

Université de Montréal

**Rôle du récepteur tyrosine kinase AXL dans la progression métastatique du
cancer du sein**

Par
Marie-Anne Goyette

Programmes de Biologie Moléculaire
Faculté de Médecine

Thèse présentée
en vue de l'obtention du grade de Ph.D - doctorat
en Biologie Moléculaire

Janvier 2022

© Marie-Anne Goyette, 2022

Université de Montréal

Biologie moléculaire : Institut de recherche clinique de Montréal (IRCM), Faculté de médecine

Cette thèse intitulée

Rôle du récepteur tyrosine kinase AXL dans la progression métastatique du cancer du sein

Présenté par

Marie-Anne Goyette

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Jacques Drouin

Président-rapporteur

Jean-François Côté

Directeur de recherche

John Stagg

Membre du jury

Daniela Quail

Examineur externe

Résumé

Une femme sur huit recevra un diagnostic de cancer du sein au cours de sa vie et même avec le dépistage préventif et les progrès des traitements disponibles, cette maladie reste mortelle. Les sous-types HER2⁺ et triple-négatif (TNBC) sont les cancers du sein les plus agressifs et présentent un mauvais pronostic. Les décès liés au cancer du sein sont principalement causés par des complications liées aux tumeurs secondaires qui se forment dans des organes distants, c'est-à-dire les métastases. Ainsi, les métastases représentent un défi clinique important et sa progression n'est toujours pas bien comprise. Le récepteur tyrosine kinase AXL est largement exprimé dans divers cancers, où il corrèle avec une survie réduite et la formation de métastases, mais ses fonctions exactes dans le processus métastatique restent mal définies. L'objectif de cette thèse donc est de mieux comprendre les rôles d'AXL dans la progression métastatique et d'exploiter ces connaissances vers de nouvelles stratégies thérapeutiques.

AXL est bien connu pour être nécessaire à l'invasion et la formation de métastase dans le TNBC. AXL émerge donc comme une cible thérapeutique dans ce sous-type où les traitements ciblés font défaut. Dans le chapitre 2, la signature de suppression d'AXL a été utilisée pour explorer si des médicaments déjà connus pourraient être repositionnés pour le traitement du TNBC. Ce criblage a ainsi révélé qu'une classe d'antipsychotiques peut réduire la croissance et la charge métastatique de cellules TNBC *in vivo*, suggérant qu'ils peuvent potentiellement être repositionnés pour le traitement de ce cancer du sein très agressif.

Dans les lignées cellulaires de cancer du sein humain, l'expression d'AXL est restreinte aux cellules TNBC mésenchymateuses, mais nous avons constaté qu'AXL est surexprimée dans les échantillons de cancer du sein humain indépendamment du sous-type. Plus spécifiquement chez les patients HER2⁺, AXL corrèle avec des caractéristiques mésenchymateuses, une survie réduite et la présence de métastases. Dans un modèle préclinique de cancer du sein HER2⁺, AXL est nécessaire à la progression métastatique sans affecter la croissance tumorale primaire. Pour ce processus, AXL contourne le besoin de son ligand GAS6 en coopérant avec HER2 pour favoriser l'invasion cellulaire. Ainsi, l'inhibition pharmacologique d'AXL réduit la charge métastatique du modèle murin de cancer du sein HER2⁺. Nos travaux du chapitre 3 identifient donc AXL comme une cible anti-métastatique potentielle pouvant être utilisée en co-thérapie avec un inhibiteur d'HER2 pour le traitement des cancers du sein HER2⁺.

De plus, l'interaction des cellules cancéreuses avec leur environnement est essentielle pour le processus métastatique et l'hypoxie contribue à la dérégulation du microenvironnement, à l'invasion cellulaire, à l'évasion immunitaire et à la résistance au traitement. La délétion d'AXL dans les cellules cancéreuses favorise un microenvironnement anti-tumorigénique et réduit les métastases en modifiant la réponse hypoxique, montrant un nouveau rôle pour AXL dans l'expression de HIF-1 α . Ainsi, l'inhibition d'AXL génère un cadre idéal pour l'immunothérapie où la combinaison de l'inhibition d'AXL et d'un anti-PD-1 réduit la croissance tumorale et la charge métastatique. Les travaux du chapitre 4 suggèrent alors qu'AXL peut être une cible intéressante pour moduler le microenvironnement tumoral en améliorant l'immunothérapie et en réduisant la progression métastatique.

AXL est également exprimé dans plusieurs types de cellules stromales soutenant les cellules cancéreuses, influençant le microenvironnement et favorisant les métastases. En particulier, il a été démontré qu'AXL joue un rôle dans les cellules immunitaires et vasculaires. Ainsi, la suppression spécifique d'AXL dans ces cellules conduit à une modulation du microenvironnement tumoral et à une réduction de la charge métastatique. Subséquemment, les expériences du chapitre 5 suggèrent qu'AXL dans ces compartiments est nécessaire pour la formation de métastases, éclairant sur d'autres mécanismes d'action de l'inhibition systémique d'AXL dans le traitement du cancer.

En conclusion, cette thèse apporte des connaissances sur les différents rôles d'AXL dans la progression métastatique du cancer du sein. Ces découvertes ont ensuite conduit à l'étude d'opportunités de traitement incluant l'utilisation de médicaments déjà sur le marché tels que les antipsychotiques ou l'association d'un traitement anti-AXL avec d'autres traitements connus tels que l'inhibition de HER2 ou l'immunothérapie. Ainsi, les études menées dans cette thèse positionnent AXL comme une cible prometteuse pour augmenter la survie et la qualité de vie des patients atteints d'un cancer du sein métastatique.

Mots-clés : Métastases, Cancer du sein, Repositionnement de médicaments, AXL, HER2, transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), Microenvironnement, Hypoxie, Immunothérapie, Inhibiteur d'AXL

Abstract

One in eight women will be diagnosed with breast cancer during her life and even with the preventive screening and treatment advances, this disease remains deadly. HER2⁺ and Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) subtypes display the most aggressive features for growth and metastasis and are linked to poor survival. Breast cancer-related deaths are predominantly associated to complications arising from metastases, i.e. secondary tumors that form in distant organs. Thus, metastasis represents a clinical challenge and its progression is still not well understood. The receptor tyrosine kinase AXL is broadly expressed in various cancers, where it correlates with survival and metastasis, but its exact functions in the metastatic process remains poorly defined. The goal of this thesis is to better understand AXL roles in the metastatic progression and harness this knowledge toward novel therapeutic strategies.

AXL is well known to be required for invasion and metastasis of TNBC, so AXL emerges as a therapeutic target in this subtype where targeted treatments are lacking. In chapter 2, AXL deletion signature was used to explore if drugs already used could be repurposed for the treatment of TNBC. This screen revealed that a class of antipsychotics reduces the growth and metastatic burden of TNBC *in vivo*, suggesting that they can potentially be repurposed for the treatment of this very aggressive breast cancer.

In human breast cancer cell lines, AXL expression is restrained to mesenchymal TNBC cells, but we found that AXL is overexpressed in human breast cancer samples independently of the subtype. More specifically in HER2⁺ patients, AXL correlates with mesenchymal features, reduced survival and the presence of metastases. In a preclinical model of HER2⁺ breast cancer, AXL is required for the metastatic progression, without affecting the primary tumor growth. For this process, AXL bypasses the need of its ligand GAS6 by cooperating with HER2 to promote cell invasion. Thus, AXL pharmacological inhibition reduces the metastatic burden of HER2⁺ breast cancer mice. Our work in chapter 3 then identifies AXL as a potential anti-metastatic co-therapeutic target for the treatment of HER2⁺ breast cancers.

Furthermore, the interaction of cancer cells with their environment is essential for the metastatic process and hypoxia contributes to the microenvironment deregulation, cell invasion, immune evasion and therapy resistance. Then, AXL deletion in cancer cells promotes an anti-tumorigenic microenvironment and reduces metastasis by altering the hypoxic response,

highlighting a novel role for AXL in HIF-1 α expression. Thus, AXL inhibition generates an ideal setting for immunotherapy where combining AXL inhibition and anti-PD-1 reduces the primary tumor and metastatic burdens. The work in chapter 4 then suggests that AXL can be an interesting target to modulate the tumor microenvironment enhancing immunotherapy and reducing the metastatic progression.

AXL is also expressed in several stromal cell types supporting cancer cells, influencing the microenvironment and promoting metastasis. In particular, AXL has been shown to have a role in immune and vascular cells. Then, specific deletion of AXL in these cells leads to a modulation of the tumor microenvironment and a reduction of the metastatic burden. Subsequently, the experiments from chapter 5 suggest that AXL in these compartments is required for the formation of metastases, shedding light on other mechanisms of action for the systemic AXL inhibition in cancer treatment.

In conclusion, this thesis provides knowledge about the various roles of AXL in the metastatic progression of breast cancer. These findings then led to the study of treatment opportunities including the use of drugs already on the market such as antipsychotics or the combination of anti-AXL treatment with other known treatments such as HER2 inhibition or immunotherapy. Thus, the studies carried out in this thesis position AXL as a promising target to increase the survival and life quality of patients afflicted with metastatic breast cancer.

Keywords : Metastasis, Breast cancer, Drug repurposing, AXL, HER2, Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), Tumor microenvironment, Hypoxia, Immunotherapy, AXL inhibitor

Préface

Cette thèse est rédigée sous forme hybride et est divisée en 5 chapitres suivis d'une discussion. Elle contient 4 articles publiés et un chapitre de résultats non publiés. Les articles publiés seront présentés dans leur format de publication en anglais.

Chapitre 1 : Introduction

Ce chapitre introduit les concepts qui seront abordés. Il contient une revue de la littérature pertinente aux sujets de cette thèse et un manuscrit d'un article de revue. Pour terminer, la dernière section de ce chapitre contient les objectifs de recherche et hypothèses.

Ce chapitre contient un article de revue en révision dans *Cancers* :

Goyette MA and Côté JF. (2022). *AXL receptor tyrosine kinase as a promising therapeutic target directing multiple aspects of cancer progression and metastasis*. *Cancers*.

Chapitre 2 : AXL knockdown gene signature reveals a drug repurposing opportunity for a class of antipsychotics to reduce growth and metastasis of triple-negative breast cancer.

Ce chapitre contient un article publié dans *Oncotarget* en 2019:

Goyette MA, Cussedu R, Elkholi I, Abu-Thuraia A, El-Hachem N, Haibe-Kains B, Gratton JP, Côté JF. (2019). *AXL knockdown gene signature reveals a drug repurposing opportunity for a class of antipsychotics to reduce growth and metastasis of triple-negative breast cancer*. *Oncotarget*.

Chapitre 3 : The Receptor Tyrosine Kinase AXL Is Required at Multiple Steps of the Metastatic Cascade during HER2-Positive Breast Cancer Progression

Ce chapitre contient un article publié dans *Cell Reports* en 2018:

Goyette, M.A., Duhamel, S., Aubert, L., Pelletier, A., Savage, P., Thibault, M.P., Johnson, R.M., Carmeliet, P., Basik, M., Gaboury, L., Muller, W. J., Park, M., Roux, P. P., Gratton, J. P., Cote, J. F. (2018). *The Receptor Tyrosine Kinase AXL Is Required at Multiple Steps of the Metastatic Cascade during HER2-Positive Breast Cancer Progression*. *Cell Reports*.

Chapitre 4 : Targeting Axl favors an anti-tumorigenic microenvironment that enhances immunotherapy responses by decreasing Hif-1 α levels

Ce chapitre contient un article publié dans PNAS en 2021:

Goyette MA, Elkholi I.E., Apcher C., Kuasne H., Rothlin C.V, Muller W.J., Richard D.E., Park M., Gratton JP, Côté JF. (2021). *Targeting Axl favors an anti-tumorigenic microenvironment that enhances immunotherapy responses by decreasing Hif-1 α levels*. PNAS.

Chapitre 5 : Étude du rôle d'AXL dans le stroma tumoral

Ce chapitre contient des résultats non publiés.

Table des matières

Résumé	5
Abstract	7
Préface	9
Table des matières	11
Liste des tableaux	15
Liste des figures	17
Liste des sigles et abréviations	21
Remerciements	27
Chapitre 1 - Introduction	29
1.1 Le cancer du sein	31
1.1.1 Origine et progression	31
1.1.2 Classification clinique et traitements disponibles	32
1.1.3 HER2 dans le cancer du sein	34
1.1.4 Modèle <i>in vivo</i> de cancer du sein	40
1.1.5 Conclusion	43
1.2 Les métastases, un défi clinique	44
1.2.1 La cascade métastatique	44
1.2.2 La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT)	49
1.2.3 TGF- β	52
1.2.4 Conclusion	53
1.3 : Microenvironnement tumoral	54
1.3.1 : Hypoxie	55
1.3.2 : Angiogenèse	58

1.3.3 : Immunité antitumorale	60
1.3.4 Conclusion.....	65
1.4 : AXL receptor tyrosine kinase as a promising therapeutic target directing multiple aspects of cancer progression.	66
1.4.1 AXL activation and therapeutic targeting	69
1.4.2 Implications of AXL expression in the metastatic cascade and therapy resistance	72
1.4.3 AXL as a modulator of the tumor microenvironment.....	77
Hypothèses de recherches et objectifs.....	84
Chapitre 2 - AXL knockdown gene signature reveals a drug repurposing opportunity for a class of antipsychotics to reduce growth and metastasis of Triple Negative Breast Cancer.....	87
Contributions	89
Abstract	91
Introduction	92
Results	94
Discussion	105
Experimental procedures.....	108
Acknowledgments	112
Supplementary Information.....	113
Chapitre 3 - The Receptor Tyrosine Kinase AXL is Required at Multiple Steps of the Metastatic Cascade during HER2-positive Breast Cancer Progression.....	125
Contributions	128
Abstract	130
Introduction	132
Results	134
Discussion	152
Experimental procedures.....	155

Acknowledgments.....	164
Supplementary information.....	165
Chapitre 4 - Targeting Axl favors an anti-tumorigenic microenvironment that enhances immunotherapy responses by decreasing Hif-1 α levels	177
Contributions.....	179
Abstract	181
Introduction	182
Results	184
Discussion	201
Acknowledgments.....	205
Supplemental information.....	206
Chapitre 5 - Étude du rôle d'AXL dans le stroma tumoral	226
Introduction	227
Résultats	229
Discussion et perspectives.....	237
Matériel et méthodes	241
Discussion	245
Nouvelles stratégies pour le traitement du TNBC	248
Cibler AXL pour le traitement du cancer.....	250
AXL et HER2 : partenaires importants dans la progression métastatique.....	253
AXL et l'EMT dans la progression métastatique.....	255
AXL, l'hypoxie et le microenvironnement tumoral.....	258
AXL dans le stroma.....	261
Conclusion.....	262
Références bibliographiques	265

Liste des tableaux

Table 2. S1: Connectivity analysis of drugs with a similar gene signature to AXL decrease.	119
Table 3. S1. Related to Figure 5. GSEA results of gene sets downregulated in <i>Neu⁺:Axl^{-/-}</i> tumor grafts in FVB and <i>Neu⁺:Axl^{-/-}</i> tumors.	172
Table 3. S2. Related to Figure 1 and 6. Sequences of shRNA against AXL and genotyping primers.	174
Table 4. S1. Related to Fig. 4.1. GSEA results of gene sets up and downregulated in <i>Neu⁺:Axl^{-/-}</i> tumors.	223
Table 4. S2. Related to Fig. 4. S2. GSEA results of gene sets up and downregulated in <i>Neu⁺:Axl^{-/-}</i> tumor grafts in wt hosts.	224
Table 4. S3. Related to Fig. 4.6. Cytokine/chemokine array results on conditioned media from NIC WT and <i>Axl</i> KO cells in hypoxia (mean of n=6, result in pg/mL).	225

Liste des figures

Figure 1.1 : Caractéristiques clés à progression tumorale	30
Figure 1.2 : Anatomie de la glande mammaire humaine.....	31
Figure 1.3 : Classification du cancer du sein en sous-types moléculaires	33
Figure 1.4 : Famille de récepteurs tyrosines kinases.....	35
Figure 1.5 : Récepteurs de la famille de l'EGFR.....	37
Figure 1.6 : HER2/Neu et leurs variants oncogéniques	43
Figure 1.7 : La dissémination de cellules métastatiques	48
Figure 1.8 : L'EMT et MET dans la cascade métastatique.....	51
Figure 1.9 : Survol du microenvironnement tumoral.....	54
Figure 1.10 : Mécanisme d'activation de HIF-1α dans les cellules cancéreuses	56
Figure 1.11 : Vaisseaux tumoraux anormaux.....	59
Figure 1.12 : Inhibiteurs du blocage de point de contrôle immunitaire.....	63
Figure 1.13. Cancer cell intrinsic implication of AXL in the metastatic cascade.....	72
Figure 1.14. AXL implication in the tumor microenvironment in different cell types.....	77
Figure 2.1: AXL knockdown gene expression signature in MDA-MB-231 is similar to the signature of a class of antipsychotics.	96
Figure 2.2: Treatments with THZ, FLZ and TFP reduces the migration potential of TNBC cells.....	97
Figure 2.3: The phenothiazines reduce cell proliferation and induce cell cycle arrest of TNBC cells.....	99
Figure 2.4: THZ, FLZ and TFP exhibit cytotoxic effects on TNBC cells.	101
Figure 2.5: Phenothiazines treatments on TNBC affects PI3K/AKT/mTOR and MAPK pathways.....	102
Figure 2.6: THZ, FLZ and TFP treatments reduce tumor growth and metastasis <i>in vivo</i>.	104
Figure 2. S1: Gene expression signature of AXL knockdown in MDA-MB-231 reflects AXL roles in different biological processes and oncogenic pathways.	113
Figure 2. S2: Treatment with THZ, FLZ and TFP reduces the migration ability of Hs578t TNBC cells.	114

Figure 2. S3: THZ, FLZ and TFP induce cell cycle arrest and reduce cell proliferation of TNBC cells.	115
Figure 2. S4: THZ, FLZ and TFP exhibit cytotoxic effects on Hs578t.	116
Figure 2. S5: THZ, FLZ and TFP treatment affect PI3K/Akt/mTOR without affecting AXL activity.	117
Figure 2. S6: Combination of THZ, FLZ or TFP with paclitaxel reduces tumor and metastatic burden in vivo.	118
Figure 3: Graphical Abstract	131
Figure 3.1: AXL contributes to metastasis in human HER2+ breast cancers and in a mouse model of the HER2 subtype.	135
Figure 3.2: HER2 interacts with AXL to promote its stability and accumulation at the cell surface.	139
Figure 3.3: HER2 transactivates AXL to promote cell invasion.	141
Figure 3.4: AXL is required at multiple steps of the metastatic cascade.	144
Figure 3.5: Transcriptomics analyses reveal a role for AXL in TGF-β and EMT signaling.	147
Figure 3.6: AXL is required for TGF-β-induced cell invasion and its expression is linked to EMT and TGF-β signaling in human HER2⁺ tumors.	149
Figure 3.7: Prolonged pharmacological inhibition of AXL <i>in vivo</i> in the MMTV-NIC HER2+ breast cancer model reduces metastasis.	151
Figure 3. S1: Related to Figure 3.1. AXL expression in human samples correlates with survival.	165
Figure 3. S2: Related to Figure 3.1. Axl KO and Gas6 KO mice mammary gland development and tumorigenesis are similar to WT mice.	166
Figure 3. S3: Related to Figure 3.2. HER2 interacts with AXL.	167
Figure 3. S4: Related to Figure 3.3. AXL and HER2 crosstalk to increase cell invasion. ...	168
Figure 3. S5: Related to Figure 3.5. Gene expression analyse reveal a role for AXL in focal adhesion, stemness and HER2 signaling.	169
Figure 3. S6: Related to Figure 3.5. AXL is essential for TGF-β-induced cell migration. ..	170
Figure 3. S7: Related to Figure 3.6 and 3.7. AXL is required for TGF-β-induced cell migration of HER2+ PDX cell line.	171

Figure 4.1. Axl contributes to the tumor microenvironment deregulation.....	186
Figure 4.2. Conditional <i>Axl</i> deletion in the mammary epithelial cells generates an anti-tumorigenic microenvironment and reduces the metastatic burden.....	189
Figure 4.3. Axl regulates HIF-1α levels in hypoxia.....	192
Figure 4.4. Axl is required for a complete hypoxic response.	194
Figure 4.5. <i>Axl</i> is required for hypoxia-induced EMT and cell migration and invasion.....	195
Figure 4.6. Axl is required for hypoxia-induced secretion of factors that leads to macrophage proliferation, invasion and polarization.....	197
Figure 4. 7. Axl inhibition generates an anti-tumorigenic microenvironment that enhances anti-PD-1 therapy.....	200
Figure 4. S1. Related to Fig. 4.1. Axl contributes to the tumor microenvironment deregulation.	214
Figure 4. S2. Related to Fig. 4.1. Orthotopic grafts of <i>Axl</i> KO cancer cells in WT host leads to an anti-tumorigenic microenvironment.....	215
Figure 4. S3. Related to Fig. 4.2. Specific deletion of <i>Axl</i> in cancer cells leads to an anti-tumorigenic microenvironment.	216
Figure 4. S4. Related to Fig. 4.3. AXL and HER2 activity regulates HIF-1α levels in hypoxia.	217
Figure 4. S5. Related to Fig. 4.4. Expression of <i>AXL</i> in human sample correlates with genes linked to the hypoxic response.	218
Figure 4. S6. Related to Fig. 4.5. AXL is necessary for hypoxia-induced EMT and cell invasion and migration.....	219
Figure 4. S7. Related to Fig. 4.6. Axl-dependent secretome from cancer cells in hypoxia.	220
Figure 4. S8. Related to Fig. 4.7. Basal and HER2 subtypes presents more hypoxia and higher hypoxia score in HER2⁺ breast cancer patients correlates with poorer outcome.	221
Figure 4. S9. Related to Fig. 4.7. AXL inhibition enhances the effect of anti-PD-1 treatment in MMTV-Neu mice.	222
Figure 5.1 : La délétion d'AXL dans le stroma mène à la normalisation du microenvironnement.....	230
Figure 5.2 : La délétion d'AXL dans le système immunitaire diminue la croissance tumorale et la formation de métastases	233

Figure 5.3 : La délétion d'AXL dans les cellules endothéliales normalise les vaisseaux sanguins et réduit la charge métastatique.....236

Figure 6.1. Découvertes sur le rôle d'AXL dans la progression du cancer du sein HER2⁺ 246

Liste des sigles et abréviations

Ang-1 : Angiopoïtin-1

CAR: Chimeric antigen receptor

Ctl : Control

CD31: Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1

CD45: Protein tyrosine phosphatase, Receptor Type, C

CTC: Circulating tumor cells

CCL: Chemokine (C-C motif) ligand 2

CSF: Colony stimulating factor 1

CXCL: Chemokine (C-X-C Motif) ligand

CXCR: Chemokine (C-X-C Motif) receptor

DC: Dendritic cells

EGF: Epidermal growth factor

EGFR: Epidermal growth factor receptor

EMT: Epithelial-to-mesenchymal transition

FBS: Fetal bovine serum

FDA: Food and drug administration

FLZ: Fluphenazine

GAS6: Growth arrest specific 6

GPCR: G protein-coupled receptors

GSEA: Gene set enrichment analysis

H&E: Hematoxylin and eosin

HER2: Human epidermal growth factor receptor 2

HGF: Hepatocyte growth factor

HIF: Hypoxia-inducible factor

HRE: Hypoxia-response element

HRG: Heregulin

IL: Interleukin

IRES: Internal ribosome entry site

KD: Kinase dead

KD: Knock-down

KO: Knock-out

MCSF: Macrophage colony stimulating factor

MET: Mesenchymal-to-epithelial transition

MDSC: Myeloid-derived suppressor cells

MHC: Major histocompatibility complex

MIN: Mammary intraepithelial neoplastic

MMTV: Mouse mammary tumor virus

PBS: Phosphate buffer saline

PCR: Polymerase chain reaction

PD-1: Programmed death 1

PD-L1: Programmed death-ligand 1

PDX: Patient-derived xenograft

PFA: Paraformaldehyde

PHD : Prolyl hydroxylase domain-containing proteins

RPM: Revolution per minute

RTK: Receptor tyrosine kinase

PyMT : Polyomavirus middle T

STAT: Signal transducer and activator of transcription

TAM: Tyro3, AXL, MER

TAM: Tumor associated macrophages

TFP: Trifluoperazine

TGF- β : Transforming growth factor beta

THZ: Thioridazine

TMA: Tumor microarrays

TME: Tumor microenvironment

TNBC: Triple negative breast cancer

TLR: Toll-like receptor

Treg: Regulatory T cell

VEGF: Vascular endothelial growth factor

VEGFR: Vascular endothelial growth factor receptor

VHL : Von-Hippel Lindau

VSMC: Vascular smooth muscle cells

WT: Wild-type

À ma famille,

Remerciements

Le long parcours du doctorat et le processus de terminer cette thèse n'aurait pas pu se faire sans la contribution de plusieurs personnes. J'aimerais donc prendre le temps de les remercier autant pour leur soutien moral, scientifique et technique.

Tout d'abord, j'aimerais exprimer toute ma gratitude envers mon mentor dans cette entreprise, Jean-François. J'ai toujours été très reconnaissante de son support et surtout de sa confiance. J'ai été très choyée de pouvoir avoir autant de liberté pour réaliser mes idées et tester mes hypothèses avec de grands moyens. Merci pour l'espace laissé pour pleinement développer mon indépendance et mes propres intérêts de recherche. Merci pour les opportunités de collaborations, de supervisions et de participation aux congrès qui ont agrémenté mon parcours. Je suis reconnaissante pour les encouragements, discussions et judicieux conseils qui me confortent sur le chemin de ma future carrière en recherche.

Aussi, j'ai eu la chance de travailler avec de nombreux collaborateurs qui m'ont offert leur expertise et aidé à la poursuite de mes projets, soit Morag Park, Philippe Roux, Louis Gaboury, Jean-Philippe Gratton, William J. Muller et Darren Richards ainsi que les membres de leur laboratoire. Merci aussi aux membres de mon comité de thèse pour leur intérêt et suivi de mes projets au cours des années, soit Sylvie Mader, Morag Park et Marie Kmita. J'aimerais aussi remercier les membres des plateaux technologiques de l'IRCM qui m'ont appuyé pour la réalisation de mes expériences; Manon Laprise, Marie-Claude Lavallée et Suzie Riverin de l'animalerie; Dominic Filion de la microscopie; Éric Massicotte et Julie Lord de la cytométrie en flux; Simone Terouz de l'histologie; Odile Neyret de biologie moléculaire et Virginie Calderon de bioinformatique. Merci aussi aux membres du département de biologie moléculaire de l'Université de Montréal et aux membres des affaires académiques de l'IRCM pour leur support.

Ensuite, il est important de remercier les organismes qui ont subventionné mon parcours et mes projets. Merci aux FRQS, IRSC, à l'IRCM et la faculté de médecine pour les bourses de formation maîtrise et doctorat, bourse de voyage et prix de présentations aux congrès. Merci pour les fonds de recherches venant du FRQS, IRSC, la fondation du cancer du sein du Québec ainsi que la chaire air Transat du cancer du sein qui ont permis de réaliser ces projets.

Bien sûr, j'aimerais remercier mes nombreux collègues présent et passé du labo Côté qui ont chacun contribué à leur façon. Au cours de ces nombreuses années, j'ai eu la chance de rencontrer et côtoyer plusieurs personnes qui m'ont appris beaucoup et ont amené encore plus de plaisir au travail. J'ai beaucoup apprécié nos lunchs tous ensemble et nos occasionnelles sorties et activités, et bien entendu j'ai beaucoup de bons souvenirs de conférences avec beaucoup d'entre vous. Un merci particulier à ceux qui ont participé directement à mes projets Ariane, Marie-Pier, Stéphanie, Rebecca, Islam et Chloé. Merci aussi à Islam et Afnan pour nos collaborations et précieuses discussions de science et de futur.

Pour terminer, j'utilise cette opportunité pour mettre par écrit toute ma reconnaissance envers ma famille, à qui je dédie cette thèse. Votre soutien a été essentiel à la poursuite de ce doctorat. Merci de m'encourager et d'essayer de suivre mes projets et ma carrière même si vous ne comprenez pas toujours le monde scientifique qui est si différent du vôtre. Merci à ma belle-famille, Sylvie et Jean-Robert, qui sont toujours curieux et intéressés par la science. Surtout, un énorme merci à Charles, qui a récemment accepté de devenir mon mari pour faciliter notre déménagement prochain à Boston. Merci de me suivre dans cette nouvelle aventure qui est le postdoc pour poursuivre mon objectif de carrière. Merci pour son soutien au quotidien, sa foi en moi et sa compréhension pour mon travail. Merci à nos deux cocos, Mathieu et Ophélie, qui m'ont beaucoup appris sur moi-même, mes capacités et me permette d'avoir un bel équilibre de vie. Vous me rendez très fière et heureuse !

Chapitre 1 - Introduction

Le cancer est une maladie très complexe qui est caractérisée par la croissance incontrôlée de cellules endogènes du corps. Il nécessite une reprogrammation de circuits signalétiques normaux pour acquérir des caractéristiques qui permettent de proliférer sans frein et de déjouer les défenses du corps. Conceptuellement, ces capacités ont été décrites comme «Hallmarks» du cancer [1, 2] (Figure 1.1). Au cours de la progression cancéreuse, les cellules de la tumeur primaire peuvent coloniser des organes distants, formant ainsi des métastases [3, 4]. Ce processus est une suite d'événements encore peu compris et qui requiert l'ensemble de ces capacités. Les métastases présentent un défi clinique important puisque les cellules métastatiques sont résistantes aux traitements et causent 90% des décès liés au cancer. Ainsi, les travaux de cette thèse visent à mieux comprendre la progression métastatique dans un contexte de cancer du sein. Plus particulièrement, l'intérêt est porté sur le récepteur tyrosine kinase AXL. Les études de cette thèse visent à comprendre son rôle dans la progression métastatique en approchant plusieurs capacités cellulaires acquises incluant l'invasion, l'angiogenèse, l'évasion immunitaire et l'inflammation. Ces connaissances sont alors utilisées pour suggérer de nouvelles avenues thérapeutiques utilisant cette cible prometteuse pour le traitement des cancers métastatiques.

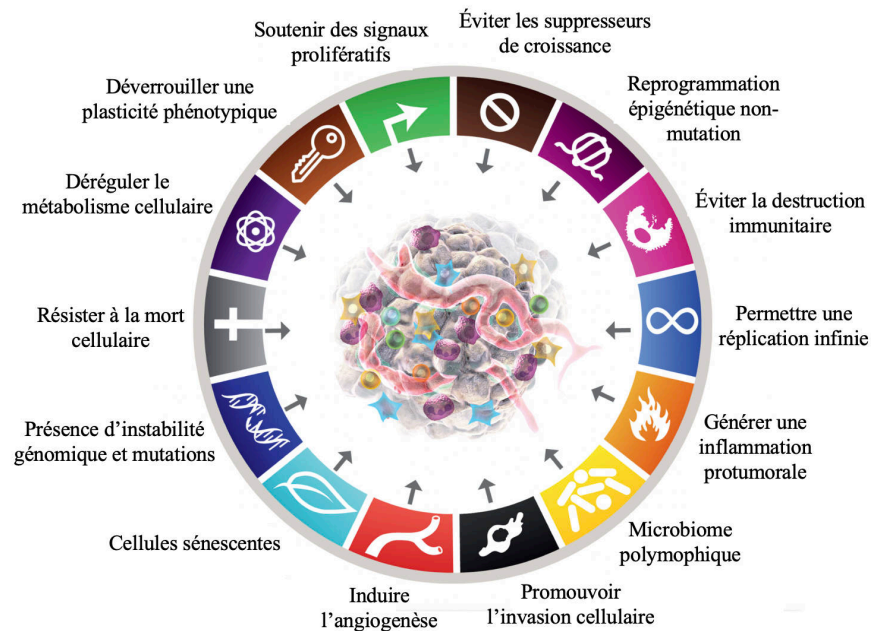


Figure 1.1 : Caractéristiques clés à progression tumorale

Plusieurs capacités acquises sont nécessaires à la croissance et à la progression de la tumeur. Ces caractéristiques régulent alors le microenvironnement tumoral pour accélérer la progression tumorale et métastatique. Adaptée de Hanahan Cancer Discovery, 2022 [2]

1.1 Le cancer du sein

Au Canada, une femme sur huit recevra un diagnostic de cancer du sein au cours de sa vie. Malgré le dépistage préventif et les avancés dans les traitements, les cancers du sein restent un problème de santé important puisqu'il représente 13% des décès par cancer chez les femmes [5].

1.1.1 Origine et progression

La glande mammaire est un organe dynamique qui évolue en réponse à des signaux hormonaux au cours de la vie suite à la puberté, la grossesse, la lactation et la ménopause. Cet organe est principalement formé de lobes et canaux composés d'une couche de cellules luminales épithéliales et d'une couche de cellules basales myoépithéliales entourées de cellules stromales comme des fibroblastes et des adipocytes [6, 7]. Comme tout tissu épithélial, il se renouvelle constamment grâce à la présence de cellules souches pouvant se différencier pour générer tous les types cellulaires composant l'épithélium (Figure 1.2).

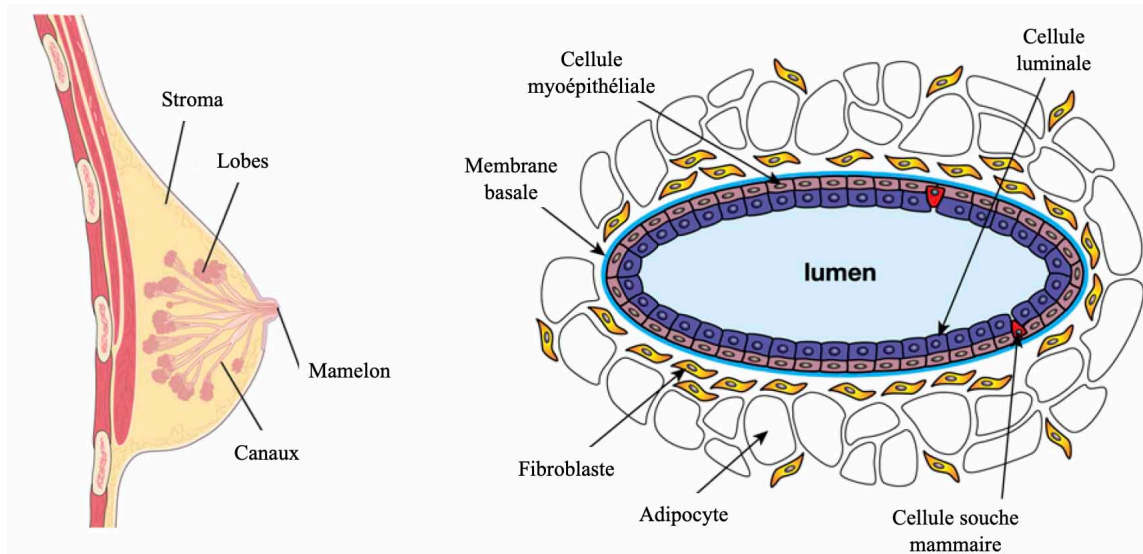


Figure 1.2 : Anatomie de la glande mammaire humaine

Les glandes mammaires humaines contiennent des lobes et de canaux entourés de stroma qui sont drainés au niveau du mamelon. Ces lobes et canaux sont composés de couches cellulaires luminales et myoépithéliales entourées d'un stroma composé principalement de fibroblastes et d'adipocytes. Des cellules souches permettent le renouvellement épithélial. Adaptée de Visvader, *Genes & Development Review*, 2009 [7]

Les cellules cancéreuses du sein ont comme principale origine les cellules souches mammaires ou les cellules épithéliales [6]. Ces cellules peuvent accumuler des anomalies génétiques (modifications épigénétiques et instabilité génomique) menant à une prolifération incontrôlée suite à la modification de l'expression ou de la fonction d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeur [8]. Cette hyperplasie peut mener à la formation de carcinomes considérés comme des lésions prémalines. Les carcinomes sont considérés malins lorsqu'ils deviennent invasifs et commencent à se propager à l'extérieur des lobes et des canaux en envahissant la membrane basale et le stroma [9]. Les cellules peuvent alors coloniser des organes distants et former des métastases. Dans le cancer du sein, les métastases se développent principalement au niveau des os, du foie, des poumons et du cerveau, pouvant occasionner des dysfonctions de ces organes [10].

1.1.2 Classification clinique et traitements disponibles

Le cancer du sein est particulièrement hétérogène et chaque cas présente des caractéristiques biologiques et histopathologiques différentes. Subséquemment, le pronostic et la réponse aux traitements varient grandement d'un patient à l'autre. Ainsi, un grand effort de classification basée sur les caractéristiques histologiques et moléculaire a permis d'améliorer le pronostic du cancer du sein en dictant une ligne de traitement en clinique [6, 9, 11-13]. Le récepteur humain du facteur de croissance épidermique 2 (HER2), le récepteur d'estrogène (ER) et le récepteur de progestérone (PR) sont les principaux biomarqueurs utilisés dans la classification clinique du cancer du sein. Les sous-types moléculaires actuellement utilisés à des fins de planification thérapeutiques inclut le cancer Luminal A (ER/PR⁺, HER2⁻), Luminal B (ER/PR⁺, HER2^{+/-}), HER2⁺ et basal ou triple négatif (TNBC, ER⁻/PR⁻/HER2⁻) [11, 13, 14] (Figure 1.3). Ces marqueurs ne sont toutefois pas suffisants dans tous les cas pour assurer un traitement sans faille. Ainsi, l'expansion de la classification clinique des sous-types de cancer du sein se continue et la recherche de nouveaux biomarqueurs est encore très importante.

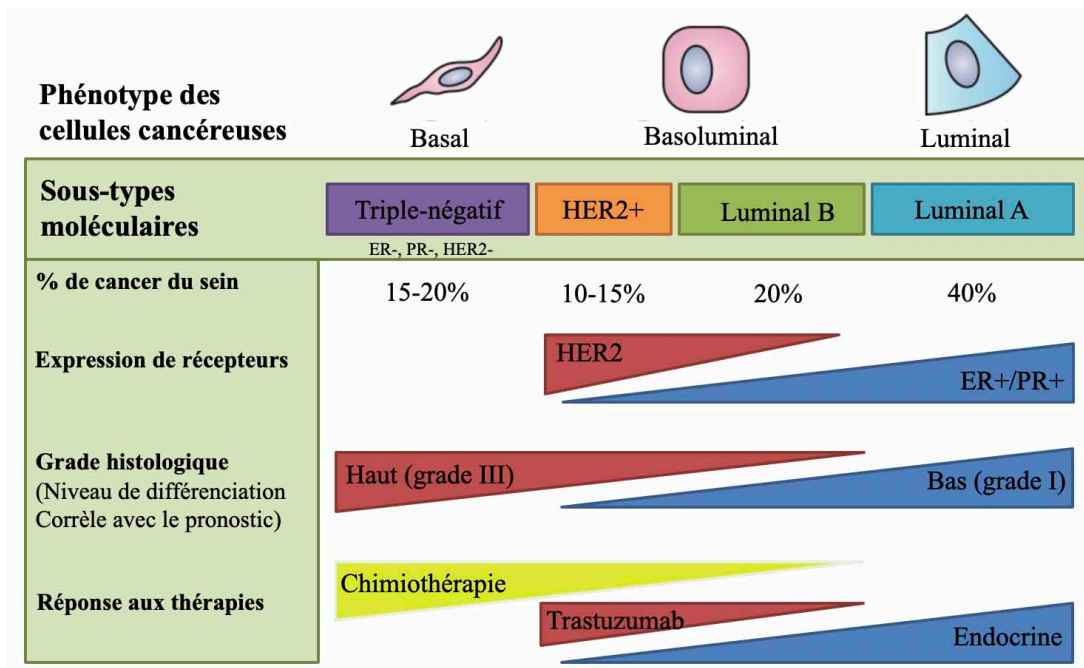


Figure 1.3 : Classification du cancer du sein en sous-types moléculaires

Les 4 sous-types principaux de cancer du sein sont caractérisés dans cette figure selon le phénotype cellulaire, le pourcentage d'incidence, l'expression des récepteurs HER2, ER et PR, le grade histologique, le niveau de différenciation, le pronostic ainsi que la réponse aux types de thérapies.

Adaptée de Wong et al., McMaster Pathophysiology Review, 2012

Les principaux traitements actuels du cancer du sein comprennent la chirurgie, la radiothérapie, l'hormonothérapie, la chimiothérapie et l'immunothérapie. Plusieurs drogues ou traitements ciblés sont aussi utilisés et la combinaison de plusieurs types de traitements est généralement conseillée pour augmenter l'efficacité et réduire les cas de résistance [12, 15]. La classification des cancers permet alors de choisir la stratégie thérapeutique ayant le plus de chance de réussite. Les squelettes thérapeutiques actuels basés sur les sous-types comprennent la thérapie endocrinienne, le ciblage anti-HER2 et la chimiothérapie [13]. Les thérapies endocrines sont utilisées pour les cancers exprimant ER/PR et visent à bloquer la signalisation de ces récepteurs qui favorise la croissance des tumeurs qui y sont dépendantes (ex. Tamoxifen) et ces traitements sont souvent combinés à la chimiothérapie [11, 13]. Dans le cas des cancers HER2⁺, des anticorps ciblant HER2 comme le Herceptin/Trastuzumab ou sa version couplée à une drogue cytotoxique comme le Trastuzumab-emtansine (T-DM1) sont dans les traitements de première ligne en combinaison avec la chimiothérapie [11, 13]. Il existe aussi de petites molécules inhibitrices ciblant HER2 ou la famille de récepteur de HER2 comme le Lapatinib pouvant réduire la signalisation

tumorigénique de ce récepteur. Pour terminer, le sous-type triple négatif est hétérogène puisqu'il regroupe tous les types de cancer négatifs pour les récepteurs hormonaux et HER2. Le manque de cibles biologiques disponibles laisse la chimiothérapie comme principale option de traitement de base et malheureusement beaucoup de patients développent une résistance et des métastases [11, 13, 15]. Ainsi, il y a un besoin criant de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les patients présentant un cancer de ce sous-type de cancer du sein.

Présentement, tous les patients de cancer du sein sont traités de base avec des agents chimiothérapeutiques qui cause la mort des cellules en division rapide, normales ou néoplasiques. Ce type de traitement peu spécifique a des effets secondaires énormes qui dégradent la qualité de vie des patients. Ainsi, il est souhaitable de trouver des méthodes pouvant cibler spécifiquement les cellules cancéreuses et réduire l'usage de chimiothérapies. Plusieurs nouvelles avenues de traitements ciblés sont en développement. Ainsi, la recherche se poursuit pour améliorer la stratégie thérapeutique existante, particulièrement pour les cancers du sein métastatiques qui sont les plus difficiles à traiter.

1.1.3 HER2 dans le cancer du sein

HER2 est un biomarqueur important pour la classification du cancer du sein en clinique puisqu'il est un oncogène puissant qui conduit la croissance tumorale et sa progression. Malgré la disponibilité de ces traitements ciblant HER2, le cancer du sein HER2⁺ demeure l'une des formes les plus agressives de cancer du sein qui menace la vie des patientes puisqu'il progresse en formant des métastases.

1.1.3.1 Les récepteurs tyrosines kinases

HER2 est un récepteur tyrosine kinase (RTK), une classe de protéines membranaires qui possèdent un domaine kinase permettant la phosphorylation de cible intracellulaire suite à la liaison d'un ligand. Les RTK permettent ainsi la transmission de signaux de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule et sont des joueurs clés dans la biologie du cancer puisqu'ils régulent plusieurs processus cellulaires incluant la migration, la prolifération, la survie, le métabolisme et la différenciation [16-18]. Ils sont composés de trois domaines; un domaine extracellulaire pouvant être composé de

motifs variés, un domaine transmembranaire constitué d'une hélice et un domaine intracellulaire contenant un domaine kinase [17] (Figure 1.4). Ces récepteurs s'activent suite à la liaison d'un ligand qui entraîne un changement conformationnel permettant une homo- ou hétérodimérisation avec d'autres RTK, souvent de la même famille. Cette association rapproche les domaines transmembranaires et cytoplasmiques, ce qui permet une transphosphorylation de la boucle d'activation du domaine kinase entraînant l'activation de sa fonction de phosphorylation. Une autophosphorylation permet ensuite le recrutement et l'activation de molécules signalétiques qui entraînent une cascade d'événements qui peuvent déterminer le destin cellulaire.

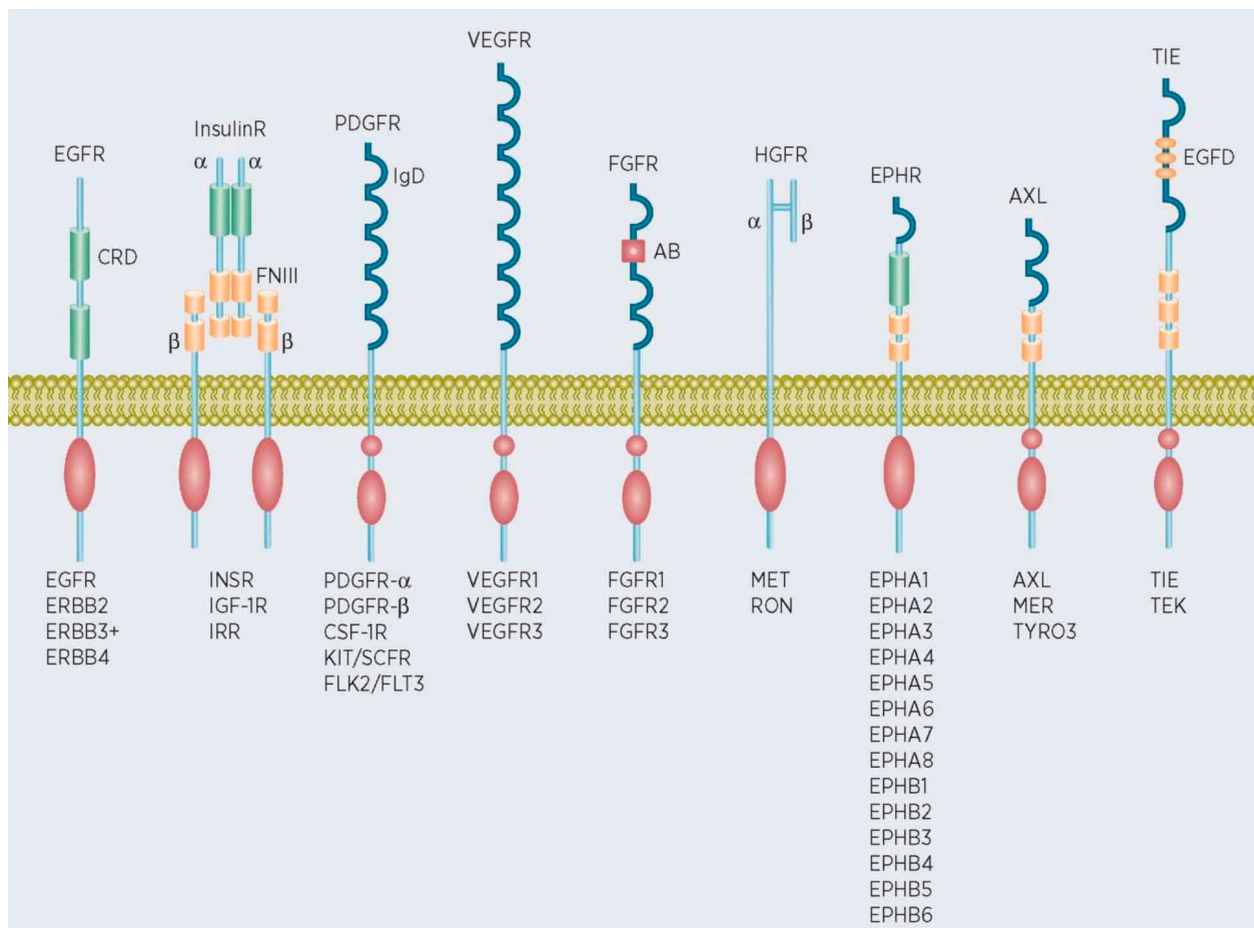


Figure 1.4 : Famille de récepteurs tyrosines kinases
 Représentation des différentes familles de récepteur tyrosine kinase.
 Adaptée de Antony & Huang, Cancer Research Review, 2017

Dans des conditions physiologiques normales, la fonction des RTK est étroitement régulée. Par contre, dans un contexte oncogénique, plusieurs RTK sont anormalement activés par différents mécanismes incluant des mutations activatrices, des réarrangements chromosomiques, des amplifications génomiques ou une régulation positive de leurs ligands [18-20]. De plus, des «crosstalks » entre RTK sont souvent observés dans le cancer et permettent une diversification des signaux qui augmente l'agressivité tumorale et mène à de la résistance aux traitements [21-23]. Ainsi, les RTK ont un rôle central dans la tumorigénèse et la progression métastatique et ils constituent donc des cibles thérapeutiques très intéressantes. De nombreux inhibiteurs de RTK sont d'ailleurs utilisés en clinique, mais plusieurs mécanismes de résistances ont été observés au cours de leur utilisation. Des exemples précis seront discutés plus bas pour la famille du récepteur à l'EGF, mais il est intéressant de noter que ces mécanismes peuvent s'appliquer à d'autres RTK.

