPM4
COL7A1	GADD45A	MAGEE1	RGS4	VCAM1
COL8A2	GADD45B	MATN2	RHOB	VCAN
COMP	GAS1	MATN3	SAT1	VEGFA
COPA	GEM	MCM7	SCG2	VEGFC
CRLF1	GJA1	MEST	SDC1	VIM
CTGF	GLIPR1	MFAP5	SDC4	WIPF1
CTHRC1	GLT25D1	MGP	SERPINE1	WNT5A

## Annexe 5 – Groupe de gènes associés à la phosphorylation oxydative

Gènes composant le "Gene set" : HALLMARK_OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION				
ABCB7	BDH2	GPX4	NDUFA5	POR
ACAA1	BRP44L	GRPEL1	NDUFA6	PRDX3
ACAA2	CASP7	HADHA	NDUFA7	RETSAT
ACADM	COX10	HADHB	NDUFA8	RHOT1
ACADSB	COX11	HCCS	NDUFA9	RHOT2
ACADVL	COX15	HSD17B10	NDUFAB1	SDHA
ACAT1	COX17	HSPA9	NDUFB1	SDHB
ACO2	COX4I1	HTRA2	NDUFB2	SDHC
AFG3L2	COX5A	IDH1	NDUFB3	SDHD
AIFM1	COX5B	IDH2	NDUFB4	SLC25A11
ALAS1	COX6A1	IDH3A	NDUFB5	SLC25A12
ALDH6A1	COX6B1	IDH3B	NDUFB6	SLC25A20
ATP1B1	COX6C	IDH3G	NDUFB7	SLC25A3
ATP5A1	COX7A2	IMMT	NDUFB8	SLC25A4
ATP5B	COX7A2L	ISCA1	NDUFC1	SLC25A5
ATP5C1	COX7B	ISCU	NDUFC2	SLC25A6
ATP5D	COX7C	LDHA	NDUFS1	SUCLA2
ATP5E	COX8A	LDHB	NDUFS2	SUCLG1
ATP5F1	CPT1A	LRPPRC	NDUFS3	SUPV3L1
ATP5G1	CS	MAOB	NDUFS4	SURF1
ATP5G2	CYB5A	MDH1	NDUFS6	TCIRG1
ATP5G3	CYB5R3	MDH2	NDUFS7	TIMM10
ATP5H	CYC1	MFN2	NDUFS8	TIMM13
ATP5I	CYCS	MGST3	NDUFV1	TIMM17A
ATP5J	DECR1	MRPL11	NDUFV2	TIMM50
ATP5J2	DLAT	MRPL15	NNT	TIMM8B
ATP5L	DLD	MRPL34	NQO2	TIMM9
ATP5O	DLST	MRPL35	OAT	TOMM22
ATP6AP1	ECH1	MRPS11	OGDH	TOMM70A
ATP6V0B	ECHS1	MRPS12	OPA1	UQCR10
ATP6V0C	ECI1	MRPS15	OXA1L	UQCR11
ATP6V0E1	ETFPA	MRPS22	PDHA1	UQCRB
ATP6V1C1	ETFB	MRPS30	PDHB	UQCRC1
ATP6V1D	ETFDH	MTRF1	PDHX	UQCRC2
ATP6V1E1	FDX1	MTRR	PDK4	UQCRF51
ATP6V1F	FH	MTX2	PDP1	UQCRH
ATP6V1G1	FXN	NDUFA1	PHB2	UQCRCQ
ATP6V1H	GLUD1	NDUFA2	PHYH	VDAC1
BAX	GOT2	NDUFA3	PMPCA	VDAC2
BCKDHA	GPI	NDUFA4	POLR2F	VDAC3

## Annexe 6 – Consommation d’oxygène dans des modèle murins



Taux de consommation d’oxygène calculé par les Seahorse Analyzer des lignées cellulaires murines 4T1 et SM1 LWT1. (A, C) Graphique des taux de consommation d’oxygène selon les composé ajouté (Glucose, Basal; Oligomycine; FCCP, Maximal; Antimycine A et roténone, Non-mitochondrial) et comparant les résultats des cellules exprimant ou non CD73. (B, D) Consommation de l’oxygène destiné à la production d’ATP, calculé par la soustraction de la consommation d’oxygène non lié à l’ATP synthase au taux de consommation d’oxygène basal.