1.1.3.2 HER2 et signaux tumorigéniques

Le récepteur humain de croissance épidermal 2 (HER2) appartient à la famille de récepteur à l'EGF comprenant EGFR/HER1/ERBB1, HER2/ERBB2, HER3/ERBB3 et HER4/ERBB4 [24] (Figure 1.4 et 1.5). La liaison de ligands incluant le facteur de croissance épithélial (EGF) et l'Héréguline (HRG ou Neuréguline (NRG)), permet un changement de conformation de ces récepteurs favorisant leur dimérisation et activation. Ces récepteurs présentent plusieurs aberrations dans le cancer incluant des mutations et des amplifications. EGFR est d'ailleurs une souvent ciblé pour le traitement de nombreux cancers. Cependant, une grande proportion de patients développe une résistance aux inhibiteurs de ce récepteur tyrosine kinase [25]. En effet, EGFR est connu pour ces nombreuses mutations activatrices permettant d'échapper aux agents le ciblant. La majorité des cas sont des délétions ou mutations ponctuelles qui déstabilise la conformation inactive du récepteur et favorise son activation constitutive [26, 27]. Ainsi, au cours des dernières décennies plusieurs générations d'inhibiteurs de EGFR ont été développées pour résoudre le problème de résistance. La première et deuxième génération ciblent le EGFR sauvage, la deuxième ayant l'avantage d'être irréversible grâce à sa liaison covalente au récepteur. Puis, pour pallier l'apparition de mutations sous les traitements précédents, une troisième génération de ces inhibiteurs a alors été développée pour cibler directement les mutants de EGFR [26, 27].

Contrairement aux autres membres de la famille, HER2 est un récepteur orphelin, ce qui veut dire qu'il n'a pas de ligand et qu'il doit s'associer avec un autre récepteur pour être activé. Il est en revanche dans une conformation basale le rendant accessible, ainsi la liaison d'un ligand sur un autre récepteur permet son association avec celui-ci et son activation. Lorsqu'HER2 est amplifié ou muté dans un contexte cancéreux, il est aussi plus susceptible à l'homodimérisation, ce qui augmente sa signalisation. Un autre membre de la famille, HER3, est aussi atypique puisqu'il n'a pas de domaine kinase actif. Ainsi il dépend d'un partenaire pour son activation. Le dimère HER2-HER3 a d'ailleurs été montré comme contribuant à la progression du cancer du sein HER2⁺ [24, 28]. Cette famille de récepteurs active plusieurs voies de signalisation intracellulaires incluant les MAP kinases, PI3 Kinase et SRC kinase menant à la transcription de gènes liés à la prolifération, la survie, l'angiogenèse, l'adhésion, l'invasion et la différenciation [29, 30]. Ainsi, l'amplification d'HER2 contribue à la croissance tumorale, l'invasion et la progression métastatique du cancer du sein. C'est pour ces raisons qu'il est considéré comme une cible thérapeutique de choix.

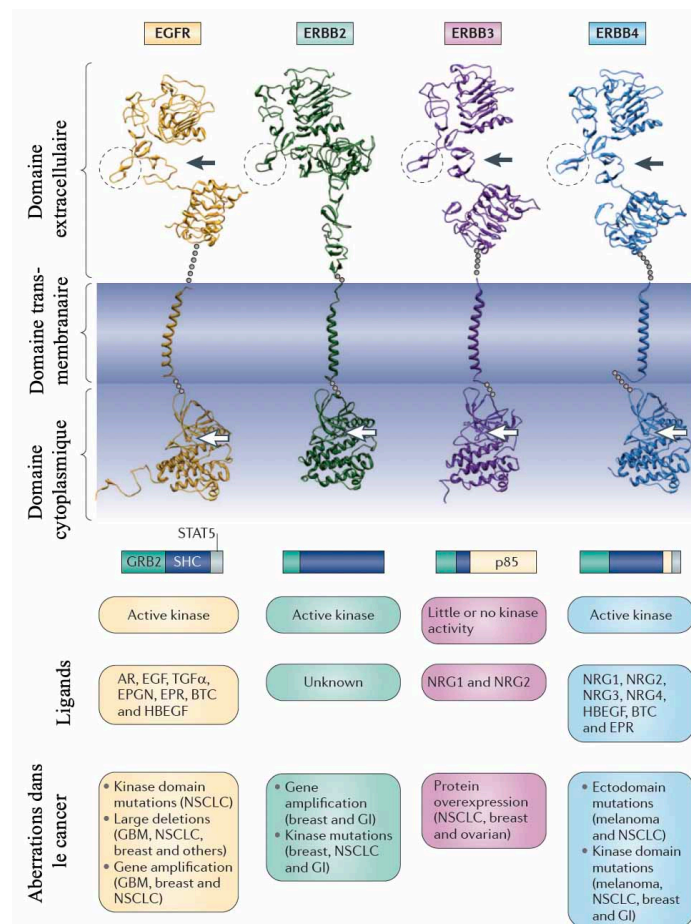


Figure 1.5 : Récepteurs de la famille de l'EGFR

Les structures cristallines des quatre membres de la famille sont représentées dans cette figure et montrent leurs trois domaines principaux. La flèche noire représente les poches de liaison du ligand, les cercles pointillés montrent les boucles de dimérisation et la flèche blanche pointe les fentes de liaison à l'ATP dans le domaine kinase. Des caractéristiques uniques à chacun sont ensuite listées sus chaque récepteur, incluant l'activité kinase, les ligands et les aberrations retrouvées dans différents cancers.

Adaptée de Yarden & Pines, Nature Review Cancer, 2012 [24].

1.1.3.3 Résistance aux traitements ciblant HER2

Les patients atteints de cancer du sein HER2⁺ peuvent bénéficier de thérapies ciblées qui permettent d'améliorer leur survie et qualité de vie. Malheureusement, beaucoup de ces patients ne répondront à ces agents ou développeront une résistance menant à une rechute et au développement de métastases, ainsi la survie à long terme est incertaine. Les mécanismes de résistances du Trastuzumab sont donc étudiés pour trouver des alternatives thérapeutiques puisqu'il est le traitement standard en clinique pour les cancers HER2⁺ [31, 32]. Le Trastuzumab (ou Herceptin) est un anticorps monoclonal humanisé recombinant dirigé contre le domaine extracellulaire de HER2 qui réduit son activité et peut déclencher son internalisation et sa dégradation. Le Trastuzumab permet aussi d'induire une réponse immunitaire contre les cellules ciblées, cette thérapie représente alors la première forme d'immunothérapie.

Par contre, plusieurs mécanismes de résistance à ce traitement ont été rapportés. Premièrement, des formes tronquées de HER2 peuvent surgir et empêcher la liaison de l'anticorps. Aussi, il est possible de retrouver dans une tumeur de l'hétérogénéité spatiale et cellulaire pour l'amplification d'*ERBB2* et l'expression de la protéine HER2, y compris la présence de cellules *ERBB2* non amplifiées et HER2-négatives (HER2-) qui résisteront aux traitements ciblant HER2 [33, 34]. Ensuite, la surexpression de d'autres RTK peut permettre de garder l'activation de signalisation en aval de HER2. Par exemple, la surexpression de HER3, dont la dimérisation avec HER2 n'est pas affectée par le Trastuzumab, permet de contourner l'inhibition [35]. Aussi, d'autres RTK comme IGF-1R et c-MET permettent de contourner HER2 pour activer les mêmes voies signalétiques et permettre la survie des cellules tumorales [36, 37]. Également, Cyclin D1/CDK4 permet de relâcher la rétroaction inhibitrice en amont de l'inhibition de EGFR/HER2, menant à une résistance [38, 39]. La combinaison d'inhibition de CDK4/6 et EGFR/HER2 permet alors une diminution de la prolifération de cellules de cancer du sein HER2⁺ *in vivo* [38]. Pour terminer, des mutations ou dérégulations d'expression de composés de voie de signalisation en aval de HER2 est aussi la cause de résistance, comme la perte de PTEN, la réduction d'expression p27 ou des

mutations activatrices dans PI3 kinase [31, 32]. De cette façon, il est envisagé de combiner l'utilisation du Trastuzumab avec des petites molécules inhibitrices ciblant HER2 comme le Lapatinib ou ciblant des éléments de signalisation alternatifs incluant des RTK et des éléments de signalisation en aval.

Plus récemment, il a été montré que le microenvironnement tumoral peut aussi grandement affecter la réponse au Trastuzumab [34]. En effet, comme une partie de son mécanisme d'action est d'induire une réponse cytotoxique immunitaire, un milieu immunosuppresseur peut atténuer ces effets [40]. Ainsi, la combinaison des agents d'immunothérapies pouvant augmenter la réponse immunitaire antitumorale est présentement testée et a récemment été approuvée pour le traitement des cancer gastriques HER2⁺ [41]. Ces études sont encore très préliminaires pour le cancer du sein et l'approche a besoin d'être raffinée pour obtenir de vrais bénéfices chez les patients [40, 42].

De cette façon, plusieurs avenues sont envisageables pour le traitement des patients résistants aux agents ciblant HER2 utilisés de routine en clinique. Plusieurs combinaisons de thérapies seront envisagées dans le futur pour optimiser la réponse et réduire la résistance. Le défi sera aussi de déterminer à quel patient ceux-ci bénéficieront, ce qui permettra de déjouer le pronostic de ce cancer agressif.

1.1.4 Modèle *in vivo* de cancer du sein

Pour étudier le cancer du sein, plusieurs modèles ont été développés pour mieux comprendre la maladie, trouver des cibles thérapeutiques et tester des traitements innovateurs. Les lignées de cellules cancéreuses dérivées de cancer humain ou souris permettent d'étudier des processus biochimiques et cellulaires dans des conditions bien contrôlées. Par contre, ces modèles *in vitro* ne permet pas de récapituler toute la complexité de la maladie qui dépend beaucoup de l'environnement et l'interaction avec d'autres types cellulaires de l'hôte. De cette façon, des modèles précliniques *in vivo* ont été développés et permettent de reproduire la progression tumorale dans son ensemble et récapituler les «Hallmarks» de cancer.

1.1.4.1 Transplantations

Il est possible d'injecter en souris des cellules cancéreuses pour étudier la progression tumorale. Par exemple, il est possible de transplanter des cellules cancéreuses sous-cutanées ou dans le coussin adipeux de la glande mammaire, offrant un environnement plus physiologique [8, 43]. L'initiation et la croissance tumorale peuvent alors être suivie et parfois la formation de métastases spontanées peuvent être monitorée. Des essais de métastases expérimentales sont aussi utilisés pour contourner la croissance de la tumeur primaire et observer directement la progression métastatique. Lors de ces essais, les cellules cancéreuses sont inséminées directement dans la circulation de la souris, par exemple par la veine de la queue (pour augmenter la proportion de métastases aux poumons) ou la veine splénique (pour le foie) [8, 44].

Les cellules utilisées peuvent alors être marquées pour faciliter leur détection *in vivo* grâce à l'expression de protéines reportrices fluorescentes ou bioluminescentes, comme le GFP ou la Luciférase. Plusieurs types de cellules peuvent être utilisées, incluant des lignées de cellules cancéreuses immortalisées et des xénogreffes dérivées de patients (PDX). Les PDX sont des fragments de tumeurs obtenus d'un patient suite à une chirurgie ou une biopsie qui peut être implantée dans un hôte murin [45, 46]. Ce modèle permet de garder l'hétérogénéité des échantillons, ce qui permet de modéliser un écosystème plus près de la réalité.

De plus, il est important de noter que la souris hôte doit être compatible avec les cellules injectées. Ainsi, pour la transplantation de cellules murines, il est important d'utiliser des souris du

même fond génétique (syngénique) duquel proviennent les cellules, sinon la greffe peut être ciblée et détruite par le système immunitaire de l'hôte. Ainsi, pour faire des xéogreffes, il faut utiliser des souris immunocompromises pour éviter ce rejet. Plusieurs souches de souris ont alors été générées avec des niveaux variés de déficience immunitaire, par exemple les souris Nude ou NSG. Par contre, ces modèles sont moins physiologiques puisqu'une portion de leur système immunitaire est manquante ou non-fonctionnelle, ainsi l'effet du système immunitaire sur la progression cancéreuse ne pourra pas être évalué. Pour pallier ce problème, des souris humanisées sont conçues pour soutenir un système immunitaire humain, ce qui permet de greffer des cellules humaines et mieux récapituler l'environnement tumoral présent chez le patient, mais ces modèles sont encore marginaux [45].

Ainsi, les modèles variés utilisant les greffes offrent des opportunités intéressantes pour étudier plusieurs aspects et étapes de la progression tumorale et métastatique. Par contre, plusieurs limitations existent puisque ces systèmes artificiels ne récapitulent pas toute la complexité de la maladie et sont peu physiologiques.

1.1.4.2 Lignées transgéniques

Les lignées transgéniques de cancer du sein sont des modèles précliniques plus physiologiques que les transplants. En effet, ces souris sont conçues pour développer spontanément des tumeurs et des métastases, ce qui permet d'étudier toutes les étapes de la progression tumorale et métastatique. Le Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV) est un rétrovirus dont les LTR sont utilisés comme promoteur pour permettre spécifiquement l'expression dans l'épithélium mammaire [47, 48]. Plusieurs modèles de cancer du sein ont alors été développés utilisant l'expression d'oncogènes sous ce promoteur, incluant les souris MMTV-PyVMT et les souris MMTV-Neu et ses dérivés [44, 47, 49].

Bien que plusieurs modèles de souris manipulant des gènes humains ou leurs orthologues soient disponibles, un oncogène viral non physiologique, l'antigène Polyomavirus middle T (PyVMT), exprimé sous le promoteur MMTV est largement utilisé pour modéliser le cancer du sein. Cet oncogène possède une section intracellulaire ressemblant beaucoup à la queue interne d'un récepteur tyrosine kinase et permettant la transmission de signaux oncogéniques [50]. Ainsi,

les souris MMTV-PyVMT phénocopie la progression de la maladie humaine en développant des tumeurs mammaires qui progressent en métastases, mais ce modèle reste assez artificiel puisque l'oncogène n'est pas physiologique.

Suite à la découverte de la surexpression de HER2 dans le cancer du sein, des modèles de souris transgéniques ont été développés pour étudier les habilités de cet oncogène [48]. La surexpression dans la glande mammaire d'une forme active de Neu, l'orthologue de HER2 du rat, mène au développement de tumeurs et de métastases spontanées. Le variant d'abord utilisé, Neu-NT, consiste en une mutation simple dans le domaine transmembranaire permettant la dimérisation indépendante de ligand menant à une activation constitutive [47]. Par contre, des mutations similaires ne sont pas retrouvées dans la maladie humaine. Plus tard, des variants de Neu ont été découverts, Neu-NDL1 et Neu-NDL2, et ces derniers ressemblent fortement à l'isoforme HER2 delta16 décrit chez l'humain [28, 51]. Ce transcrite alternatif d'HER2 a d'ailleurs été associé à une résistance au Trastuzumab et à une augmentation de la formation de métastases [52-54]. Les variants Neu-NDL possèdent une délétion dans la région juxtamembranaire qui permet une homodimérisation constitutive grâce à la formation de ponts de cystines, comme pour HER2 delta16 (Figure 1.6). Ce modèle permet alors de se rapprocher davantage de la maladie humaine.

Ce modèle a aussi été couplé avec le système Cre-Lox pour générer des souris MMTV-Neu-NDL2.5-IRES-Cre nommées MMTV-NIC. Dans ces souris, la Cre recombinase est insérée après Neu-NDL2.5 grâce à un site d'entrée interne du ribosome (IRES) [55]. Ainsi, toutes les cellules transformées par l'oncogène exprimeront la Cre recombinase qui permet la délétion d'un gène d'intérêt. De plus, plus de la moitié des souris MMTV-Neu et MMTV-NIC développe des métastases, ainsi ce sont des modèles idéaux pour étudier la progression tumorale et métastatique en évaluant la contribution d'un gène d'intérêt dans ces processus. De plus, un modèle inductible à la tétracycline (MMTV-rtTA/TetO-NeuNT) permettant de contrôler dans le temps l'expression de l'oncogène [56]. Ce modèle permet d'ailleurs d'étudier les cas de rechute indépendant de HER2 qui pourraient refléter une résistance aux traitements anti-HER2 chez certains patients.

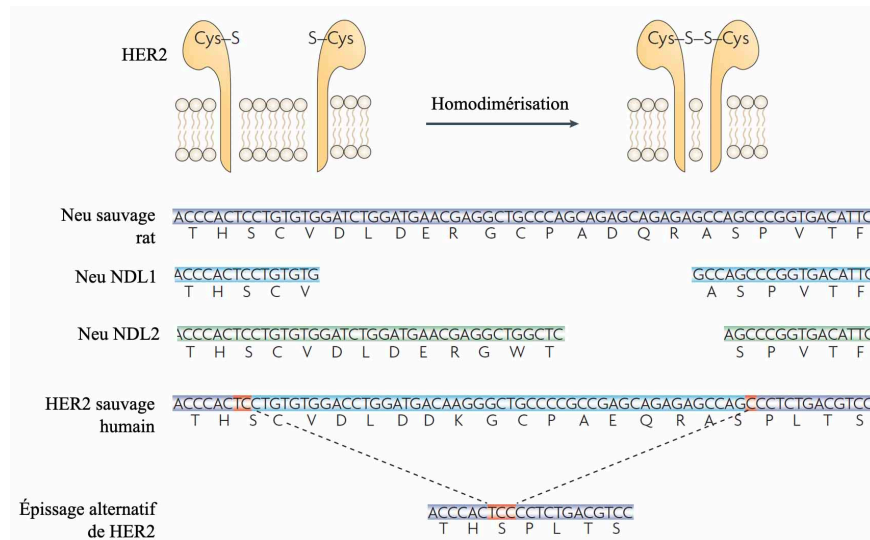


Figure 1.6 : HER2/Neu et leurs variants oncogéniques

La séquence illustrée représente la section juxtamembranaire des récepteurs HER2 de l'humain et son orthologue chez le rat, Neu. Les variants de Neu (NDL1 et NDL2) mènent à la génération d'une protéine constitutivement active suite à la formation d'homodimères grâce à des ponts disulfures. Ces variants sont semblables à un variant d'épissage alternatif de l'oncogène humain HER2.

Adaptée de Ursini-Siegel et al., Nature Review Cancer, 2007 [48]

1.1.5 Conclusion

En conclusion, les modèles *in vivo* de cancer du sein permettent de recréer un contexte physiologique qui tient compte d'un écosystème caractérisé par des interactions entre les cellules tumorales et son hôte. Ainsi, ces modèles permettent d'étudier des cibles thérapeutiques potentielles ou des avenues de traitements en étant le plus près possible de la réalité du patient dans sa complexité et son hétérogénéité. Ces modèles sont donc essentiels à l'étude du processus hautement complexe qui est la progression métastatique. Par contre, aucun modèle n'est parfait et ne représente exactement toute la complexité et le contexte unique de chaque patient. Ainsi, de meilleurs modèles devront être développés pour permettre de vraiment refléter le contexte clinique et développer des médicaments efficaces et personnalisés.

1.2 Les métastases, un défi clinique

L'invasion et la formation de métastases représentent un «Hallmark» important du cancer qui est étroitement lié à la survie. En effet, lorsqu'un cancer s'étend à d'autres organes, un processus appelé la progression métastatique, il devient très difficile à cibler et traiter. De plus, la majorité des décès du cancer sont causés par ces tumeurs secondaires, ainsi il y a un besoin criant de trouver des approches thérapeutiques ciblant ce processus [3, 57].

1.2.1 La cascade métastatique

La formation de métastatique requière plusieurs étapes complexes et demeure un aspect peu compris de la biologie du cancer. Ce processus, appelé cascade métastatique, requiert l'acquisition de certains traits par les cellules cancéreuses ainsi que la coopération de plusieurs cellules non néoplasiques composant le stroma [3, 57, 58]. La cascade métastatique se divise en étapes : invasion locale des cellules cancéreuses, entrée dans la circulation (intravasation), survie dans la vasculature, arrêt au site distant, entrée dans un organe secondaire (extravasation), survie dans l'organe secondaire et croissance pour former des métastases macroscopiques (Figure 1.7) [3, 59]. Ce processus est peu efficace puisque plusieurs embûches attendent les cellules cancéreuses à toutes ces étapes. Elles doivent s'adapter pour arriver à coloniser un organe distant, ce qui nécessite plusieurs capacités décrites comme «Hallmarks» comme la plasticité cellulaire, l'évasion immunitaire, la résistance à l'apoptose, la coopération avec d'autres cellules tumorales et stromales et la capacité d'entrer et sortir de dormance [57]. Une meilleure compréhension de toutes ces étapes est requise pour développer des stratégies thérapeutiques efficaces et améliorer le pronostic des cancers métastatiques.

1.1.2.1 Invasion locale et intravasation

La première étape débutant l'initiation métastatique est le goulot d'étranglement du processus et représente une cible intéressante. Cette étape de la cascade métastatique, l'intravasation, est dépendante de la capacité invasive des cellules cancéreuses (Figure 1.7). La migration et l'invasion cellulaire sont des processus critiques pour le développement et le bon fonctionnement des organismes complexes. Au cours de la progression de nombreuses pathologies,

telle que le cancer, les cellules affectées peuvent utiliser ces processus à leur avantage. Dans les tumeurs, la migration et l'invasion cellulaire sont utilisées par les cellules néoplasiques pour envahir le tissu environnant et se disséminer pour former des métastases qui mettent en danger la vie des patients [60].

La migration et l'invasion cellulaire sont des processus en plusieurs étapes qui impliquent l'activation de voies de signalisation variées et requièrent la coordination de plusieurs composants cellulaires. Les cellules remodelent leurs jonctions cellule-cellule, leur cytosquelette, leurs points d'adhésion et digèrent la matrice extracellulaire les entourant pour se déplacer dans le tissu. Pour y arriver, les cellules activent une cascade d'événements impliquant plusieurs molécules. Premièrement, le cytosquelette se polarise pour former des protrusions vers la direction de migration et des points d'adhésion permettent un ancrage à la matrice extracellulaire pour générer une forme de traction [61, 62]. De plus, une protéolyse locale a lieu pour permettre à la cellule de se frayer un chemin dans le tissu [63]. À l'arrière de la cellule, les points d'adhésion se dissolvent pour permettre l'avancement et ce cycle se poursuit [62]. Pour que l'invasion soit efficace dans un contexte métastatique, la migration cellulaire doit être dirigée et dépend alors de la capacité des cellules à détecter et évoluer vers des gradients de chemoattractants. Les chemokines, cytokines et facteurs de croissance se lient à des récepteurs spécifiques de la membrane cellulaire comme les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) et récepteurs tyrosine kinases (RTK) qui activent alors des voies de signalisation permettant le remodelage polarisé du cytosquelette [60].

Les cellules cancéreuses peuvent migrer en solo ou en groupe en conservant leurs jonctions cellules-cellules. Les cellules migratoires solitaires peuvent se déplacer selon deux modes interconvertibles : arrondie (migration amiboïde) ou allongé (migration mésenchymale) [64]. Les cellules qui entreprennent une migration collective peuvent quant à elles entrer dans la circulation en agrégats en entraînant des cellules stromales et cette coopération les aide pour la suite du processus métastatique [65-67].

Dans le processus d'intravasation, les cellules cancéreuses migrent vers les vaisseaux sanguins et lymphatiques où elles pénètrent. Les cellules doivent alors traverser la membrane basale, la barrière de péricytes et la paroi endothéliale, qui forme le mur vasculaire, pour entrer dans la circulation. Plusieurs cytokines comme le VEGF ou le TGF- β sécrétés par les cellules

cancéreuses où les cellules stromales aident à ce processus en augmentant la perméabilité vasculaire et dissociant les jonctions entre les cellules endothéliales [68] (Figure 1.7).

1.1.2.2 Survie dans la circulation et extravasation

Les tumeurs primaires peuvent produire une grande quantité de cellules cancéreuses dans la circulation, mais seulement une petite fraction de ces cellules seront capables de former des métastases cliniques [57]. Les étapes suivant l'entrée dans la circulation sont donc cruciales à la formation de métastases. Les cellules cancéreuses entrées dans la circulation, nommées cellules tumorales circulantes (CTC), doivent survivre à d'énormes stresses incluant des pressions immunologiques, des forces hémodynamiques et de fréquentes collisions avec des cellules sanguines en circulation et les murs des vaisseaux [63]. Les cellules doivent aussi être résistantes à la mort cellulaire programmée causée par un détachement de la matrice extracellulaire, l'anoïkis. Seules les cellules capables de survivre et même d'exploiter ces conditions pourront en ressortir dans un organe distant pour former des métastases. Par exemple, les cellules circulantes s'associent souvent avec des cellules de la circulation comme des cellules immunitaires et des plaquettes pour les aider dans ce processus [57, 68, 69]. Ainsi, la caractérisation des CTC devient potentiellement un biomarqueur utilisé en clinique pour le diagnostic et le pronostic. Comme les CTC sont peu abondantes dans la circulation (typiquement 1 CTC par 1-10 millions de cellules immunitaires), la recherche d'ADN provenant de ces cellules apparaît comme une solution plus viable pour la clinique [65].

Suite à leur périple dans la circulation, les CTC doivent s'arrêter et cette étape peut arriver de deux façons. En effet, les cellules peuvent être physiquement piégées par leur arrivée dans un vaisseau de petite taille ou adhérer aux murs de vaisseaux d'un organe distant grâce à des molécules d'adhésions exprimées à la surface des CTC et des cellules endothéliales [63, 68, 69]. Certaines cellules peuvent arrêter leur voyage ici et croître directement à l'intérieur des vaisseaux [68]. Sinon, les cellules cancéreuses entreprennent de retraverser la barrière endothéliale, l'extravasation. Des cytokines et chemokines sécrétées par les cellules cancéreuses ou par les cellules circulantes associées augmentent alors la perméabilité locale pour permettre la migration transendothéliale [68] (Figure 1.7).

1.1.2.3 Croissance au site secondaire et dormance

À leur sortie de la circulation, les cellules doivent s'adapter à un environnement étranger. Le destin des cellules qui ont été capables de faire l'extravasation peut être de mourir, rester en dormance ou proliférer pour former des métastases (Figure 1.7). Certaines cellules disséminées seront portées à se mettre en dormance au lieu de proliférer, un état de quiescence cellulaire où elles ne se divisent pas et restent cachées du système immunitaire. Ces cellules disséminées endormies sont peu vulnérables aux thérapies anti-tumorales et peuvent causer des rechutes lorsqu'elles se réveillent, parfois plusieurs années après que les patients ont montré une absence de signes cliniques [70, 71]. Par contre, il n'y a toujours pas de preuve de la dormance en clinique, mais plusieurs modèles animaux précliniques ont montré son existence [72]. Le mécanisme de sortie de dormance est encore très peu connu et semble être régi par des signaux intrinsèques et extrinsèques [71, 73].

L'environnement que les cellules disséminées rencontreront aura une forte incidence sur l'issue du processus métastatique. En 1889, Dr Steven Paget pose l'hypothèse « graine et sol » (seed and soil) qui tient encore de nos jours [10, 74]. Cette hypothèse propose que certaines cellules tumorales (graine) aient une affinité spécifique pour le milieu de certains organes (sol) et que les métastases se forment seulement lorsque la graine et le sol sont compatibles. Ainsi, ce processus n'est pas dû au hasard, comme on le croyait à l'époque, mais bien à un microenvironnement réceptif, nommé la niche métastatique. Cette niche représente un écosystème complexe incluant une variété de cellules stromales et de facteurs qui vont influencer le destin des cellules cancéreuses y résidant. Certains microenvironnements peuvent soutenir la formation de macrométastases en entretenant le caractère souche des cellules, en régulant activement la prolifération cellulaire et en favorisant l'angiogenèse et l'évasion immunitaire [69, 73]. D'autres niches favorisent plutôt une dormance cellulaire par la sécrétion de facteurs supportant l'arrêt et la survie cellulaire [57, 70, 71]. Ces niches se forment en réponse à des facteurs sécrétés par les cellules tumorales (localement ou à distance) ou peuvent être préexistantes. Elles sont en constante évolution pour soutenir les besoins des cellules cancéreuses [73, 75].

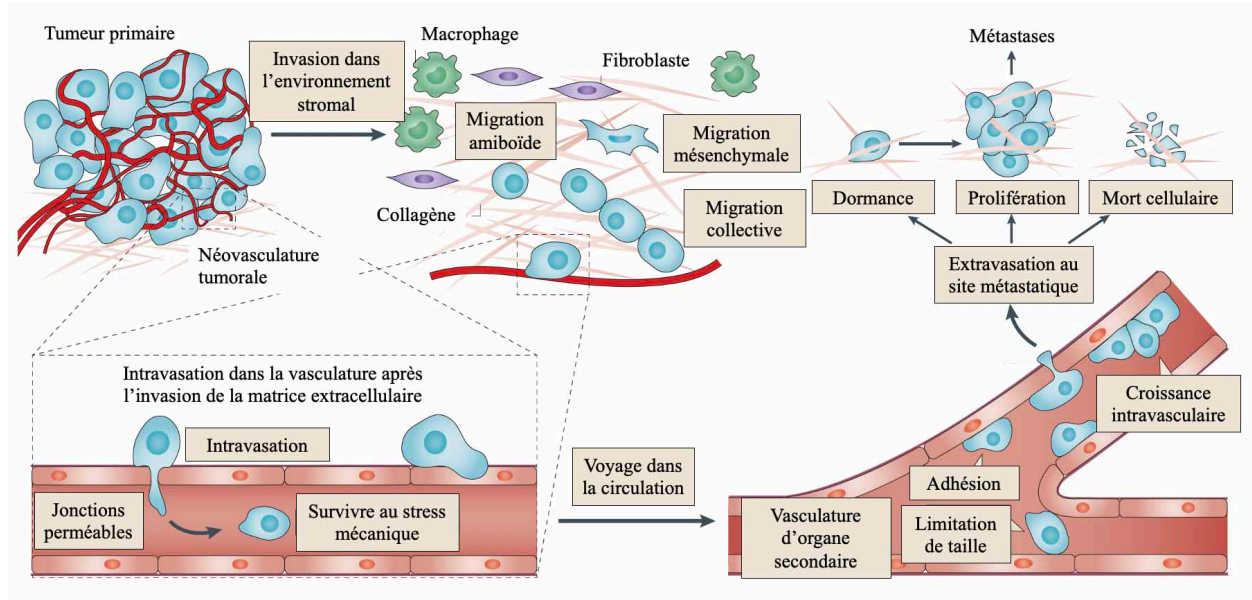


Figure 1.7 : La dissémination de cellules métastatiques

Dans la tumeur primaire, quelques cellules cancéreuses acquièrent des propriétés invasives qui leur permettent d'envahir l'environnement stromale en utilisant différents modes de migration. Certaines cellules migrent alors vers les vaisseaux et pénètrent dans la circulation en traversant les jonctions des cellules endothéliales. Dans la circulation, elles doivent survivre à plusieurs stress et voyager à travers le corps vers un organe secondaire. Une fois arrivées, les cellules s'arrêtent soit parce qu'elles sont freinées par la diminution de la taille du vaisseau ou parce qu'elles adhèrent à la paroi vasculaire. Par la suite, les cellules peuvent croître directement dans la lumière du vaisseau ou extravaser au site métastatique où elles peuvent mourir, entrer dans un état de dormance ou proliférer pour former des métastases. Adaptée de Reymond et al., Nature Reviews, 2013 [68].

Malheureusement, la cascade métastatique n'est pas un processus restreint aux tumeurs avancées et invasives de haut grade. Effectivement, plusieurs études montrent que des cellules peuvent quitter le lieu primaire de néoplasie avant même l'apparition d'une tumeur primaire cliniquement détectable [71, 76-79]. Ainsi, il est crucial de mieux comprendre les mécanismes régissant la survie et la prolifération des cellules disséminées pour pouvoir réduire les rechutes et la mortalité des patients atteints.

1.2.2 La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT)

Le processus métastatique est très complexe et requiert l'adaptation des cellules cancéreuses et l'acquisition de caractéristiques cellulaires variées. Le processus de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est un programme dynamique et plastique qui donne plusieurs avantages aux cellules cancéreuses métastatiques. L'EMT permet aux cellules épithéliales d'acquérir des caractéristiques mésenchymales comme une motilité accrue, une résistance à l'apoptose et une réduction de la prolifération [80-83]. Ce programme cellulaire est essentiel dans les tissus normaux durant le développement (gastrulation, la formation de la crête neurale, etc.) ou la cicatrisation, mais il est aussi activé dans des contextes pathologiques comme la fibrose et la progression tumorale. Il a été montré nécessaire particulièrement au cours de la cascade métastatique (Figure 1.8). Il est important de noter que ce processus n'est pas binaire, ce qui veut dire que les cellules présentent un spectre d'états intermédiaires entre un phénotype purement épithélial ou purement mésenchymal. Ainsi, le terme plasticité épithélio-mésenchymateuse (EMP) semble être plus approprié pour définir ce processus et fait l'objet d'un consensus dans la communauté [80].

L'EMT peut être déclenchée par différents éléments environnementaux comme l'hypoxie, l'inflammation, les stressés mécanique ou le traitement avec des drogues et plusieurs facteurs de signalisation tels que TGF- β , Wnts et interleukines. Ces signaux permettent l'augmentation de facteur de transcription (incluant Snail, Slug, Zeb et Twist), de régulateurs épigénétiques et post-transcriptionnels comme des microARN modulant l'expression de protéines qui permettront l'acquisition de caractéristiques utiles durant la cascade métastatique [80-84]. Au départ, les cellules épithéliales modifient leurs molécules d'adhésions et augmentent l'expression de métalloprotéinases matricielles, favorisant un comportement migratoire. La perte de polarité apico-basale remplacée par une polarité avant-arrière et la diminution des contacts cellule-cellule et la fixation à la matrice extracellulaire permet donc d'envahir le tissu adjacent à la tumeur et faciliter l'intravasation. Il a même été montré que ce processus peut arriver très tôt, ce qui contribue à la dissémination précoce [77]. Cette augmentation de motilité est aussi utile lors de l'extravasation et l'invasion d'un organe secondaire [3, 82, 85] (Figure 1.8). De plus, il est intéressant de noter que l'EMT ne permet pas seulement la migration en solo, mais qu'elle participe également à la migration collective où le groupe migratoire présente des cellules avec des degrés variés d'EMT

permettant de maintenir des jonctions cellules-cellules tout en favorisant un phénotype migratoire [67, 86].

En plus d'augmenter l'invasion cellulaire, l'EMT confère une résistance à l'anoïkis, un arrêt du cycle cellulaire et une certaine flexibilité/déformabilité qui augmente la survie dans la circulation et l'environnement hostile de l'organe secondaire [80, 84, 85]. En effet, l'expression de marqueur mésenchymal a été montrée présente dans les CTC et ces traits devenant prédominants chez les patients résistants aux traitements [85, 87]. De plus, l'EMT permet l'acquisition de propriétés de cellules souches permettant l'initiation tumorale, un élément important pour la colonisation métastatique [84, 86]. Ainsi, l'EMT est associé à une rechute clinique puisqu'il contribue à la résistance à plusieurs thérapies et à la dormance [3, 57, 84]. De cette façon, le processus inverse de l'EMT, la transition mésenchymateuse-épithéliale (MET) est nécessaire lors de la croissance de métastases [80, 82]. Le MET est en effet associé à une perte de liberté de mouvement et permet de retrouver une capacité de prolifération. De plus, un concept émergent souligne que l'EMT est aussi lié à l'inflammation, où cellules cancéreuses mésenchymale sécrètent des facteurs proinflammatoires [88]. Ces cytokines induites par l'EMT peuvent alors moduler le microenvironnement tumoral ou métastatique pour favoriser sa progression en dialoguant avec les cellules stromales.

Ainsi, ce programme hautement dynamique et plastique est utilisé tout au long de la cascade métastatique et favorise la réussite de ce processus par plusieurs mécanismes.

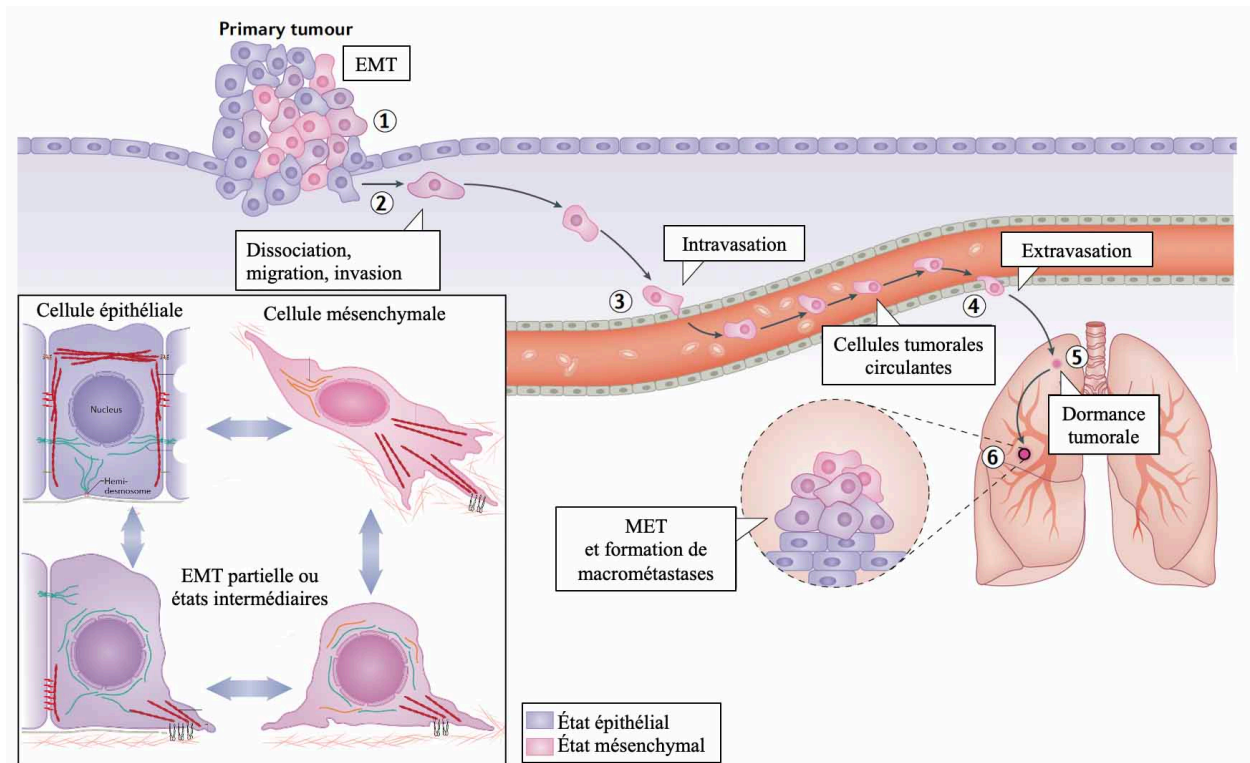


Figure 1.8 : L'EMT et MET dans la cascade métastatique

Le processus d'EMT est illustré par un modèle de plasticité épithéliale-mésenchymateuse (en bas à gauche). Les cellules épithéliales sont caractérisées par une polarité apico-basale et sont connectées entre elles et avec la membrane basale. Quant à elles, les cellules mésenchymales sont libres d'attaches, motiles et présentent une polarité avant-arrière. Lors de l'EMT ou MET, la perte ou le gain de caractéristiques épithéliales ou mésenchymateuses poussent les cellules vers divers intermédiaires d'états de manière dynamique et réversible. Ce programme dynamique est utilisé par les cellules cancéreuses pour promouvoir la formation de métastases. Un gradient de couleur (du rose au mauve) illustre l'état épithélio-mésenchymateux des cellules au cours de la cascade métastatique. Dans la tumeur primaire, quelques cellules acquièrent des caractéristiques mésenchymales qui leur permettent d'intravaser, de survivre dans la circulation et d'extravaser. Une fois dans l'organe distant, les cellules retrouvent des caractéristiques épithéliales qui permettent la formation de macrométastases.

Adaptée de Yang et al., Nature Reviews, 2020 [80]

1.2.3 TGF- β

Le TGF- β (Transforming Growth Factor beta) est un facteur important dans la progression tumorale et est sécrété particulièrement par un stroma réactif [89]. Le TGF- β a plusieurs effets tumorigéniques qui inclue une augmentation de la croissance et de l'invasion et il est connu comme initiateur d'EMT [89].

La voie de signalisation du TGF- β est une voie classique de signal membrane-noyau impliquant une activation direct des facteurs de transcription SMAD en aval de récepteurs membranaires, TGFBR1 et TGFBR2 [89, 90]. SMAD2 et SMAD3 sont des substrats directs de ces récepteurs en réponse au TGF- β et leur activation permet leur liaison à SMAD4 pour former un complexe transcriptionnel. Ce complexe activé peut ensuite interagir avec différents partenaires de transcription et permettre l'expression de gènes dépendant du contexte cellulaire. Dans les cellules cancéreuses, ce programme peut avoir des effets suppresseurs ou promoteurs de tumeur [90, 91]. En effet, lors de la progression pré-maligne du cancer, le TGF- β peut induire l'apoptose et réduire la prolifération cellulaire. Par la suite, une transformation des cellules cancéreuses (causée par exemple par des altérations génétiques) peut entraîner une réécriture du programme. En effet, pendant la progression tumorale, le TGF- β induit l'expression de plusieurs gènes protumoraux, incluant des cytokines, des mitogènes et des facteurs de transcription induisant l'EMT [89, 91, 92].

Dans des modèles murins de cancer du sein HER2⁺, l'expression d'une forme active de TGFBR1 ou de TGF- β 1 réduit la tumorigénèse, mais augmente la formation de métastases [93, 94]. D'ailleurs, grâce au traçage de l'activation des voies de signalisation du TGF- β *in vivo*, le TGF- β a été montré essentiel à l'intravasation de cellules solitaires dans la circulation sanguine où le TGF- β est sécrété par les cellules périvasculaires [95, 96]. Le TGF- β est aussi sécrété par les plaquettes interagissant avec les CTC lors de leur transport dans la circulation, les préparant ainsi à l'extravasation en favorisant un état mésenchymal [97]. De plus, les cellules transformées par le TGF- β sont plus résistantes aux thérapies et favorise l'état de dormance tumorale [72, 96]. Ainsi, grâce à ces capacités d'induire l'invasion et l'EMT, le TGF- β a été montré utile dans plusieurs étapes de la cascade métastatique.

Le TGF- β est un aussi facteur clé jouant sur le microenvironnement tumoral puisqu'il permet une activation protumorale de cellules stromales comme les fibroblastes et les cellules immunitaires [89, 90]. Par exemple, il a un rôle crucial dans l'homéostasie immunitaire en inhibant l'expansion et les fonctions de certaines cellules immunitaires [90]. Ainsi, il est associé à de l'évasion immunitaire et une faible réponse à l'immunothérapie [90, 98]. De plus, le TGF- β influence la transformation des fibroblastes associés au cancer (CAF) qui peuvent à leur tour favoriser la prolifération, l'invasion et l'angiogenèse tumorale [89, 99]. Ainsi, l'effet du TGF- β sur le microenvironnement, contribue aussi grandement à la progression métastatique.

1.2.4 Conclusion

En conclusion, la progression métastatique est une cascade d'événements qui requière une variété de processus cellulaires au cours de chaque étape de ce parcours complexe. L'EMT et l'activation des voies du TGF- β contribue au succès de cette entreprise malheureuse. En revanche, un débat est en cours dans la communauté sur le rôle de l'EMT dans la formation des métastases puisque deux études publiées simultanément dans la prestigieuse revue Nature ont émis des évidences montrant que ce processus contribuerait surtout à la résistance aux drogues et ne serait pas essentiel à la formation de métastases [100, 101]. D'autres études devront être faites pour mieux éclairés la situation et cette controverse sera plus amplement discuté dans la section discussion de cette thèse.

Bref, il est important de bien comprendre les processus entourant la progression métastatique pour être en mesure d'approcher ce problème clinique qui cause la majorité des décès liés au cancer. Le rôle du microenvironnement dans ce processus n'est pas à négliger et sera discuté dans la section suivante. Malgré les avancées faites pour comprendre la formation des métastases, leur présence mène à un diagnostic fatal pour les patients. Les recherches doivent donc se poursuivre pour mieux limiter sa progression et être en mesure de sauver la vie des patients affectés.

1.3 : Microenvironnement tumoral

La progression tumorale et métastatique est aussi fortement influencée par le milieu entourant les cellules cancéreuses, soit le microenvironnement tumoral. Celui-ci est composé non seulement des cellules cancéreuses et leur environnement physique, mais aussi d'une multitude de cellules normales comme des fibroblastes, cellules vasculaires et des cellules immunitaires qui sont transformées ou éduquées pour supporter la progression tumorale (Figure 1.9) [102]. En effet, la tumeur est un écosystème où tous les éléments sont interdépendants et communiquent entre eux pour promouvoir la croissance, la survie et la formation de métastases [103]. La composition et les caractéristiques du microenvironnement peut alors permettre de prédire l'efficacité des thérapies et l'issue de la maladie, ce qui permet de l'utiliser comme marqueur pronostique. De plus, cibler le microenvironnement et les cellules stromales est une avenue thérapeutique intéressante puisqu'il permet entre autres d'augmenter l'efficacité des thérapies anticancéreuses [104].

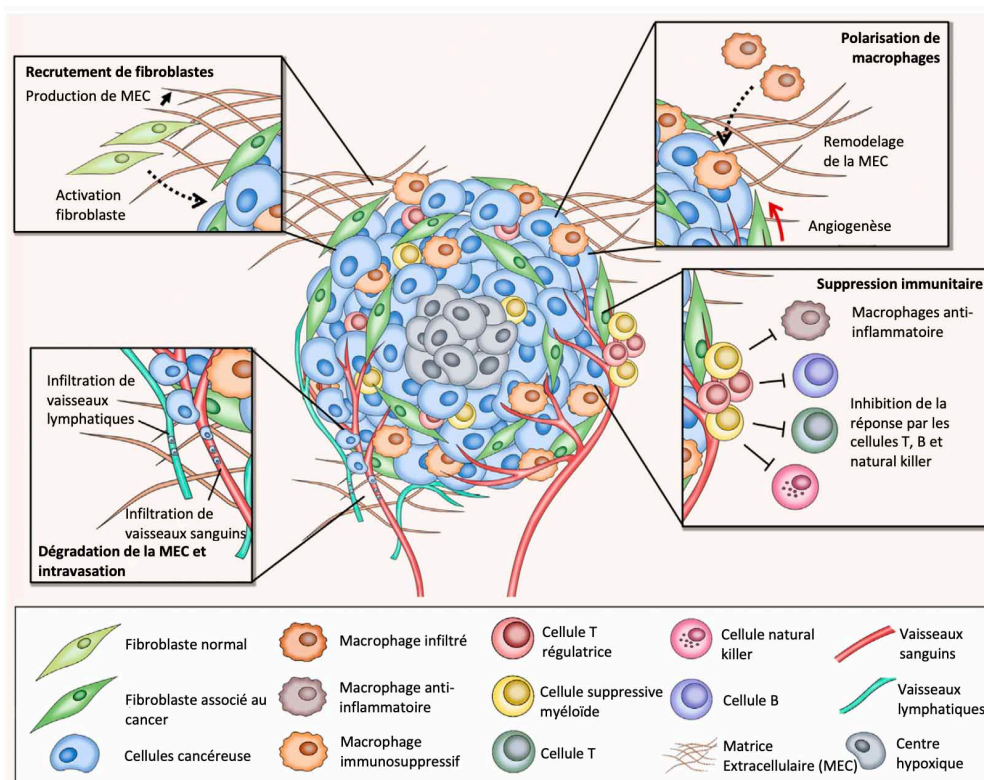


Figure 1.9 : Survol du microenvironnement tumoral

Représentation du microenvironnement tumoral incluant une grande variété de types cellulaires engagés dans des processus clés à la progression tumorale, incluant le recrutement de fibroblastes, la vascularisation, la polarisation de macrophages et la suppression immunitaire.

Adaptée de Rodrigues et al., Trends in Cancer, 2021 [105].

1.3.1 : Hypoxie

L'hypoxie, soit un faible niveau d'oxygène dans les tumeurs est un élément très important du microenvironnement qui affecte une grande variété de processus. Elle est causée par une croissance tumorale rapide qui mène à une diminution du niveau d'oxygène dans certaines régions tumorales moins bien perfusées. Cet état hypoxique est un élément central du microenvironnement puisqu'il génère une réponse adaptative qui modifie drastiquement le comportement des cellules exposées. De plus, l'hypoxie est associée à un mauvais pronostic et à la présence de métastases dans plusieurs types de cancers solides, incluant le cancer du sein [106, 107]. Ainsi, l'hypoxie joue un rôle important dans la progression tumorale et métastatique.

1.3.1.1 : Facteurs de transcription induits par l'hypoxie (HIFs)

La réduction du niveau d'oxygène mène à une adaptation cellulaire qui est orchestrée par les facteurs de transcription HIFs qui comprennent trois membres, soit HIF-1, HIF-2 et HIF-3. Ces facteurs se comportent en hétérodimères composés d'une sous-unité alpha (HIF-1 α , 2 α , 3 α) et d'une sous-unité commune HIF-1 β . En condition oxygénée, les HIF- α sont très instables avec une demi-vie inférieure à 5 minutes, leur niveau protéique est donc faible [108, 109]. En effet, ces derniers sont modifiés par une famille d'enzymes prolyl-hydroxylase (PHD, Prolyl hydroxylase domain-containing proteins), dont l'activité catalytique est dépendante de la concentration d'O₂. L'hydroxylation de HIF- α permet alors le recrutement de l'E3 ubiquitine ligase von-Hippel Lindau (VHL) qui entraîne sa dégradation rapide par le protéasome. Ainsi, lorsque les niveaux d'O₂ diminuent dans la cellule, ce mécanisme de dégradation est levé et les HIFs peuvent s'accumuler. Ces facteurs de transcription entraînent alors la transcription d'éléments qui permettront une adaptation à l'hypoxie. Dans un contexte oncogénique, certains récepteurs tyrosine kinase peuvent aussi influencer HIF dans des conditions oxygénées en jouant sur sa transcription, sa stabilité, sa synthèse et son activité via différentes voies de signalisation incluant PI3K/AKT, JAK/STAT3, et MAPK [110-112] (Figure 1.10).

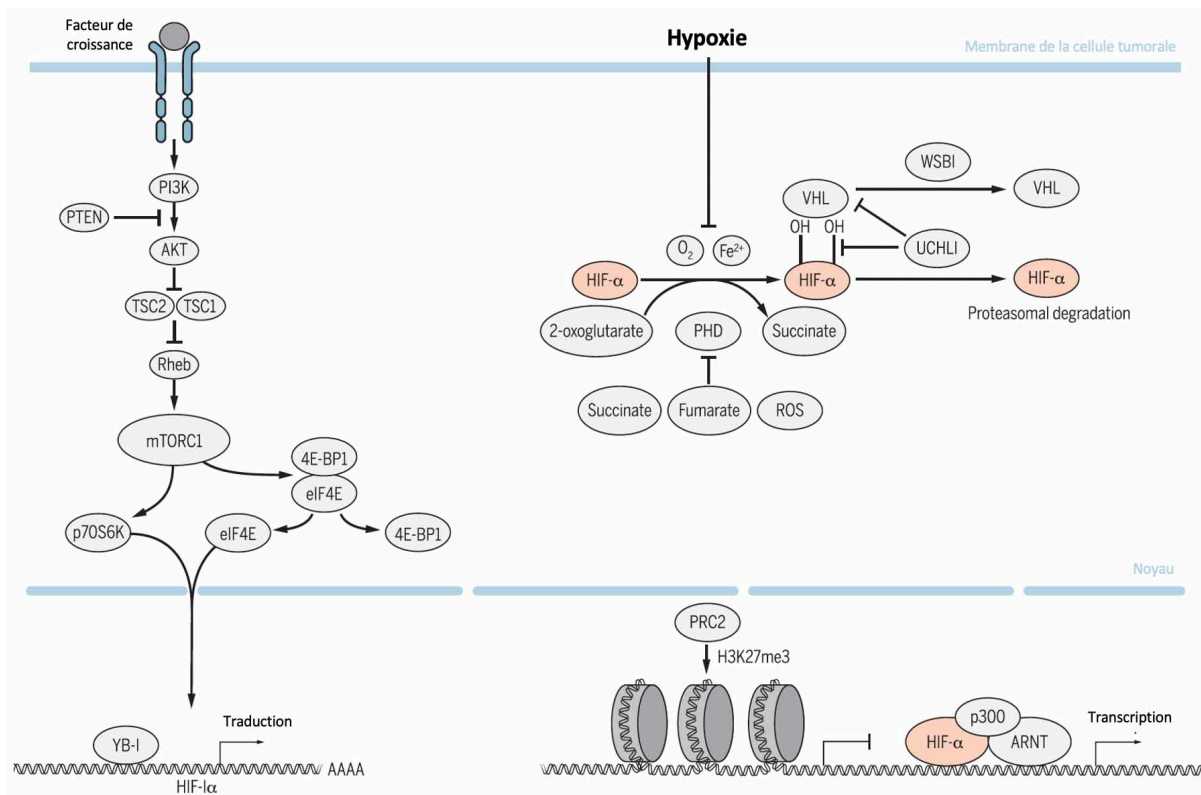


Figure 1.10 : Mécanisme d'activation de HIF-1 α dans les cellules cancéreuses

La diminution du niveau d'oxygène ou hypoxie est la principale cause de l'activation de HIF- α . Ainsi, dans des conditions de normoxie, les enzymes PHD utilisent l'oxygène pour hydroxyler la sous-unité HIF- α ce qui entraîne son interaction avec pVHL menant à son ubiquitination et dégradation. Ainsi, en hypoxie, HIF- α est moins dégradé et peut transloquer au noyau où induit la transcription de gènes sous les éléments de réponse à l'hypoxie (HRE). Les cellules cancéreuses peuvent aussi augmenter l'expression de HIF-1 α via la signalisation de RTK. Par exemple, TORB1 ou YB-1 peuvent augmenter la production de HIF-1 α ou UCHL1 et WSB1 peuvent prévenir sa dégradation. Adaptée de Rankin et Giaccia, Science, 2016 [113]

Les facteurs de transcription HIF orchestrent la réponse adaptative à l'hypoxie en augmentant l'expression d'une grande variété de gènes sous un élément de réponse à l'hypoxie (HRE, hypoxia-response element). Ces gènes induits par l'hypoxie sont liés à une multitude de processus incluant l'angiogenèse, la reprogrammation métabolique, le remodelage de la matrice extracellulaire, l'invasion cellulaire, l'EMT, la maintenance de caractères souches et l'évasion immunitaire [114]. C'est de cette façon que l'hypoxie est un joueur très important dans la progression métastatique et la dérégulation du microenvironnement en influençant le comportement des cellules tumorales et stromales. Il est aussi intéressant de noter que les recherches sur l'hypoxie ont fait l'objet du prix Nobel de médecine en 2019, montrant l'importance accordée à ce processus.

1.3.1.2 : L'hypoxie et la progression métastatiques

La signalisation en amont de l'hypoxie contribue grandement à la formation de métastases puisqu'ils favorisent plusieurs processus importants durant la cascade métastatique comme l'invasion, l'angiogenèse, l'évasion immunitaire, la formation de la niche prémétastatique et la résistance à l'apoptose [106, 113]. Par exemple, les gènes cibles de HIF facilitant l'intravasation et l'extravasation en favorisant l'invasion comprennent les facteurs de transcription de l'EMT comme *SNAIL*, *SNAI2*, *TWIST*, *ZEB1* et *ZEB2* ainsi qu'une variété de metaloprotéinase matricielles comme *MMP2*, *MMP9* et *MMP14* [114]. HIF régule aussi l'expression de *LICAM* et *ANGPTL4* qui favorise l'adhésion au vaisseau à la fin de voyage dans la circulation et l'extravasation [115]. L'hypoxie permet aussi une résistance à l'anoikis en diminuant de façon HIF-dépendante la signalisation par $\alpha 5$ intégrine [116]. De plus, HIF favorise l'expression d'enzymes (LOX, LOCL2 et LOXL4) qui sont libérées dans la circulation pour remodeler le microenvironnement de la niche métastatique [117].

Le dérèglement du microenvironnement causé par l'hypoxie, particulièrement l'angiogenèse et l'évasion immunitaire, peut aussi influencer la progression métastatique. En effet, la réponse hypoxique dans plusieurs types cellulaires mène à des réponses changeant leur comportement en plus d'affecter leur environnement et les cellules qui les entourent par la sécrétion de facteurs extracellulaires. Ainsi, l'hypoxie est un facteur majeur augmentant l'angiogenèse dans les tumeurs et produisant une diminution de la réponse immunitaire par des facteurs directs et indirects (autonomes ou paracrines). Ces éléments clés seront introduits et discutés plus en détail dans les sections suivantes.

1.3.2 : Angiogenèse

La croissance rapide des cellules cancéreuses requiert l'acheminement d'oxygène et de nutriments. Ce besoin doit être comblé par la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir du réseau préexistant, nommé angiogenèse. Ce processus est défini comme un des grands «Hallmarks» du cancer puisqu'il est essentiel à la croissance tumorale. De plus, puisque les vaisseaux générés sont dysfonctionnels, cette angiogenèse contribue fortement à la dérégulation du microenvironnement tumoral, à la réponse immunitaire et à la formation de métastases.

1.3.2.1 Vaisseaux tumoraux anormaux

Les facteurs angiogéniques tels que *VEGFA*, *ANGPT2*, *PDGFB* et *PGF* sont des gènes cibles d'HIF [114]. Ainsi, la diminution du niveau d'oxygène dans les tumeurs enclenche la sécrétion de ces facteurs permettant le bourgeonnement des vaisseaux environnants et générant de nouveaux vaisseaux. Par contre, un fort niveau de ces facteurs empêche aussi la maturation des vaisseaux formés, ce qui les rend anormaux et dysfonctionnels. Ainsi, une boucle de rétroaction s'enclenche dans les régions hypoxiques (Figure 1.11). En effet, les vaisseaux tumoraux sont alors caractérisés par des embranchements irréguliers et ces composantes sont hétérogènes. En effet, les cellules endothéliales ne forment pas une barrière étanche, la membrane basale est discontinuée et les cellules permettant la stabilisation des murs des vaisseaux, les péricytes, sont détachées [118, 119]. Par conséquent, les vaisseaux sont moins bien perfusés et plus perméables, ce qui affecte une grande variété de processus. En effet, la perfusion anormale des vaisseaux mène à une faible pénétration des drogues dans la tumeur, ce qui réduit l'efficacité des traitements anticancéreux [118, 120]. Aussi, une perfusion altérée ne permet pas un acheminement adéquat de l'oxygène et des nutriments, ce qui cause une augmentation de l'hypoxie et une diminution du pH. Ensuite, l'augmentation de la perméabilité permet plus facilement aux cellules cancéreuses de traverser la barrière endothéliale pour entrer dans la circulation et dérégule le recrutement immunitaire, ce qui modifie la réponse immunitaire contre la tumeur [118].

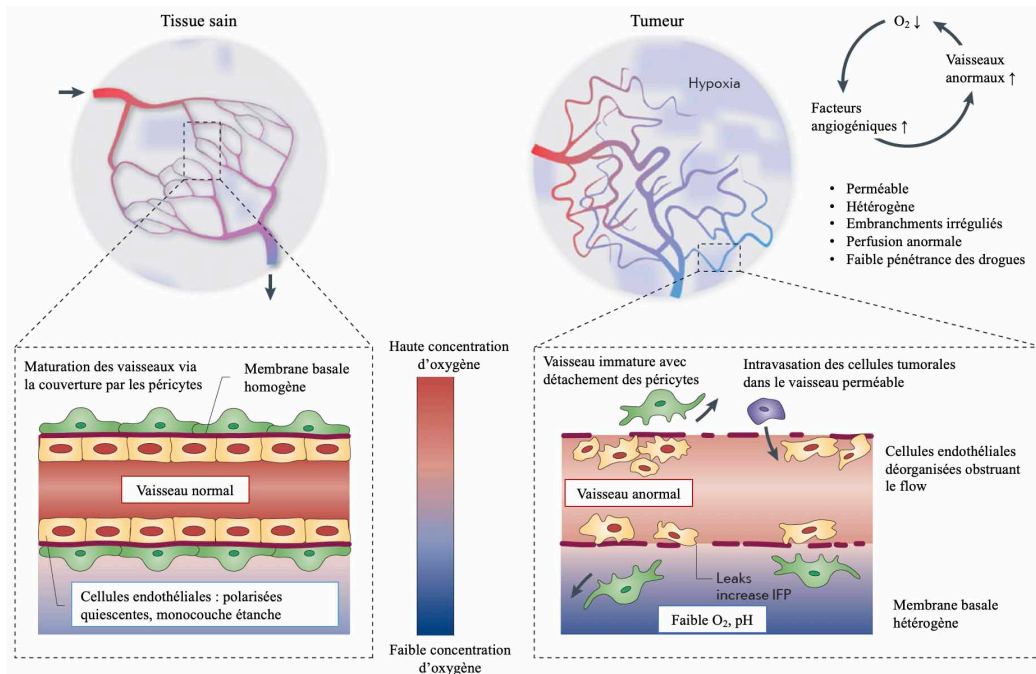


Figure 1.11 : Vaisseaux tumoraux anormaux

La croissance tumorale rapide mène à un dérèglement des vaisseaux sanguins principalement causé par un manque d'oxygène entraînant une augmentation de la sécrétion de facteurs angiogéniques. Ceci crée alors une boucle aggravant davantage le phénotype. Ainsi, comparées à un tissu sain (à gauche), les tumeurs (à droite) présentent des vaisseaux anormaux caractérisés par un détachement des péricytes, une discontinuité de la membrane basale, une augmentation de la perméabilité et une diminution de la perfusion.

Adaptée de Carmeliet et Jain, Nature Reviews, 2011 [118]

1.3.2.2 Normalisation des vaisseaux tumoraux

Cibler l'angiogenèse est une stratégie anticancéreuse intéressante. Ainsi, des inhibiteurs d'angiogenèse, comme des bloqueurs de VEGF, ont été développés pour freiner la formation de nouveaux vaisseaux et affamer la tumeur. Par contre, un traitement prolongé avec ces agents induit davantage d'hypoxie et d'inflammation résultant en une augmentation de l'invasion et des métastases [121]. Par contre, durant une courte fenêtre d'action, les inhibiteurs d'angiogenèse permettent de rendre les vaisseaux plus normaux, ce qui permet des effets bénéfiques [122]. Ainsi, une avenue plus intéressante serait des agents qui permettraient de normaliser les vaisseaux à long terme [123]. En effet, ce genre de traitement permettrait de réduire l'hypoxie, changer l'infiltration immunitaire et réduire l'invasion des cellules cancéreuses [118, 124]. Ainsi, grâce à son effet sur la perfusion et la perméabilité vasculaire, la normalisation des vaisseaux est une avenue intéressante pour réduire la formation de métastases et améliorer l'efficacité de plusieurs traitements incluant la chimiothérapie et l'immunothérapie [120, 123, 125-129].

1.3.3 : Immunité antitumorale

Pour croître et se propager, les cellules cancéreuses doivent tromper le système immunitaire pour éviter d'être ciblées et détruites, ce que l'on appelle l'évasion immunitaire. De plus, les cellules cancéreuses développent plusieurs mécanismes pour éduquer le système immunitaire pour promouvoir sa progression. Ainsi, l'évasion immunitaire, ainsi que la promotion d'un milieu inflammatoire protumorale, sont des «Hallmarks» importants du cancer qui peuvent être cibler pour combattre la maladie [1, 2].

1.3.3.1 Réponse immunitaire contre le cancer

En guise d'introduction, cette section présente une brève vue simplifiée de l'immunité antitumorale et des cellules qui y contribuent. La réponse antitumorale est menée par plusieurs types de cellules immunitaires, autant des cellules myéloïdes que lymphoïdes [130]. Les cellules du compartiment myéloïde, soit les cellules provenant de la moelle osseuse (macrophages, monocytes, cellules dendritiques, neutrophiles), sont très plastiques en réponse aux signaux environnementaux et peuvent jouer plusieurs fonctions dans la tumeur. Ensuite, les cellules du compartiment lymphoïdes (Natural Killer (NK), cellules T et cellules B) permettent une réponse spécifique contre les cellules tumorales.

L'axe majeur de réponse antitumorale découle de l'interaction entre plusieurs types cellulaires des deux compartiments immunitaires [130]. Les cellules présentatrices d'antigène, soit les macrophages et les cellules dendritiques, exposent les antigènes tumoraux rencontrés pour faire la communication avec les cellules T ($CD4^+$, $CD8^+$ et NK T). Ainsi, ces cellules sont très importantes pour diriger la réponse cytotoxique antitumorale en activant les lymphocytes T naïfs. Les cellules T $CD8^+$ seront alors activées par la présentation d'antigènes tumoraux, la présence de co-stimulation via des molécules comme CD80, CD70 et CD86, et des cytokines appropriées. Ainsi activés, ils peuvent se différencier en cellules cytotoxiques qui pourront détruire spécifiquement les cellules cancéreuses. Ces cellules sont alors considérées comme les effecteurs majeurs anticancéreux. Quant à elles, les cellules $CD4^+$ naïves peuvent se différencier en cellules de soutien (helper cells) ou en cellules T régulatrices (T reg) dont le rôle est de réduire l'activité des cellules

cytotoxiques par la production de diverses cytokines modulant les fonctions cytotoxiques et présentatrices d'antigènes des autres cellules immunitaires (Figure 1.12).

De plus, les autres cellules lymphoïdes contribuent à la réponse antitumorale en agissant comme cellules cytotoxiques (cellules NK) ou en produisant des anticorps (cellules B). Pour ce qui est des cellules myéloïdes, elles jouent un rôle important de support en influençant le microenvironnement par la sécrétion de plusieurs facteurs qui contribueront au recrutement des cellules immunitaires, à leur fonction et à l'angiogenèse [131, 132].

1.3.3.2 Évasion immunitaire

Les cellules tumorales interagissent localement et systémiquement avec les cellules du système immunitaire. Durant la progression tumorale, les cellules tumorales peuvent moduler leur recrutement, les éduquer et affecter leurs fonctions pour conférer un avantage aux cellules cancéreuses. Ainsi, les cellules tumorales peuvent utiliser plusieurs mécanismes pour favoriser une tolérance ou une suppression immunitaire afin d'éviter leur destruction, soit faire de l'évasion immunitaire [130, 133, 134]. Ce phénomène peut être engendré dans une tumeur par des moyens intrinsèques et extrinsèques aux cellules tumorales.

Les cellules cancéreuses ont des moyens intrinsèques de diminuer la réponse immunitaire. Premièrement, les cellules néoplasiques peuvent avoir un faible taux de protéines potentiellement antigéniques, par exemple si elles présentent peu de mutations [134]. Ainsi, certaines cellules tumorales peuvent être peu antigéniques et donc moins reconnues comme cible par le système immunitaire. Ensuite, les cellules cancéreuses peuvent réduire leur visibilité au système immunitaire par la diminution de la présentation d'antigène à leur surface en modulant par exemple l'expression et le trafic des complexes majeurs d'histocompatibilité, ce qui réduit leur reconnaissance par les cellules immunitaires [134]. De plus, les cellules tumorales peuvent aussi sécréter des chemokines et cytokines qui affectent directement ou indirectement le microenvironnement et le recrutement et les fonctions des cellules immunitaires [130]. Ainsi, elles peuvent moduler l'environnement en générant une inflammation protumorale et un milieu immunosuppresseur qui favorise l'exclusion des cellules T cytotoxiques ou les rend insensibles [98, 134]. Finalement, les cellules cancéreuses peuvent aussi exposer à leur surface des protéines qui

empêche l'activation des cellules T lorsqu'elles sont reconnues par celles-ci. Les ligands des protéines de points de contrôles (incluant PD-L1 et CTLA-4) sont reconnus par des récepteurs à la surface des cellules T et permettent la transmission d'un signal inactivateur [135] (Figure 1.12). Il est aussi intéressant de noter que plusieurs de ces mécanismes peuvent être augmentés en hypoxie comme la sécrétion de cytokines ou l'expression de protéine de point de blocage comme PD-L1, qui est d'ailleurs un gène cible de HIF [114, 136].

Ensuite, la dérégulation du microenvironnement peut aussi mener à de l'évasion immunitaire par des mécanismes extrinsèques aux cellules cancéreuses par la modulation de l'infiltration immunitaire, par exemple menant à une absence de cellule T à l'intérieur de la tumeur. Par exemple, l'hypoxie et le TGF- β est connue pour favoriser une immunosuppression dans plusieurs types de cellules immunitaires et à diminuer l'activation et la prolifération des cellules T [90, 137]. De plus, les cellules immunitaires peuvent aussi être amenées à augmenter l'expression de protéines de point de contrôle immunitaire, ce qui peut rendre les cellules T anergiques et donc inefficaces [134].

1.3.3.3 Immunothérapies

L'immunothérapie consiste à utiliser le système immunitaire du patient pour combattre efficacement son cancer en augmentant l'immunosurveillance tumorale. Cette approche novatrice de traitement a d'ailleurs fait l'objet du prix Nobel en 2018, montrant l'importance de l'émergence de ce concept. Même si ce type de traitements présentent des effets secondaires, leur utilisation semble causer moins d'effets néfastes que la chimiothérapie traditionnelle qui est moins spécifique [135].

Les cellules T sont le focus central de ces traitements et plusieurs stratégies ont été développées [135]. Par exemple, des vaccins peuvent être développés contre un antigène spécifique de la tumeur afin d'éduquer le système immunitaire à reconnaître les cellules cancéreuses et les éliminées [138]. Une autre approche d'immunothérapie consiste à isoler des cellules T et de les cultivé *in vitro* pour permettre leur expansion avant de les réinjecter chez le patient pour aller détruire les cellules tumorales [139]. Ces cellules T peuvent alors être modifiées pour leur

introduire des récepteurs T chimériques (CAR) générant des cellules T plus réactives face aux cellules tumorales.

Les cellules cancéreuses prennent avantage des mécanismes de point de contrôle immunitaire, incluant les récepteurs et ligands PD-1, PD-L1 et CTLA-4, pour éviter leur destruction lors de la rencontre d'une cellule T. Ce point de contrôle est alors une cible intéressante pour générer une réponse immunitaire contre la tumeur. Il existe des anticorps monoclonaux pouvant bloquer ces protéines, nommés inhibiteurs du blocage de point de contrôle immunitaire (immune checkpoint inhibitors) [140] (Figure 1.12). Ces derniers représentent l'approche la plus répandue et accessible. Par contre, une réponse très variable est observée lors de ce type de traitement et des recherches sont en cours pour mieux comprendre comment utiliser ces thérapies prometteuses [141].

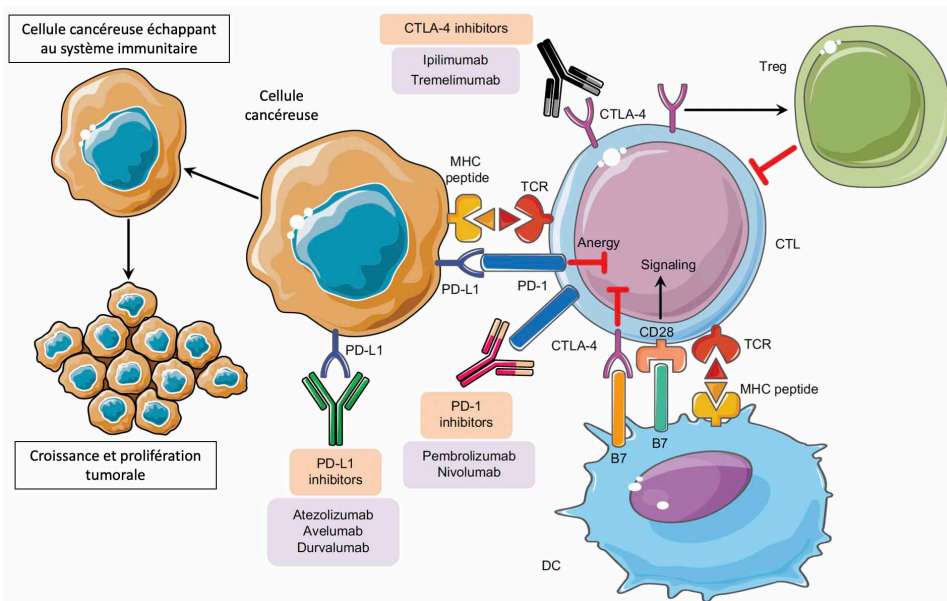


Figure 1.12 : Inhibiteurs du blocage de point de contrôle immunitaire

La suppression de l'activation des cellules T cytotoxiques (CTL) dans le microenvironnement tumoral permet la croissance et la prolifération des cellules cancéreuses. Les lymphocytes peuvent alors être inhibés par l'action de cellules T régulatrices (Treg) ou par l'activation de point de contrôle immunitaire. Ainsi, l'expression de ligand de ces protéines de contrôle comme Programmed cell Death-1 Ligand (PD-L1) ou Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA-4) par les cellules tumorales ou les cellules présentatrices d'antigènes (incluant les cellules dendritiques (DC)) mène à une anergie des lymphocytes. De cette façon, l'inhibition pharmacologique de ces points de contrôles d'activation immunitaire par des anticorps monoclonaux permet de restaurer l'activation des cellules T cytotoxiques pour lever l'immunosuppression.

Adaptée de Ayoub et al., Breast Cancer (Dove Medical Press)- Targets and Therapy, 2019 [142]

Plusieurs mécanismes de résistances aux immunothérapies ont été décrits, autant intrinsèques qu'extrinsèques aux cellules cancéreuses tel que discuté dans la section précédente. Tous ces mécanismes d'évasion immunitaire sont donc des barrières aux traitements d'immunothérapie. Ainsi, les recherches se tournent maintenant vers l'utilisation de l'immunothérapie en co-thérapie [134]. La modulation du microenvironnement offre d'ailleurs des opportunités pouvant améliorer l'efficacité où une réduction de l'hypoxie, une augmentation de l'infiltration immunitaire et une normalisation des vaisseaux ont été montrées avoir un effet positif sur la réponse à l'immunothérapie [137, 143-145].

Dans le cancer du sein, l'immunothérapie est une option attrayante. Les patients pour qui aucun traitement ciblé n'est disponible, principalement le TNBC, pourraient en bénéficier grandement [146, 147]. D'ailleurs, la combinaison d'un agent de chimiothérapie (nab-paclitaxel) et d'un anti-PD-L1 (atezolizumab) est maintenant utilisée de routine pour les patients atteints de TNBC avancés positifs à PD-L1 et des études cliniques de phase III considèrent une combinaison similaire comme traitement de première ligne [146]. Également, beaucoup se penche sur la possibilité de ce type de traitement pour les cancers HER2⁺ où la première preuve de concepte a été faite en combinant de Trastuzumab et un anti-PD-1 [148]. Il est intéressant de noter que le Trastuzumab, étant un anticorps contre HER2, est considéré comme l'une des premières formes d'immunothérapie utilisée en clinique [149]. Plusieurs études suggèrent d'ailleurs l'utilisation de vaccins contre HER2 comme traitement, mais aucune approche n'a encore été approuvée puisque plusieurs effets secondaires ont été rapportés tels que le développement d'auto-immunité [150]. Pour ce qui est des traitements d'inhibition de point de blocage immunitaire, les études récentes montrent un grand potentiel, mais de faibles bénéfices pour l'instant [40, 42, 151]. En effet, les grands défis sont de trouver des combinaisons de thérapies pour augmenter leur efficacité et de déterminer quels patients répondront à ceux-ci. Par exemple, la positivité à PD-L1 chez les cancers du sein TNBC avancés est déterminante pour l'utilisation d'agent le bloquant, mais d'autres facteurs devront être explorés puisque la résistance est plus complexe. En effet, beaucoup reste à faire pour amener l'immunothérapie efficace en clinique et le développement de thérapie de combinaison, ainsi que l'identification de biomarqueurs sera cruciale.

1.3.3.4 Polarisation des macrophages et dérèglement du microenvironnement

Les macrophages représentent une composante stromale jouant un rôle majeur dans la dérégulation du microenvironnement et dans la progression métastatique. Ces cellules sont très plastiques et sont reprogrammées par des signaux environnementaux en sous-types spécialisés, comprenant un spectre de phénotypes antitumoraux (pro-inflammatoire) ou protumoraux (immunosuppresseur ou cicatrisant) [152-155]. Les macrophages associés aux tumeurs ont alors souvent des caractéristiques immunosuppressives et proangiogéniques. Il est intéressant de noter qu'*in vivo*, les macrophages sont recrutés dans les zones hypoxiques de la tumeur où ces phénotypes sont raffinés [156-158]. Ainsi, cette polarisation et ces comportements influencent grandement la progression tumorale et la réponse à l'immunothérapie [159]. De plus, les macrophages sont aussi connus pour promouvoir l'intravasation des cellules tumorales grâce à une boucle paracrine [160-162]. En effet, les cellules tumorales recrutent les macrophages et permettent de les rendre plus invasifs. Les macrophages infiltrants accompagnent alors les cellules cancéreuses vers les vaisseaux sanguins où ils promeuvent une augmentation de perméabilité pour faciliter l'intravasation. En conséquence, les macrophages peuvent promouvoir la progression tumorale et métastatique en affectant non seulement la réponse immunitaire, mais aussi l'angiogénèse et l'invasion des cellules tumorales.

Plusieurs autres types de cellules immunitaires peuvent aussi jouer un rôle important dans la dérégulation du microenvironnement. Par exemple, plusieurs autres cellules myéloïdes comme les neutrophiles, les monocytes et éosinophiles ainsi que les cellules T CD4⁺ produisent une grande variété de chemokines et cytokines qui peuvent affecter l'infiltration immunitaire et l'angiogénèse [131, 132]. En effet, la réponse immunitaire et l'angiogénèse sont fortement reliées puisqu'une dérégulation vasculaire entraîne un recrutement changé des cellules immunitaires et plusieurs cellules immunitaires peuvent aussi jouer sur l'angiogénèse [163, 164]. Ceci démontre alors à quel point la tumeur est un écosystème complexe dont la régulation est multifactorielle.

1.3.4 Conclusion

Typiquement, les thérapies anticancéreuses ciblent principalement les cellules cancéreuses et leur effet sur le stroma tumoral n'est pas souvent pris en compte. Par contre, les caractéristiques du microenvironnement tumoral incluant l'hypoxie, l'angiogénèse, la réponse immunitaire et la polarisation des macrophages influencent grandement la progression tumorale et la réponse aux

thérapies. Ce domaine en pleine émergence peut offrir des options thérapeutiques pour traiter les cancers métastatiques et plusieurs avenues de cothérapies prometteuses seront tester dans les prochaines années.

1.4 : AXL receptor tyrosine kinase as a promising therapeutic target directing multiple aspects of cancer progression.

Préface

Ce chapitre a été écrit sous la forme d'un article de revue et a été adapté pour être introduit ici. Cette revue de littérature en révision dans *Cancers* vise à introduire le récepteur tyrosine kinase AXL et discute d'ailleurs des nouveaux concepts liés à la biologie d'AXL incluant certains qui sont présentés dans les chapitres 3 et 4. Elle comprend aussi une section de futures perspectives contenant des éléments qui complémentes ou qui seront discutés plus en profondeur dans la section discussion de cette thèse.

AXL receptor tyrosine kinase as a promising therapeutic target directing multiple aspects of cancer progression and metastasis.

Marie-Anne Goyette^{1,2}, and Jean-François Côté^{1,2,3,4,*}

¹ Montreal Clinical Research Institute (IRCM), Montréal, QC, H2W 1R7, Canada.

² Molecular Biology Programs, Université de Montréal, Montréal, QC, H3T 1J4, Canada.

³ Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, H3C 3J7, Canada.

⁴ Department of Anatomy and Cell Biology, McGill University, Montréal, QC, H3A 0C7, Canada.

*Correspondance:

Jean-François Côté

IRCM

110 avenue des Pins Ouest

Montréal (QC) Canada

H2W 1R7

Email: jean-francois.cote@ircm.qc.ca

Author Contributions: M.A.G. wrote this review with inputs from J.F.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Simple Summary

Metastasis is a complex process that requires the acquisition of certain traits by cancer cells as well as the cooperation of several non-neoplastic cells that populate the stroma. Cancer-related deaths are predominantly associated to complications arising from metastases. Limiting metastasis therefore represents an important clinical challenge. The receptor tyrosine kinase AXL is required at many steps of the metastatic cascade and contributes to tumor micro-environment deregulation. In this review, we describe how AXL contributes to metastatic pro-gression by governing various biological processes in cancer cells and in stromal cells, highlighting the potential of its inhibition.

Abstract

The receptor tyrosine kinase AXL is emerging as a key player in tumor progression and metastasis and its expression correlates with poor survival in a plethora of cancers. While studies have shown the benefits of AXL inhibition for the treatment of metastatic cancers, additional roles for AXL in cancer progression are still being explored. This review discusses recent advances in understanding AXL's functions in different tumor compartments including cancer, vascular, and immune cells. AXL is required at multiple steps of the metastatic cascade where its activation in cancer cells leads to EMT, invasion, survival, proliferation and therapy resistance. AXL activation in cancer cells and various stromal cells also results in tumor microenvironment deregulation, leading to modulation of angiogenesis, fibrosis, immune response and hypoxia. A better understanding AXL's role in these processes could lead to new therapeutic approaches that would benefit patients suffering from metastatic diseases.

Introduction

AXL is a member of the TAM family of receptor tyrosine kinases (RTKs) that also includes TYRO3 and MER. This was the last family of RTKs to be identified and because their inactivation in mice resulted in rather mild phenotypes, their biological roles were slow to be characterized. Now, however, in addition to being recognized as key regulators of immune cell activation, TAM RTKs have been shown to be expressed in cancer cells where they promote survival and invasion and contribute to resistance to various therapies. The structure shared by these RTKs includes an extracellular domain consisting of tandem repeats of immunoglobulin-like and Fibronectin type 3 (FN-III)-like domains, a single-pass transmembrane domain and an intracellular domain that includes a catalytically competent kinase defined by a unique KWIAIES conserved sequence [1]. While a few genetic mutations and amplifications have been reported in TAMs in cancers (listed in [2]), their functional importance has yet to be defined.

Nevertheless, it is now well established that AXL expression is linked to increased risk of metastasis and poor survival in a variety of solid cancers including breast cancer, non-small cell lung carcinoma, ovarian cancer, and clear cell renal carcinoma [3-8]. AXL is expressed and plays a role in different types of cells including tumor cells, fibroblasts, vascular cells and several immune cells. Thus, in a cancer context, AXL expression in tumor cells and in stromal cells can contribute to the progression of the disease. This review highlights novel discoveries about AXL functions in different tumor compartments and discusses potential therapeutic interventions through AXL inhibition.

1.4.1 AXL activation and therapeutic targeting

AXL can be activated in various ways and these activation mechanisms are unique. Thus, several therapeutic targeting strategies have been designed and evaluated to efficiently inhibit AXL.

1.4.1.1 Ligand dependant and independent mechanisms of activation

The principal ligands that lead to TAM activation are Growth arrest specific factor 6 (GAS6) and Protein S, both of which require Vitamin-K dependent γ -Carboxylation to achieve maximal activation [9, 10]. These ligands vary in their affinity for the different TAM receptors: GAS6 binds all TAM receptors, with the highest affinity for AXL, while Protein S only binds MER

and TYRO3. These ligands can also bind the lipid moiety of Phosphatidylserine (PS) and can activate TAMs when exposed on apoptotic cells, aggregating platelets, exosomes or virus envelopes [11-13]. It has also been shown that GAS6 activation of AXL is localized at regions with high GAS6 concentration, resulting in a diffusional influx of AXL and receptor aggregation and dimerization [14]. Furthermore, GAS6 can mediate dimer formation of other TAM members (MER or TYRO3) which have a lower affinity for GAS6 binding, and more experiments are needed to determine if the receptors can also heterodimerize and how this affects their signaling [15-17]. Many laboratory studies have shown that the GAS6/AXL axis promotes cell invasion, proliferation and survival, thus contributing to cancer progression and metastasis. Conversely, clinical studies have shown a correlation between GAS6 expression and patients' survival in breast cancer, suggesting that GAS6 may not be essential in this context [18, 19]. In support of this, it was observed that GAS6 is dispensable in a pre-clinical model of HER2+ breast cancer for the formation of metastases [3]. Interestingly, AXL can be activated in a ligand-independent manner in many pathological contexts. For example, its increased expression, or the presence of oxidative stress, can lead to AXL homodimerization and autophosphorylation [20-22]. Furthermore, AXL has been shown to crosstalk and heterodimerize or cluster with other RTKs such as EGFR, HER2, HER3, MET, PDGFR and VEGFR-2 to promote downstream signaling [3, 23-29]. These partnerships serve to diversify the downstream signaling of these RTKs and confer advantages to cancer cells. Through such a mechanism, AXL can promote resistance to a variety of therapies, including chemotherapy and targeted therapies including inhibitors of its partners EGFR, HER2 and PDGF [23, 30-36].

1.4.1.2 AXL therapeutic targeting

AXL is a particularly interesting candidate as a therapeutic target because its genetic deletion or pharmacological inhibition in mice is well tolerated. Various approaches to inhibit AXL have been studied for cancer treatments including small molecule inhibitors that compete with ATP-binding or monoclonal antibodies [37-39]. Indeed, a number of clinical trials are ongoing with the AXL inhibitor R428 (also known as BGB324 or Bemcentinib), which is highly specific for AXL among the TAMs and other RTKs [39]. Additionally, a number of other broad spectrum kinase inhibitors that would also inhibit AXL, are currently under study and are reviewed in [40]. Other approaches have also been envisioned to inhibit the GAS6/AXL axis, including decoy

receptors that trap GAS6 and Vitamin K antagonists that would reduce the ability of GAS6 to activate AXL [41-43]. However, because there are multiple ways to activate AXL as previously mentioned, there may not be an absolute requirement for GAS6 in certain contexts. More recently, an original approach exploited AXL as a cancer antigen for chimeric antigen receptor (CAR)-T cell therapy. In triple-negative breast cancer (TNBC) where AXL is overexpressed, engineered T cells with AXL-CAR-T were able to induce cytokine release and an antigen-specific cytotoxicity [44, 45].

Before we can apply AXL-targeting therapeutic strategies to their full potential in cancer treatment, it is important to better understand the consequences of effective, systemic AXL inhibition. As such, a more detailed understanding of the functions of AXL in various tumor cell types, including both in cancer and different stromal cells, is needed. Accordingly, the next sections will discuss our current understanding of AXL function in a variety of cancer-related biological processes that are both intrinsic and extrinsic to cancer cells.

1.4.2 Implications of AXL expression in the metastatic cascade and therapy resistance

Increased AXL expression has been shown to correlate with decreased patients' survival and metastasis of cancer cells in a plethora of solid cancers. Several biological triggers within the tumors that are known to promote metastasis, such as TGF- β /EMT and hypoxia, impact AXL expression levels in cancer cells [3, 4, 46-48]. Signals downstream of AXL advantage cancer cells throughout the metastatic process and lead to therapy resistance. AXL has been implicated in many steps of the metastatic cascade and recent studies have clarified the cancer cell-intrinsic AXL contributions to this complex process (Figure 1.13).

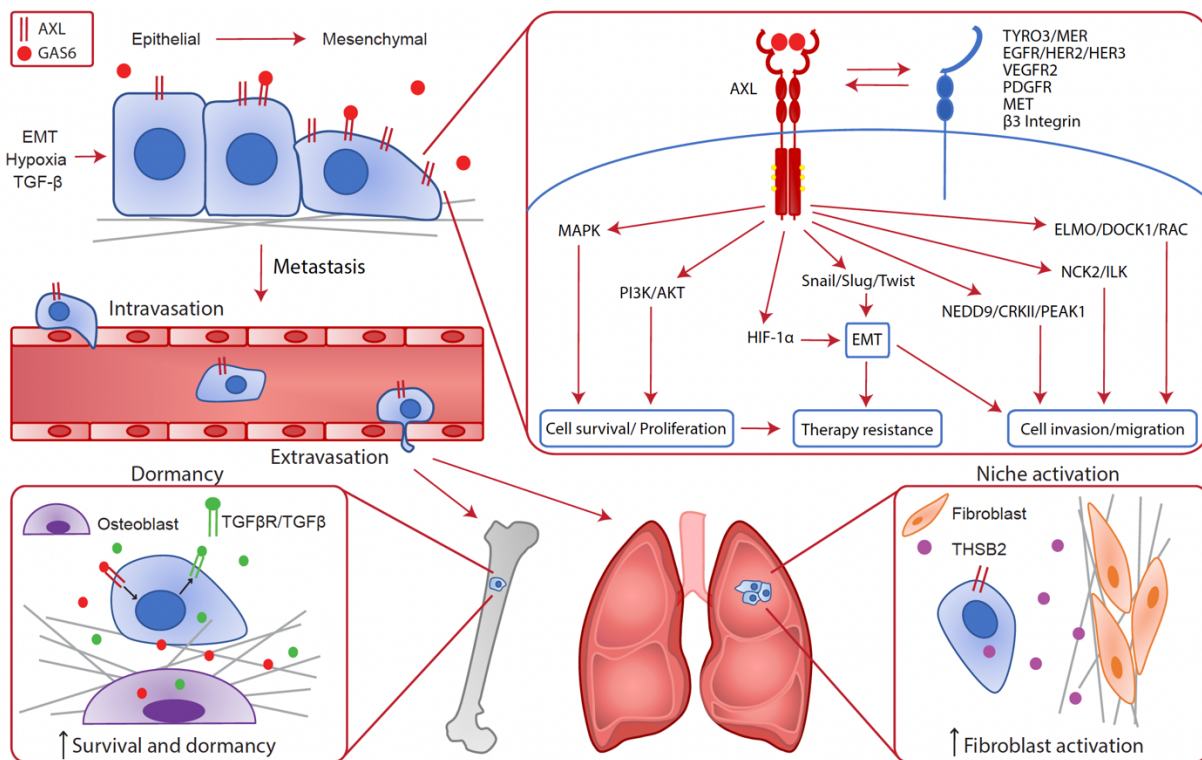


Figure 1.13. Cancer cell intrinsic implication of AXL in the metastatic cascade.

In cancer cells, AXL expression can be enhanced by EMT, hypoxia and TGF- β leading to metastatic progression. Indeed, various cellular pathways downstream of AXL confers advantages to cancer cells such as survival, proliferation, cell invasion and migration, EMT and therapy resistance. Consequently, AXL is required throughout the metastatic cascade for local invasion, intravasation, extravasation and metastatic growth at distant sites. In the bones, AXL expression on disseminated cells increases the survival and dormancy of cancer cells by stimulating the expression of TGF- β 2 and TGF- β Rs. In the lungs, AXL expression in cancer cells is linked to THSB2 secretion that activates the fibroblasts in the metastatic niche to promote metastatic growth.

1.4.2.1 Epithelial to mesenchymal transition (EMT)

An emerging function of AXL during cancer progression is its role in the plastic and dynamic program called epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). EMT affords several advantages to tumor cells by enhancing cell invasion, apoptosis resistance and stem-like characteristics at the expense of proliferation, therefore contributing to tumor progression and therapy resistance [49]. AXL expression correlates strongly with EMT markers in various cancers [50]. It is now well established that EMT induces the expression of AXL via different EMT transcription factors like SNAIL, SLUG, TWIST or ZEB2 [4, 46]. As a feedback mechanism, AXL activation then upregulates the expression of EMT transcription factors and mesenchymal markers to sustain EMT [38, 51, 52]. Thus, AXL plays multiple roles in tumor progression and metastasis through its modulation of several steps of the metastatic cascade and therapy resistance.

1.4.2.2 Cell invasion and migration

Invasive characteristics of cancer cells are particularly important in the first steps the metastatic cascade including invasion of the tumor parenchyma and transendothelial migration during the entry (intravasation) and exit (extravasation) of the systemic circulation. In addition to the role of AXL in enhancing cell invasion by promoting mesenchymal features, other elements triggered by AXL signaling are also important to promote cell motility. For example, AXL can activate several generic downstream effectors from such RTKs as MAPK, PI3K/AKT and JAK/STAT to promote actin reorganization, migration and survival of cancer cells [165-170]. Indeed, AXL has been shown to regulate cell adhesion via NCK2/ILK and this signaling converges on the Integrin β 3 pathway to stimulate cell adhesion [171, 172]. In addition, AXL was shown to phosphorylate ELMO proteins in complex with the GEF DOCK1, leading to RAC-mediated cytoskeleton remodeling and migration of TNBC cells [173]. More recently, the first phosphoproteome of AXL was generated following stimulation of AXL by GAS6 in TNBC cells to uncover specific AXL effectors. This phosphoscreen identified NEDD9/CRKII/PEAK1 downstream of AXL and described a novel role for AXL in focal adhesion turnover [174]. This screen also suggested the existence of many other processes and pathways affected by AXL signaling such as RNA transport and vesicle trafficking. Additional research is required to determine which of these AXL-mediated signaling events contributes to invasion and metastasis.

AXL has also been identified as a direct HIF target gene in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) [175]. During hypoxic stress, ccRCC cells upregulate AXL to promote metastasis by maximizing invasion via the GAS6/AXL signaling cascade leading to MET activation. AXL was also shown to regulate HIF-1 α levels, thus contributing to the hypoxic response in HER2⁺ breast cancer cells [176]. In this context, AXL is required for hypoxia-induced EMT and invasion leading to metastasis.

In human cell lines, AXL expression seems to be restricted to invasive and mesenchymal lines, raising the possibility that AXL is a marker for mesenchymal cancers, like TNBC [177]. Nevertheless, its expression in breast cancer correlates with patients' survival and metastasis independently of the subtype [178]. For example, AXL was found to correlate with metastasis in HER2⁺ breast cancer, a subtype that retains epithelial characteristics even though it often leads to metastasis and evidence suggest that EMT is required for this capacity [178, 179]. Indeed, during progression of epithelial cancer, only a small population of motile cells invade the surrounding tissue to disseminate and form metastases. TGF- β , a factor that induces EMT, is required in several steps of the metastatic process including local invasion, intravasation and extravasation [95-97]. Interestingly, in epithelial cell lines that don't express AXL at basal levels, like HER2⁺ cells and patient-derived xenografts (PDX), TGF- β reprogramming can promote AXL expression [178, 180]. In this context, AXL deletion in a preclinical model of HER2⁺ breast cancer almost completely abrogated the metastatic dissemination by blocking intravasation, extravasation and growth at the metastatic site [178], supporting a role for AXL in TGF- β -induced cell invasion

These new findings regarding AXL signaling and biology further confirm its role in cancer cell dissemination through the reprogramming of cells to be able to leave the primary tumor and enter a distant organ by increasing cell motility.

1.4.2.3 Modulation of the metastatic niche and dormancy

Following entry in a distant organ, cells must adapt to the foreign environment to form macrometastases. To do so, mesenchymal cells must be reprogrammed to a more epithelial state in order to be able to proliferate. In a HER2⁺ breast cancer model, inducible AXL downregulation after the arrival of cancer cells in the lungs led to a reduction of metastatic outgrowth [178]. A similar observation was made using cells isolated from the PyMT murine breast cancer model and

with MDA-MB-231 breast cancer cells where it was found that AXL inhibition post-seeding reduced the metastatic burden [181]. By using AXL⁺ tumor initiating cells that display partial EMT, it was suggested that AXL prepared the metastatic niche by activating lung fibroblasts via the secretion of THSB2. Those fibroblasts subsequently promoted a switch toward a more epithelial state, reducing AXL levels and promoting proliferation of cancer cells leading to the formation of macrometastasis.

Disseminated cancer cells can also enter a dormant state in the new organ instead of proliferating and can then survive in a quiescent state for years where they are highly resistant to treatment and can lead to cause relapse in patients [70]. Both AXL and GAS6 have been implicated in dormancy in the context of bone marrow metastasis of prostate cancer. In the bone marrow niche, osteoblasts produce GAS6 that can activate AXL on the surface of nearby disseminated cancer cells [182, 183]. AXL activation then induces the expression of TGF- β 2 and TGF- β Rs that results in the arrest of proliferation and cell survival [183]. AXL has also been reported to be strongly expressed in dormant myeloma cells and its inhibition induces their proliferation [184]. Altogether, these results suggest that the persistence of AXL expression and signaling in disseminated cancer cells can lead to dormancy in the metastatic niche in some cancers.

1.4.2.4 Therapy resistance

AXL promotes and sustains a mesenchymal phenotype leading to metastasis, but its role in EMT also has an important impact on therapy outcome. Indeed, EMT is associated with a wide range of changes linked to stemness and drug resistance, implicating AXL as an important mediator of resistance to chemotherapy, antimetabolic drugs and various targeted therapies.

In support of this role, AXL has been found to be upregulated in chemo-resistant cells in a variety of cancers. Many studies have shown a better drug sensitivity when combining AXL inhibition with chemotherapeutic compounds such as Docetaxel, Cisplatin, Pemetrexel, Vincristine, Paclitaxel, Adriamycin, Gemcitabine or Carboplatin [74-78]. In cancer cells, chemotherapy induces EMT and AXL is also upregulated in this context [51, 56, 68]. Indeed, AXL was found to be associated with mesenchymal features of breast and lung cancer cells and its inhibition synergized with antimetabolic agents to induce cell death [68]. Furthermore, genetic or pharmacologic inhibition of AXL was shown to revert EMT in pancreatic and prostate cancer cells

and to modulate the expression of nucleoside transporters playing a role in chemotherapeutic response [75, 77]. Additionally, many studies link the resistance to the EGFR inhibitor Erlotinib to EMT and AXL overexpression [57, 79]. In this context, Erlotinib-resistant cells displayed EMT features that were pre-vented by AXL inhibition. However, EMT-associated resistance to Erlotinib has also been reported to be independent of AXL [68] and further studies are needed to explain this discrepancy. Crizotinib, an ALK inhibitor, has also been linked to the activation of AXL and induction of EMT [80]. Thus, interfering with AXL can improve responses to various therapies by reverting EMT and dampening downstream pathways that lead to drug resistance. In conclusion, numerous studies provide rationale for the use of AXL inhibition to enhance sensitivity and/or prevent resistance to cytotoxic chemotherapies and targeted agents, highlighting the potential of AXL-targeted drugs in combination with a variety of other therapies.

1.4.3 AXL as a modulator of the tumor microenvironment

AXL is also known to contribute to cancer progression, metastasis and therapy resistance by reprogramming the tumor microenvironment to be more favorable for cancer progression. Indeed, AXL is expressed by several non-cancerous cells including endothelial cells, fibroblasts, monocytes, platelets, natural killer cells (NK), dendritic cells (DC), and macrophages. Therefore, AXL activation in cancer cells and stromal cells could also promote disease progression by acting on angiogenesis, fibrosis, immune evasion, and hypoxia (Figure 1.14).

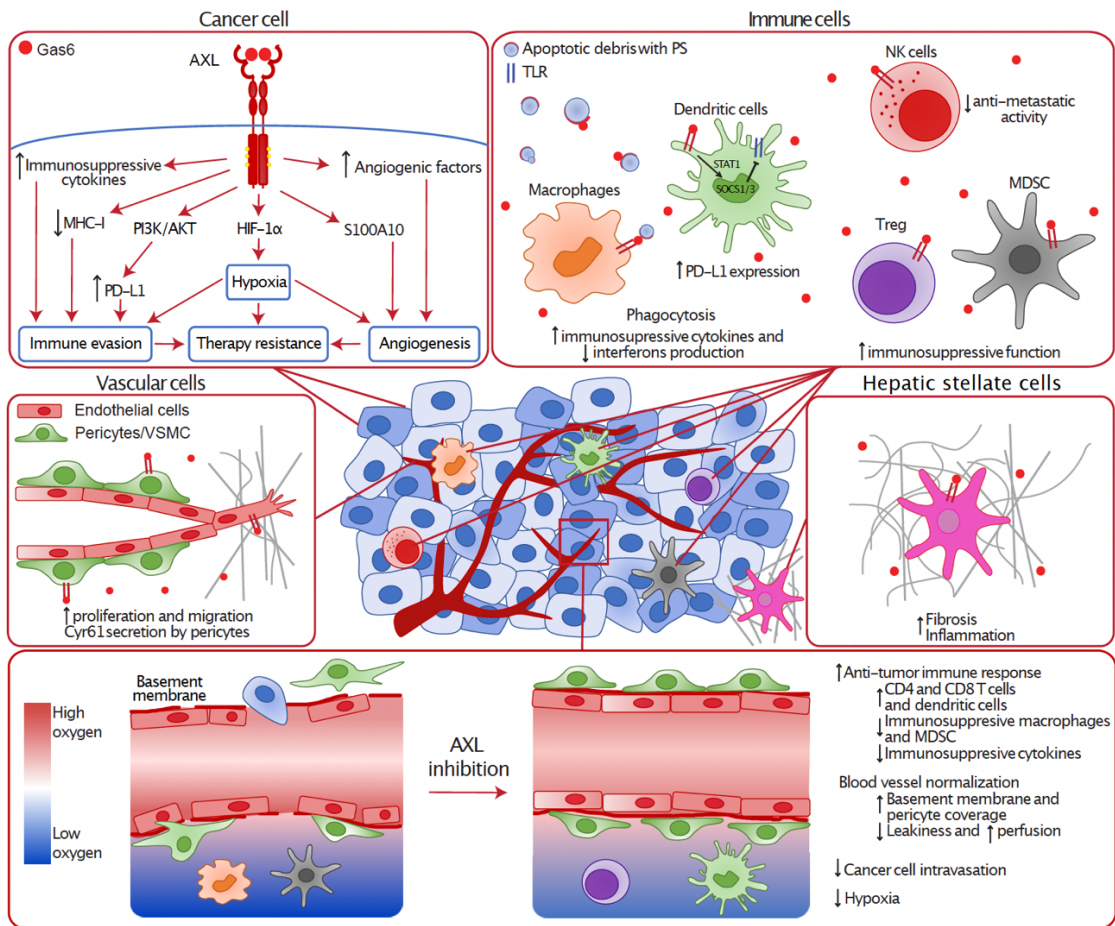


Figure 1.14. AXL implication in the tumor microenvironment in different cell types

AXL is expressed in a variety of tumor residing cells where its activity can remodel the microenvironment. In cancer cells, AXL downstream signaling leads to hypoxia, immune evasion, angiogenesis and therapy resistance. AXL is also expressed in different immune cells such as macrophages, dendritic cells, NK cells, regulatory T cells (Treg) and Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) where its activity leads to immunosuppression. In vascular cells, AXL promotes proliferation and migration of endothelial cells and pericytes, enhancing angiogenesis. AXL also contributes to liver fibrosis by increasing the activation of hepatic stellate cells (HSC). Thus, inhibiting AXL can remodel the tumor microenvironment by increasing the immune response and normalizing the blood vessels to reduce metastasis and improve therapy responses.

1.4.3.1. Angiogenesis

Primary tumor growth and metastatic progression depend on the ability of cancer cells to promote angiogenesis to deliver nutrients and oxygen to cells in the tumor. Some cancer cells have the capacity to secrete proangiogenic factors that will recruit endothelial cells and degrade the extracellular matrix, thereby contributing to abnormal angiogenesis in the tumor. This angiogenesis then leads to tumor and metastatic growth and AXL has been shown to play a role in this process. Indeed, AXL downregulation or inhibition in cancer cells reduces the secretion of angiogenic factors leading to a suppression of the angiogenic capacity of breast cancer cells both in vitro and in vivo [81]. Furthermore, in ccRCC cells AXL expression correlates with antiangiogenic resistance, mediated by the GAS6/AXL/S100A10 axis promoting plasmin production, endothelial cell migration, and angiogenesis [82].

AXL and GAS6 are expressed by different components of the cardiovascular system including endothelial cells, pericytes and vascular smooth muscle cells (VSMC). GAS6/AXL axis have been implicated in vasculogenesis by affecting the migration and apoptosis of vascular smooth muscle cells (VSMC) [83]. Furthermore, autocrine and paracrine GAS6/AXL signaling is required for endothelial tube formation in vitro, suggesting a role for AXL in angiogenesis [84-86]. On pericytes, paracrine activation of AXL by GAS6 was shown to regulate the expression of the pro-angiogenic proteins Cyr61 leading to angiogenesis and tumor growth [87]. Thus, several studies now support the notion that AXL inhibition in vivo could lead to a reduction of tumor angiogenesis or a normalization of the blood vessels [39, 48, 81, 82].

1.4.3.2. Fibrosis

In the context of liver fibrosis, the soluble extracellular domain of AXL is cleaved and released into the circulation where it is an accurate biomarker to detect advanced liver fibrosis and cirrhosis [88]. AXL is involved in the development of fibrosis, linking AXL with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)/non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and hepatocellular carcinoma (HCC) [89]. Indeed, advanced liver fibrosis characterized by inflammation, injury, and hepatic fibrosis predisposes patients to HCC, suggesting that AXL can be an oncogenic driver in this context [90, 91]. The AXL/GAS6 axis is required for the activation of hepatic stellate cells (HSC) that can promote a permissive environment for cancer development by the production of

extracellular matrix and inflammation [89, 90]. In mice, interfering with AXL functions reduced HSC activation, liver fibrosis and inflammation, and prevented development of NASH [89].

1.4.3.3. Generation of an immunosuppressive microenvironment

A dampened immune response is permissive for tumor progression. In some cases, cancer cells have been shown to interact with immune cells to reduce their anti-tumoral activity and hijack them to support their progression. To achieve this, certain cancer cells either secrete chemokines that modulate the behaviour and recruitment of immune cells or modulate the expression of molecules at their cell surface that serve as communication modules with the immune system to increase or decrease their activity. Several studies now suggest that AXL contributes to an immunosuppressive tumor microenvironment and can modulate the ability of immune cells to eliminate cancer cells.

Indeed, AXL has been reported to upregulate the secretion of immunosuppressive cytokines such as CSF1-3, CCL2-5, CXCL1,2,5, IL-1a, IL-6, TGF- β and TNF- α [48, 77, 92, 93]. AXL signaling has also been associated with immunosuppressive macrophages in a cancer context where conditioned media from AXL expressing cancer cells cause macrophages to polarize in vitro [48, 94, 95]. AXL can also contribute to immune escape by decreasing major histocompatibility complex class I (MHC-I) molecules present at the cell surface leading to a decrease of antigen presentation, important for the antitumor immune response [92, 93]. AXL has also been reported to drive the expression of the immune checkpoint protein PD-L1 on cancer cells via the PI3K-AKT axis to prevent T-cell activation [92, 93, 96-98]. Experimentally, inhibiting AXL increases the recruitment and activation of T cells and dendritic cells and decreases the infiltration and polarization of macrophages toward a pro-tumoral phenotype [48, 92, 93]. Interestingly, a recent study also reported a role of TAMs in promoting the oligomerization of MLKL leading to necroptosis, a pro-inflammatory necrotic cell death [99], underscoring the biological complexity of these receptors.

Within the immune system, TAMs are primarily expressed by antigen presenting cells (macrophages and dendritic cells) and NK cells. TAM receptors have crucial roles in innate immunity. Indeed, the triple KO mice of TAMs are viable but suffer from chronic inflammation and systemic autoimmunity [100]. TAMs are in the center of a negative feedback loop that prevents overactivation of adaptive immunity and serves to maintain homeostasis. They reduce

inflammation by different mechanism including the phago-cytosis of apoptotic cells, the regulation of toll-like receptor (TLR) signaling and the production of cytokines and interferons by macrophages and dendritic cells [15, 101-105]. Unlike in cancer cells, the downstream effectors of AXL signaling leading to cytokine secretion in immune cells have been well characterized. Indeed, TLRs induce the ex-pression of pro-inflammatory cytokines and their activation also upregulates AXL. The upregulation of AXL triggers a negative feedback loop via STAT1/SOCS1-3, inhibiting TLR signaling to maintain tissue homeostasis [103]. Therefore, AXL inhibition could stimulate an antitumor immunity by modifying the production of pro-inflammatory factors by immune cells.

Many studies have also described roles for the TAMs in immune cells in a tumor setting. For example, the TAMs have been shown to act as a break for NK cells activation by inhibiting the downstream signaling of the activating receptors NKG2D [42]. The degradation of TAMs via the E3 ubiquitin ligase Cbl-b, or their pharmacological inhibition, induces a robust NK cell anti-metastatic activity. The GAS6/AXL axis has also been im-plicated in regulatory T cell (Tregs) suppressive activity where AXL activation by GAS6 on CD4+CD25+ Tregs leads to an increase in their immunosuppressive activity in vitro and in vivo [106]. Additionally, TAMs are upregulated in tumor-derived myeloid suppressor cells (MDSC) where they are required for immunosuppressive functions [107]. Furthermore, AXL was also found to upregulate the expression of PD-L1 in dendritic cells, influencing T cell infiltration and activation in tumors [108]. These recent observations suggest that AXL can affect the antitumor immune response in a great variety of ways and that AXL inhibition could have positive impacts at several levels.

1.4.3.4. Hypoxia

Hypoxia resulting from rapid tumor growth is another important component of the tumor microenvironment and that can be amplified by feedback mechanisms from sur-rounding tissues. Hypoxia generates a response that leads to deregulation of cancer cell behaviour and interaction with the stroma by modulating the expression of genes related to angiogenesis, immune evasion and invasion [109]. Importantly, AXL was recently shown to be required to generate the hypoxic response in HER2+ breast cancer by regulating HIF-1 α expression [48]. AXL was found to be essential for cancer cell hypoxia-induced EMT, invasion and cytokine production. These, in turn, led to macrophage proliferation, invasion, and polarization, thus deregulating the tumor microenvironment, and promoting metastasis. These studies suggest that AXL inhibition in a

preclinical murine model considerably modulates the tumor microenvironment by changing the immune infiltration and normalizing the blood vessels leading to increased perfusion and decreased leakiness.

1.4.3.5. Therapeutic implications

A body of work now suggests that inhibition of AXL, and in some cases TAMs more generally, leads to an antitumorigenic microenvironment by affecting angiogenesis and immune response at the cancer and stromal cells levels. These data explain why systemic inhibition of AXL is emerging as a promising approach to enhance anti-angiogenic therapies and immunotherapies.

Since AXL is implicated in tumor angiogenesis, its role in acquired resistance to angiogenesis inhibitor therapy has been of great interest. Sunitinib, an anti-angiogenic small molecule, was shown to increase AXL expression and signaling [110, 111]. Chronic treatment with Sunitinib induces AXL and MET RTKs, leading to invasion and angio-genesis. In this context, co-inhibition of AXL and MET impaired Sunitinib acquired resistance in vitro and in vivo [110]. Thus, a combination of inhibitors could provide an effective approach to counter resistance to angiogenesis inhibitors.

Cancer immunotherapy using checkpoint inhibitors is another emerging option in the clinic, but a lot of patients are unresponsive. Mechanisms of evasion include adaptive immune resistance, where tumor cells promote an immunosuppressive environment leading to T cell exclusion and inactivation [112]. Since AXL inhibition has been shown to promote a pro-inflammatory microenvironment, normalize blood vessels, and reduce immune evasion and hypoxia, combining it with immune checkpoint blockade or radiation could be a viable solution to increase their efficacy. For example, while a combination of radiation therapy and checkpoint immunotherapy have been suggested to treat various cancers, tumors resistant to this strategy have been shown to overexpress AXL [92]. In these tumors, AXL inhibition increased the sensitivity of combination therapy by increasing CD8⁺ T cell response. Furthermore, since AXL activation is linked to PD-L1 expression on cancer cells, combining PD-L1 and AXL inhibition was able to increase anti-tumor efficacy in vivo [48, 93, 113]. In addition, broad-spectrum inhibition of TAMs has been reported to enhance the effect of immune checkpoint blockage [107, 114]. In conclusion, numerous lines of investigation identify AXL as a strong therapeutic target with the aim to enhance the efficacy of cancer treatments.

1.4.3.5. Future directions

In recent years, AXL has been implicated in a variety of biological processes leading to tumor progression, metastasis, and resistance to therapies. Indeed, its expression is linked with EMT, invasion, metastasis and changes in the tumor microenvironment including hypoxia, angiogenesis, and immune evasion. Thus, AXL is an attractive therapeutic target to impair multiple stages of cancer progression by affecting a wide variety of cell types within the tumor. Nevertheless, a number of important questions remain to be resolved to fully benefit from AXL inhibition in the clinic.

First, AXL needs to be validated as a biomarker to stratify patients with regard to treatments, to predict responses and to prevent resistance to therapies. Given the increasing evidence of AXL implication in EMT and the deregulation of the tumor microenvironment, this RTK may be an interesting candidate for the prediction of disease progression including metastasis, relapse, and therapy response. Some studies suggest that AXL could also be an interesting marker for patients' survival of different cancer types and a recent meta-analysis support these observations [5, 115, 116]. Also, a study using liquid biopsies for informative diagnosis in lung adenocarcinoma patients found AXL to be more highly expressed in circulating tumor cells from patients with a poor prognosis [117]. However, further large-scale analysis will be required to validate the prognostic value of AXL expression in cancer.

Secondly, since AXL inhibitors will likely enter the clinic in a near future, it will be important to predict potential secondary effects and resistance mechanisms limiting their clinical use. More fundamentally, there is a need to stratify cancers based on AXL dependency so as to select patients that could benefit the most from AXL targeted therapies and avoid potential toxicity or resistance. Furthermore, it is key to find the right timing for the use of anti-AXL therapies in the clinic. Beyond their potential use in preventing metastases in early stages of cancer, the evidence suggesting that AXL activity can keep the disseminated tumor cells dormant could provide a way to eliminate disseminated cells by making them less resistant to other therapies. Thus, identifying the optimal timing and targets to use with anti-AXL treatment could be crucial in determining their effectiveness.

Finally, preclinical data provides ample evidence that therapeutic targeting of AXL can greatly potentiate the effectiveness of other therapies such as standard chemotherapy, radiotherapy,

immunotherapy or targeted therapy. As an example, AXL inhibition could be used to prepare the field before the administration of the designed combination therapy. Accordingly, there is a great chance that the future of anti-AXL therapy in the clinic will be as a combination agent and future studies should focus on testing the most promising combinations in different contexts.

Funding

This work was supported by operating grants from the Canadian Institute of Health Research (202104PJT to J.-F.C.). J.-F.C. holds the Transat Chair in Breast Cancer Research and the Canada Research Chair in Cancer Signaling and Metastasis. M.-A.G. is a recipient of a CIHR Doctoral studentship.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Hypothèses de recherches et objectifs

Au cours de cette thèse, plusieurs objectifs sont formulés dans le but de mieux comprendre le rôle d'AXL dans la progression métastatique du cancer du sein et d'utiliser ces connaissances pour décrire de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Objectif 1 (Chapitre 2) : Utiliser une signature génétique de délétion d'AXL dans le but de découvrir des médicaments existants pouvant être repositionnés pour le traitement du cancer du sein triple négatif.

Les thérapies ciblées font défaut pour gérer le cancer du sein triple négatif (TNBC) en clinique. Les patients sont donc traités de routine avec la chimiothérapie menant à de nombreux effets secondaires et à l'émergence de résistance. Développer de nouvelles avenues de traitements efficaces représente donc un défi clinique urgent, mais le développement de médicament prend beaucoup de temps et est coûteux. Le repositionnement de médicaments déjà en utilisation pour d'autres maladies est donc une approche intéressante. Un corpus important de travaux a établi AXL comme une cible clinique prometteuse pour la gestion de ce cancer agressif due à son rôle dans la progression métastatique et la résistance aux traitements. Ainsi, l'hypothèse du chapitre 2 est que *la signature de suppression d'AXL peut être utilisée pour explorer si des médicaments déjà connus pourraient être repositionnés pour le traitement du TNBC*. Le but est alors de déterminer l'efficacité de médicaments identifiés grâce cette approche de pharmacogénomique pour éliminer des cellules TNBC humaines *in vitro* et *in vivo*. Les médicaments ainsi repositionnés pourraient alors être amenés en clinique plus rapidement et à moindre coût.

Objectif 2 (Chapitre 3) : Comprendre le rôle d'AXL dans la progression métastatique du cancer du sein HER2⁺.

Des approches thérapeutiques ciblant AXL sont en développement pour une grande variété de cancer, incluant le cancer du sein. En revanche, aucun modèle génétique de cancer n'a encore été utilisé pour mieux comprendre son rôle dans ce contexte. Dans les modèles cellulaires de cancer du sein, AXL est considéré comme un marqueur du sous-type triple négatif, mais nos études montrent que c'est une autre histoire chez le patient. En effet, AXL est surexprimé dans tous les

sous-types de cancer du sein et, chez les patients HER2⁺, il corrèle avec une survie réduite et la présence de métastases. Ainsi, dans le chapitre 3, un modèle préclinique de cancer du sein HER2⁺ incluant une délétion génétique d'AXL a été utilisé pour étudier le rôle d'AXL dans ce contexte. L'hypothèse posée est alors qu'*AXL est une cible thérapeutique intéressante pour limiter la progression métastatique du cancer du sein HER2⁺*. Ainsi, il est essentiel de mieux comprendre comment AXL est activé dans ces cancers. Considérant que le rôle de son ligand GAS6 est controversé et qu'AXL peut parler avec d'autres récepteurs tyrosines kinases incluant EGFR, l'hypothèse est qu'*AXL peut être activé par HER2 sans la nécessité de GAS6 pour mener à l'invasion cellulaire et la formation de métastases*. En conséquence, l'efficacité de l'inhibition pharmacologique d'AXL pour la progression du cancer du sein HER2⁺ a été définie *in vivo*, proposant une nouvelle stratégie thérapeutique combinant l'inhibition d'AXL et HER2.

Objectif 3 (Chapitre 4) : Étudier la contribution d'AXL à la dérégulation du microenvironnement tumoral.

Le microenvironnement tumoral a un grand impact sur la progression métastatique et la résistance aux médicaments et AXL émerge comme une cible intéressante dans ce contexte. Les avancées réalisées dans les dernières décennies ont permis de développer des traitements ciblant HER2 qui améliorent grandement la survie des patients atteints de cancer du sein HER2⁺. Par contre, une bonne proportion de patients ne répond pas à ces traitements standards ou développe une résistance. Ainsi, de nouvelles avenues thérapeutiques sont nécessaires et les thérapies jouant sur le microenvironnement, comme l'immunothérapie, sont étudiées. Cependant, des études récentes ont montré que les cancers du sein HER2⁺ ne sont pas de très bons candidats pour l'immunothérapie. Ainsi, l'hypothèse du chapitre 4 est que *l'inhibition d'AXL pourrait augmenter une réponse à l'immunothérapie pour ce sous-type de cancer du sein en affectant le microenvironnement tumoral*. Ce chapitre a alors pour but de définir l'effet de la délétion d'AXL dans les cellules cancéreuses sur la dérégulation du microenvironnement et étudier le rôle d'AXL dans la réponse hypoxique. Étant donné que l'hypoxie et un microenvironnement protumoral diminuent l'efficacité des traitements d'immunothérapie, l'inhibition d'AXL est testé pour générer un contexte favorable à l'efficacité d'un traitement anti-PD-1, ouvrant la voie à une nouvelle approche de combinaison thérapeutique pour améliorer l'efficacité des traitements actuels.

Objectif 4 (Chapitre 5) : Comprendre le rôle d'AXL dans les cellules stromales.

Dans les chapitres précédents, le rôle d'AXL dans les cellules cancéreuses menant à la progression métastatique a été abordé. Par contre, AXL est aussi exprimé et joue des rôles importants dans d'autres types cellulaires qui peuvent aussi être impliqués dans la progression métastatique. Ainsi, l'hypothèse du chapitre 5 est qu'*AXL peut affecter la progression tumorale par ces rôles joués dans différentes cellules stromales, plus particulièrement dans le système immunitaire et les cellules endothéliales*. Étant donné l'intérêt grandissant pour les agents ciblant AXL, ces études permettront de mieux comprendre l'effet d'une inhibition systémique d'AXL à des fins thérapeutiques.

Chapitre 2 - AXL knockdown gene signature reveals a drug repurposing opportunity for a class of antipsychotics to reduce growth and metastasis of Triple Negative Breast Cancer

Le cancer du sein triple négatif (TNBC) est l'un des plus agressifs et est associé à un faible pronostic puisqu'ils mènent souvent à la formation de métastases. Le traitement actuel en clinique pour ces patients est la chimiothérapie, mais des effets secondaires graves y sont liés et il y a un grand risque de rechute. Ainsi, des thérapies ciblées sont en développement pour mieux gérer la maladie. Le processus de développement de nouveaux médicaments est très long et coûteux, ce qui a poussé les chercheurs à étudier les effets potentiels de drogues déjà utilisées pour d'autres buts. Étant donné qu'AXL émerge comme une cible de choix spécialement pour le TNBC, le chapitre suivant entreprend d'utiliser une approche de pharmacogénomique minant la signature de suppression d'AXL pour explorer le repositionnement de médicaments existants. Cette étude mène alors à la découverte d'agents thérapeutiques déjà approuvés qui pourront être amenés en clinique pour traiter le cancer du sein TNBC plus rapidement et avec un moindre coût.

Contributions

Figure 2.1 : Marie-Anne Goyette

Figure 2.2 : Marie-Anne Goyette

Figure 2.3 : Marie-Anne Goyette

Figure 2.4 : Marie-Anne Goyette

Figure 2.5 : Rebecca Cusseddu

Figure 2.6 : Marie-Anne Goyette et Rebecca Cusseddu

Figure 2.S1 : Marie-Anne Goyette

Figure 2.S2 A-B : Marie-Anne Goyette

Figure 2.S2 C: Rebecca Cusseddu

Figure 2.S3 : Marie-Anne Goyette

Figure 2.S4 : Marie-Anne Goyette

Figure 2.S5 A, D-E: Marie-Anne Goyette

Figure 2.S5 B, C, F-I: Rebecca Cusseddu

Figure 2.S6 : Marie-Anne Goyette et Rebecca Cusseddu

Conceptualisation, M.A.G, J.P.G and J.F.C; Méthodologie, M.A.G and J.F.C; Recherche, M.A.G, R.C and I.E; Écriture – Brouillon original, M.A.G and J.F.C; Écriture- Revision and édition, M.A.G, I.E, A.A, R.C, N.E., B H.K, J.P.G and J.F.C; Supervision : J.F.C; Acquisition de financement, J.P.G and J.F.C.

AXL knockdown gene signature reveals a drug repurposing opportunity for a class of antipsychotics to reduce growth and metastasis of Triple Negative Breast Cancer

Marie-Anne Goyette^{1,2}, Rebecca Cusceddu^{1,2}, Islam Elkholi^{1,2}, Afnan Abu-Thuraia^{1,2}, Nehme El-Hachem¹, Benjamin Haibe-Kains^{3,4,5,6,7}, Jean-Philippe Gratton⁸ and Jean-François Côté^{1,2,9,10*}

¹ Montreal Clinical Research Institute (IRCM), Montréal, QC, H2W 1R7, Canada.

² Molecular Biology Programs, Université de Montréal, Montréal, QC, H3T 1J4, Canada.

³ Princess Margaret Cancer Centre, Toronto, University Health Network, ON M5G 1L7, Canada

⁴Department of Medical Biophysics, University of Toronto, Toronto, ON M5G 1L7, Canada.

⁵Department of Computer Science, University of Toronto, Toronto, ON M5T 3A1, Canada.

⁶Ontario Institute for Cancer Research, Toronto, ON M5G 1L7, Canada.

⁷Vector Institute, Toronto, ON M5G 1L7, Canada.

⁸Department of Pharmacology and Physiology, Université de Montréal, Montréal, QC, H3C 3J7, Canada.

⁹ Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, H3C 3J7, Canada.

¹⁰Department of Anatomy and Cell Biology, McGill University, Montréal, QC, H3A 0C7, Canada.

*Corresponding author and lead author: Jean-François Côté, jean-francois.cote@ircm.qc.ca

** Manuscrit publié dans Oncotarget (2019)

Abstract

Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) is an aggressive cancer subtype that is associated with a poor prognosis due to its propensity to form metastases. The receptor tyrosine kinase AXL plays a role in tumor cell dissemination and its expression in breast cancers correlates with poor patient survival. Here, we explored whether already used drugs might elicit a gene signature similar to that seen with AXL knockdown in TNBC cells and which could, therefore, offer an opportunity for drug repurposing. To this end, we queried the Connectivity Map with an AXL gene signature which revealed a class of dopamine receptors antagonists named phenothiazines (Thioridazine, Fluphenazine and Trifluoperazine) typically used as anti-psychotics. We next tested if these drugs, similarly to AXL depletion, were able to limit growth and metastatic progression of TNBC cells and found that phenothiazines are able to reduce cell invasion, proliferation, viability and increase apoptosis of TNBC cells *in vitro*. Mechanistically, these drugs did not affect AXL activity but instead reduced PI3K/AKT/mTOR and ERK signaling. When administered to mice bearing TNBC xenografts, phenothiazines were able to reduce tumor growth and metastatic burden. Collectively, these results suggest that these antipsychotics display anti-tumor and anti-metastatic activity and that they could potentially be repurposed, in combination with standard chemotherapy, for the treatment of TNBC.

Keywords : Triple Negative Breast Cancer, Drug repurposing, AXL, Phenothiazines, Metastasis

Introduction

Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) is an aggressive molecular subtype that is usually associated with increased metastatic incidences and a poor prognosis [7, 15, 185]. This particularly aggressive cancer subtype represents 10-20% of breast cancer cases and is characterized by the low expression of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and HER2 receptor. Currently, no efficient targeted therapies are available to treat this aggressive cancer. Being routinely treated with standard chemotherapies, TNBC patients are commonly subject to serious side effects and are at high risk of developing drug resistance, tumor relapses and metastases [186]. Therefore, developing effective treatments to treat TNBC represents one of the most pressing challenge in breast cancer research.

AXL is a member of the TAM family of receptor tyrosine kinases (RTKs) that also includes TYRO3 and MER. These RTKs have well-established roles in various steps of tumorigenesis including proliferation, survival, migration, angiogenesis, immune evasion and drug resistance [187]. In breast cancer cell lines, AXL expression is restricted to TNBC cells that display strong mesenchymal phenotypes [180]. Functionally, AXL-driven mesenchymal characteristics endow tumor cells with an increased invasive phenotype and a resistance to chemotherapeutics [180, 188-190]. Mechanistically, AXL promotes tumorigenesis and metastasis in part by activating key signaling molecules, including PI3K/AKT, MAPKs and Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) modulators [178, 187]. Indeed, we and others have shown that the expression of AXL in human solid tumors is linked to a poor prognosis and is essential for metastasis in breast cancer models of TNBC and HER2+ subtypes *in vivo* [178, 189]. A significant body of work, therefore, has established AXL as a promising clinical target for managing multiple cancers, and TNBC in particular. Consequently, a small molecule inhibitor specific to AXL (R428; also known as BGB-324 or Bemcentinib) is currently under investigation in a phase II clinical trial for various cancers, including non-operable and metastatic TNBC [191, 192]. While this specific AXL inhibitor may soon reach the clinic and is promising in terms of overall survival and response rate as suggested by data from preclinical models [193], unfavorable outcomes including problems with drug tolerability and resistance could also arise. In this case, novel alternative approaches mimicking AXL inhibition might be of importance for advanced TNBC patient care.

Drug repurposing involves the identification of novel clinical applications of previously approved drugs. Since these drugs are approved by the FDA or other regulatory agencies and are used in the clinic, their safety, toxicity and pharmacological properties have already been thoroughly characterized. Consequently, drug repurposing represents a cost- and time-effective approach to identify novel pharmacotherapies to manage aggressive conditions such as TNBC. A powerful tool to identify drugs for repurposing is the use of large collections of genome-wide transcriptional gene expression datasets from human cells treated with a variety of FDA approved and experimental small molecules.

In this study, using the novel integrative package for pharmacogenomics PharmacoGx [194-196], we found that the phenothiazine class of antipsychotics (Thioridazine (THZ), Fluphenazine (FLZ) and Trifluoperazine (TFP)) displays a gene signature similar to that seen with *AXL* depletion in TNBC cells. *In vitro*, phenothiazines were able to reduce cell invasion, proliferation, tumorsphere formation and increase cell death in TNBC cells and these actions correlated with reduced signalling from PI3K/AKT/mTOR and ERK pathways. *In vivo*, the administration of phenothiazines to mice bearing xenografts of MDA-MB-231 TNBC cells reduced tumor growth and metastatic burden. These findings identify members of this class of drugs as potential candidates for repurposing in TNBC.

Results

Pharmacogenomics identifies phenothiazines, a class of antipsychotics, as candidates for drug repurposing in TNBC

TNBC is currently treated by chemotherapy and carries a risk of drug resistance, relapse and metastasis [15]. Because AXL is emerging as a promising drug target to limit certain metastatic cancers including TNBC [178, 187, 189], we sought to identify drugs that could be repurposed based on their induction of a gene signature similar to that seen with AXL depletion. The aggressive AXL^{high} TNBC cell line MDA-MB-231 was subjected to siRNA-mediated knockdown of *AXL* and RNA-seq was performed to generate an *AXL* gene signature (GSE120268). To validate this signature, we first performed Gene Ontology and Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) to assess enrichment of biological processes and pathways [197]. Many of the genes associated with known physiological roles of AXL including proliferation, migration and regulation of EMT, were found to be modulated by AXL depletion (Figure 2. S1A, C). Furthermore, different pathways related to AXL were enriched including PI3K/AKT, mTOR and MAPK signalling pathways (Figure 2. S1B-C). Altogether, these results suggest that the generated *AXL* gene signature is representative of AXL depletion in cancer cells and is a valid tool to interrogate pharmacogenomics databases.

We next interrogated the Connectivity map (CMap), a database intersecting pharmacological drugs and genomics data, using our Bioconductor platform PharmacoGx to find known drugs that induce a response that mimics the *AXL* signature (Figure 2.1A) [194-196]. Approximately 50 compounds were identified (P -value <0.05 , Table 2. S1) which we reduced to the 10 compounds with the highest positive connectivity score (Figure 2.1B). Among the top hits, we found inhibitors of PI3K and mTOR whose pathways are known to be modulated downstream of AXL [187, 198] therefore validating our approach. The compound with the highest connectivity, STOCK1N-35696, is not well characterized and not currently used in the clinic. As such, it was not further investigated as part of our search for previously accepted drugs. Interestingly, four dopamine receptor (DR) inhibitors, belonging to the antipsychotic family of phenothiazines, were among the top hits in our screen (Figure 2.1B) [199]. Some members of this family of antipsychotics were recently reported to have effects on proliferation, apoptosis, stemness and migration in several cancer types including melanoma [200, 201], ovarian cancer [202, 203], breast cancer [204, 205], cervical and endometrial cancer [206] and lung cancer [207, 208]. Indeed, previous work has shown that DRs are enriched

in leukemic and primary TNBC cancer stem-like cells, suggesting that THZ could act through these receptors to limit their expansion [209]. However, our RNA-seq data suggest that DRs are minimally expressed in MDA-MB-231 cells, implying that their mechanism of action is likely to be different in these cells. THZ and TFP have also been linked to a decrease in activity of PI3K/AKT pathway, however the mechanism in this context remains unexplored [202, 203, 206]. In this study, we selected Thioridazine (THZ), Fluphenazine (FLZ) and Trifluoperazine (TFP) to further investigate their action on TNBC.

We next used PharmacoGx to extract the gene signatures of THZ, FLZ or TFP from CMap and identify the common gene expression patterns shared by cells when treated with these antipsychotics and compared these to the patterns obtained when AXL is depleted in MDA-MB-231 cells. By comparing Gene Ontology analyses across all treatments, we found that genes involved in the biological processes of cell migration, cell proliferation and apoptosis were modulated in all of the conditions (Figure 2.1C). Furthermore, genes involved in mTOR, MAPK and PI3K/AKT signaling pathways were also modulated, suggesting a possible mechanism of action for these drugs (Figure 2.1D). To further confirm the effect of these compounds in the context of TNBC, we also performed RNA sequencing of MDA-MB-231 treated with one of the phenothiazines, THZ, considering that all three drugs have a similar signature in CMap. Accordingly, we found that the pattern of biological processes and pathways modulated by THZ treatment to be similar to those found using the PharmacoGx datasets (Figure 2. S1D). Thus, these analyses suggest that these antipsychotics could be candidates for drug repurposing in TNBC.

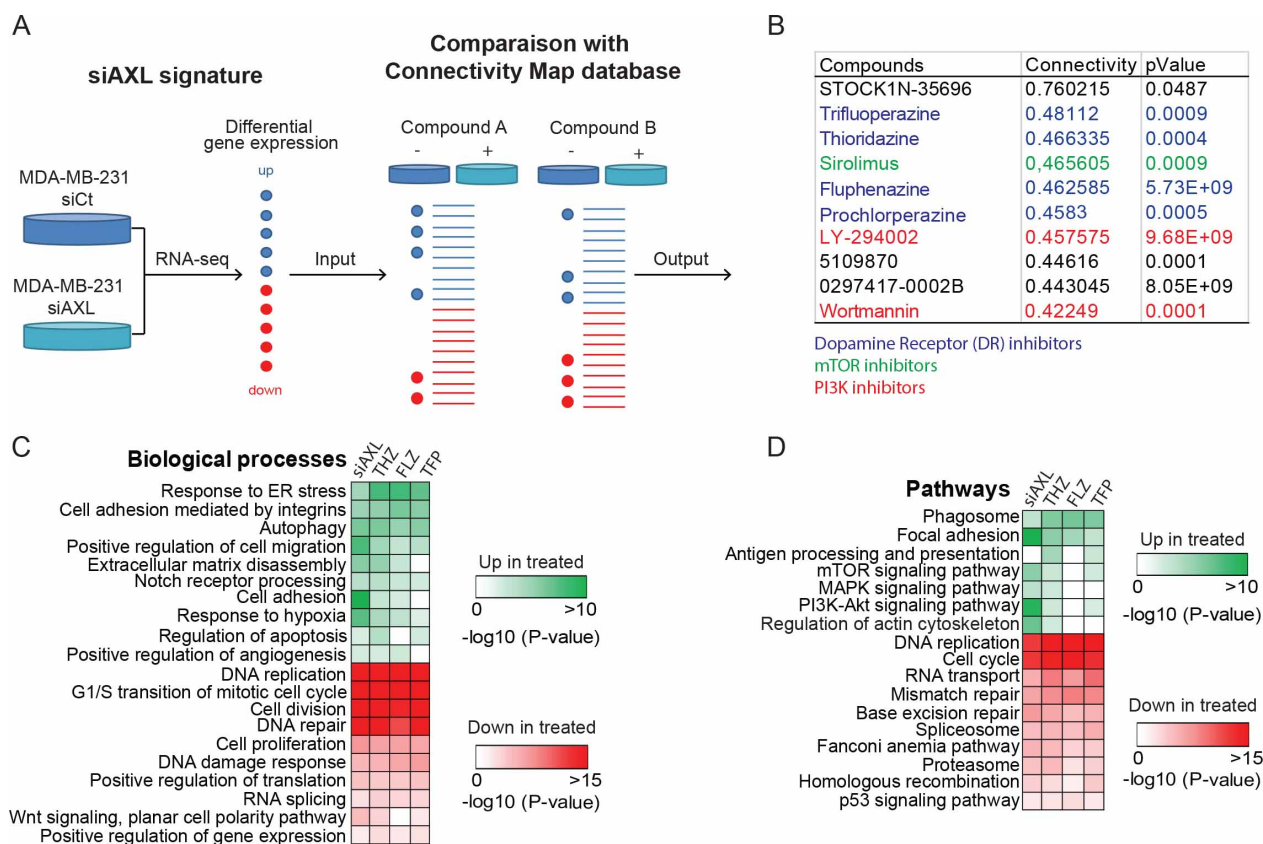


Figure 2.1: AXL knockdown gene expression signature in MDA-MB-231 is similar to the signature of a class of antipsychotics.

A) Representation of the Connectivity map (CMap) approach used to define FDA approved drugs that resembles AXL depletion in MDA-MB-231 TNBC cell line. MDA-MB-231 cells treated with siCtI or siAXL were used to generate a gene expression signature that was compared to the CMap reference database to identify compounds that produce similar gene expression modulations.

B) Table of the top 10 hits with the best Connectivity with the AXL knockdown signature. This CMap analysis includes a class of dopamine receptor inhibitors, the phenothiazines that were selected for further characterization. Other families of inhibitors are also highlighted.

C-D) The gene signatures changes induced by phenothiazines treatments were extracted from PharmacoGx and compared to our AXL knockdown signature. Gene Ontology analyses of the common modulated genes show the pathways and biological processes modulated by these treatments.

Phenothiazine-family antipsychotics reduce migration and invasion of TNBC cells

Since AXL is a driver of cell migration and invasion in TNBC cells [189], we investigated whether phenothiazines can interfere with these processes. As expected, targeting AXL either pharmacologically (using the small molecule inhibitor R428) or genetically through siRNA in MDA-MB-231 cells decreased cell migration speed as measured by live cell imaging (Figure 2.2A-C, Figure 2.S2C, Supplemental Movie1). Treatment of MDA-MB-231 cells with the phenothiazines similarly reduced cell migration (Figure 2.2A-C, Figure 2. S2C, Supplemental

Movie1). Similar attenuation in cell migration was also observed when the TNBC cell line Hs578T was treated with THZ, FLZ or TFP (Figure 2. S2A). Similar to AXL pharmacological inhibition or siRNA-mediated depletion, treatment of MDA-MB-231 cells with phenothiazines also reduced cell invasion in a matrigel Boyden invasion assay toward serum (Figure 2.2D). However, only the treatment of Hs578T cells with FLZ and TFP, but not THZ, was able to decrease their invasion (Figure 2.S2B). Collectively, these results suggest that certain phenothiazine antipsychotics can reduce the motility and invasiveness of TNBC cells.

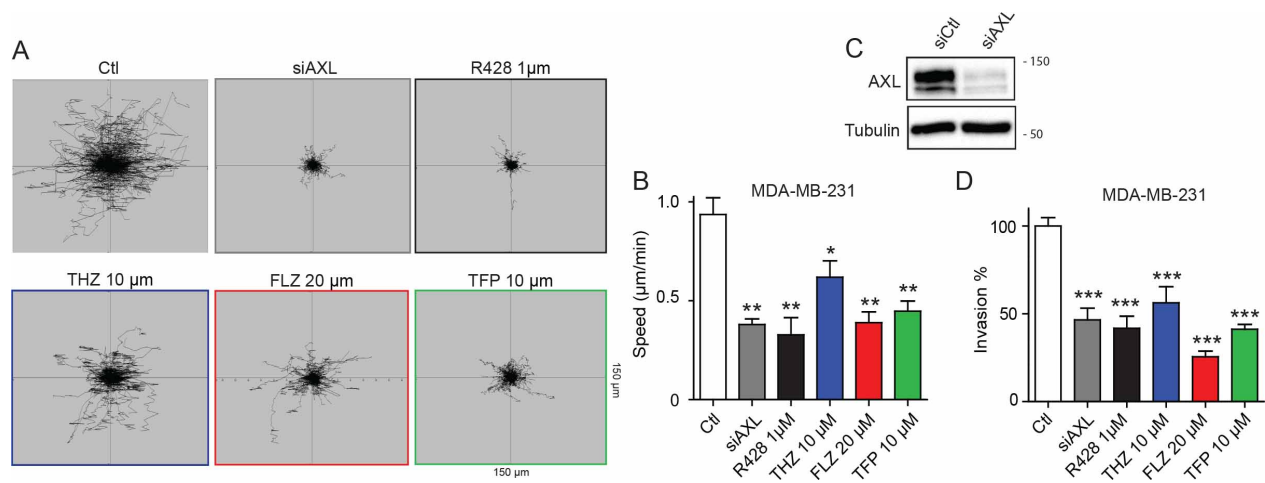


Figure 2.2: Treatments with THZ, FLZ and TFP reduces the migration potential of TNBC cells.

A-B) Treatments with the indicated concentrations of phenothiazines reduce cell migration speed. The migration of MDA-MB-231 cells was tracked by time-lapse microscopy over a 6h period in the presence of phenothiazines or AXL inhibitor or siRNA as positive controls. (**p=0.0029, **p=0.0044, *p=0.0365, **p=0.0016) (n=3). Data are represented as mean +/- SEM.

C) Cells were transfected with the indicated siRNA and knockdown of AXL was validated by Western Blot. Equal loading of proteins between samples was confirmed by blotting against Tubulin.

D) Inhibition of AXL via siRNA and the small molecule inhibitor R428 or treatments with the antipsychotics reduce invasion of MDA-MB-231 cells in a Boyden invasion assay toward FBS as an attractant (***p<0.0001). (n=3) Data are represented as mean +/- SEM.

Phenothiazines reduce the proliferation of TNBC cells

Further analysis of the RNA-Seq data revealed a shared effect of both AXL depletion and phenothiazine treatment on genes involved in cell proliferation, cell cycle and G1/S transition of the mitotic cell cycle (Figure 2.1C-D, Figure 2. S3A). This prompted us to investigate whether phenothiazines might display anti-proliferative effect on TNBC cells. To test this, we used MDA-MB-231 cells engineered to express Luciferase (MDA-MB-231-Luc) and measured bioluminescence as a surrogate to quantify the number of cells at different time points of the

treatment. We found that MDA-MB-231-Luc cells treated with either the AXL inhibitor R428 or phenothiazines displayed reduced proliferation in a dose-dependent manner (Figure 2.3A, Figure 2. S3B). Furthermore, BrdU flow cytometry analyses showed that both MDA-MB-231 and Hs578T cells treated with phenothiazines accumulate in G1/S (Figure 2.3B, Figure 2. S3C-D). AXL inhibition with R428 led to the accumulation of cells in G1/S in MDA-MB-231 cells but this effect was not significant in Hs578T cells (Figure 2.3B, 2. S3C-D).

We next tested whether phenothiazines can decrease TNBC progression in a more direct way. The ability of forming tumorspheres and to proliferate in suspension in an *in vitro* context is suggested to be mediated by a subpopulation of cells with stem cell-like traits [210, 211]. Being capable of self-renewal in addition to giving rise to a progeny of cancer cells, this subpopulation of cells is also believed to maintain tumor progression *in vivo* [210, 211]. As such, we tested the effect of the AXL inhibitor R428 or the phenothiazines on tumorsphere formation and found that treating either MDA-MB-231 or Hs578T TNBC cells with R428, THZ, FLZ or TFP led to a dose-dependent decrease in tumorsphere formation (Figure 2.3C-D, Figure 2. S3E-F). Together, these results demonstrate that phenothiazines have anti-proliferative effects and also suggest a potential role for these drugs in decreasing the progression of TNBC.

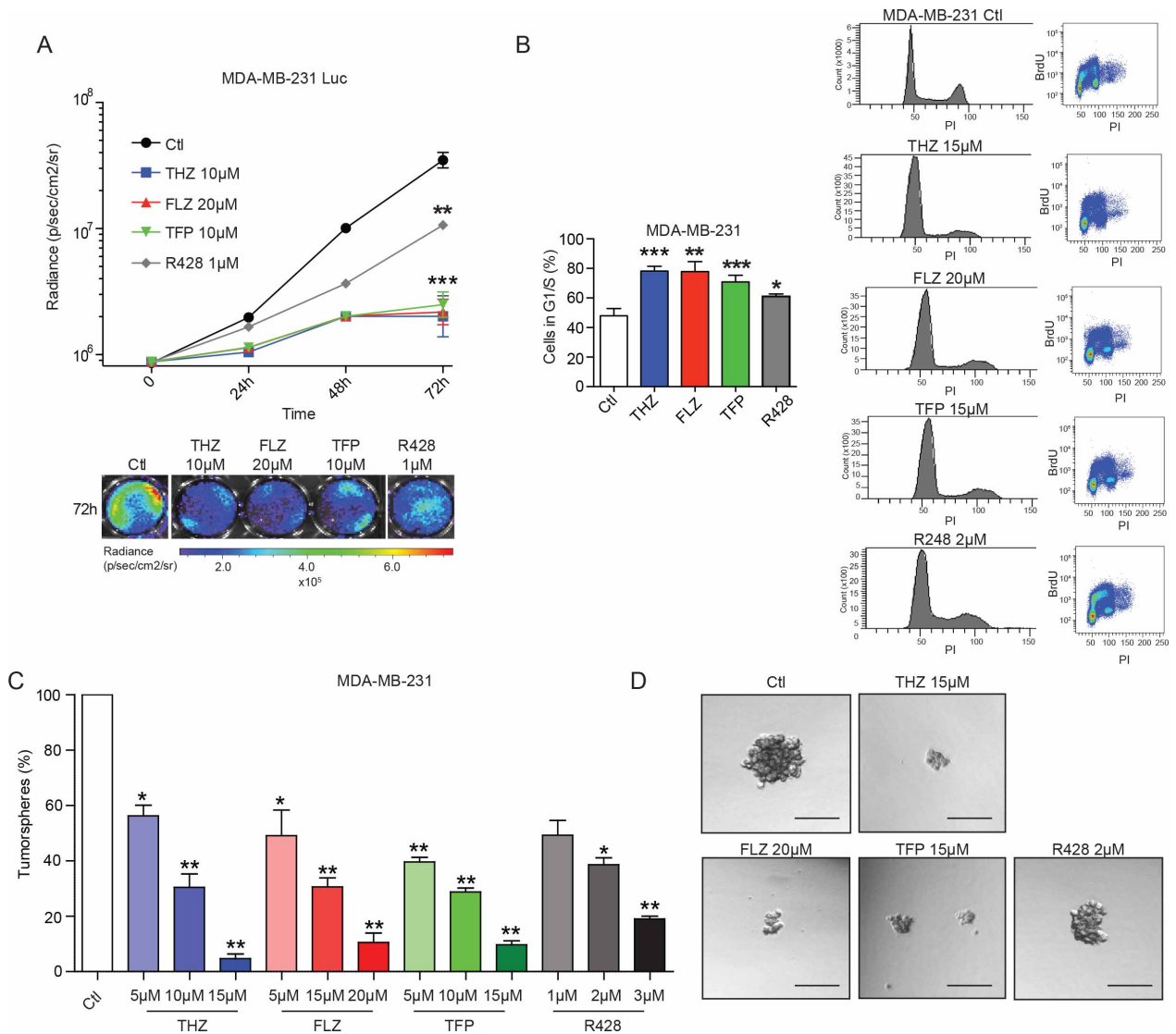


Figure 2.3: The phenothiazines reduce cell proliferation and induce cell cycle arrest of TNBC cells.

A) The antipsychotics and AXL inhibitor R428 reduce the proliferation of MDA-MB-231-Luc cells as shown by quantification of the luminescence signal (expressed in radiance) over a 72h period (** $p=0.0002$, $p=0.0009$, ** $p=0.0041$) ($n=4$).

B) Treatments with the antipsychotics and R428 led to an increase in the number of cells in G1/S. Cell cycle analyses were done using FACS analyses of BrdU stained MDA-MB-231 cells. (** $p=0.0009$, ** $p=0.0033$, * $p=0.0041$, * $p=0.038$) ($n=3$). Data are represented as mean \pm SEM.

C-D) Tumorspheres formation of MDA-MB-231 is inhibited by THZ, FLZ, TFP and R428 in a dose-dependent manner (* $p=0.0375$, ** $p=0.0088$, ** $p=0.0018$, * $p=0.0279$, ** $p=0.0057$, ** $p=0.0023$, ** $p=0.0096$, ** $p=0.0054$, ** $p=0.0022$, * $p=0.0126$, ** $p=0.0033$) ($n=3$). Control was set at 100% for comparison purposes. Scale bar, 150 μ m. Data are represented as mean \pm SEM.

Phenothiazines cooperate with paclitaxel to reduce tumorsphere formation

RNA-seq analyses also revealed a potential role for these compounds on apoptosis (Figure 2.1C). Indeed, we found that higher doses of phenothiazines promoted apoptosis and cell death, as determined by Annexin V and Propidium Iodide (PI) FACS analyses in MDA-MB-231 and Hs578T cells (Figure 2.4A-B, Figure 2. S4A-B). In contrast, pharmacological inhibition of AXL with R428 or AXL depletion by siRNA did not induce apoptosis in either the MDA-MB-231 or the Hs578T cells, suggesting that broader, pleiotropic effects may result from phenothiazine treatment in comparison to interfering with AXL function (Figure 2. S4C-E). In agreement with these observations, viability of MDA-MB-231 cells was reduced by THZ, FLZ and TFP, but not by R428 treatment (Figure 2.4C).

Based on the observed anti-proliferative and pro-apoptotic effects of the phenothiazines, we asked whether these drugs might sensitize TNBC cells to the conventional chemotherapy treatment currently used to treat this form of breast cancer in the clinic [185, 186]. We tested whether the combination of the phenothiazines or R428 might cooperate with the chemotherapeutic paclitaxel to decrease tumorsphere formation and cell viability. While treatment with a suboptimal dose of paclitaxel alone did not show a significant effect, the combination with phenothiazines or R428 severely impaired tumorsphere formation and cell viability (Figure 2.4D-E, Figure 2. S4F). These findings suggest that phenothiazines may warrant testing in the clinic as a means to sensitize the tumor cells to standard chemotherapy.

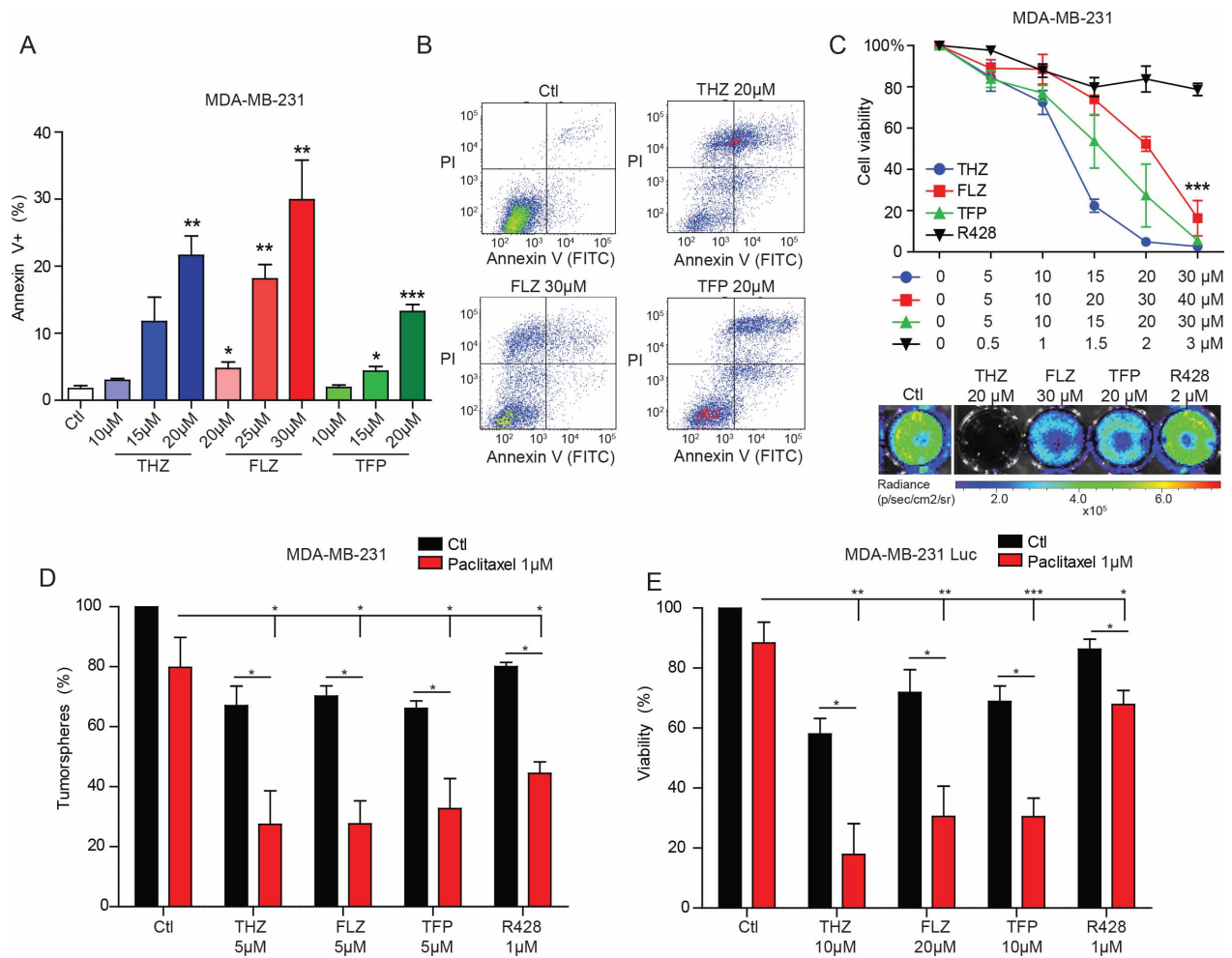


Figure 2.4: THZ, FLZ and TFP exhibit cytotoxic effects on TNBC cells.

A-B) 24h treatments with the antipsychotics induce apoptosis and cell death as evaluated by Annexin V and PI FACS analyses. (** $p=0.0024$, * $p=0.0473$, ** $p=0.0017$, ** $p=0.0089$, * $p=0.0369$, *** $p=0.0006$). (n=3) Data are represented as mean \pm SEM.

C) Phenothiazines reduce cell viability of MDA-MB-231-Luc cells as assessed by quantifying the bioluminescence signal after 24h of treatment as a surrogate of cell number (*** $p<0.0001$). (n=3) Data are represented as mean \pm SEM.

D-E) The combination of paclitaxel and the antipsychotics or R428 increase the inhibitory effect of these drugs on tumorspheres formation and cell viability (* $p=0.0251$, * $p=0.0143$, * $p=0.0292$, * $p=0.0298$ / * $p=0.0187$, * $p=0.0209$, * $p=0.0294$, ** $p=0.0034$, ** $p=0.0014$, ** $p=0.0033$, *** $p=0.0008$, * $p=0.0466$). (n=3) Data are represented as mean \pm SEM.

THZ, FLZ and TFP affect PI3K/AKT/mTOR and MAPK pathways in TNBC

Phenothiazines are known to target dopamine receptors [199], yet our transcriptomics analyses revealed that MDA-MB-231 cells do not express significant amounts of the dopamine receptor family (Figure 2. S5A). We therefore investigated the mechanism of action of phenothiazines in TNBC cells. Since the *AXL* depletion gene signature was similar to the that induced by

phenothiazine treatment, we hypothesized that these drugs might be inhibiting AXL directly. To test this, we measured AXL phosphorylation levels (as a readout of its activation) upon treatment of MDA-MB-231 or Hs578T cells with the phenothiazines and found that it was unaffected, implying that these antipsychotics do not directly target AXL (Figure 2. S5B-C).

Because not all of the characterized effects of phenothiazines on cell viability are reproduced with AXL inhibition (Figure 2.4C, Figure 2. S4C-D), we reasoned that these treatments might have both overlapping and non-overlapping effects. This led us to test whether co-treatment of TNBC cells with R428 together with phenothiazines might result in an additive or synergistic effect on cell invasion or survival. Indeed, we found that the combination of R428 with the antipsychotics had a greater effect on cell invasion and viability than either treatment alone (Figure 2. S5D-E).

Examination of the RNA-Seq analyses suggested that one mechanism of action for the phenothiazines might be through the PI3K-AKT, mTOR and MAPK signaling pathways (Figure 2.1C). Notably, the PI3K/AKT pathway was previously shown to be modulated by these drugs in different cancer types [202, 203, 206]. In the context of TNBC cells, we found that the phosphorylation levels of AKT, mTOR and ERK were reduced upon treatment with phenothiazines in MDA-MB-231 cells (Figure 2.5A-D). In Hs578T, we observed a similar effect of phenothiazines on the activation levels of mTOR and AKT. However, the effects of the drugs were less consistent on ERK activity (Figure 2. S5F-I). Thus, phenothiazines dampen the signalling from PI3K/AKT/mTOR and, to some extent, MAPK pathways in TNBC cells.

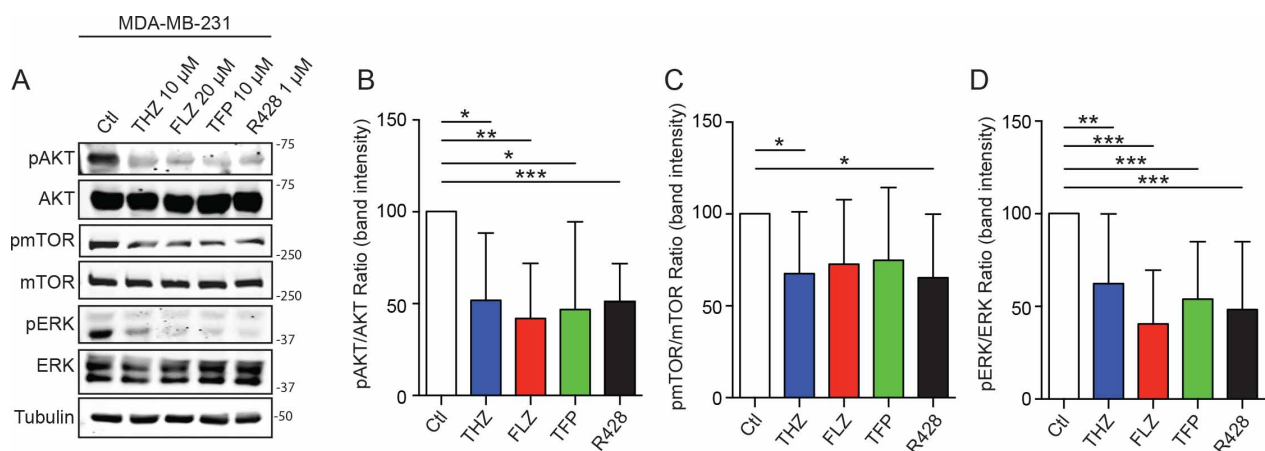


Figure 2.5: Phenothiazines treatments on TNBC affects PI3K/AKT/mTOR and MAPK pathways.

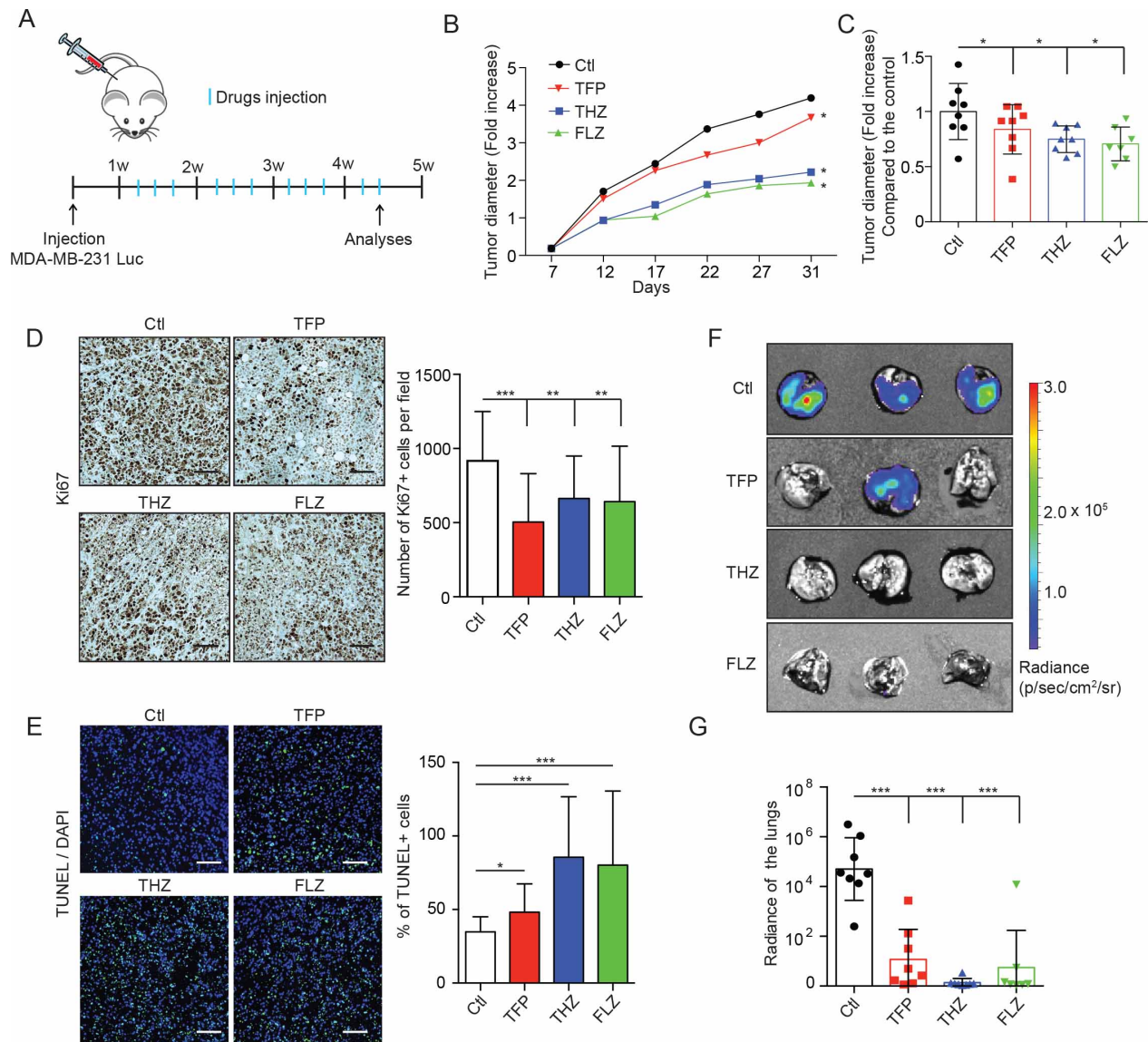
A) THZ, FLZ, TFP and R428 reduce the phosphorylation of mTOR, ATK and ERK in MDA-MB-231.

B-D) Quantification of the phosphorylation intensity was done by measuring a ratio of band intensity of the phosphorylation signal over the signal of the total protein and is presented relative to the control condition for each protein. (*p=0.0188, **p=0.0025, *p=0.0377, ***p=0.0008 / **p=0.0084, ***p<0.0001, ***p=0.0004, ***p=0.0006 / *p=0.0400, *p=0.0342). (n=6-8) Data are represented as mean +/- SEM.

THZ, FLZ and TFP reduce tumor growth and metastasis *in vivo*

To investigate the therapeutic value of these drugs *in vivo*, MDA-MB-231-Luc cells were grafted in the mammary fat pads of nude mice and tumors were allowed to grow for one week prior to treatment with the different phenothiazines as illustrated in Figure 2.6A. These experiments revealed that tumor growth, as measured by tumor diameter, was significantly impaired in treated mice compared to the untreated controls (Figure 2.6B-C). Furthermore, cell proliferation as assessed by Ki67 staining, was decreased (Figure 2.6D). Cell apoptosis, as assessed by a TUNEL assay, was increased in these tumors (Figure 2.6E). These results not only explained the observed *in vivo* phenotypes but also confirmed the *in vitro* effects observed in Figures 2.3-4.

Because 90% of cancer-related deaths are caused by metastasis and since AXL plays a major role in this process, we investigated whether phenothiazine treatment also impacted the metastatic progression of injected TNBC cells. The lungs of the mice, which are the preferred metastatic site of MDA-MB-231 cells in this spontaneous model of metastasis, were harvested at the experimental endpoint and were found by bioluminescence imaging to have a decreased metastatic burden as compared to untreated control animals (Figure 2.6F-G). Furthermore, while the combination of the phenothiazines and paclitaxel *in vivo* tended to decrease the tumor growth and the metastatic burden, the difference between the single and the combined treatments were not statistically significant at the drug doses used (Figure 2. S6A-B). Collectively, these results demonstrate that THZ, FLZ and TFP treatments can decrease tumor growth and the metastatic progression of TNBC cells *in vivo*, making these drugs a viable option for repurposing in the clinic.



Discussion

Managing TNBC represents such a major clinical challenge that novel therapeutic approaches are needed to significantly improve the survival and the quality of life of affected patients. Drug repurposing using pharmacogenomic approaches has emerged as a powerful resource to decrease the cost and time taken to translate novel treatment options from the bench to the bedside. In this study, we demonstrated that the gene expression signature resulting from *AXL* depletion can be used to identify potential drugs to repurpose against TNBC. Using the PharmacoGx platform, we were able to uncover members of a class of antipsychotics (THZ, FLZ and TFP) with the potential to antagonize TNBC progression. These compounds are typically described as dopamine receptor antagonists and have been used in the clinic to treat schizophrenia and other psychotic disorders [199]. Interestingly, some studies have demonstrated that schizophrenia patients have a low prevalence of melanoma that could be attributed to their treatment by neuroleptics, suggesting that these antipsychotic drugs might have a protective role against cancer [212, 213].

THZ was suggested to act on cancer cells via dopamine receptors that are expressed by a population of breast cancer and AML cells having stem cell-like properties [209]. Nonetheless, in our case, transcriptomic analyses revealed that MDA-MB-231 cells do not express significant amounts of the dopamine receptor family suggesting that these drugs may have different target(s) in TNBC cells. In agreement with our observations, a recent study investigated the effects of THZ on a panel of TNBC cells relative to their DRD2 expression [205]. While they found that THZ treatment of cells expressing DRD2 reduced their self-renewal and sphere formation via the DRD2/STAT3/IL-6 pathway, cell proliferation and survival were affected in a DRD2-independent manner in all cell lines via an unknown mechanism. Our study demonstrates that the effect of phenothiazines on proliferation and survival of TNBC cells expressing low levels of DRD2 could be mediated by decreasing the activity of the PI3K/AKT/mTOR and, to some extent, MAPK pathways. Interestingly, a similar pharmacogenomic approach that exploited a gene signature of AKT pathway inhibition identified the same three antipsychotics and suggested that at least THZ and TFP may be functioning through inhibition of the PI3K/AKT pathway [202, 203, 206]. While these findings suggest that phenothiazines may act directly on these signaling molecules, further work is needed to determine their exact targets in addition to DRD2.

The effects of phenothiazines seem to be cancer cell-dependent. Hs578T cells did not react in exactly the same manner as MDA-MB-231 cells and this is probably due to their different mutational profiles. The exact target(s) of phenothiazines in these cells should be determined to better understand the differences we and others have observed. Interestingly, we also determined that co-treating the TNBC cells with the AXL inhibitor R428 and phenothiazines further inhibited cell invasion and survival. These results suggest that there might be both common and unique effectors for these drugs. In fact, it is possible that the combination of these two drugs that individually affect PI3K/AKT signalling can further reduce cancer aggressiveness.

Members of the phenothiazine class of drugs have been shown to decrease proliferation and survival of different type of cancer cells [200, 202, 203, 205-207]. In this study, we report that THZ, FLZ and TFP have a negative impact on cell migration and invasion, proliferation and viability *in vitro* using TNBC cell lines as models. We also demonstrate that these drugs robustly decrease metastasis *in vivo* in nude mice. In addition, the treated mice did not show any alarming physical side effect at the end of the experiments (as assessed by weight measurements) other than drowsiness. Notably, it is hard to compare the doses we used in these experiments to those used in treated patients, especially since the mode of administration is different and the pharmacokinetics (blood concentrations, half-life and metabolism) of these compounds is unknown in our studies. However, because phenothiazines are FDA-approved and used in the clinic, their tolerability and toxicity levels in humans are already known. As such, the drowsiness side effect in mice remains a minimal issue to be addressed in future work. Indeed, further studies on TNBC pre-clinical models would complement our study before repurposing these drugs for TNBC patients with the goal of defining the most effective dosage in terms of diminishing tumor burden and metastatic incidences while minimizing the associated side effects.

Currently, advanced TNBC is mainly managed by chemotherapy. The lack of targeted therapies for this disease and the risk of developing resistance constitute bottlenecks in patient care and therapeutic strategies. AXL is a known mediator of resistance to different therapies including Receptor Tyrosine Kinase inhibitors, chemotherapeutics and radiation [187]. Therefore, the *AXL* gene signature identified here has the potential to reveal drugs that could sensitize TNBC cells to traditional therapies. Indeed, our work on TNBC cells and other studies in different cancer cell

types have shown that phenothiazines can increase the sensitivity to traditional therapies including chemotherapy and radiotherapy [207, 214, 215]. Nonetheless, most of the studies, including our own, have been carried out using immunocompromised mice and it has been established that immune cells greatly modulate the efficacy of traditional therapies. Nevertheless, immunocompetent mouse cancer models were successfully treated with THZ in two different studies, suggesting that the effect on tumor growth is maintained in immunocompetent models [201, 204].

Altogether, we show that THZ, FLZ and TFP are potential candidates to be repurposed for the treatment of TNBC due to their ability to limit tumor growth and metastatic burden in mouse models. Metastasis being an undefeatable clinical obstacle, these drugs could be a new approach to test for improving the survival and quality of life of TNBC patients. In conclusion, our pharmacological approach, using an *AXL* gene signature, facilitated the identification of approved and clinically available drugs for repurposing in the treatment of TNBC. Thus, the identified compounds hold potential for TNBC treatment and constitute good candidates for further clinical testing in combination with current chemotherapeutic approaches.

Experimental procedures

Cell Culture and Treatments

Human breast cancer cells MDA-MB-231 Luc [36] and Hs578T were maintained in DMEM with 10% FBS supplemented with ZellShield (Minerva). Cells were treated with Thioridazine (Sigma), Fluphenazine (Sigma), Trifluoperazine (Sigma), R428 (Apexbio) and paclitaxel (Sigma) at the indicated concentrations and time. Phenothiazines were resuspended in water and R428 and paclitaxel in DMSO. For experiments including siRNA, cells were transfected with a control siRNA or an ON-TARGET Smart Pool siRNA specific to AXL (Dharmacon) using Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific).

RNA Sequencing and Pharmacogenomics Analyses

Total RNA was extracted from cells of the indicated treatments using the RNeasy column kit (QIAGEN). Deep sequencing was performed using the Illumina HiSeq 2000 platform at the Génome Québec Innovation Centre (McGill University). The differential expression measurements were performed with DESeq2 v1.4.5. GEO accession number: GSE120268. Gene ontology analyses were conducted using Gene Ontology Consortium [37] and GSEA v2.1.0 (Gene Set Enrichment Analysis) [17, 38]. For pharmacogenomics analysis, we used the PharmacoGx platform (version 1.1.5) to leverage the Connectivity Map data for drug repurposing analyses [14].

Invasion Assay

Boyden cell invasion assays were performed using 8 μ m pore Boyden Chambers (Costar) with the upper chamber coated with 6 μ L of Matrigel (BD Biosciences). 50,000 cells were seeded in the top chamber and allowed to invade for 16h toward the bottom chamber containing 10% FBS in DMEM. Cells were then fixed with 4% PFA and stained using SlowFade Gold reagent (Invitrogen) before counting the cells that migrated to the underside of the membrane using Leica DM6 microscope. Each experiment was performed in triplicate.

Cell Migration Analysis by Time-Lapse Microscopy

Cell migration tracking experiments were conducted as in [10]. For most experiments, 24h prior to imaging, cells were plated in 12 well plates and drugs were added 1h before imaging. For cell migration tracking on collagen, cells were plated in serum free media in 12 well plates coated with

collagen ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 2h prior imaging cells. Drugs were added 1h before imaging. To generate time-lapse movies, pictures were taken every 10 minutes for 6h with a DM IRE2 microscope (Leica) equipped with an automated stage and controlled environment (PECON). Orca-ER Model C-4742 digital camera (Hamamatsu) was used and migration speed data and plots were generated with Volocity software (PerkinElmer Life and Analytical Sciences). For collagen plated experiments, quantification was done manually using Fiji. Briefly, 90 healthy cells per conditions were tracked manually for at least 20 pictures and average speed was used to compare conditions.

Proliferation and cell viability assays

MDA-MB-231 expressing Luciferase were plated in 24 well plates and left to adhere for 24h. The next day, the indicated concentration of drugs were added to the wells and Beetle Luciferin (Promega) was used to quantify the cells using the Xenogen IVIS 200 with Living Image 4.2 software (PerkinElmer). For proliferation, the plates were imaged after 24h, 48h and 72h of treatment and for the viability assay, the plates were imaged after 24h.

Flow cytometry analysis

For cell cycle analysis, cells were treated as indicated in the figures for 24h. BrdU (BD Pharmingen) was incorporated in cells for 2h and cells were then fixed with EtOH. Denaturation was then done using 2N HCl that was neutralised with $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$. Anti-BrdU (BD Pharmingen) was then incubated 1h followed by a secondary antibody Alexa-Fluor 350 (Life Technologies) and counterstained with Propidium Iodide (PI) (Sigma-Aldrich). For apoptosis analysis, cells were stained using Annexin V-FITC (Abcam) and counterstained with PI. All FACS acquisitions and analysis were done using BD LSR Fortessa and FACSDiva software (BD).

Tumorsphere formation assay

MDA-MB-231 and Hs578T cells were plated into low adherence plates in DMEM/F12 media supplemented with 0.4% FBS, EGF (20ng/mL), FGF (10 ng/mL), Insulin (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and B27 supplements (Invitrogen 17504-044) as described in [39]. Briefly, compounds were added at time of the plating in the tumorsphere media at indicated concentration and kept during all the experiment. 7 days later, the number of tumorspheres was determined manually using a DM IRE2 microscope (Leica).

Western Blot Analyses

Cells were treated with the indicated drugs for 1h before they were lysed in NP-40 buffer (150 mM NaCl, 50mM Tris pH 7.5, 1% Nonidet P-40) supplemented with complete protease (Roche) and phosphatase inhibitors (Sodium Orthovanadate 1µM, NaF 0,5M). Proteins were quantified using the DC Protein Assay Kit (Bio-Rad) and a total of 80µg of protein lysate was separated by SDS/PAGE to be detected by immunoblotting using Li-Cor technology.

Antibodies

FACS : Anti-BrdU (1:200, BD Pharmingen)

Western Blot : mTOR (1 :1000, Cell Signaling), p-mTOR (1 :1000, Cell signaling) , AKT (1 :1000, Cell signaling), p-AKT Ser473 (1 :1000, Cell Signaling), ERK1/2 (1 :1000, Cell Signaling), p-ERK Thr202/Tyr204 (1 :1000, Cell Signaling), AXL (1 :10 000, Genscript), p-AXL Tyr702 (1 :1000, Cell Signaling) and Tubulin (1 :10 000, Sigma).

Secondary antibodies: goat anti-rabbit IgG (IRDye 680RD, 1 :10 000) and goat anti-mouse IgG (IRDye 800CW, 1 :10 000) were purchased from Li-Cor.

Animal Experiments

A total of 32 Nude female mice were purchased from Jackson Laboratories and used at 3 weeks of age. Mice were housed in a specific pathogen-free (SPF) facility and experiments were approved by the Animal Care Committee of the Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM) and complied with the Canadian Council of Animal Care guidelines. For the experiments 4 groups of 8 mice were made randomly.

Mammary Fat pad Grafts experiments and Bioluminescence Imaging

Mammary fat pad xenografts in Nude mice and bioluminescence imaging were previously described [10]. Briefly, a total of 10^6 MDA-MB-231-Luc cells were injected in the cleared mammary fat pad of Nude mice of 3 weeks of age. The treatments began 10 days after the graft. Thioridazine (25mg/kg), Fluphenazine (40mg/kg), Trifluoperazine (25mg/kg) and paclitaxel (10mg/kg) were injected intraperitoneally 3 times a week for 4 weeks. Phenothiazines were in a PBS solution and paclitaxel was administered in corn oil. Tumor diameter was measured before

the beginning of the treatment (10 days after the graft) to quantify the fold increase overtime. Randomisation was performed for injection and treatments.

To detect lung metastasis, 300mg/kg of Beetle Luciferin (Promega) solution was injected intraperitoneally 10 minutes before harvesting the lungs for imaging. Bioluminescence imaging was done using a Xenogen IVIS 200 (PerkinElmer) and the Living Image 4.2 software. To measure bioluminescence, radiance was calculated for each lung using a circular region of interest.

Immunohistochemistry (IHC) and TUNEL Assay

Paraffin embedded tumors were cut at 5 μ m and deparaffinized in xylene then rehydrated with an ethanol gradient. An antigen retrieval protocol was applied using 10mM Sodium citrate (pH 6) prior to blocking the sections in 3% H₂O₂. Sections were permeabilized with PBSTT (1X PBS, 0,5% Triton-X100, 0,02% Tween) and slides were further blocked in PBSTT containing 1% BSA. The sections were consequently incubated with a primary antibody against Ki67 (1:250, Mediacorp), a biotin-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody (1:1000, BA-1000 Vector Laboratories) and a Streptavidin-HRP ternary antibody (1:1000, BD Pharmingen). DAB detection kit (Vector Laboratories) was then used to reveal the staining and a counterstain using Mayer's Hematoxylin solution (Sigma) was performed. Apoptosis detection was performed following DeadEnd Fluorometric TUNEL system (Promega) and Hoechst was used to counterstain the nuclei (Thermo Fisher Scientific).

Statistics

Data are presented as mean \pm SEM from 3 or more independent experiments. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism Software and the Student's t test (comparison of two independent groups). P-values <0.05 were considered as significant (*p < 0.05, **p < 0.001, ***p < 0.0001).

Acknowledgments

We thank Dr. Odile Neyret, Dr. Virginie Calderon and Simone Terouz from the IRCM core facilities for their help in RNA-sequencing and histology analyses.

Conflicts of Interest

The authors declare no competing interests.

Funding

This work was supported by operating grant from the Canadian Institute of Health Research (MOP-142425 to J.F.C. and J.P.G). M.A.G. is a recipient of a CIHR Doctoral studentship. I.E. was supported by an IRCM Foundation Scholarship. N.E-H was supported by the Cancer Research Society. B.H-K was supported by the Terry Fox Research Institute, Canadian Institutes of Health Research, and the Canadian Cancer Society. J.F.C. holds the Transat Chair in Breast Cancer Research. J.F.C is supported by a FRQS Senior investigator career award.

Data availability

GEO accession number: GSE120268.

Supplementary Information

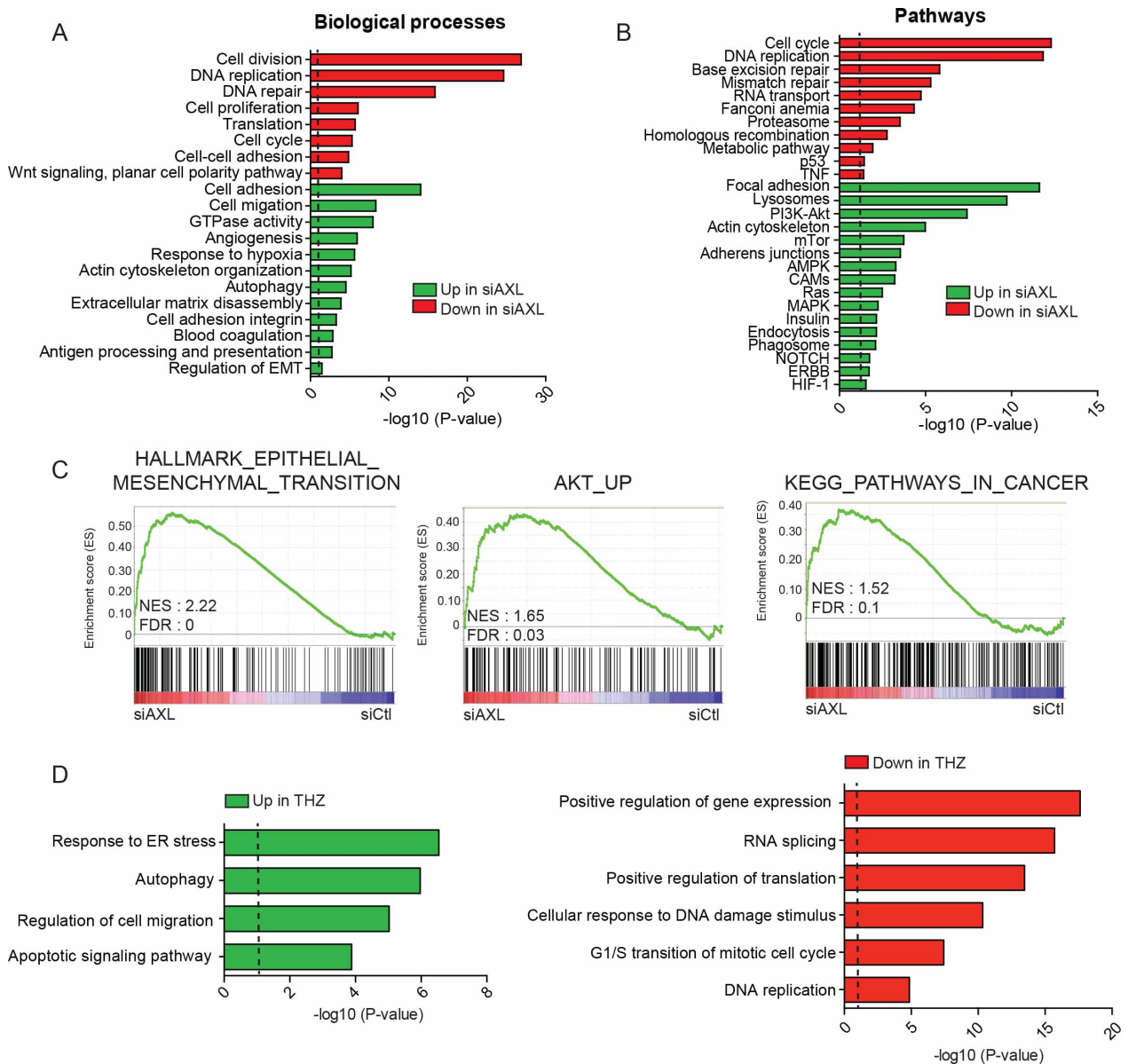


Figure 2. S1: Gene expression signature of AXL knockdown in MDA-MB-231 reflects AXL roles in different biological processes and oncogenic pathways.

A-B) Gene Ontology of MDA-MB-231 siAXL gene signature showing modulated biological processes and pathways. C) GSEA analysis of the AXL depletion gene signature presents a role for AXL in EMT, AKT signaling and other general pathways implicated in cancer. D) Gene Ontology of MDA-MB-231 treated with 10 μ M THZ for 6h present similar features found in siAXL signature.

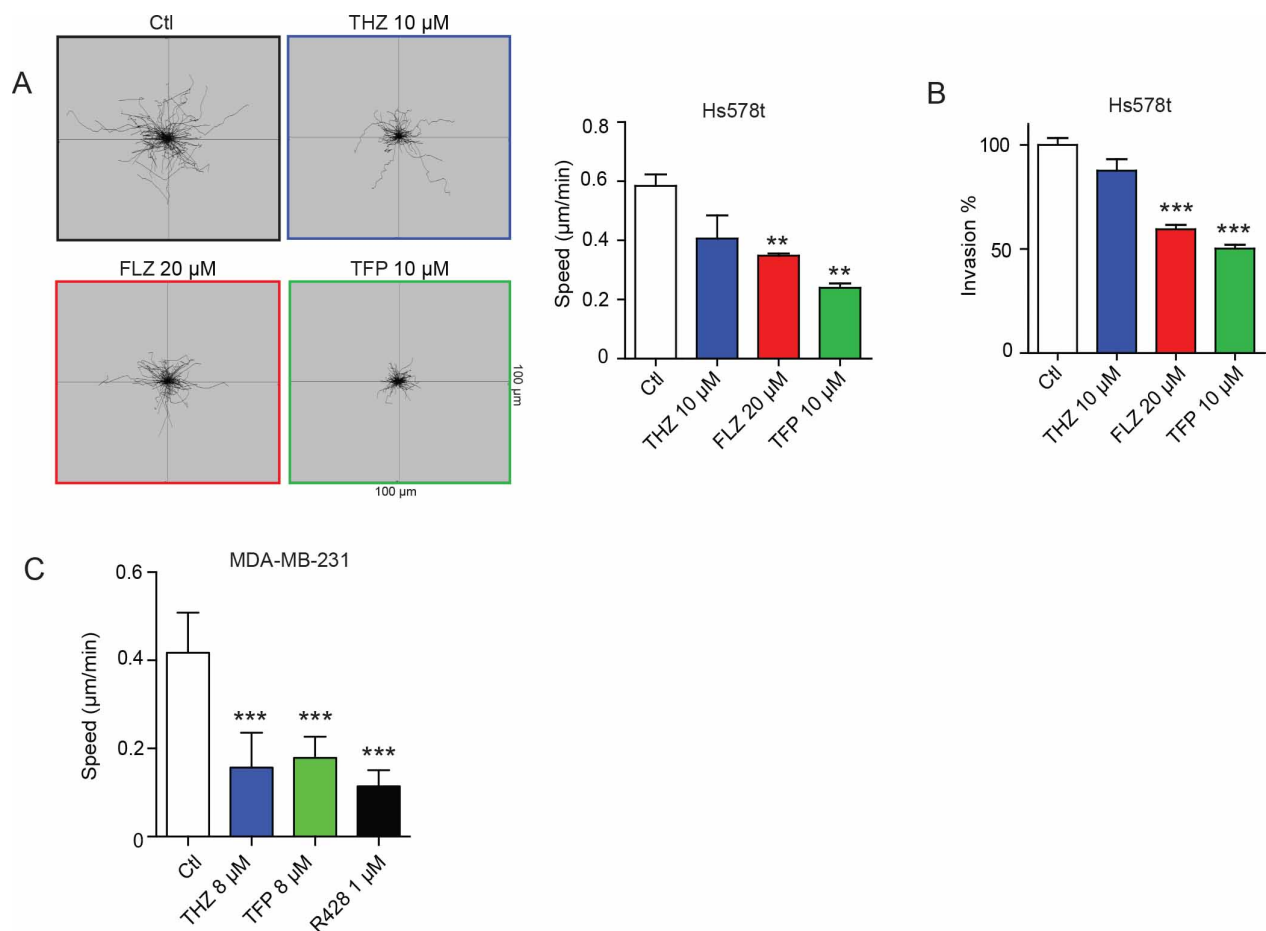


Figure 2. S2: Treatment with THZ, FLZ and TFP reduces the migration ability of Hs578t TNBC cells.

A) Time-lapse experiments over a 6h period in the presence of phenothiazines show that these treatments reduce the migration speed of Hs578t TNBC cells (** $p=0.0039$, ** $p=0.0012$). Data are represented as mean \pm SEM. B) Treatment with the antipsychotics reduces invasion of Hs578t in a Boyden invasion assay toward FBS (** $p<0.0001$). Data are represented as mean \pm SEM. C) Time-lapse experiments on MDA-MB-231 were performed on collagen coated plates confirming that phenothiazines and R428 reduce migration speed. FLZ wasn't included since it induced cell death in these conditions.

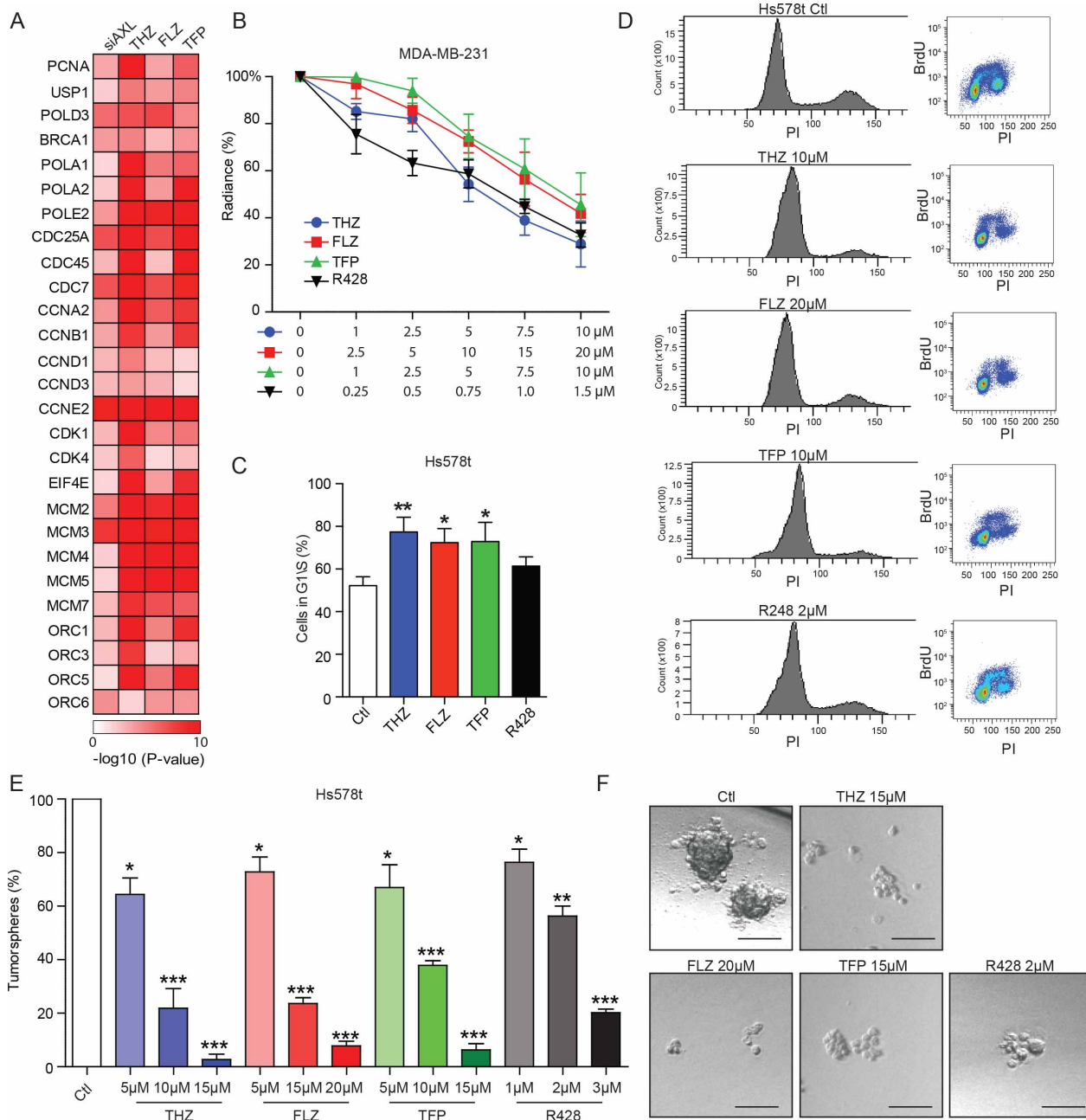


Figure 2. S3: THZ, FLZ and TFP induce cell cycle arrest and reduce cell proliferation of TNBC cells.

A) Heatmap representing the downregulation of genes (p-value) related to cell cycle and G1/S transition in cells treated with siAXL, THZ, FLZ and TFP. B) The antipsychotics and AXL inhibitor R428 reduce the proliferation of MDA-MB-231-Luc cells in a dose dependant manner as shown by cell quantification using luminescence (radiance) after 72h treatment at indicated concentrations (n=4). C-D) Treatment with the phenothiazines induces a cell cycle arrest in G1/S. Cell cycle analysis of Hs578t was performed using a BrdU staining assay by flow cytometry (**p=0.0059, *p=0.0110, *p=0.0229) (n=3). Data are represented as mean +/- SEM. E-F) Tumorspheres formation of Hs578t is inhibited by the treatment with THZ, FLZ, TFP and R428 in a dose-dependant manner (*p=0.0184, **p=0.0009, ***p<0.0001, *p=0.0416, ***p<0.0001, *p=0.0307, ***p=0.0002, ***p<0.0001, *p=0.0013, **p=0.0029, ***p<0.0001) (n=3). Scale bar, 150 μ m. Data are represented as mean +/- SEM.

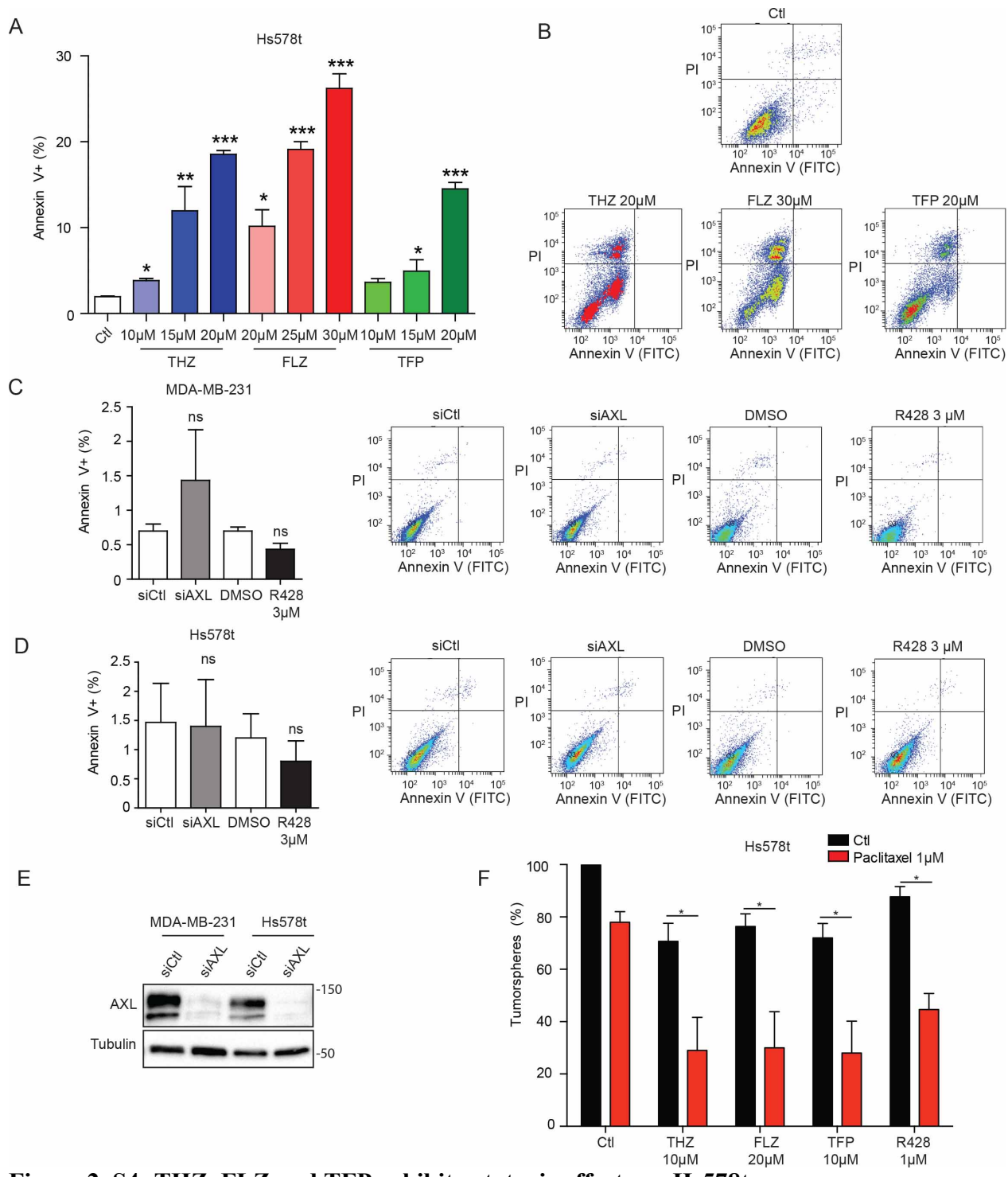


Figure 2. S4: THZ, FLZ and TFP exhibit cytotoxic effects on Hs578t.

A-B) Treatment with the phenothiazines during 24h at indicated concentration induces the apoptosis of Hs578t cells. Flow cytometry analyses of Annexin V staining was used. (* $p=0.0155$, * $p=0.0254$, ** $p=0.0026$, * $p=0.0142$, *** $p<0.0001$, * $p=0.0203$, *** $p<0.0001$). Data are represented as mean \pm SEM. C) AXL inhibition or AXL knockdown does not induce apoptosis of MDA-MB-231 or Hs578t TNBC cells in an Annexin V assay. (n=3) Data are represented as mean \pm SEM. E) Validation of AXL knockdown by siRNA by western blot. F) Combination of paclitaxel and the phenothiazines or R428 increase the effect of these drugs on tumorspheres formation of Hs578t (* $p=0.0211$, * $p=0.0289$, * $p=0.0175$, * $p=0.0102$). (n=3) Data are represented as mean \pm SEM.

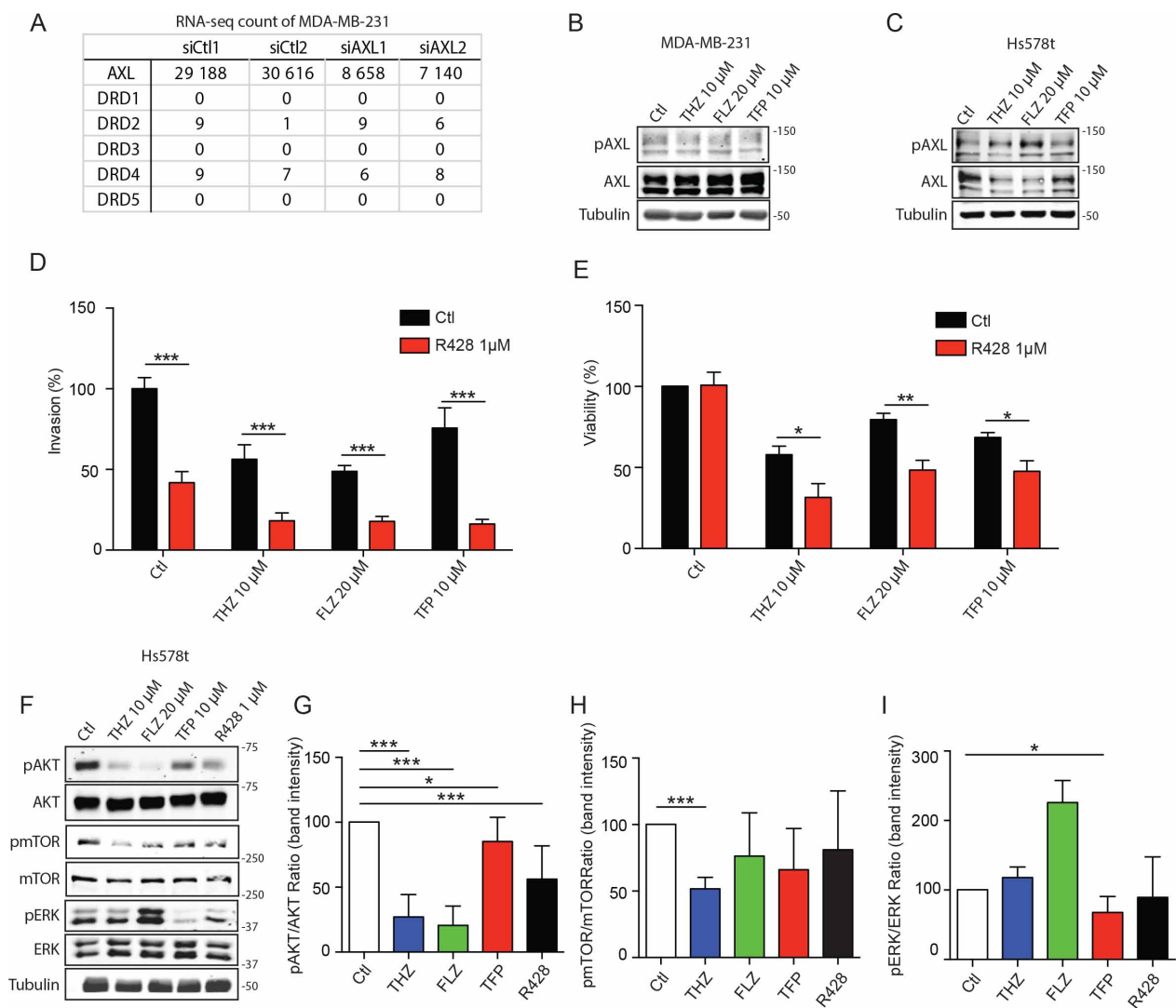


Figure 2. S5: THZ, FLZ and TFP treatment affect PI3K/Akt/mTOR without affecting AXL activity.

A) RNA-seq count of MDA-MB-231 showing that these cells do not express any dopamine receptors. B-C) Treatment with THZ, FLZ or TFP does not affect AXL phosphorylation in MDA-MB-231 and Hs578t. D-E) Combination of the antipsychotics and AXL inhibitor R428 increases the effects of these drugs on cell invasion and cell viability (** $p < 0.0001$ / * $p = 0.0456$, ** $p = 0.0047$, * $p = 0.0283$). (n=3) Data are represented as mean \pm SEM. F) Treatment with phenothiazines and R428 modulates the phosphorylation of AKT, mTOR and ERK in Hs578t. G-I) Quantification of this decrease using a ratio of band intensity of the phosphorylated form over the total protein.

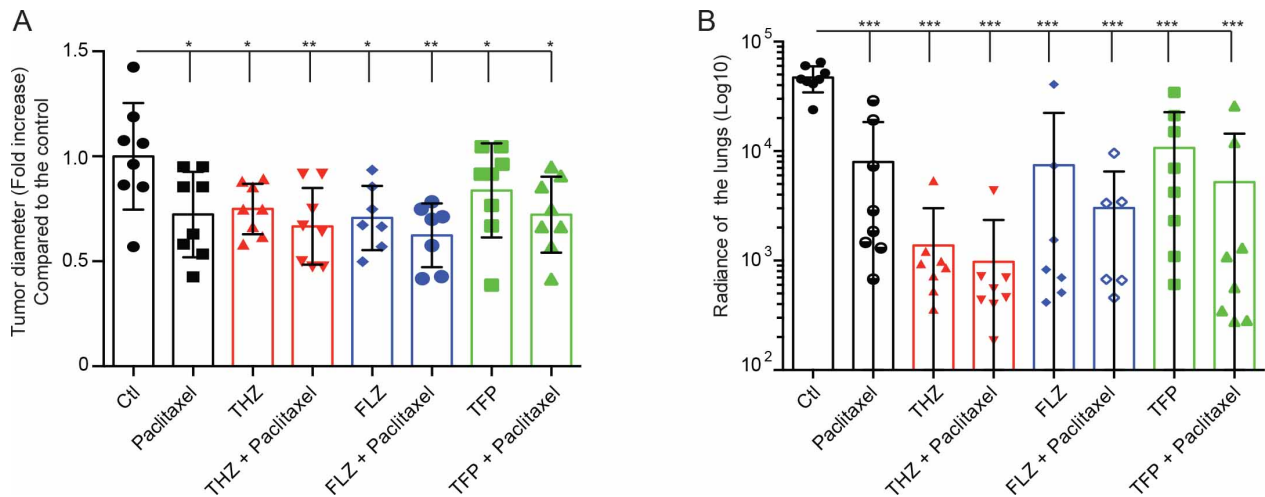


Figure 2. S6: Combination of THZ, FLZ or TFP with paclitaxel reduces tumor and metastatic burden in vivo.

A) Treatment of MDA-MB-231-Luc fat pad grafts with the phenothiazines and paclitaxel reduces tumor growth. Tumor diameter was measured before the beginning of the treatment (7 days after the graft) to quantify the fold increase overtime. Experiment was stopped at 31 days after the graft (* $p=0.0304$, * $p=0.0242$, ** $p=0.0093$, * $p=0.0197$, ** $p=0.0046$, * $p=0.0344$, * $p=0.0244$). ($n=6-8$) Data are represented as mean \pm SEM. The conditions Ctl, THZ, FLZ and TFP are the same as in Figure 6C. B) Treatment with the antipsychotics and paclitaxel reduces the metastatic progression of MDA-MB-231-Luc xenografts to the lungs. Lungs were dissected and imaged for bioluminescence signal 31 days after tumor engraftment, at the end of the growth experiment. (** $p<0.0001$) Data are represented as mean \pm SEM. The conditions Ctl, THZ, FLZ and TFP are the same as in Figure 6C.

Table 2. S1: Connectivity analysis of drugs with a similar gene signature to AXL decrease.

Compound	Connectivity	P Value
STOCK1N-35696	0.760215	0.048786099
trifluoperazine	0.48112	0.000892695
thioridazine	0.466335	0.000363537
sirolimus	0.465605	0.000936876
fluphenazine	0.462585	5.73E-05
prochlorperazine	0.4583	0.000471357
LY-294002	0.457575	9.68E-05
5109870	0.44616	0.000147726
0297417-0002B	0.443045	8.05E-05
wortmannin	0.42249	0.000104494
nortriptyline	0.416855	0.000112603
ciclopirox	0.415545	0.000110677
chlorpromazine	0.410835	0.000105068
levomepromazine	0.40536	5.94E-05
cloperastine	0.403275	8.04E-05
tonzonium bromide	0.402465	0.000105283
methylbenzethonium chloride	0.399725	0.000100575
norcyclobenzaprine	0.39664	0.000103414
protriptyline	0.395965	5.64E-05
syrosingopine	0.394145	5.50E-05
fulvestrant	0.39319	5.31E-05
promazine	0.39039	5.52E-05
CP-645525-01	0.386385	0.000540382
resveratrol	0.38461	7.05E-05
0175029-0000	0.383935	0.001415278
alsterpaullone	0.383425	0.003168117
quinostatin	0.38237	0.007928474
phenazopyridine	0.382245	7.09E-05

metergoline	0.382065	7.14E-05
geldanamycin	0.38005	6.77E-05
perhexiline	0.378515	0.000126951
monensin	0.376525	6.46E-05
loperamide	0.375515	7.13E-05
trimipramine	0.3723	0.000575889
PF-00539758-00	0.37053	5.20E-05
metixene	0.368635	5.78E-05
homochlorcyclizine	0.368075	5.62E-05
rifabutin	0.36648	5.62E-05
erastin	0.36488	5.20E-05
perphenazine	0.36435	0.000104275
maprotiline	0.363655	7.55E-05
doxorubicin	0.361145	0.007900847
raloxifene	0.35951	0.000428642
famprofazone	0.35946	9.29E-05
etacrynic acid	0.357435	0.000198679
tanespimycin	0.356705	8.80E-05
irinotecan	0.35417	0.001280348
astemizole	0.35359	5.97E-05
HC toxin	0.3514	6.15E-05
co-dergocrine mesilate	0.35139	0.000118941
pimozide	0.351165	6.18E-05
fluspirilene	0.348785	9.87E-05
vorinostat	0.348725	5.58E-05
GW-8510	0.34816	7.24E-05
camptothecin	0.34815	0.007907755
tetryzoline	0.34526	5.81E-05
pyrvinium	0.344625	9.49E-05
valproic acid	0.34459	5.85E-05

etoposide	0.343635	5.33E-05
ellipticine	0.343555	0.000220742
withaferin A	0.34254	5.18E-05
0173570-0000	0.34175	5.28E-05
benzethonium chloride	0.34174	8.59E-05
scriptaid	0.34114	0.001004933
H-7	0.341135	0.000274399
bromocriptine	0.339505	0.000232433
AG-013608	0.334985	9.56E-05
alvespimycin	0.333335	5.36E-05
thioguanosine	0.333255	0.001028491
Prestwick-559	0.333	0.000100309
dihydroergocristine	0.332485	6.83E-05
benzamil	0.3316	0.00013243
clomifene	0.330385	0.000380431
mepacrine	0.33008	0.000132255
phenoxybenzamine	0.32954	5.66E-05
chlorcyclizine	0.32794	6.13E-05
niclosamide	0.327735	5.55E-05
sulfapyridine	0.32553	6.18E-05
amoxapine	0.32404	0.000227628
clomipramine	0.323895	0.000715475
colforsin	0.323715	0.000210578
pergolide	0.323585	7.13E-05
methotrexate	0.322645	5.35E-05
amiodarone	0.322575	0.000168514
thiethylperazine	0.32239	7.09E-05
fluoxetine	0.3222	5.70E-05
deptropine	0.320985	0.000100538
saquinavir	0.32042	5.93E-05

ciclosporin	0.32038	0.00014725
gossypol	0.320115	6.16E-05
clozapine	0.31913	0.000299923
azacitidine	0.319125	0.004308051
rescinnamine	0.318965	9.85E-05
parthenolide	0.318535	5.66E-05
proscillaridin	0.31794	0.000495004
staurosporine	0.316645	5.27E-05
terfenadine	0.315935	6.36E-05
lanatoside C	0.31501	0.001127296
CP-944629	0.314365	0.000116165
trichostatin A	0.314245	5.79E-05
promethazine	0.314185	5.27E-05
piperacetazine	0.31406	5.49E-05
mebhydrolin	0.31363	0.000182508
dihydroergotamine	0.313445	7.51E-05
mefloquine	0.31333	0.000102549
propafenone	0.313	0.007900847
mitoxantrone	0.31153	0.001035022
flupentixol	0.310585	8.01E-05
alexidine	0.3098	0.000270726
mebendazole	0.30936	7.87E-05
cyproheptadine	0.30861	5.26E-05
trifluridine	0.308515	6.67E-05
fluvoxamine	0.308385	5.60E-05
sulconazole	0.307645	0.000100656
lovastatin	0.307585	8.53E-05
fluvastatin	0.30716	7.63E-05
alimemazine	0.306465	0.002342371
thiopropazine	0.304345	0.000139439

dipyridamole	0.304325	0.000342891
bufexamac	0.30412	5.24E-05
monorden	0.30385	5.59E-05
daunorubicin	0.303035	0.000513021
quinisocaine	0.30198	0.000125182
monobenzone	0.301815	6.37E-05
corbadrine	0.30173	9.23E-05
butoconazole	0.30146	6.99E-05
PNU-0230031	0.300975	0.000931543
colchicine	0.30063	5.99E-05
tyrphostin AG-1478	0.300325	6.14E-05
15-delta prostaglandin J2	0.30023	0.000327755
CP-319743	0.300045	6.58E-05
ethaverine	0.300015	5.82E-05

Supplementary Movie 1: Video time lapse microscopy of MDA-MB-231 cells treated with vehicle (Control) or THZ, FLZ or TFP drugs. Images were acquired every 10 minutes for 6 hours and were used to generate the movies.

* The movie can be found on the journal website (Oncotarget)

Chapitre 3 - The Receptor Tyrosine Kinase AXL is Required at Multiple Steps of the Metastatic Cascade during HER2-positive Breast Cancer Progression

Aucun modèle génétique de cancer n'a encore été utilisé pour mieux comprendre le rôle d'AXL dans ce contexte, mais de nombreuses approches thérapeutiques le ciblant sont en développement pour une grande variété de cancer, incluant le cancer du sein. Dans les lignées humaines de cancer du sein, AXL est exprimé principalement dans les lignées TNBC qui présentent des caractéristiques plus mésenchymales. Ainsi, les études sur AXL dans le cancer du sein sont principalement dirigées vers ce sous-type. Par contre, dans les tumeurs humaines, AXL est surexprimé dans tous les sous-types de cancer du sein et chez les patients HER2⁺, AXL corrèle avec une survie réduite et la présence de métastases. De plus, GAS6, le ligand d'AXL a un rôle controversé dans la progression du cancer du sein. Ainsi, le chapitre suivant a été entrepris pour définir le rôle d'AXL et GAS6 dans un contexte de cancer du sein HER2⁺ en utilisant un modèle murin préclinique. Considérant qu'AXL peut parler avec d'autres récepteurs tyrosines kinases incluant EGFR, l'interaction et la co-signalisation d'AXL et HER2 a été étudié, ainsi que le mécanisme d'action d'AXL menant à l'invasion cellulaire et la formation de métastases. Ainsi, ce chapitre vise à mieux comprendre le rôle d'AXL et son mode d'activation pour être en mesure d'en faire une cible de choix dans les cancers HER2⁺, proposant une nouvelle stratégie thérapeutique combinant l'inhibition d'AXL et HER2.

Contributions

Figure 3.1 A-D : Stéphanie Duhamel et Marie-Anne Goyette

Figure 3.1 E-I : Marie-Anne Goyette et Ariane Pelletier

Figure 3.2 A-E, G-I : Marie-Anne Goyette

Figure 3.2 F : Léo Aubert

Figure 3.3 : Marie-Anne Goyette

Figure 3.4 : Marie-Anne Goyette

Figure 3.6 A-I : Marie-Anne Goyette

Figure 3.6 J : Stéphanie Duhamel et Marie-Anne Goyette

Figure 3.6 K : Radia Marie Johnson

Figure 3.7 : Marie-Anne Goyette

Figure 3. S1 A-B: Marie-Anne Goyette

Figure 3. S1 C: Stéphanie Duhamel et Marie-Anne Goyette

Figure 3. S2: Marie-Anne Goyette

Figure 3. S3 A-D, G-H: Marie-Anne Goyette

Figure 3. S3 F : Léo Aubert

Figure 3. S4 A-C, E-G : Marie-Anne Goyette

Figure 3. S4 D : Marie-Pier Thibault

Figure 3. S5-S7: Marie-Anne Goyette

Conceptualization, M.A.G, J.P.G and J.F.C; Methodology, M.A.G, L.A, A.P, P.S, R.M.J, P.P.R and J.F.C; Investigation, M.A.G, S.D, M.P.T, L.A, A.P, P.S and R.M.J; Formal Analysis, M.A.G, L.A and R.M.J; Resources, W.J.M., P.C, M.B and L.G; Writing - Original Draft, M.A.G and J.F.C; Writing - Review and Editing, M.A.G, W.J.M., P.C, P.P.R, M.P, J.P.G and J.F.C; Supervision, M.P, P.P.R, and J.F.C; Funding Acquisition, J.P.G and J.F.C.

The Receptor Tyrosine Kinase AXL is Required at Multiple Steps of the Metastatic Cascade during HER2-positive Breast Cancer Progression

Marie-Anne Goyette^{1,2}, Stéphanie Duhamel¹, Léo Aubert³, Ariane Pelletier¹, Paul Savage⁴, Marie-Pier Thibault¹, Radia Marie Johnson⁴, Peter Carmeliet^{5,6}, Mark Basik⁷, Louis Gaboury⁸, William J. Muller⁴, Morag Park⁴, Philippe P. Roux^{3,8}, Jean-Philippe Gratton⁹ and Jean-François Côté^{1,2,10,11,*}

¹ Montreal Clinical Research Institute (IRCM), Montréal, QC, H2W 1R7, Canada.

² Molecular Biology Programs, Université de Montréal, Montréal, QC, H3T 1J4, Canada.

³ Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), Université de Montréal, Montréal, QC, H3C 3J7, Canada.

⁴ Rosalind and Morris Goodman Cancer Research Centre, McGill University, Montréal, QC, H3A 1A1, Canada.

⁵ Laboratory of Angiogenesis and Vascular Metabolism, VIB Vesalius Research Center, VIB, Leuven B-3000, Belgium.

⁶ Laboratory of Angiogenesis and Vascular Metabolism, Department of Oncology, University of Leuven, Leuven, B-3000, Belgium

⁷ Department of Oncology and Surgery, Segal Cancer Center, Lady Davis Institute for Medical Research, Sir Mortimer B. Davis Jewish General Hospital, McGill University, Montréal, QC, H3T 1E2, Canada.

⁸ Department of Pathology and Cell Biology, Université de Montréal, Montréal, QC, H3C 3J7, Canada.

⁹ Department of Pharmacology and Physiology, Université de Montréal, Montréal, QC, H3C 3J7, Canada.

¹⁰ Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, H3C 3J7, Canada.

¹¹ Department of Anatomy and Cell Biology, McGill University, Montréal, QC, H3A 0C7, Canada.

*Corresponding author and lead author: Jean-François Côté, jean-francois.cote@ircm.qc.ca

** Manuscrit publié dans Cell Reports (2020)

Abstract

AXL is activated by its ligand GAS6 and is expressed in triple-negative breast cancer cells. In the current study, we report AXL expression in HER2 positive (HER2⁺) breast cancers where it correlates with poor patient survival. Using murine models of HER2⁺ breast cancer, Axl, but not its ligand Gas6, was found to be essential for metastasis. We determined that AXL is required for intravasation, extravasation and growth at the metastatic site. We found that AXL is expressed in HER2⁺ cancers displaying EMT signatures where it contributes to sustain EMT. Interfering with AXL in a patient-derived xenograft (PDX) impaired TGF- β -induced cell invasion. Lastly, pharmacological inhibition of AXL specifically decreased the metastatic burden of mice developing HER2⁺ breast cancer. Our data identify AXL as a potential anti-metastatic co-therapeutic target for the treatment of HER2⁺ breast cancers.

Keywords: AXL, HER2, breast cancer, metastasis, EMT, PDX, AXL inhibitor

Significance

Metastasis is responsible for the majority of breast cancer deaths and is a feature of triple-negative and HER2⁺ molecular subtypes. Patients afflicted with HER2⁺ breast cancer are treated with anti-HER2 agents but many will succumb of a metastatic disease once the tumor cells acquire resistance to the therapies. We report here that AXL, a predicted marker of triple-negative breast cancer, is expressed in HER2⁺ human tumors that acquire mesenchymal features and is essential at multiple steps of the metastatic cascade in a murine model of HER2⁺ breast cancer. Inhibition of AXL *in vivo* was sufficient to robustly decrease the metastatic burden of mice developing HER2⁺-like breast cancer. Our results suggest that co-targeting AXL and HER2 as therapeutic targets may limit the metastatic progression of HER2⁺ breast cancer.

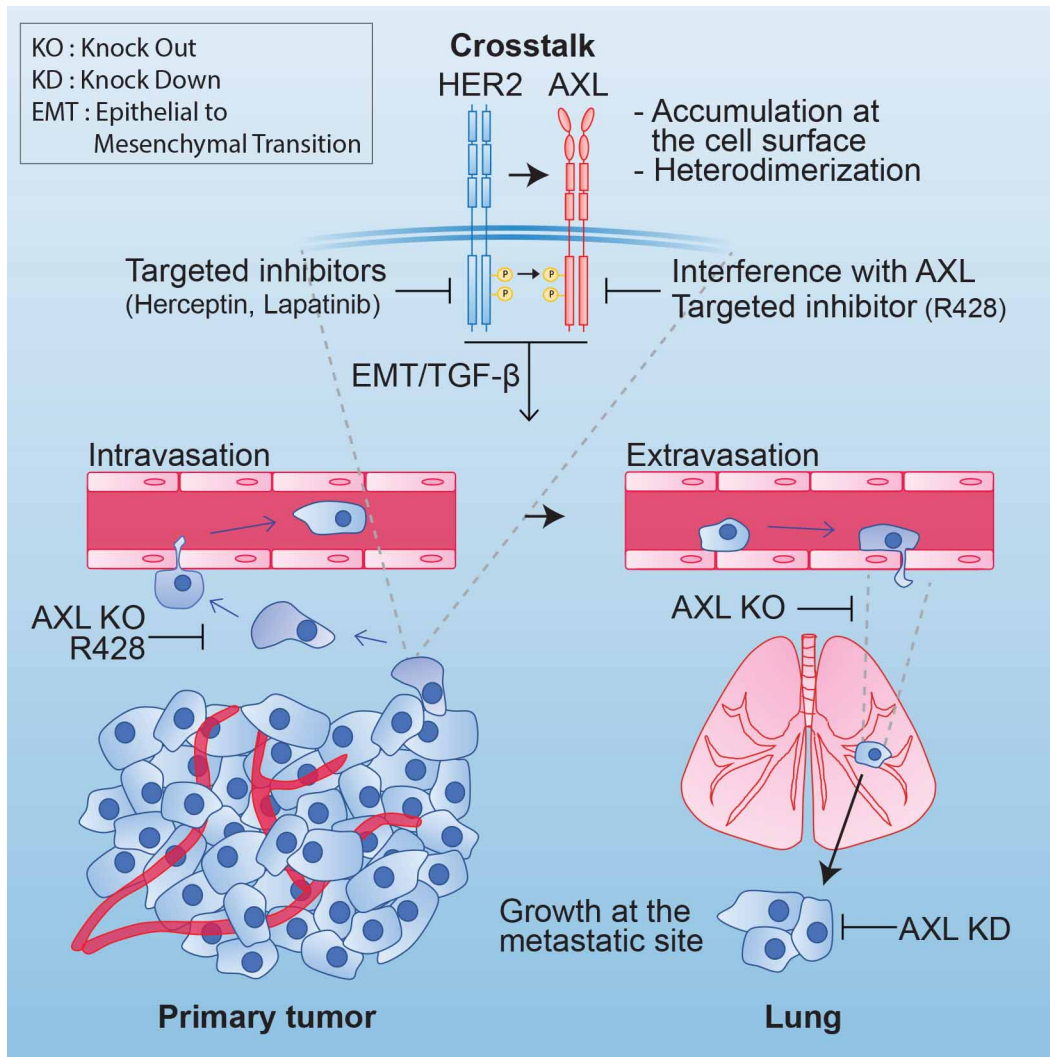


Figure 3: Graphical Abstract

Highlights

- AXL expression correlates with poor outcome of HER2+ breast cancer patients
- Co-signaling of HER2 and AXL mediates metastasis of HER2+ breast cancer
- AXL promotes the mesenchymal phenotypes of HER2+ cancer cells for metastasis
- Pharmacological inhibition of AXL reduces metastasis in HER2+ breast cancer mice

Introduction

Metastasis is a complex multistep process that involves intratumoral cell invasion followed by entry into the circulation (intravasation), and completes when the cancer cells invade (extravasation) and survive into distant tissues before growing as macro-metastatic lesions [3, 68]. Unfortunately, once the disease spreads to secondary organs it becomes virtually incurable, and as such, metastasis is responsible for the majority of breast cancer fatalities [60]. Among breast cancers, the triple-negative and HER2⁺ subtypes are linked to poor survival due to their propensity to metastasis [7, 185]. HER2, a member of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) of receptor tyrosine kinases (RTKs) that is overexpressed or amplified in approximately 20% of human breast cancers, transmits signals mediating tumor growth, invasion and metastasis [186]. While some patients afflicted with HER2⁺ breast cancer will benefit of treatments with anti-HER2 therapeutic agents, some will be unresponsive or will develop resistance and relapse with a metastatic disease [32, 216]. Hence, defining the molecular mechanisms by which HER2 promotes cancer spreading may reveal novel and much needed anti-metastatic therapeutic strategies.

AXL, TYRO3 and MER collectively form the TAM family of RTKs. Within the TAM, AXL is specifically activated by its vitamin K-dependent ligand GAS6 [170, 187, 217]. While TAMs are dispensable for embryonic development, their compound genetic deletions in mice revealed their essential functions to inhibit innate immunity [218, 219]. TAMs are frequently implicated in diseases, and AXL is particularly broadly expressed in solid cancers including breast cancer, non-small cell lung carcinoma, ovarian cancer and clear cell renal carcinoma, where its levels correlate with increased risks of metastasis [189, 220-223]. In addition, AXL expression correlates with the acquisition of mesenchymal features of cancer cells and provides advantages to tumors such as increased invasion and resistance to antimetabolic agents in *in vitro* contexts [180, 188-190]. Within breast cancer cell lines, AXL expression is highly restricted to mesenchymal cells, notably with the triple-negative gene signature, such that AXL is frequently viewed as a marker of this breast cancer subtype [177, 180]. Whether AXL is activated by GAS6 during cancer progression and metastasis remains unclear. *GAS6* expression correlates with positive outcome of breast cancer [224] while it is linked to increased metastasis in non-small cell lung cancer [225]. AXL can also bypass the need of GAS6 by cooperating with other transmembrane receptors including EGFR,

MET, PDGF and VEGFR-2 [226-228]. In this study, we set out to develop murine genetic models of AXL and GAS6 deletion to test their role in HER2⁺ breast cancer on metastasis. Furthermore, we aimed to confirm our *in vivo* conclusions in the murine models exploiting tumor specimens and multiple human cell lines, including patient-derived xenografts, and to also assess if pharmacological inhibition of AXL could be a valid strategy to limit breast cancer metastasis in patient.

Results

AXL expression in HER2+ breast cancers correlates with poor patient outcome

Because expression of AXL in human breast cancer is reported to be limited to cell lines derived from TNBC patients [177], AXL is currently viewed as a marker of the TNBC molecular subtype [229]. Indeed, analysis of RNA-seq data [180] revealed that only TNBC cell lines express high levels of *AXL* and this is correlated with *Vimentin (VIM)* expression, suggesting that AXL is expressed in cell lines displaying mesenchymal features (Figure 3. S1A). However, analyses of the expression levels of AXL in breast cancer patient samples has yielded conflicting data for expression in molecular subtypes and for patient outcomes [180, 189, 230, 231]. To resolve which breast cancer molecular subtypes express AXL at the protein level, we stained a panel of tumor microarrays (TMA) [232], derived from breast tumor specimens linked with clinical data, using an AXL antibody that had been validated for immunostaining on human samples [180] and that we validated in this study (Figure 3. S1B). Unlike observations made in cell lines, these analyses revealed that AXL expression was broadly detectable across breast cancer subtypes (Figure 3.1A-B). Furthermore, high expression of AXL protein correlated with adverse clinical outcome when data from all breast cancer subtypes were pooled (Figure 3. S1C). We sought to characterize the role of AXL in HER2+ breast cancers since this molecular subtype is aggressive and prone to progress to a metastatic disease. We found that high AXL protein levels correlated with lung and brain metastases in HER2+ patients (Figure 3.1C). We analyzed transcriptomics data linked to clinical data of our cohort of HER2+ breast cancer patients (GSE58644) and found that low expression of *AXL* correlated with better survival (Figure 3.1D). Thus, high AXL expression in HER2+ breast cancer unexpectedly correlates with increased risk of metastasis and a reduced probability of survival.

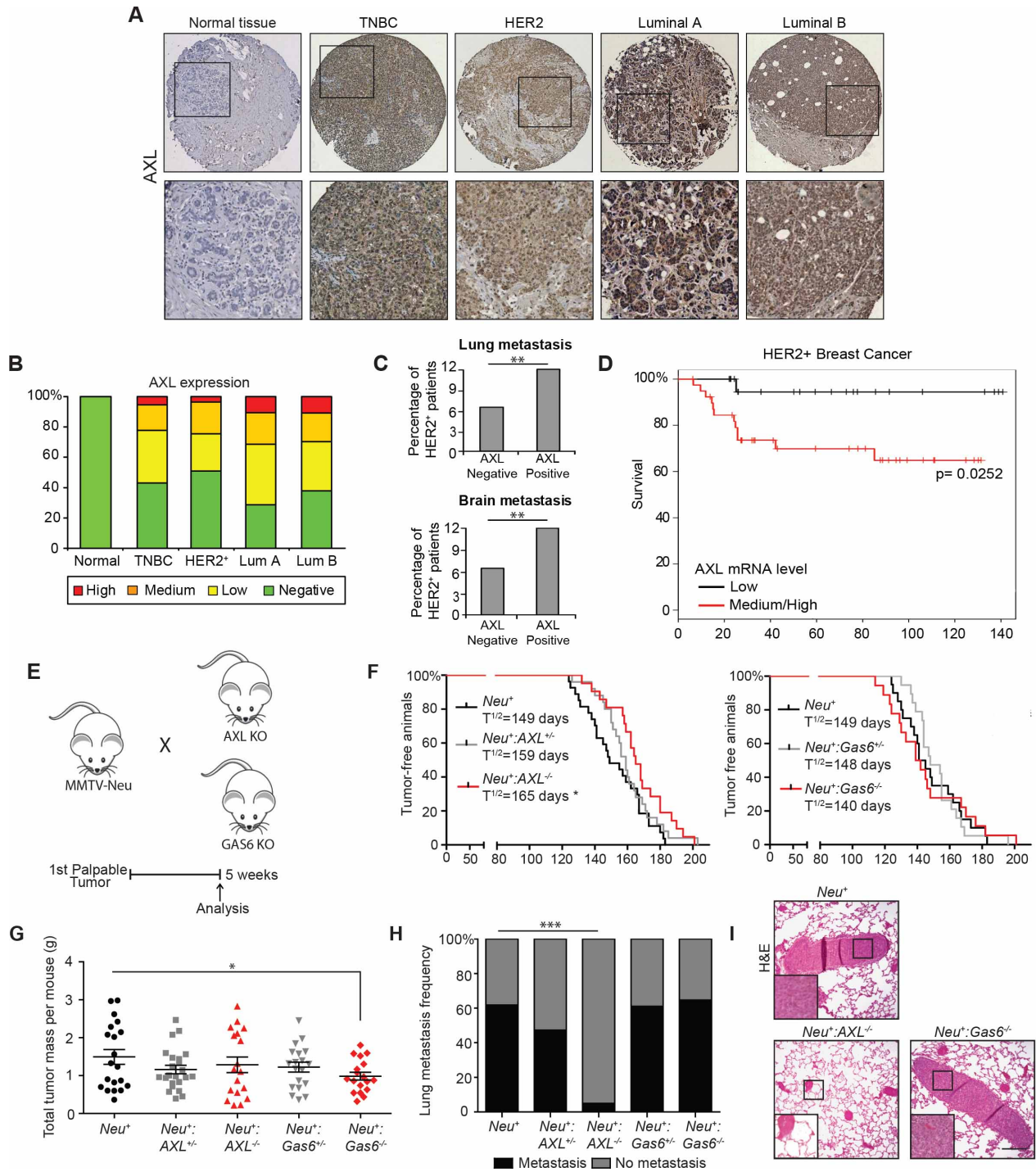


Figure 3.1: AXL contributes to metastasis in human HER2+ breast cancers and in a mouse model of the HER2 subtype.

(A-B) AXL is expressed in all breast cancer molecular subtypes (Normal mammary gland (n=10), TNBC (n=130), HER2+ (n=57), Luminal A (n=150), Luminal B (n=58)).

(C) AXL expression is associated with metastasis in HER2+ breast cancer (TMA staining, AXL negative (n=16) and AXL positive (n=17) since not all patients from (A) were followed for metastasis, **p=0.003).

(D) mRNA level of AXL correlates with overall survival in HER2+ breast cancer samples from GSE58644 (n=66).

(E) MMTV-Neu mice were crossed with AXL KO or GAS6 KO mice and the cohort was analysed 5 weeks after tumor onset.

(F) Kaplan–Meier analyses of tumor onset (n=20-23, *p=0.015).

(G) Axl does not contribute to HER2-induced tumor growth, but *Neu*⁺:*Gas6*^{-/-} mice show a reduction of total tumor mass (n=20, *p=0.0314).

(H-I) *Neu*⁺:*Axl*^{-/-} mice were protected from lung metastasis (n=20-23, ***p=0.0006 (Chi-square analysis)). Representative images (10X, scale bar: 250µm).

See also Figure 3. S1 and S2 and Table 3. S2.

Axl promotes the metastatic progression of HER2+ breast cancer *in vivo* independently of Gas6

Because we found that AXL expression correlated with poor outcome of HER2+ breast cancer patients, we used a murine HER2+ breast cancer model to investigate the specific contributions of AXL and its ligand GAS6 in disease progression. Expression of a deletion mutant of the rat orthologue of HER2 targeted to the mammary gland of mice using mouse mammary tumor virus (MMTV; NeuNDL2-5) results in tumors that progress to invasive carcinoma and metastasize to lungs [55]. Transcriptomic data revealed that *Axl* and *Gas6* were both expressed in MMTV-NIC tumors [233], suggesting that this model would be useful to determine their functions *in vivo* during HER2-driven breast cancer progression. After verifying that mammary gland development occurred normally in the absence of *Axl* or *Gas6* (Figure 3. S2A-C), we interbred *Axl* and *Gas6* germline knockout mice with MMTV-Neu animals to generate five female cohorts: *Neu*⁺, *Neu*⁺:*Axl*^{+/-}, *Neu*⁺:*Axl*^{-/-}, *Neu*⁺:*Gas6*^{+/-} and *Neu*⁺:*Gas6*^{-/-} (Figure 3.1E). We reasoned that these Axl and Gas6 knockout models would faithfully mimic an effective systemic inhibition of this ligand/RTK pair. The mice were monitored by weekly palpation to test for apparition of tumors. We found that all genotypes developed mammary tumors and noted a minor delay of tumor onset for *Neu*⁺:*Axl*^{-/-} females, whereas *Neu*⁺:*Gas6*^{-/-} mice presented no difference as compared to the *Neu*⁺ control (Figure 3.1F). Five weeks after tumor onset, the mice were sacrificed for characterization of tumor initiation, tumor growth and metastasis. To characterize the tumor initiation process, we quantified the number of mammary intraepithelial neoplastic lesions (MINs) on inguinal mammary glands. Only *Neu*⁺:*Axl*^{-/-} females presented an increased number of MINs suggesting that neoplastic initiation occurs efficiently in the absence of *Axl* (Figure 3. S2D-E). Furthermore, all genotypes bore tumors with a solid adenocarcinoma phenotype (confirmed by a pathologist) suggesting that loss of *Axl* or *Gas6* did not alter the differentiation state of the tumors (Figure 3. S2F). While loss of *Axl* did not alter the total tumor mass, a small decrease was observed when *Gas6* was ablated (Figure 3.1G). To assess the proliferative and apoptotic status of the

tumors, we stained them for Ki67 or Cleaved-Caspase 3, respectively, and while we found no difference in proliferation or apoptosis in *Axl*-null tumors, tumors devoid of *Gas6* showed increased apoptosis (Figure 3. S2G-I). This increase in apoptosis was independently confirmed by TUNEL staining and likely explained the decrease in tumor mass seen in *Gas6* mutants (Figure 3. S2J-K). Strikingly, *Neu⁺:Axl^{-/-}* mice exhibited a decrease in both the frequency and the total number of lung metastatic lesions (Figure 3.1H-I, S2L). In contrast, ablation of *Gas6* had no effect on the lung metastatic burden (Figure 3.1H-I, S2L). These data demonstrate an essential and *Gas6*-independent contribution of *Axl* to the metastatic progression of HER2+ breast cancer.

HER2 complexes with AXL to promote its stability and recruitment at the cell surface

Because our mouse models revealed that *Gas6* is dispensable for the metastatic progression of HER2+ breast cancer, we investigated the possibility of crosstalk between AXL and HER2. We tested if AXL can co-immunoprecipitate with either human HER2 or its splice variant HER2 Δ 16 that is frequently expressed in human tumors [28, 51]. An interaction between AXL and HER2 and HER2 Δ 16 was detected when the proteins were co-expressed in HEK293T cells (Figure 3.2A). The interaction between AXL and HER2 was also detectable both by co-immunoprecipitation and Proximity Ligation Assay (PLA) in MCF10A cells that stably express HER2 (Figure 3.2B-C). Furthermore, immunofluorescence revealed that the AXL/HER2 complex is localized at cell edges in MCF10A-HER2 cells (Figure 3.2C and Figure 3. S3A). An interaction between endogenous HER2 and AXL was also detectable in SKBR3 cells (Figure 3. S3B). Because all of the mouse models and mouse cell lines used in this study exploit either NeuNDL2-5 or an activated mutant of Neu (NeuT; V664E mutant), we tested whether these variants also interact with AXL. We found that AXL co-precipitated with NeuT not only when the proteins were co-expressed in HEK293T cells, but also endogenously with NeuNDL2-5 in NIC cells (a cell line derived from the MMTV-Neu-IRES-Cre mice [55]) (Figure 3. S3C-D). To test whether AXL was also found in a complex with HER2 in tumors from HER2+ breast cancer patients, we performed PLA experiments that revealed the existence of AXL/HER2 complexes in human tumors (Figure 3.2D). In addition, immuno-staining for both proteins revealed that a pool of AXL is co-localized with HER2 at the plasma membrane in HER2+ tumor samples (Figure 3.2E).

To address the functional impact of HER2/AXL coupling, we performed surface biotinylation experiments in MCF10A control and MCF10A-HER2 cells to determine AXL protein levels at the

cell surface. These experiments revealed that HER2 expression leads to a 3.4-fold increase in the cell surface pool of AXL, and this enrichment occurs despite a decrease in the expression of *AXL* and *GAS6* at the mRNA levels (Figure 3.2F and Figure 3. S3E). Interestingly, this HER2-mediated enrichment of AXL at the cell surface was not dependent on the kinase activity of either AXL or HER2 (Figure 3. S3F). One possible explanation for the HER2-associated increase in AXL at the cell surface is that HER2 affects the trafficking of AXL and we therefore tested the localization of AXL with late (Rab7⁺) or recycling (Rab11⁺) endosomes. Using an AXL antibody that stained the intracellular pool of AXL, these experiments revealed that in cells expressing HER2, the presence of AXL decreased in Rab7⁺ late endosomes and increased in Rab11⁺ recycling vesicles as compared to the control cells (Figure 3.2G-H, Figure 3. S3G-H). To test whether the coupling of AXL to HER2 might stabilize the protein, we performed cycloheximide chase assays that revealed that the AXL protein is more stable in MCF10A-HER2 ($t_{1/2}$ =5.13 h) than in the control MCF10A cells ($t_{1/2}$ =1.73 h) (Figure 3.2I). Collectively, these results suggest that AXL and HER2 form a physical complex that lead to HER2-mediated stabilization of AXL and its enrichment at the cell surface.

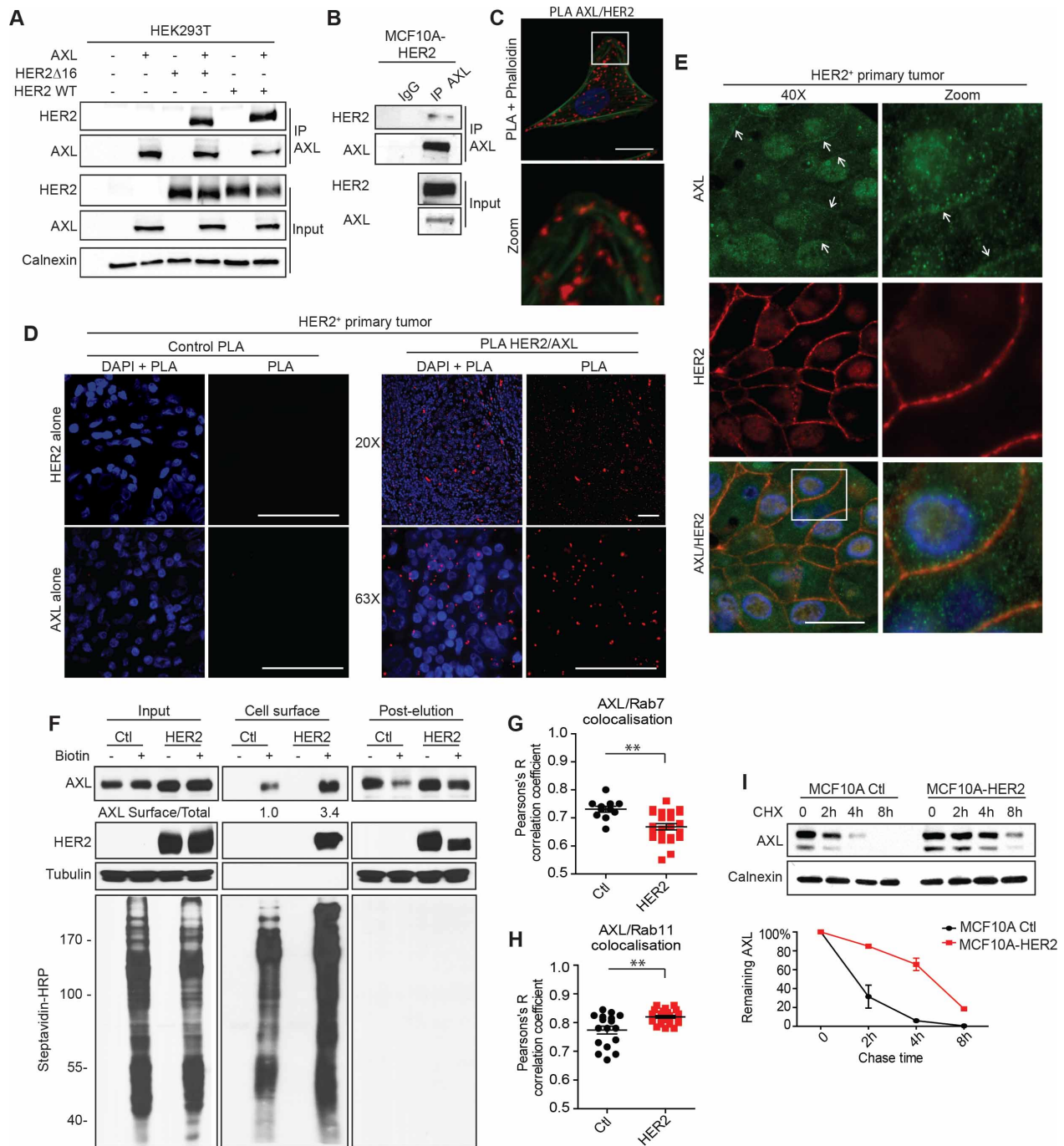


Figure 3.2: HER2 interacts with AXL to promote its stability and accumulation at the cell surface.

(A-B) AXL co-immunoprecipitates with HER2 WT and Δ 16 when co-overexpressed in HEK293T and MCF10A stably expressing HER2. MCF10A-HER2 cell were treated with the DSP chemical crosslinker to detect the interaction. (C) Proximity ligation assay (PLA) confirms AXL and HER2 interaction in MCF10A-HER2 cells (scale bar: 20 μ m). (D) PLA shows that AXL and HER2 are found as heterodimers in primary human HER2 tumors (representative images of n=4 tumors, scale bar: 50 μ m). (E) AXL and HER2 colocalizes at the cell surface in human samples (representative images of n=4 tumors, scale bar: 25 μ m).

(F) Surface biotinylation assays show that AXL is enriched at the cells surface in HER2 expressing cells (normalized intensity, * $p=0.0394$). See also Figure 3. S3E-F.
(G-H) AXL is less present in late endosomes (Rab7⁺) and enriched in recycling vesicles (Rab11⁺) in MCF10A-HER2 cells. See also Figure 3. S3G-H (n=15-25 cells, ** $p=0.0013$, ** $p=0.0061$).
(I) Cycloheximide chase shows that AXL stability is increased in MCF10A-HER2 cells in comparison to control cells (** $p<0.0001$).
See also Figure 3. S3.

HER2 transphosphorylates AXL to promote cancer cell invasion

Because a proteomic screen of HER2 over-expression revealed AXL as a candidate substrate [234], we hypothesized that the formation of an AXL/HER2 complex might facilitate transphosphorylation events between these RTKs. To test this, we overexpressed the human HER2 $\Delta 16$ or NeuT together with a kinase dead (KD) mutant of AXL in HEK293T cells. These experiments revealed that both HER2 $\Delta 16$ and NeuT phosphorylate AXL KD in a HER2 kinase activity dependent manner since it was sensitive to the HER2 inhibitor Lapatinib (Figure 3.3A and S4A). We next expressed HER2 $\Delta 16$ or NeuT in MDA-MB-231 cells that express endogenous HER2 at very low levels and AXL at high levels. We found that oncogenic HER2 variants promoted the phosphorylation of endogenous AXL and that these events were abrogated by inhibiting HER2 activity with Lapatinib (Figure 3.3B, Figure 3. S4B). We also tested whether AXL could promote the phosphorylation of HER2 in T47D Luminal A cells, which expresses HER2 but not AXL. In these cells, expression of exogenous AXL, which was found to be phosphorylated at basal state, had no impact on HER2 phosphorylation (Figure 3.3C). Similarly, inhibition of AXL with the small molecule inhibitor R428 in the MCF10A-HER2, NIC and SKBR3 cell lines had no impact on the phosphorylation of HER2 on multiple tyrosine sites (Figure 3. S4C). Interestingly, in T47D over-expressing AXL, addition of Lapatinib was sufficient to decrease AXL phosphorylation (Figure 3.3C), and this effect could be reproduced with MCF10A-HER2, NIC and SKBR3 cell lines (Figure 3. S4E). We also found that treatment of T47D cells with Heregulin (HRG), a ligand of the HER2/HER3 heterodimer, led to a further increase in AXL phosphorylation (Figure 3.3C). We confirmed that Lapatinib, at the concentration used here (0.1-1 μM), showed no off-target activity on AXL in a GAS6-mediated activation of AXL (Figure 3. S4D). We subsequently investigated whether the co-inhibition of HER2 and AXL would have a functional impact on cell invasion. While treatments with the HER2 blocking agents Lapatinib or Herceptin (antibody) had no impact, the AXL inhibitor R428 was sufficient to reduce cell invasion in MCF10A-HER2, SKBR3 and NIC cells (Figure 3.3D-G and 3. S4F-G). However, co-treatments

of Lapatinib or Trastuzumab together with R428 robustly blocked invasion (Figure 3.3D-G, Figure 3. S4F-G). Collectively, these data suggest that HER2 complexes with AXL for its transphosphorylation that promotes cell invasion.

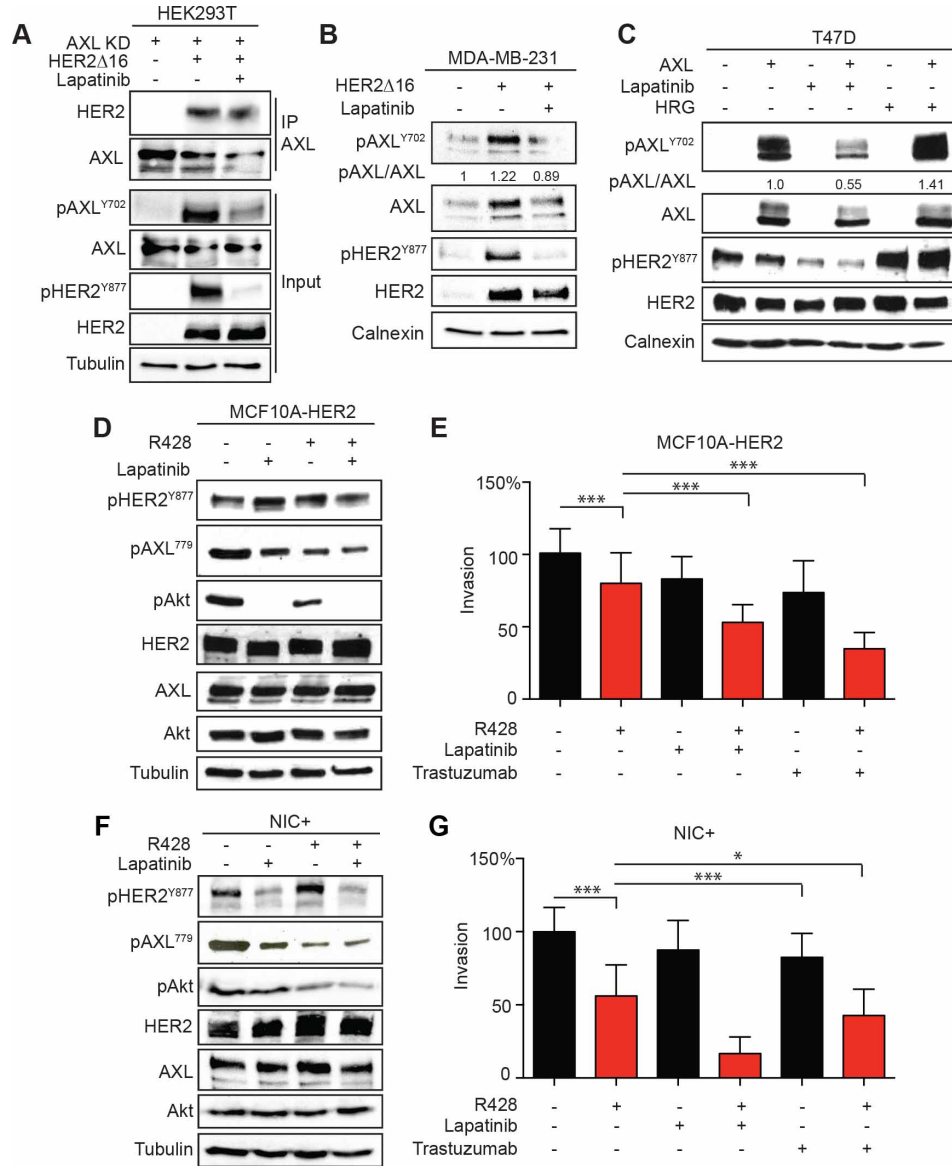


Figure 3.3: HER2 transactivates AXL to promote cell invasion.

(A) Overexpression of HER2Δ16 promotes the phosphorylation of AXL (kinase dead) and this is blocked by the HER2 inhibitor Lapatinib (1 μM).

(B) Expression of HER2Δ16 in MDA-MB-231 cells promotes transactivation of endogenous AXL, which is blocked by Lapatinib (1 μM) (For n=3 *p=0.049).

(C) Expression of AXL in serum starved T47D cells does not promote transactivation of endogenous HER2, but activation or inhibition of HER2 modulates AXL phosphorylation (n=3, Lapatinib (1 μM) **p=0.002 and HRG (20ng/mL) 20 min., **p=<0.0074).

(D-G) R428 (1 μM) and Lapatinib (1 μM) or Trastuzumab (10μg/mL) cooperates to decrease MCF10A-HER2 and NIC cells invasion (Data are represented as mean ± SEM, *p=0.0117 and ***p< 0.0001).

See also Figure 3. S4.

AXL is implicated in multiple steps of the metastatic cascade

The generation of a *Neu*⁺:*Axl*^{-/-} mouse model is the first *bona fide* pre-clinical tool to dissect the roles of AXL at various steps of the metastatic cascade *in vivo*. One of the potential limitations of the *Neu*⁺:*Axl*^{-/-} mouse model is that the global deletion of AXL might also have an impact on the tumor microenvironment. We therefore reconstituted NOD-SCID immune-compromised mice with control or *Axl*-null breast cancer cells to determine the tumor cell intrinsic role of AXL. We generated two cohorts of mice that conditionally express the Luciferase reporter in mammary epithelial cells: *NIC*⁺:*Rosa Lox-STOP-Lox Luciferase:Axl*^{+/+} or *NIC*⁺:*Rosa Lox-STOP-Lox Luciferase:Axl*^{-/-} and we derived cell explants from these models (*NIC*⁺:*Luc*⁺:*Axl*^{+/+} and *NIC*⁺:*Luc*⁺:*Axl*^{-/-}). When injected in mammary fat pads of NOD-SCID mice, *NIC*⁺:*Luc*⁺:*Axl*^{-/-} cells grew as primary tumors as efficiently as the control cells (Figure 3.4A-B). Furthermore, at endpoint, 2/10 mice grafted with *NIC*⁺:*Luc*⁺:*Axl*^{-/-} cells showed lung metastasis while 7/10 mice grafted with the control cells developed metastases (Figure 3.4C). These results demonstrate that AXL expressed in the HER2 transformed mammary epithelial cells promotes metastasis but is dispensable for tumor growth.

We next investigated the contribution of AXL in cancer cells at different steps of the metastatic cascade including intravasation, extravasation and survival/growth at the metastatic site. To assess the potential of AXL to promote intravasation, we implanted *NIC*⁺:*Luc*⁺:*Axl*^{+/+} or *NIC*⁺:*Luc*⁺:*Axl*^{-/-} cells in mammary fat pads of NOD-SCID mice and quantified the circulating tumor cells (CTCs) when the primary tumors had reached a 1.5 cm diameter (Figure 3.4D). We also quantified the CTCs directly from the *NIC*⁺ and *NIC*⁺:*Axl*^{-/-} transgenic models five weeks after tumor onset (Figure 3.4D). NOD-SCID mice bearing *NIC*⁺:*Luc*⁺:*Axl*^{-/-} tumors as well as *NIC*⁺:*Axl*^{-/-} transgenic mice presented with only a few CTCs in comparison to their respective control animals (Figure 3.4E-F). These results suggest that the AXL protein is a major contributor of intravasation.

We subsequently conducted an experimental metastasis assay by injecting *NIC*⁺:*Luc*⁺:*Axl*^{+/+} or *NIC*⁺:*Luc*⁺:*Axl*^{-/-} cells directly in the lateral tail vein of NOD-SCID mice, therefore bypassing the intravasation process (Figure 3.4G). While both cell models were retained in the lungs 1h post-injection, *Axl*^{-/-} cells produced noticeably less metastatic lesions than the control cells 30 days post-injection (Figure 3.4H-J). We designed an assay to specifically measure the extravasation potential of *Axl*-null cells by injecting fluorescently stained *NIC*⁺:*Luc*⁺:*Axl*^{+/+} or *NIC*⁺:*Luc*⁺:*Axl*^{-/-} cells in

the lateral tail vein of NOD-SCID mice. Two days later, Rhodamine-labeled Lectin was injected to stain the blood vessels and lungs were collected and sectioned to measure the ability of cells to enter the lung tissue (Figure 3.4K). These experiments revealed a decreased ability of *Axl*-null cells to exit the blood vessels and invade into the lung parenchyma (Figure 3.4L-M). To test whether AXL is also required in the cancer cells to promote survival and growth at the metastatic site, we developed a conditional AXL-depletion assay by generating *NIC⁺:Luc⁺* cells stably expressing 2 independent and Tet-inducible shRNAs against *Axl* (Figure 3.4N). We performed an experimental metastasis assay and waited for 2 days for the cells to extravasate into the lungs prior to treating the mice with doxycycline for 28 days to induce *Axl* knockdowns (Figure 3.4O). Cells in which *Axl* was conditionally depleted grew significantly less at the metastatic site than the ones expressing a non-targeting shRNA (Figure 3.4P-R). Collectively, these data suggest that AXL is continuously required in HER2+ cancer cells for efficient metastasis.

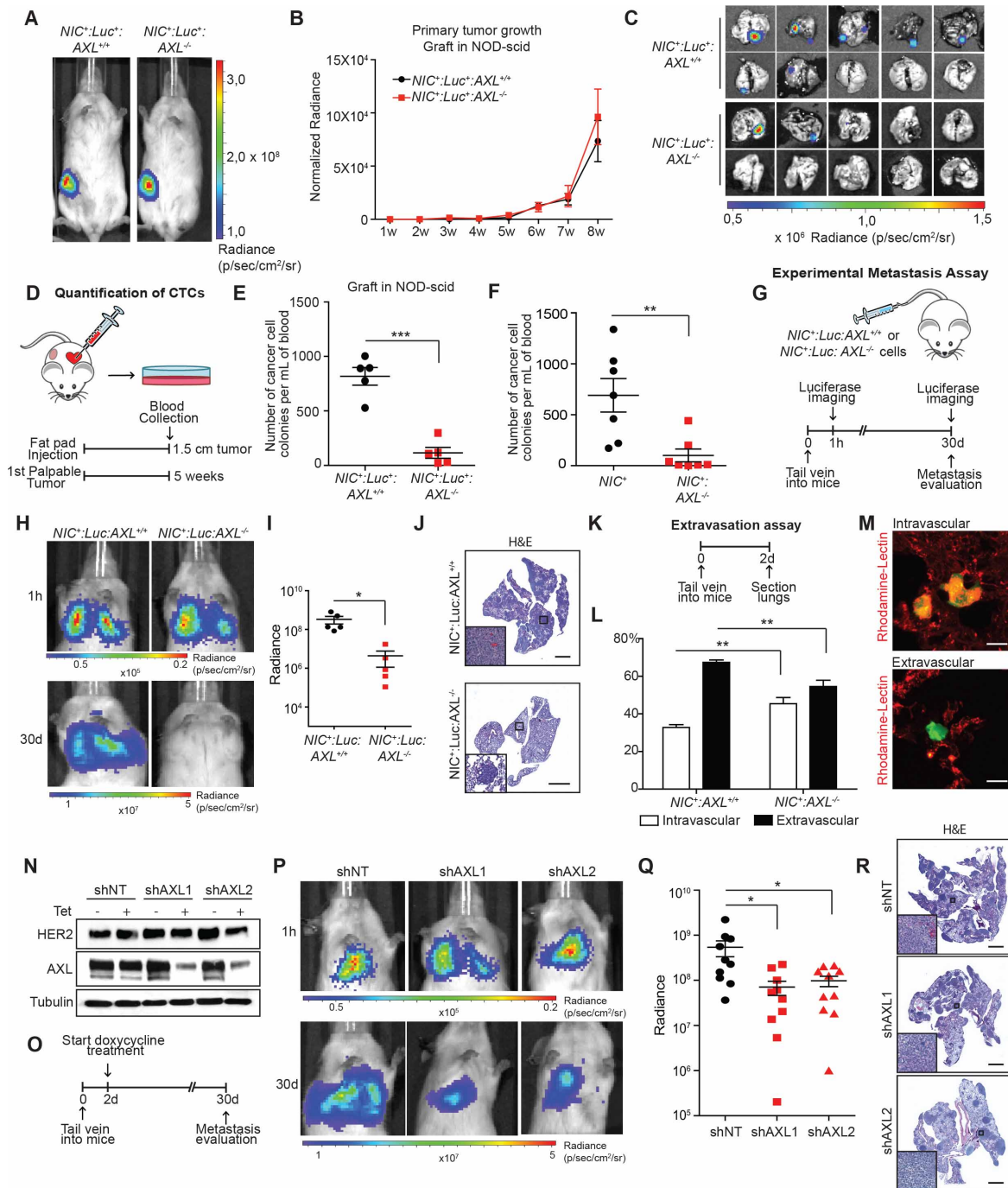


Figure 3.4: AXL is required at multiple steps of the metastatic cascade.

(A-C) *NIC⁺:Luc⁺:Axl^{-/-}* cells grafted in NOD-SCID mice present no difference in tumor growth, but developed less lung metastases (n=10).

(D) Schematic showing the method for quantifying the circulating tumor cells (CTCs) as a measure of intravasation.

(E-F) *NIC⁺:Luc⁺:Axl^{-/-}* grafts in NOD-SCID and *NIC⁺:Axl^{-/-}* mice have a decrease in the number of CTCs (Data are represented as mean ± SEM, n=5-7, **p=0.0057, ***p<0.0001).

(G) Schematic showing the experimental metastasis assay via lateral tail vein injection of the cells.

(H-J) *NIC⁺:Luc⁺:Axl^{-/-}* cells have a reduced metastatic potential in experimental metastasis assay (n=5, *p=0.0487). Representative H&E staining of metastatic lung sections (scale bar : 2 mm).

(K) Representation of an *in vivo* lung extravasation assay via lateral tail vein injection of the cells.

(L-M) *NIC⁺:Luc⁺:Axl^{-/-}* cells have a defect in extravasation to the lung (n=5 mice, 20-30 cells per lung, **p=0.0085 and **p=0.0071). Representative images of intravascular and extravascular cells quantified in the lung (63X, scale bar: 20µm).

(N) Western blot showing the efficiency of tetracycline-mediated induction of the two shAxl in *NIC⁺:Luc⁺* cells.

(O) Schematic of the experimental metastasis assay with doxycycline treatment setting for the induction of the shRNA *in vivo*.

(P-R) Induction of *Axl* knockdown after extravasation in the lung leads to a decrease of metastatic burden (n=10, *p=0.0386, *p=0.0497). Representative H&E staining of metastatic lung sections (scale bar: 2 mm).

AXL regulates TGF-β-induced cell invasion of HER2+ breast cancer cells

To gain mechanistic insights into the poor metastatic potential of *Axl*-null tumors, we performed a transcriptomic analysis. We first conducted RNA-sequencing experiments using RNA isolated from *Neu⁺:Axl^{+/+}* or *Neu⁺:Axl^{-/-}* tumors grown as grafts and identified the differentially expressed genes. Gene Ontology analysis revealed that *Axl^{-/-}* tumors displayed a decrease in expression of genes involved in pathways mediating Integrin, EGF, Rho-GTPase and TGF-β signaling (Figure 3.5A) as compared to *Axl*-expressing tumors. These analyses also identified biological processes downregulated following the loss of AXL, including Extracellular matrix organization, Cell migration, Cytoskeleton organization and Epithelial to mesenchymal transition (Figure 3.5B). Furthermore, Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) suggested that AXL acts on TGF-β signaling, EMT and cell migration (Figure 3.5C-D, Table 3. S1). Additionally, gene sets from Focal adhesion, Stem cell and HER2 signaling were also decreased in *Axl^{-/-}* tumor grafts (Figure 3. S5A-D). Similar GSEA signatures were identified when RNA was isolated from tumors from *Neu⁺:Axl^{+/+}* or *Neu⁺:Axl^{-/-}* transgenic mice (Figure 3. S5E-H, Table 3. S1). These analyses suggest that AXL may promote metastasis by controlling cell migration and invasion in the context of EMT/TGF-β signaling. We investigated the activation status of a panel of proteins involved in cell migration using activation state specific antibodies. Tissue lysates from *Neu⁺:Axl^{-/-}* tumors displayed a reduction of pSrc, pFAK, p-p130Cas and pAKT suggesting that migration pathways are impaired when AXL is absent (Figure 3. S5I). Interestingly, ablation of *Gas6* had no impact on the activation status of these pro-migration proteins (Figure 3. S5I). Other signaling intermediates, pSTAT3, pSTAT1 or pERK, were unaffected by deletion of *Axl* or *Gas6* (Figure 3. S5I).

Previous work has shown that TGF-β promotes the formation of metastases *in vivo* in *Neu⁺* breast cancer models [94] and that the plasticity of EMT is important for efficient metastasis [3, 85, 235, 236]. Since our transcriptomics experiments indicated that deletion of AXL in *Neu⁺* tumors alters their EMT status, we hypothesized that AXL is required to promote EMT-induced cell migration

and invasion. To test this, we exposed a panel of HER2+ breast cancer cell models (NIC, MCF10A-HER2 and SKBR3) to TGF- β to reprogram them toward EMT. As expected, TGF- β stimulation increased cell invasion, which could be blunted either by treatment with R428, by interfering with AXL expression using either RNAi or genetic knockout (Figure 3.5E-H, Figure 3. S6A-L, Movie S1). Treatment of the non-transformed MCF10A cells with TGF- β increased AXL expression, its phosphorylation, the expression of EMT markers and increased cell migration and invasion (Figure 3.5E-F and Figure 3. S6C-D). In this model, interfering with AXL activity (R428) or expression (siRNA) abolished TGF- β -induced cell migration and invasion and this effect was more striking in MCF10A-HER2 in comparison to MCF10A cells (Figure 3.5E-F, Figure 3. S6A-D). Furthermore, TGF- β failed to induce invasion of *NIC*⁺:*Axl*^{-/-} or *NIC*⁺:shAXL cells, and this phenotype could be rescued by re-expression of AXL (Figure 3.5G-H, Figure 3. S6K-L). To test whether AXL contributes to TGF- β -induced invasion *in vivo*, we conducted an extravasation assay similar to the one described in Figure 3.4K. While pre-treatment of *Neu*⁺:*Axl*^{+/+} cells enhanced their invasion in the lung, TGF- β had no effect on the extravasation potential of *Neu*⁺:*Axl*^{-/-} *in vivo* (Figure 3.5I). These results suggest that AXL plays a critical role in EMT/TGF- β -induced cell invasion of HER2+ breast cancer cells *in vivo*.

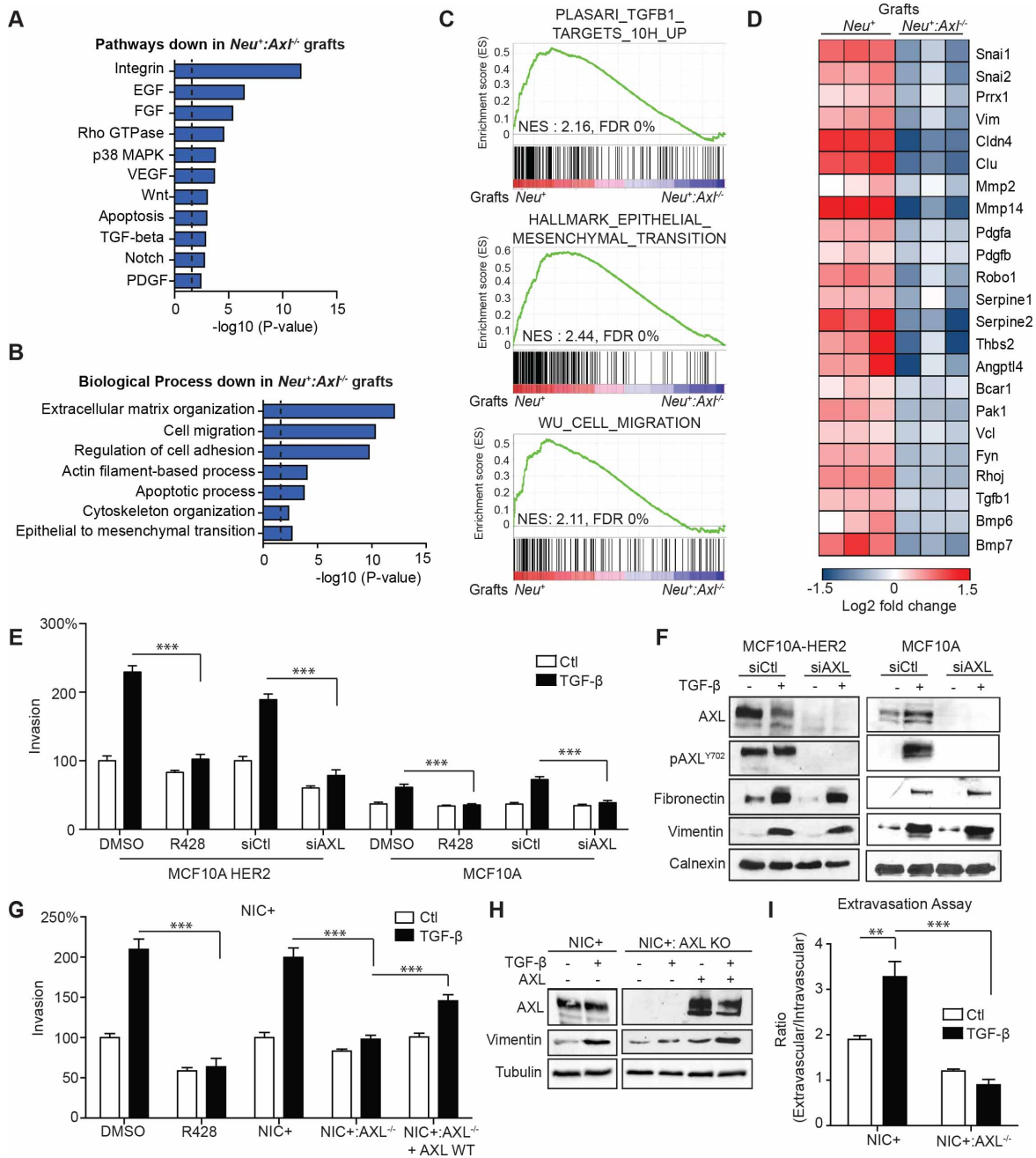


Figure 3.5: Transcriptomics analyses reveal a role for AXL in TGF-β and EMT signaling.

(A-B) Gene ontology (GO) analyses of pathways and biological processes downregulated in *Axl*-null tumor grafts in FVB females.

(C-D) GSEA plots and heat maps representing significant modulated genes related to TGF-β signaling, EMT and cell migration between *Axl*^{-/-} and control tumor grafts. See also Figure 3. S5.

(E-F) AXL is essential for TGF-β-induced cell invasion of MCF10A-HER2 (***) and control MCF10A cells treated with TGF-β (***)

(G-H) NIC cells undergo EMT upon treatment with TGF-β and the inhibition of AXL abrogates TGF-β-induced cell invasion. TGF-β-induced cell invasion in *Axl*-depleted cells was rescued with exogenous *Axl* expression (Data are represented as mean ± SEM, ***)

(I) TGF-β-induced cell extravasation *in vivo* is abrogated in *NIC*⁺:*Axl*^{-/-} cells (n=5 mice, **p=0.0036, ***)

See also Figure 3. S5 and Table 3. S1.

AXL is a critical effector of EMT for invasion of human HER2+ breast cancers

We next investigated whether the EMT/TGF- β /AXL interplay contributes to human HER2+ breast cancer progression. Unlike in human tumors (Figure 3.1), AXL is not significantly expressed in human HER2+ breast cancer cell lines (Figure 3. S1A). We used the human HER2+ breast cancer cell line HCC1954 and confirmed that AXL expression is increased upon TGF- β treatment (Figure 3.6A, Figure 3. S7A). In this context, interfering with AXL activity (R428) or expression (siRNA) abolished TGF- β -induced cell migration and invasion (Figure 3.6A-B, Figure 3. S7A-C). We found that AXL expressed following TGF- β treatment of HCC1954 cells enters in complex with HER2 by PLA (Figure 3.6C). We also observed that AXL phosphorylation is decreased following treatment with Lapatinib in TGF- β treated HCC1954 cells (Figure 3.6D). While R428 decreased the invasiveness of HCC1954 cells stimulated with TGF- β , the combination of R428 with the HER2 targeting agents Lapatinib or Trastuzumab further blocked this phenotype (Figure 3.6E). Furthermore, we derived a cell line from a HER2+ Patient-Derived-Xenograft (PDX) initially isolated as a brain metastasis. In agreement with the observations from a panel of human HER2+ cell lines, AXL is not expressed in the HER2+ PDX cells, but its expression, along with EMT markers, is induced following TGF- β stimulation (Figure 3.6F, Figure 3. S7D). While TGF- β treatment robustly induced cell invasion and migration of the PDX cells, interfering with AXL activity (R428) or expression (shAXL) blunted these effects (Figure 3.6F-G, Figure 3. S7D-F, Movie S2). Interestingly, AXL induced after TGF- β treatment of the PDX derived cells formed a complex with HER2 (Figure 3. 6H). The combination of R428 with Lapatinib or Trastuzumab in this context also blocked cell invasion in comparison to each agent alone (Figure 3.6I).

We next investigated if AXL expression in HER2+ breast cancer samples correlates with the EMT status of the tumors and found that AXL expression inversely correlated with the epithelial marker E-Cadherin and correlated with the mesenchymal marker Slug (Figure 3.6J). To confirm the correlation between *AXL* expression and the EMT status of the tumors, we mined the transcriptomic data of our cohort of HER2+ breast cancer patient samples and these analyses demonstrated that high expression of the *AXL* mRNA strongly correlates with TGF- β gene signatures in HER2+ tumors (Figure 3.6K). Immunofluorescence showed cancer cells to be positive for both pSmad2 and AXL (Figure 3. S7G), thereby confirming that this signature is present in the cancer cells, and

not only in the stroma. Our results in mouse models and human samples highlight a role for AXL in the maintenance of the EMT program and demonstrate that EMT/TGF- β signaling promotes AXL expression that mediates invasion breast cancer cells.

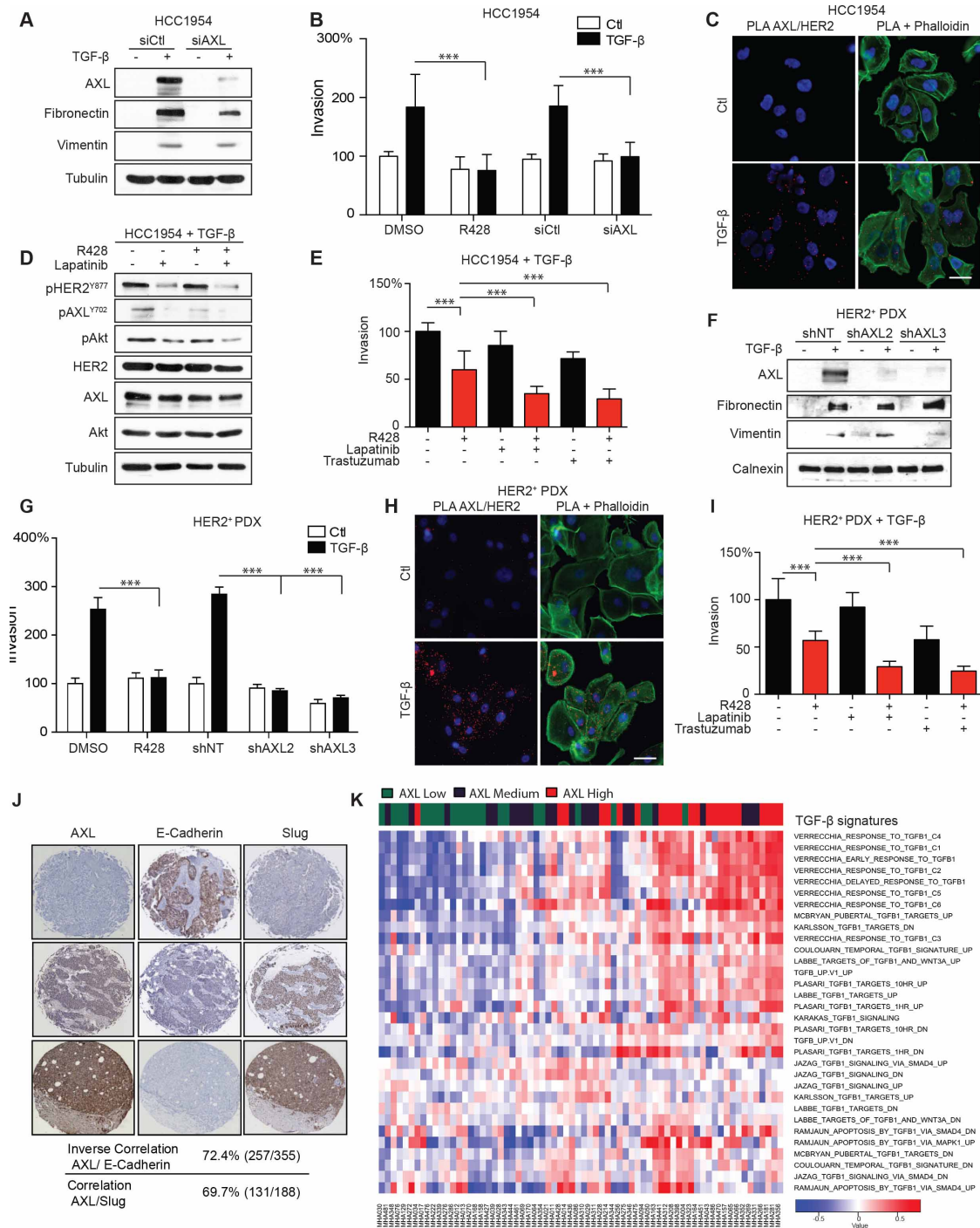


Figure 3.6: AXL is required for TGF- β -induced cell invasion and its expression is linked to EMT and TGF- β signaling in human HER2⁺ tumors.

- (A) HCC1954 cells treated with TGF- β show an increase in AXL expression.
 - (B) Treatment with R428 or siAXL abrogates TGF- β induced cell invasion of HCC1954.
 - (C) AXL and HER2 forms a complex, as measured by PLA, in HCC1954-treated with TGF- β .
 - (D-E) Combination of R428 (1 μ M) with Lapatinib (1 μ M) or Trastuzumab (10 μ g/mL) reduces cell invasion of TGF- β -treated HCC1954 cells.
 - (F) AXL expression is induced by TGF- β treatment in HER2+ PDX cells.
 - (G) AXL is required for TGF- β -induced cell invasion of HER2+ PDX cells.
 - (H) PLA shows that AXL and HER2 interacts in PDX cells following TGF- β stimulation (scale bar: 20 μ m).
 - (I) Combination of R428 (1 μ M) with Lapatinib (1 μ M) or Trastuzumab (1 μ g/mL) blocks cell invasion of TGF- β -treated HER2+ PDX cells.
 - (J) High levels of AXL in human TMA correlate with EMT markers.
 - (K) Transcriptomics analyses of HER2+ breast cancer patient samples reveal that AXL expression correlates with TGF- β signatures (n=68).
- See also Figure 3. S6 and S7.

Pharmacological inhibition of AXL reduces the metastatic progression of HER2+ breast cancer

Because our results support a role for AXL in promoting metastasis of HER2+ breast cancer, we tested whether pharmacological inhibition of AXL might be a viable anti-metastatic treatment. We used a tumorsphere model in which the ability of cancer cells with stem-like properties to form tumorspheres *in vitro* is a reflection of their capacity to form tumors *de novo* or at the metastatic site *in vivo* [237]. We found that either Lapatinib or Trastuzumab reduced tumorsphere formation of our HER2+ PDX cells, while R428 had a modest effect (Figure 3.7A-B). The combination of both AXL and HER2 inhibitors blunted the formation of tumorspheres (Figure 3.7A-B). In order to provide proof-of-principle that inhibition of AXL *in vivo* decreases metastatic burden, we used the MMTV-NIC mouse model of HER2+ breast cancer. Cohorts of females were treated daily with either R428 or vehicle for 5 weeks after the appearance of the first palpable tumors. Prolonged exposure to R428 decreased AXL phosphorylation and also led to an upregulation of AXL (Figure 3. S7H). At the end of the experiment, multiple tumor progression parameters were analyzed and we determined that prolonged *in vivo* AXL inhibition mimicked its genetic deletion. Although we found no difference in the proliferation (Ki67), apoptosis (Cleaved-Caspase 3) or the total tumor mass of R428-treated mice in comparison to mice that received vehicle alone (Figure 3.7C, Figure 3. S7I-L), R428 administration decreased the number of CTCs and the total lung metastatic burden of MMTV-NIC animals (Figure 3.7D-E). In summary, we report a preclinical model demonstrating that AXL is essential for the metastatic progression of HER2+ breast cancer *in vivo* and we suggest that AXL inhibition could be a powerful approach to limit metastatic spreading.

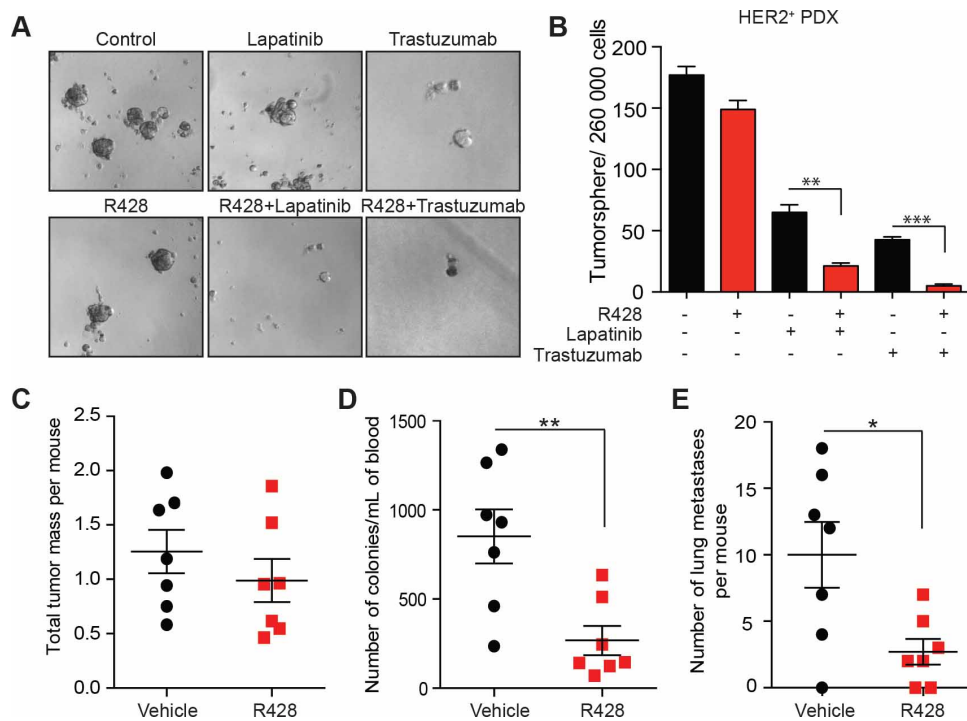


Figure 3.7: Prolonged pharmacological inhibition of AXL *in vivo* in the MMTV-NIC HER2+ breast cancer model reduces metastasis.

(A-B) Treatment of human HER2+ PDX cells with a combination of R428 (0.5 μ M) and Lapatinib (0.5 μ M) or Trastuzumab (5 μ g/mL) abrogates tumorspheres formation (** p=0.0063, ***p=0.0002, scale bar: 150 μ m).

(C) *In vivo* R428 treatment does not have a significant effect on tumor mass in MMTV-NIC HER2+ females (Data are represented as mean \pm SEM).

(D-E) Treatment with the AXL inhibitor R428 reduces the number of circulating tumor cells and lung metastasis in MMTV-NIC HER2+ females (**p=0.0054 and *p=0.018).

See also Figure 3. S7.

Discussion

AXL expression is primarily limited to breast cancer cell lines representative of the triple-negative molecular subtypes and virtually no expression is detectable in Luminal or HER2+ cell lines [177, 180]. An emerging feature of AXL expression across multiple solid tumor cell lines is the link with EMT (i.e. cells expressing mesenchymal markers) [180, 238]. These data have led to the establishment of AXL as a candidate marker of TNBC. In this study, we demonstrate that AXL is expressed in a subset of HER2+ human breast cancers that display an EMT signature and this is linked to poor clinical outcome. Based on these data, we sought to determine if AXL plays a functional role and if it is an actionable target during HER2+ breast cancer progression. Through a series of genetic and functional assays, we demonstrate a central role for AXL in promoting metastasis in the context of HER2+ breast cancer.

An AXL decoy receptor with enhanced GAS6-binding properties, was engineered as a therapeutic tool to disrupt GAS6/AXL signaling *in vivo* [239]. MYD1 was shown to block metastasis of human ovarian cancer cells and a murine breast cancer cell line in grafting assays in mice. These data led to the notion that targeting GAS6 might be a novel approach to limit metastasis. In contrast, by using a genetic approach to characterize a pre-clinical breast cancer model, we found that GAS6, but not AXL, was dispensable for HER2-driven metastasis *in vivo*. These findings not only demonstrate that autocrine secretion of GAS6 from cancer cells is not required for metastasis, but also that GAS6 expressed in the lungs is not acting as a homing factor for the cancer cells in this model. Rather, AXL appears to physically interact with HER2, thereby bypassing the necessity for GAS6, and this leads to HER2-mediated transphosphorylation and activation of AXL which triggers cell invasion. Recent data suggest that AXL heterodimerization with other transmembrane receptors occurs in multiple pathophysiological contexts [226-228]. Our results provide mechanistic details demonstrating that the interaction of AXL with HER2 increases both AXL half-life and its localization at the cell surface. Interestingly, the formation of HER2/EGFR heterodimers has also been reported to stabilize EGFR at the cell surface leading to enhanced oncogenic signaling [240, 241]. Hence, ligand-independent activation of AXL could be a common event in cancers driven by RTKs. One implication of our findings is that determining the GAS6 dependency of tumors for metastasis may be important before considering therapeutic approaches that target the GAS6/AXL interaction. Unlike in humans, our murine models have the limitation that metastasis only occurs to lungs, therefore we cannot exclude the possibility that GAS6 could

be important in controlling metastasis to other organs. In prostate cancer models, GAS6 expressed by the bone promotes a tumor cell dormancy state [182]. It will be important to determine if GAS6 is important for bone metastasis since it is a frequent site of dissemination in HER2+ breast cancer patients. In addition, PROTEIN S (PROS1), a GAS6-related protein that preferentially activates TYRO3 and MERTK over AXL [170], is also expressed in murine HER2+ tumors. Whether dual targeting of GAS6 and PROS1 would impact AXL-mediated metastasis remains to be tested.

The plasticity of EMT is critical to allow for efficient metastasis [85, 235]. Acquisition of EMT features facilitates migration within the primary tumor and intravasation [95], prepares the cells in the circulation for extravasation [97], and is required for extravasation [92]. AXL is frequently expressed in cancer cells of various origins that display mesenchymal features [189, 242]. While there is now substantial evidence to suggest that AXL is a promoter of metastasis in solid cancers, its contributions to the various steps of the metastatic process as an effector of EMT and throughout the metastatic cascade have not been dissected. While HER2+ cancers retain epithelial features, the progression to the metastatic stage is thought to require EMT [179]. We report here that AXL is essential for the intravasation of HER2+ cancer cells, as measured by quantifying the CTCs in both immune-competent and immune-compromised mice. We confirmed the contribution of AXL to EMT-induced invasion in multiple models, in particular using a human the HER2+ cell line HCC1954 and the HER2+ PDX cell. Interestingly, the HER2+ PDX cells used in this study does not express AXL and mesenchymal markers in basal conditions like other HER2+ breast cancer cell lines studied to date [177, 180], unless they are reprogrammed by TGF- β . We also found that AXL is a mediator of TGF- β -induced extravasation of HER2+ cancer cells. Hence, AXL may be needed to allow for efficient TGF- β -reprogramming of cells for extravasation. Our findings that AXL is essential for extravasation in HER2+ cancer cells are in agreement with several experimental metastasis assays that have suggested a role for AXL in the extravasation of triple-negative breast cancer cells [190]. However, the major difference is that triple-negative breast cancer cells are initially mesenchymal and express high AXL while HER2+ cells must undergo EMT for AXL expression and AXL-mediated extravasation.

By performing knockdown of AXL once HER2+ cancer cells have achieved lung colonization, we demonstrated that AXL contributes to the establishment of macrometastases. While inhibition of AXL impairs the efficiency of metastasis, the later finding has major clinical implications since

pharmacological inhibition of AXL even at later stages may have the potential to reduce metastatic outgrowth. A recent study using tumor initiating cells from PyMT transgenic mouse tumors that display partial EMT (AXL⁺) suggested that AXL, by promoting the secretion of THBS2 and activation of fibroblasts, prepares the metastatic niche [181]. We found that *THBS2* was downregulated in the *Axl*^{-/-} tumors (Figure 3.5D), in agreement with a role for AXL in the niche activation. These data support the notion that inhibition of AXL in HER2⁺ breast cancer dampens the efficiency of every step of the metastatic cascade.

Most patients afflicted with HER2⁺ breast cancer undergo first line therapy with agents that target HER2. We tested the effect of prolonged systemic pharmacological inhibition of AXL and found that R428 treatments phenocopied the genetic deletion of AXL, i.e. a decrease in both CTCs and lung metastases with no effect on primary tumor growth. Furthermore, co-treatment with R428 and HER2 blocking agents inhibited HER2⁺ PDX tumorspheres growth. Collectively, our data demonstrate that anti-AXL therapy is sufficient to reduce metastasis in HER2⁺ cancers in experimental models. It will be key to define pre-clinical conditions to determine if co-targeting of HER2 and AXL affects tumor growth, intravasation and extravasation and survival of the DTCs.

Experimental procedures

Tumor Microarrays (TMA)

A cohort of 300 female breast cancer patients comprising ductal and medullary tumors specimen of different histological grades was used in the retrospective study. Formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) samples containing tumor tissues were collected for the study and prepared as TMA at IRIC Histology core facility. Tumor grades were confirmed using the Modified Scarff-Bloom-Richardson-Elston-Ellis grading system. Information on the TMA and the follow-up data, including the onset of metastasis and relapse are described in [232]. The Human Ethics Committee of the Université de Montréal Hospital Center (3SL05.019) approved the use of these specimens and research data.

Animal Experiments

Mice were housed in a specific pathogen-free (SPF) facility and experiments were approved by the Animal Care Committee of the Institut de Recherches Cliniques de Montréal and complied with the Canadian Council of Animal Care guidelines.

TMA scoring

After staining, TMA slides were read blindly by two readers. Scoring of AXL, Vimentin and Slug expression on each core was carried out using a two tier scoring system as previously described [232]. The first parameter corresponds to the percentage of immunoreactive cells also known as the quantity score (QS). QS was estimated as follows: no staining was scored as 0, 1-10% of cells with positive staining were scored as 1, >10- 50% as 2, >50-70% as 3, and >70-100% as 4. We next assessed the second parameter (staining intensity score), which was rated as follows: No staining was scored as 0, weak staining as 1, moderate staining as 2, and strong staining as 3. The product of the quantity and the staining intensity scores represents the total IHC Score that ranges from 0 to 12. IHC Scores of 0 to 4 were considered to represent low levels of expression while score from >4 to 12 were considered as high levels of expression.

Immunohistochemistry (IHC) of Human TMAs

TMA slides were deparaffinized in an automated immunostainer (Discovery XT, Ventana Medical Systems). Heat-induced epitope retrieval [238] and blocking steps were performed using proprietary reagents (Cell Conditioner 1 and 2, Inhibitor D and Blocker D included in DABmap

detection kit (Ventana Medical Systems)). Sections were then incubated with the indicated primary antibodies at room temperature (see “Antibodies” section). Bound antibodies were detected with biotin-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody at 1:100 dilution (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Nuclei were counterstained with haematoxylin.

Bioinformatics Analyses on Human Data

The HER2⁺ breast cancer cohort is from GSE58644 [243]. The survival R package (version 2.40-1) was used to run the Kaplan-Meier analyses. The cohort was split into tertiles and the first formed the low group and the combination of the middle and last tertile formed the medium/high group. To test the TGF- β signatures, the gene lists were downloaded from MSigDB and gene set variability analysis was done with GSVA bioconductor R package (version 1.20.0) [244]. The GSVA scores were used to plot the heatmap gplots (version 3.0.1) using the R package.

Animal Experiments

Mice used were previously described: transgenic Neu FVB/NJ (MMTV-NeuNDL2-5) and NIC (MMTV-NeuNDL2-5-IRES-Cre) [48], MMTV-Cre mice [245], Gas6 KO [246], Axl KO obtained from Jackson Laboratories [247] and FVB.129S6(B6)-Gt(ROSA)26Sor^{<tm1(luc)Kael>}/J from Jackson Laboratories [248]. All these mice were backcrossed on a FVB/NJ genetic background. All tail veins and graft experiments were conducted in NOD.CB17-*Prkdc*^{scid}/J mice obtained from Jackson Laboratories.

Tumor progression studies

Axl KO and Gas6 KO mice were crossed with Neu (MMTV-NeuNDL2-5) to generate large cohorts of female mice. Each female was analyzed 5 weeks after tumor onset, which was determined by palpation. At the time of necropsy, mammary glands, tumors and lungs were harvested. The number and the total mass of tumors per mouse were determined as described in [233]. The 10% formalin perfused lungs were embedded in paraffin and cut at 5 μ m every 100 μ m followed by staining with H&E (approximately 24 slides per lung). Lung metastases were then counted under the microscope for lungs of every mouse.

Whole-Mount Analyse of Mammary Glands

To analyze mammary gland development, we collected mammary glands (number 4 or 9) of 9, 12, and 15 weeks old mice of the indicated genotypes. Mammary glands were fixed in 10% formalin, defatted using acetone and stained in carmine red solution. Tissues were dehydrated in an ethanol gradient and xylene to be mounted using Permount (Fisher). The developmental status of the mammary gland was assessed by quantification of the branching. Quantification of Mammary Intraepithelial Neoplastic Lesions (MINs) was also performed the same way with tumor-free mammary glands (number 4 or 9) from female mice at 5 weeks after tumor onset [233].

Immunohistochemistry (IHC) and Immunohistofluorescence (IHF)

For IHC analyses, paraffin sections were deparaffinized in xylene and rehydrated with an ethanol gradient followed by an antigen retrieval step with 10 mM sodium citrate buffer (pH 6) according to standard procedures. The sections were then blocked with 3% H₂O₂, permeabilized with IHC buffer (0.5% Triton X-100 and 0.02% Tween-20 in PBS), blocked with IHC buffer containing 1% BSA and incubated with primary antibody overnight (see “Antibodies” section). See “Immunohistochemistry (IHC) of Human TMAs” for the details of the detection. For immunohistofluorescence (IHF), the same protocol was used but fluorescent streptavidin antibodies were used and the counterstain was done using Slowfade with Dapi (Life Technologies).

TUNEL Assay

Paraffin embedded slides were deparaffinized, rehydrated and apoptosis detection was done following the recommended protocol (DeadEnd Fluorometric TUNEL System, Promega). Volocity software (PerkinElmer Life and Analytical Sciences) was used for the quantification of the signal.

Cell Culture and Treatments

MCF10A-Ctl and MCF10A-HER2 cells were maintained in Ham’s F12 with 10% FBS, penicillin/streptomycin, and supplemented with hydrocortisone (0.5 mg/mL), insulin (10µg/mL) and EGF (20ng/mL). HEK293T, MDA-MB-231, T47D and SKBR3 were kept in DMEM with 10% FBS penicillin/streptomycin. HCC1954 were cultured in RPMI with 10% FBS. The NIC+ cell lines of the indicated genotypes were established from primary mammary tumors from MMTV-NIC transgenic mice [55] and kept in DMEM with 5% FBS and supplemented with 1X Mammary Epithelial Growth Supplement (MEGS). For pulse-chase experiments, Cycloheximide

(Millipore) was added for the indicated times at a dose of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. T47D or MDA-MD-231 were serum starved for 16 hr prior to treatment with 20 ng/mL HRG (Peprotech) for 20 min or Gas6 (400ng/mL, R&D Systems) for 15 min. Cells were treated with Lapatinib (1 μM , Selleckchem) for 2 hours, R428 (1 μM , Apexbio) for 1h and Trastuzumab (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 2h. TGF- β 1 (Humanzyme) treatments were done with 2-5 ng/mL for 30 minutes or 2-7 days.

Transfection, Infection and Plasmids

HEK293T cells were transfected by the calcium phosphate method, whereas all other cell lines were transfected using Lipofectamine 2000 or 3000 (Thermo Fisher Scientific). pcDNA3.1 Neu-NT (c-neu oncogene, gift from Peter Siegel), pCMV-Sport6 murine Axl (gift from Rob Screaton) and pcDNA3.1 HER2 Δ 16 generated from pMSCV HER2 Δ 16 [52] were used in overexpression. For infection of cell populations, 293T cells were cotransfected with pBabe-puro vectors and pCLAmpho (2:1 ratio) or with pMDLg/pRRE, pRSV-Rev and VSVG. The viral supernatants were harvested and added to target cells in the presence of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ polybrene. shAXL sequences were obtained from Sigma (see Table S2) and were introduced into pLKO-Tet-On to generate a doxycycline-inducible expression system [5]. Cells were selected for 2 days with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ puromycin. To rescue Axl expression in cells expressing shAXL2, silent mutations (see Table S2) were introduced into the Axl cDNA to generate a clone insensitive to shAXL2. For RNAi experiments, cells were either transfected with a control siRNA or an ON-TARGET Smart Pool siRNA specific to AXL (Dharmacon).

Co-immunoprecipitation and Western Blot Analyses

For co-immunoprecipitation experiments, cells were lysed in NP-40 buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.5, 1% Nonidet P-40), and 500 μg to 1mg of total proteins were incubated with the indicated antibodies and Protein A-sepharose beads for 2h at 4°C. For HER2/AXL co-immunoprecipitation in MCF10A-HER2, proteins were crosslinked prior to cell lysis by incubation with 1 mM DSP (Pierce) for 30 minutes. For total tumor lysates preparation, liquid nitrogen frozen tumor pieces were ground with mortar and pestle and lysed in RIPA buffer (50 mM Tris pH 7.5, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholic acid, 1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA). Equal amounts of protein lysates or immunoprecipitates were separated by SDS/PAGE and specific proteins were detected by immunoblotting.

Immunofluorescence (IF) and Proximity Ligation Assay (PLA)

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA), washed extensively with PBS, and next permeabilized with PBT (PBS 0.2% Triton). After 1h of blocking in PBT 1% BSA, primary antibodies were incubated for 1h at room temperature. For IF, secondary antibodies were incubated for 30 minutes followed by extensive washing and mounting of the slides using Slowfade with Dapi (Life Technologies). Images were acquired on a Zeiss LSM710 confocal microscope and analysed using Fiji software for intensity quantification and co-localization (Coloc2 tool). For PLA assays, hybridization with the PLA probes (including control conditions), ligation and amplification were performed exactly according to the manufacturer's recommendations (Duolink In Situ, Sigma).

Antibodies

IHC/IHF of human samples: AXL (1:200, LsBio LS-B6124), HER-2/neu (1:2 Roche, 4B5), E-cadherin (1:200, Cell signaling), Slug (1:200, Cell signaling), Phospho-Smad2 Ser465/467(1:200, Cell Signaling)

IF and IHC: AXL (1:100, Cell Signaling), AXL (1:50, Santa Cruz C-20 – used for intracellular pool), Neu (1:200, Santa Cruz 3B5), Ki67 (1:250, Medicorp), Cleaved Caspase 3 (1:200, Cell Signaling)

Western blots : AXL (1:1000, Santa Cruz C-20), Neu (1:1000, Santa Cruz C-18), p-AXL Tyr702 (1:1000, Cell Signaling - directly monitor effects on one of the auto-phosphorylation site of AXL), p-AXL Tyr779 (1:1000, R&D – highly sensitive to R428), p-Neu Tyr877 (1:1000, Santa Cruz sc-101695), Anti-phosphotyrosine 4G10 (1:10 000, Millipore), p-Akt Ser473 (1:1000, Cell Signaling), Akt (1:1000, Cell Signaling), Fibronectin (1:1000, Santa Cruz H-7), Vimentin (1:1000, Cell Signaling), Phospho-Smad2 Ser465/467(1:1000, Cell Signaling), Smad 2-3 (1:1000, Cell Signaling), E-Cadherin (1:1000, BD), pSrc Tyr416 (1:1000, Cell Signaling), Src (1:1000, Cell Signaling), pFAK Tyr397 (1:1000, Cell Signaling), FAK (1:1000, Cell Signaling), p-p130Cas Tyr410 (1:1000, Cell Signaling), p-STAT3 Tyr705 (1:1000, Cell Signaling), STAT3 (1:1000, Cell Signaling), STAT1 (1:1000, Cell Signaling), pSTAT1 Tyr701 (1:1000, Cell Signaling), pERK1/2 Thr202/Tyr204 (1:1000, Cell Signaling), ERK1/2 (1:1000, Cell Signaling), Calnexin (1:5000, Santa Cruz H-70) and Tubulin (1:10 000, Sigma).

Cell Surface Biotinylation Assays

Control and HER2 overexpressing MCF10A cells were chilled on ice, rinsed twice with ice-cold biotinylation buffer (Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.4, supplemented with 1 mM CaCl₂ and 0.5 mM MgCl₂), and then incubated for 1h at 4°C with a non-permeable amine reactive biotinylation reagent, EZ-Link-Sulfo-NHS-LC-Biotin (1 mg/mL; Thermo Scientific) to label cell surface-exposed proteins. Free biotin was then quenched with 0.1 M glycine for 10 min at 4°C and cells washed twice with ice-cold biotinylation buffer. Cells were lysed in 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 5 mM iodoacetamide (Sigma-Aldrich), 1X protease inhibitor (complete, without EDTA, Roche), 1 mM Na₃VO₄, and 1 mM PMSF for 30 min at 4°C. Cell debris and nuclei were removed by centrifugation for 10 min at 4°C at 2,800 x g and then 16,000 x g. Biotinylated proteins were isolated by incubating cell lysates with high-capacity streptavidin agarose resin (Thermo Scientific) for 2h at 4°C. Beads were washed extensively with intermittent centrifugation at 1,000 x g for 5 min to eliminate all potential contaminants bound to biotinylated proteins. Three washes were then performed with lysis buffer, followed by PBS supplemented with 0.5% SDS. Beads were then incubated for 20 min at room temperature with PBS/0.5% SDS/100 mM DTT. Further washes were performed with 6 M Urea in 100 mM Tris-HCl pH 8.5, followed by a 20 min incubation at room temperature with 6 M urea/100 mM Tris-HCl pH 8.5/50 mM iodoacetamide. Additional washes were performed with 6 M urea/100 mM Tris-HCl pH 8.5, PBS and then water. For Western blotting analysis, biotinylated proteins were eluted by boiling (30 min, 95°C) in a Laemmli buffer (25 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.8% SDS, 1% β-mercaptoethanol, 4% glycerol).

Invasion Assay

Boyden cell invasion assays were performed using 8 μm pore Boyden Chambers (24-well, Costar) with the upper chamber coated with 6 μL of Matrigel (BD Biosciences) dissolved in 100 μL of DMEM. For pharmacological inhibition of AXL and/or HER2, cells were pretreated with either DMSO or the indicated inhibitors for 60 min before being detached and washed with DMEM 0,1% BSA. 50,000-100,000 cells were seeded in the top chamber and cells were allowed to migrate for 6h-24h (migration) and 16h-24h (invasion) toward the bottom chamber containing 10% FBS. Cells were then washed with PBS and fixed with 4% PFA. Cells in the upper chambers were removed using cotton swabs and the membrane was mounted on a glass slide using SlowFade Gold reagent

(Invitrogen). The average number of migrating cells in 5 independent 20× microscope fields was evaluated and each experiment was performed in triplicate.

Blood Burden Assay (Circulating Tumor Cells (CTCs))

The quantification of circulating tumor cells (CTCs) was performed using blood drawn via heart puncture (0.4 to 1 ml) from an anesthetized mouse with a 25-gauge needle and a 1 mL syringe coated with and containing 100 μL of Heparin (100U/mL). Blood was plated directly in DMEM/F12 20% FBS. Two days later and every other day, media was gently changed to remove the red blood cells without disturbing the attached tumor cells. After 8 days, tumor cell colonies in the dish were counted. Tumor blood burden was calculated as the total colonies in the dish divided by the volume of blood taken as described in [249].

Extravasation Assay

The indicated cells were stained with Vybrant CFSE or BODIPY 630/650-SE as per manufacturer's instructions (Invitrogen). 750 000 cells per condition were injected in the lateral tail vein of 6-8 weeks old NOD.CB17-*Prkdc^{scid}/J*. 48h after injection, mice were processed to image the extravasation. Briefly, 1 hour before sacrifice, 100 μL of Rhodamine-Lectin (Vector Lab) was injected in the lateral tail vein to stain the blood vessels. The lungs were next perfused with 4% PFA and fixed for 2-3h. They were then put in OCT blocks and sectioned at 60 μm. Images were then acquired with a LSM710 Zeiss confocal microscope and the number of cells inside and outside of the blood vessels was quantified manually.

Experimental Metastasis, Mammary Fat pad Grafts and Bioluminescence Imaging

10⁶ cells in 200 μL of PBS were injected in the lateral tail vein of NOD.CB17-*Prkdc^{scid}/J* of 6-8 weeks of age. For fat pad grafts, 10⁶ cells in 50 μL of PBS were injected in the mammary fat pad of NOD.CB17-*Prkdc^{scid}/J* of 3 weeks of age. Bioluminescence imaging was done using a Xenogen IVIS 200 (PerkinElmer) with the Living Image 4.2 software. 150mg/kg of Beetle Luciferin (Promega) solution (stock of 15mg/mL in PBS) was injected intraperitoneally 10 minutes before imaging. To measure lung metastasis or tumor growth, photon flux was calculated for each mouse by using a circular region of interest.

Time-Lapse Microscopy

For cell migration tracking, the indicated cells were plated in 12 well plates 24h prior imaging. To generate time-lapse movies, pictures were taken every 5 minutes for 6h at 10X using a DM IRE2 microscope (Leica) equipped with an automated stage and controlled environment (37°C, 5% CO₂, humidity; PECON). The images were acquired using an Orca-ER Model C-4742 digital camera (Hamamatsu) and the nuclei were tracked using NucBlue reagent (Life technologies). Migration speed was quantified using Volocity software (PerkinElmer Life and Analytical Sciences).

RNA Sequencing

Total RNA was extracted from tumors of the indicated genotypes from fad pad orthotropic grafts in FVB mice or from tumors of transgenic MMTV-Neu⁺. GEO reference Series: GSE102370. AXL KO tumor grafts : GSE102369, AXL KO tumors : GSE102368. Total RNA from tumors was prepared with TRIZOL reagent (Invitrogen) according to recommended procedures and purified using RNeasy columns (QIAGEN). Expression libraries were generated using cBot clusters, and deep sequencing was performed using Illumina TruSeq RNA Sample Preparation Kit, Illumina TruSeq SR Cluster Kit v2, and Illumina TruSeq SBS Kit v2 (50 cycles) according to the manufacturer's procedures. Sequencing was performed at the Génome Québec Innovation Centre (McGill University) by using the Illumina HiSeq 2000 platform. Reads were aligned to the GRCh38 genome with TopHat v2.0.10, and the raw alignment counts were calculated with HTSeq v0.5.3. The differential expression measurements were performed with DESeq2 v1.4.5. Gene ontology analysis was conducted using Gene Ontology Consortium [250] and the NIH web-based tool DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) [251]. The generation of the AXL KO signature was performed using GSEA v2.1.0 (Gene Set Enrichment Analysis) [197, 252]. Principal component analyses of the gene expression data confirmed that the triplicates of the AXL WT and KO samples respectively cluster together, whereas between genotypes, the samples were well separated from one another.

Patient-Derived-Xenografts (PDX)

All human participants provided informed consent for this study and tissue was collected at McGill University Health Center in accordance with the protocols approved by the research ethics board (SUR-99-780). All animal studies linked to this protocol were approved by the McGill University

Animal Care Committee (2014-7514). The Biobank protocol (05-006) and the protocol to generate PDX from biobank tissues (14-168) were both approved by Jewish General Hospital ethics committee.

Primary cultures were generated from Patient-Derived Xenografts (PDX) HER2⁺ GCRC1991T like in [253]. Briefly, a freshly resected HER2⁺ breast tumor brain metastasis was cut into 1-8 mm³ fragments and transplanted into the fourth mammary fat pad of a female NOG mice (Taconic). Tumors were harvested when the largest diameter reached 10 mm, dissociated with 1 mg/ml collagenase IV (Sigma) for one hour at 37°C followed by 0.25% trypsin (Gibco). Primary cultures were established in conditional reprogramming conditions, as previously described (Liu et al., 2012) and then transitioned to 75% Ham's F12/25% DMEM 5% FBS supplemented with hydrocortisone (0.4 µg/mL), insulin (5 µg/mL), cholera toxin (8.4 ng/mL), EGF (10 ng/mL) and adenine (24 µg/mL).

Tumorsphere Formation Assay

PDX cells were plated into low adherence plates in DMEM/F12 media supplemented with 0.4% FBS, EGF (20ng/mL), FGF (10 ng/mL), Insulin (5 µg/mL) and B27 supplements (Invitrogen 17504-044) as described in (Lo et al., 2012). R428 (1µM) and Lapatinib (0.5 µM) were added at that time. One week later, the quantification of tumorspheres formed was conducted using a DM IRE2 microscope (Leica).

In vivo Treatments

R428 (ApexBio) was reconstituted in DMSO at a stock concentration of 12.5 mg/mL and 12.5 mg/kg was administrated to mice orally in corn oil once a day as described in [254]. Doxycycline (Sigma) was administered to mice in the drinking water at a dose of 2 mg/mL in 5% sucrose, as done in [5].

Statistics

Data is presented as mean ± SEM from at least 3 independent experiments. Statistical analyses were performed with the GraphPad Prism Software using the Student's t test (comparison of two independent groups) or Chi-square. P values <0.05 were considered as significant (*p<0.05, **p<0.001, ***p<0.0001).

Acknowledgments

We thank Drs. Frédéric Charron, Mathieu Ferron and Mélanie Laurin for critical reading of the manuscript. We thank Drs. Tatiana Smirnova and Jeffrey E Segall (Albert Einstein College, USA) for their generous advice to measure circulating tumor cells. We thank Manon Laprise, Marie-Claude Lavallée and Suzie Riverin for their technical assistance with mice, Dominic Filion for microscopy assistance and Simone Terouz for histology. This work was supported by operating grants from the Canadian Institute of Health Research (MOP-142425 to J.F.C. and J.P.G and MOP-142374 to P.P.R.) and the Réseau de Recherche en Cancer of the FRQS (FRQ-34787) and Quebec Breast Cancer Foundation to M.P. M.A.G. is a recipient of a CIHR Doctoral studentship. L.A. is a recipient of a Cole Foundation Postdoctoral Fellowship. M.P. holds the Diane and Sal Guerrero Chair in Cancer Genomics at McGill University. J.F.C. holds the Transat Chair in Breast Cancer Research. P.P.R. and J.F.C are supported by FRQS Senior investigator career awards.

Declaration of interest

The authors declare no competing interests.

Accession numbers

GEO reference Series for RNA-seq. Mouse tumors: GSE102370. Human breast cancer cohort: GSE58644. Mendeley DOI : 10.17632/xjwbwrb35k.1

Supplementary information

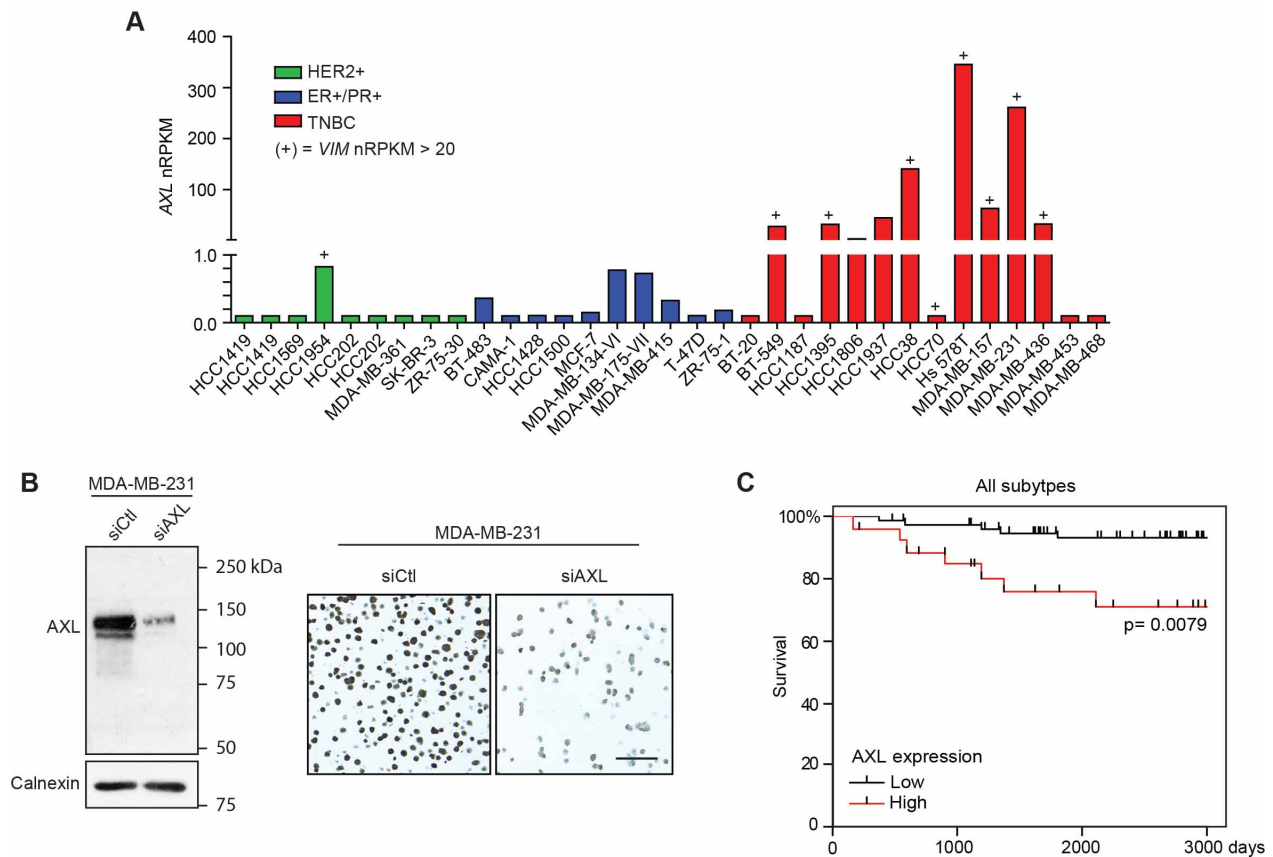


Figure 3. S1: Related to Figure 3.1. AXL expression in human samples correlates with survival.

(A) RNA-seq analysis for AXL and VIM expression from (Wilson et al., 2014) shows that AXL is mostly expressed in the Vimentin (VIM) positive subtype of TNBC.

(B) AXL antibody was validated using paraffin embedded cell extract and cell pellet of AXL expressing MDA-MB-231 siCtl and siAXL (scale bar : 100 μ m).

(C) AXL protein expression correlates with poor prognosis in all breast cancer subtypes in TMAs stained for AXL (High, (n=74), Low (n=20)).

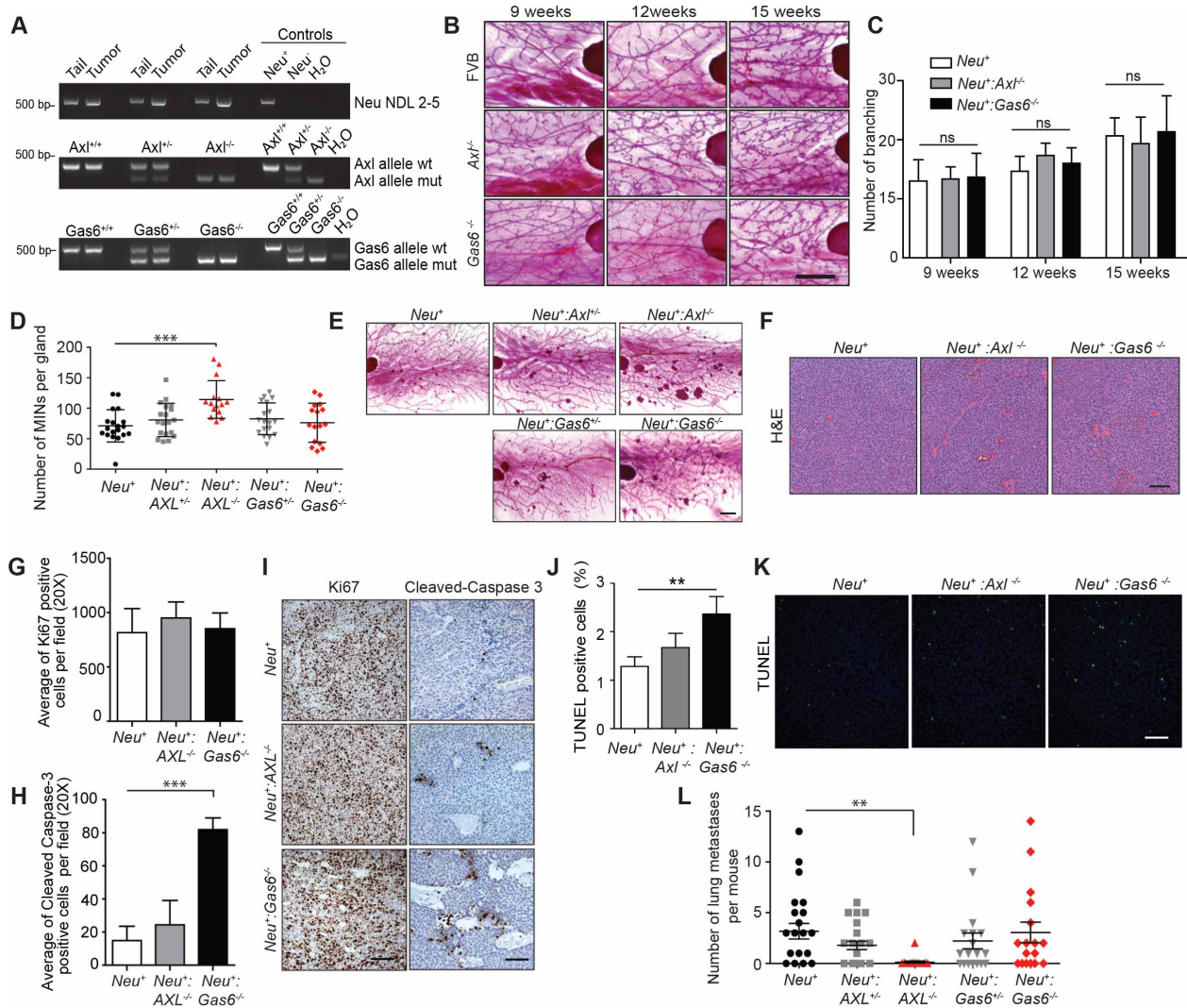


Figure 3. S2: Related to Figure 3.1. Axl KO and Gas6 KO mice mammary gland development and tumorigenesis are similar to WT mice.

(A) PCR analyse to genotype mice with DNA from tails and tumors.

(B) Whole mount inguinal mammary gland at 9, 12 and 15 weeks of age stained with carmine red showing normal ductal trees of Axl^{-/-} and Gas6^{-/-} mice (scale bar : 1 mm).

(C) Quantification of ductal branching (Data are represented as mean ± SEM, n=3 for each genotype).

(D-E) 5 weeks after tumor onset, Neu⁺:Axl^{-/-} mice develop more Mammary Intraepithelial Neoplastic lesions (MINs) and Neu⁺:Gas6^{-/-} mice present no difference (data are represented as mean ± SEM, n=17-19, ***p=0.0001). Representative images of carmine red staining of inguinal mammary gland 5 week (scale bar: 1 mm).

(F) H&E staining showing that all mice developed tumors with the same adenocarcinoma histology (20X, scale bar: 100 μm).

(G-I) Neu⁺:Axl^{-/-} mice have an identical proliferation (Ki67) and apoptotic (Cleaved-Caspase 3) index in comparison to control animals (scale bar: 50 μm). Neu⁺:Gas6^{-/-} tumors present a significant increase in apoptosis (40X, scale bar: 50 μm, n=3-6, ***p<0.0001).

(J-K) TUNEL apoptosis assay on tumor sections shows an increase of apoptosis in Neu⁺:Gas6^{-/-} tumors. (20X, scale bar: 100 μm, **p=0.0099).

(L) Neu⁺:Axl^{-/-} mice develop fewer lung metastasis (**p=0.0016).

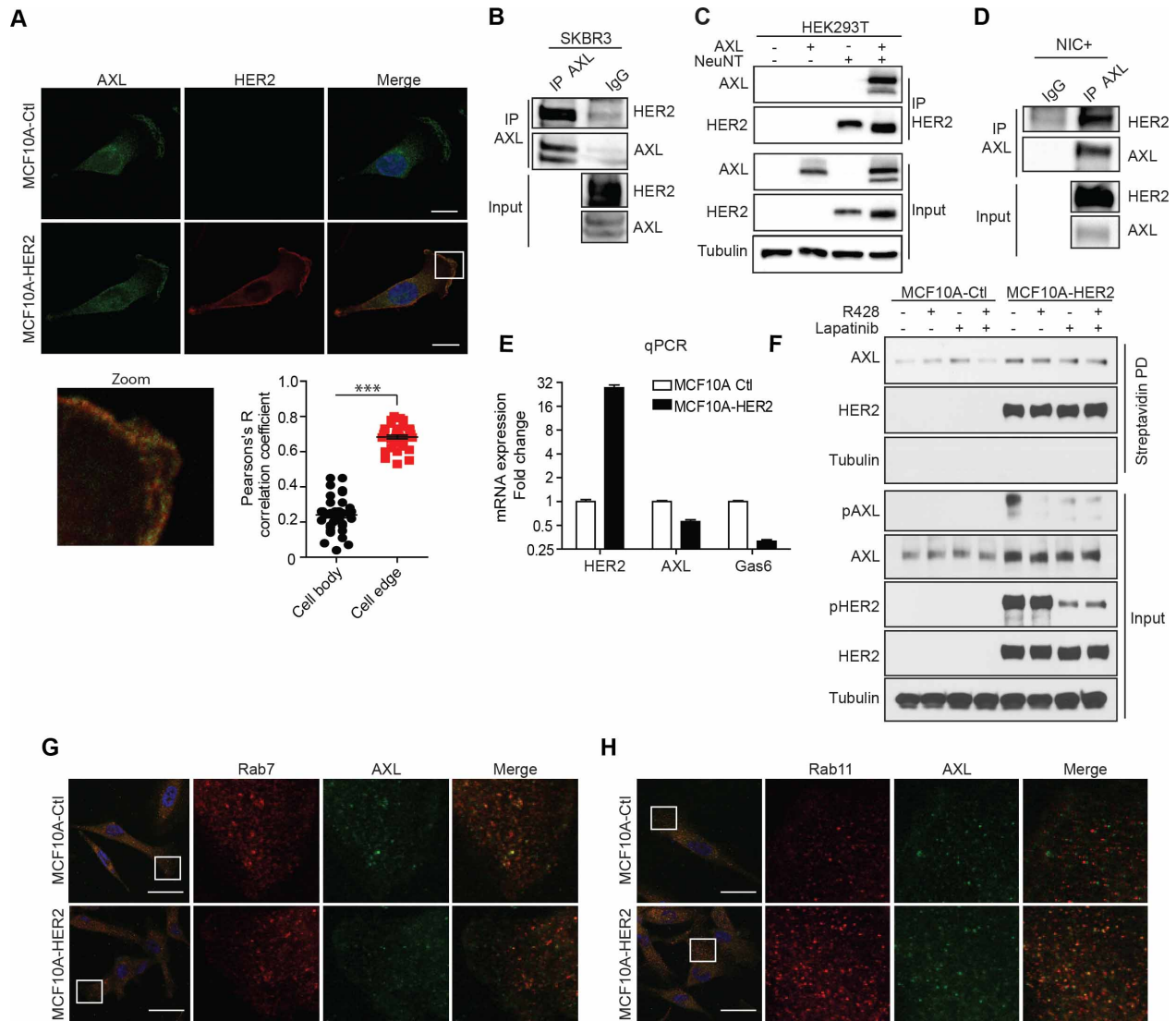


Figure 3. S3: Related to Figure 3.2. HER2 interacts with AXL.

(A) AXL and HER2 co-localize at the edge of the cells in MCF10A HER2 (scale bar: 20 μ m, *** p <0.0001).

(B) Endogenous HER2 and AXL co-immunoprecipitate in HER2+ cell line SKBR3 cells.

(C-D) AXL co-immunoprecipitates

with NeuNT overexpressed in HEK293T or endogenously with NeuNDL2-5 in NIC cells.

(E) qPCR results of MCF10A-Ctl and -HER2 present the increase of HER2 and the decrease of AXL and GAS6 expression in HER2 expressing cells.

(F) In a surface biotinylation assay, inhibition of tyrosine kinase activities of AXL and HER2 respectively with R428 and Lapatinib does not affect the recruitment of AXL at the plasma membrane in the presence of HER2 in MCF10A.

(G-H) IF against AXL and Rab7 or Rab11 in MCF10A-Ctl or -HER2 (scale bar : 50 μ m).

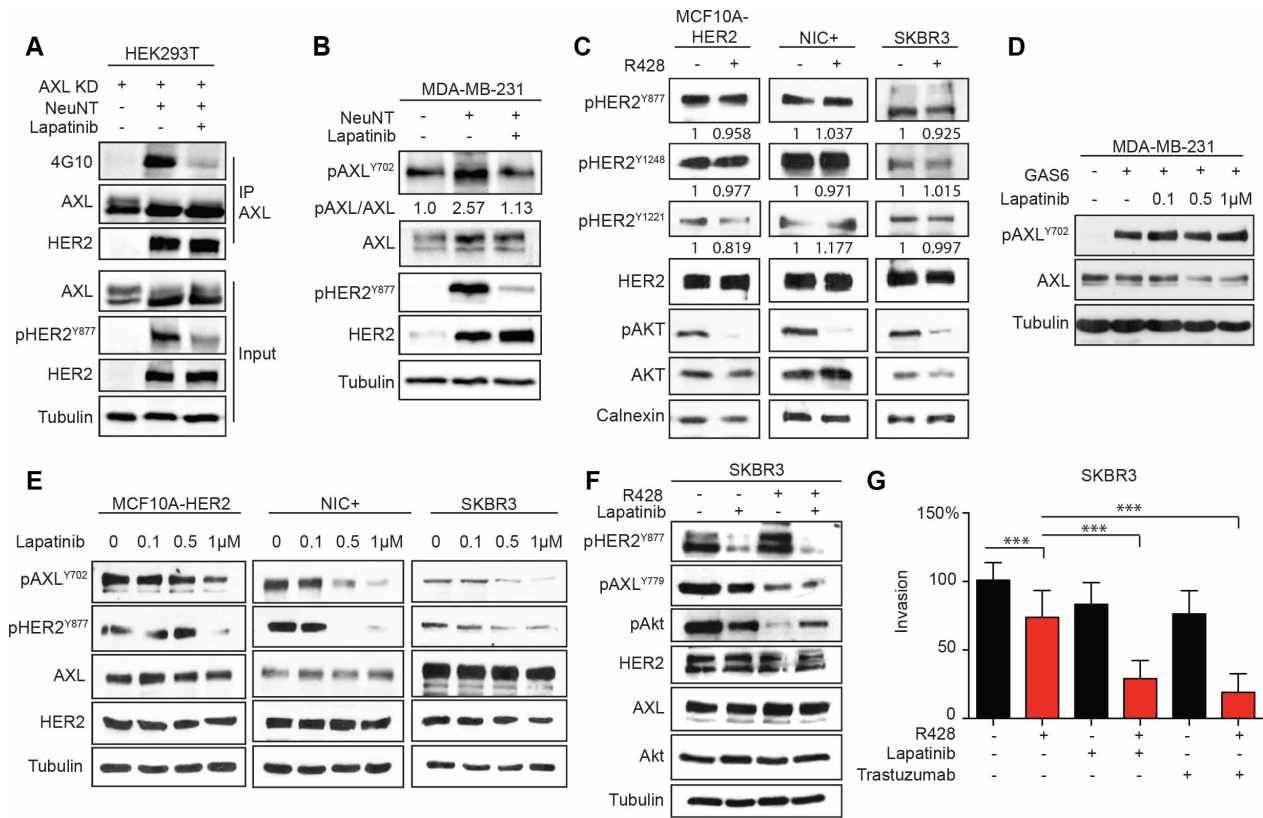


Figure 3. S4: Related to Figure 3.3. AXL and HER2 crosstalk to increase cell invasion.

(A) NeuNT promotes the phosphorylation of AXL kinase dead in overexpression and this is blocked by the inhibition of HER2 by Lapatinib.

(B) Expression of NeuNT in MDA-MB-231 cells promotes transactivation of endogenous AXL and this is blocked by Lapatinib (*p=0.049).

(C) HER2+ breast cancer cells treated with R428 (1μM) present no significant difference in the phosphorylation of HER2 at different phosphosites (n=3).

(D) Lapatinib (1μM) doesn't affect Gas6-induced phosphorylation of AXL in serum starved MDA-MB-231.

(E) Lapatinib decreases the phosphorylation of AXL in different HER2+ breast cancer cell lines.

(F-G) R428 and Lapatinib cooperates to reduce invasion of SKBR3 cells (Data are represented as mean ± SEM,

p=0.0075, *p< 0.0001).

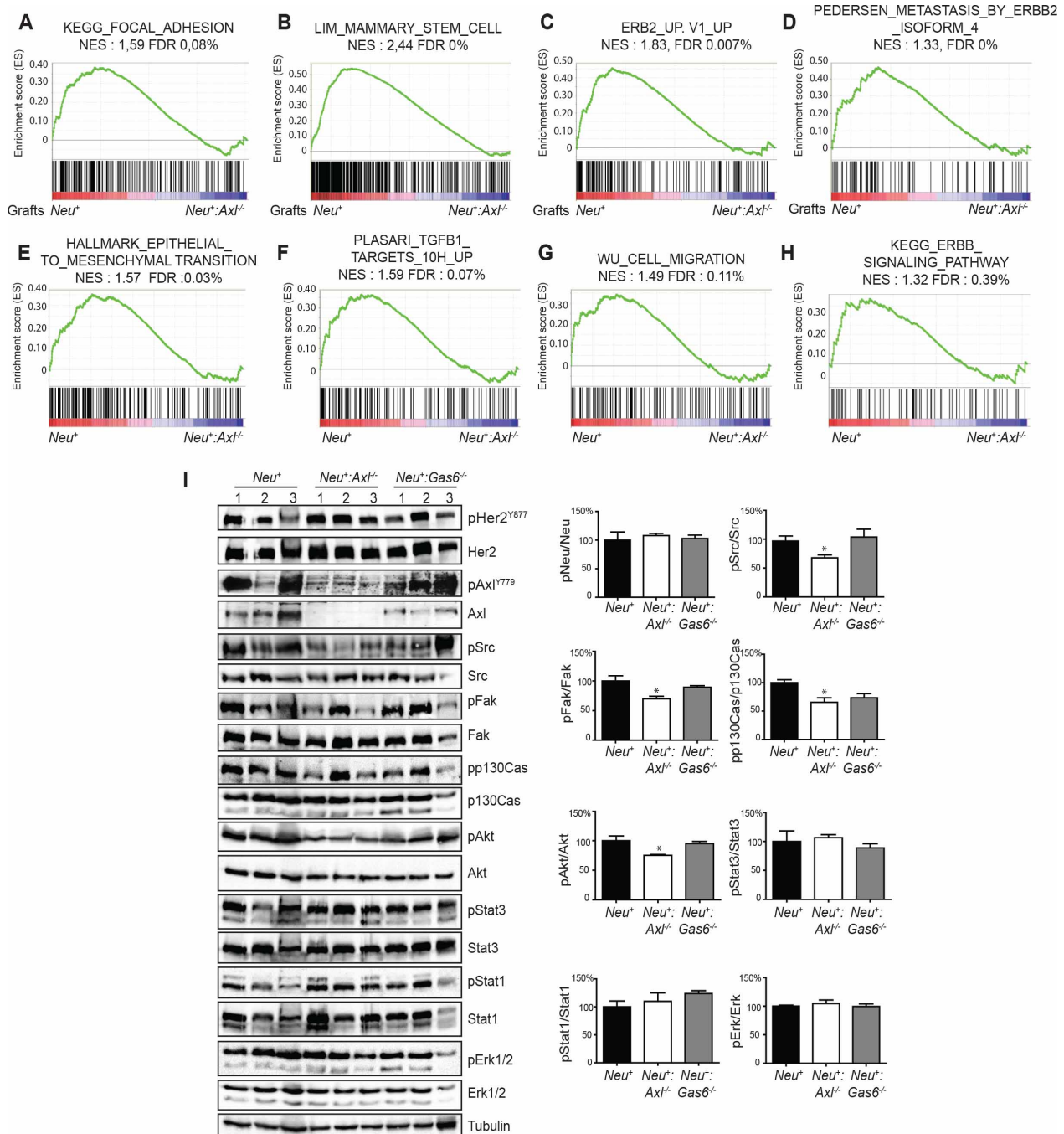


Figure 3. S5: Related to Figure 3.5. Gene expression analysis reveal a role for AXL in focal adhesion, stemness and HER2 signaling.

(A-B) GSEA plots representing Focal adhesion and Stemness reduced in Axl^{-/-} tumor grafts.

(C-D) GSEA plots showing that Axl^{-/-} tumor grafts have reduced HER2 signaling leading to metastasis.

(E-H) Tumors from Neu⁺:Axl^{-/-} transgenic mice also present reduced gene expression linked to EMT, TGF- β signaling, Cell migration and ERBB signaling. See also Table S1 and S2.

(I) Total tumor lysates from each genotype were immunoblotted with the indicated antibodies (quantification of normalized intensity, *p=0.0455, *p=0.0358, *p=0.0220 and *p=0.0388).

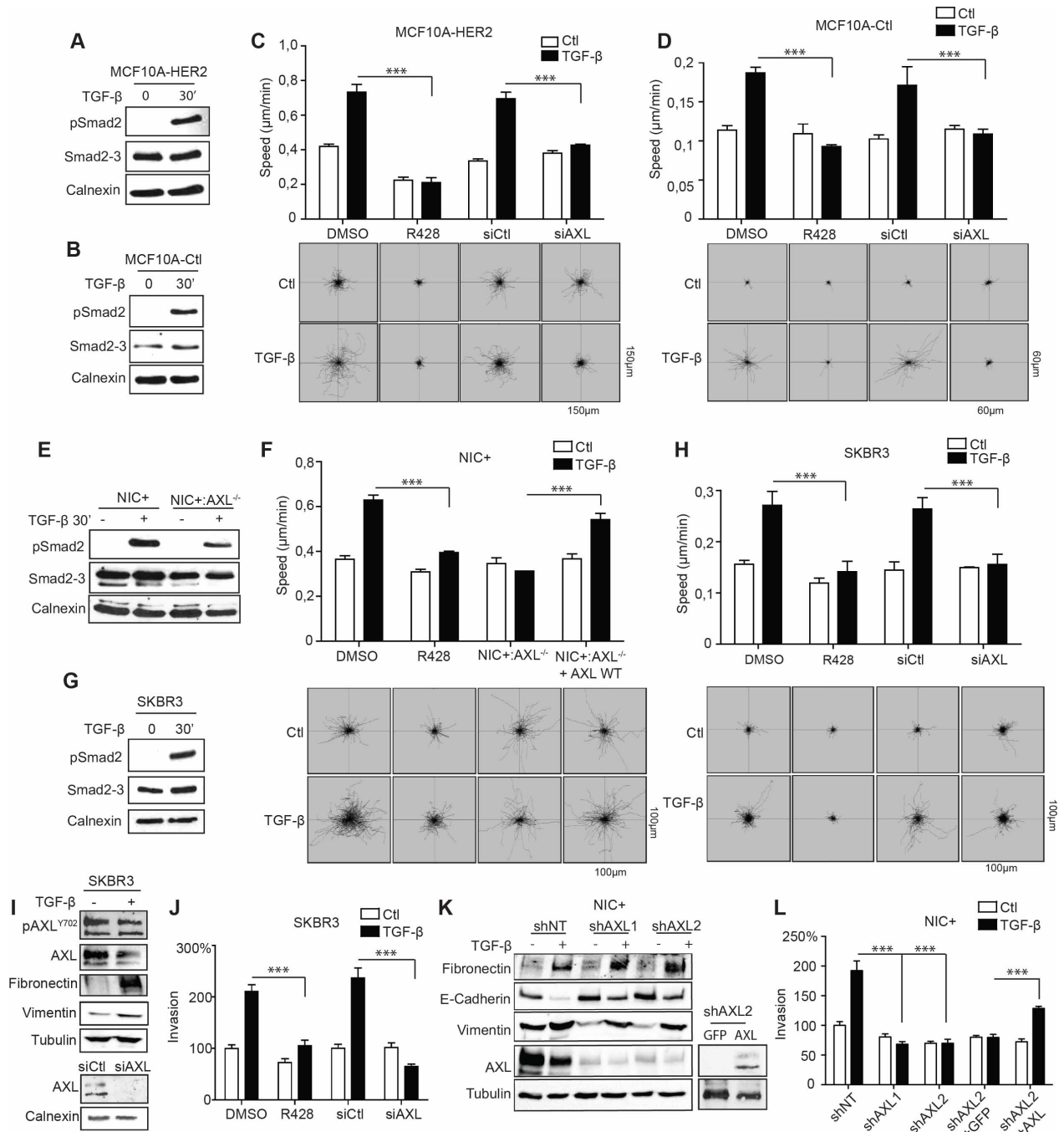


Figure 3. S6: Related to Figure 3.5. AXL is essential for TGF- β -induced cell migration.

(A-L) MCF10A-HER2, MCF10A-Ctl, NIC and SKBR3 cells respond to TGF- β and live cell imaging shows that AXL knockdown or inhibition abrogates TGF- β -induced cell migration (Data are represented as mean \pm SEM, *** p <0.0001

(K-L) AXL knockdown by shRNA blocks TGF- β -induced cell invasion in NIC+ cells and this can be rescued via a shRNA insensitive Axl cDNA.

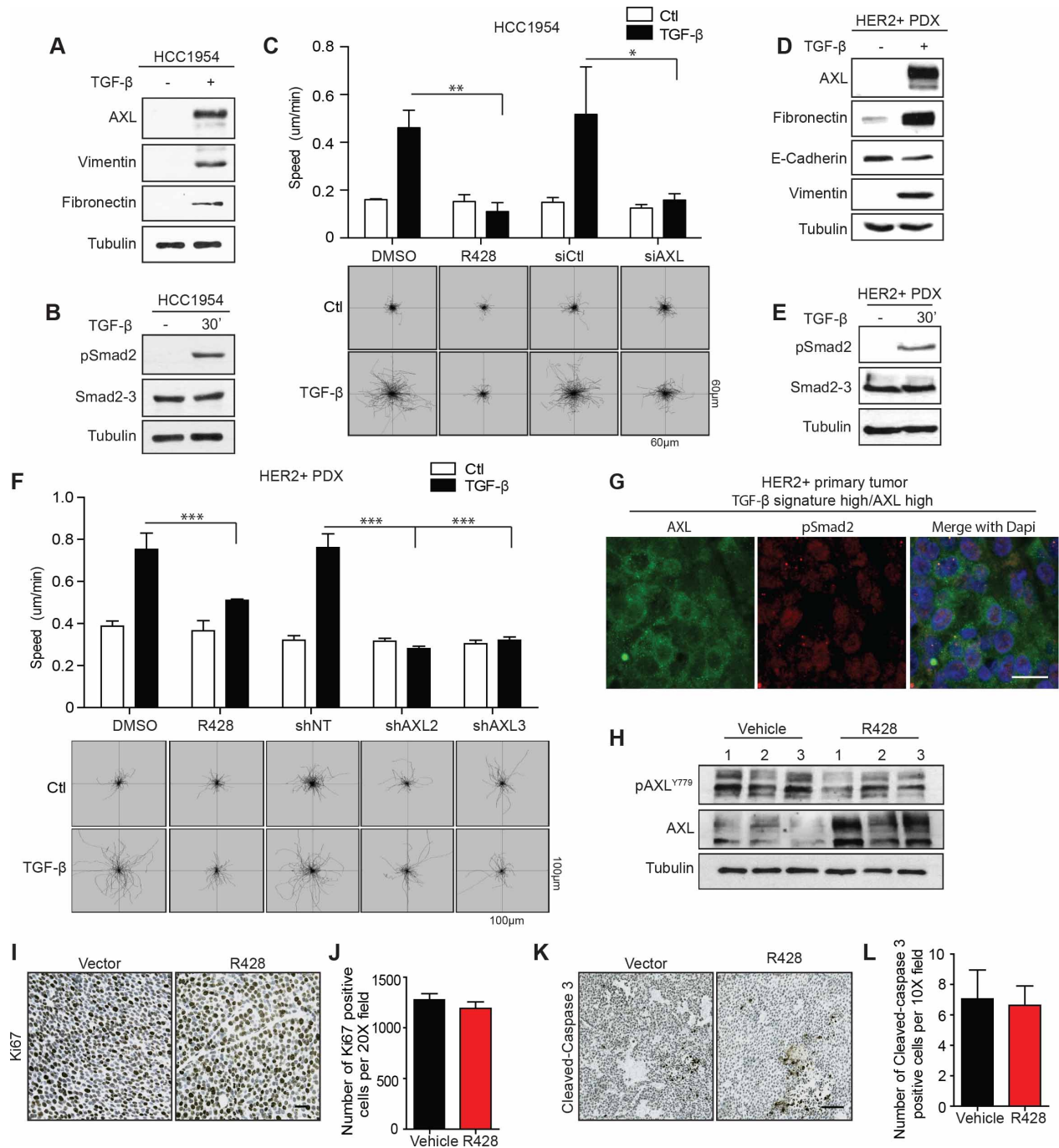


Figure 3.S7: Related to Figure 3.6 and 3.7. AXL is required for TGF- β -induced cell migration of HER2+ PDX cell line.

(A-B) HCC1954 responds to TGF- β and induce AXL expression.

(C) Blocking AXL activity or expression abrogates TGF- β -induced cell migration of HCC1954. (D-E) HER2+ PDX cells respond to TGF- β by inducing the expression of AXL and EMT markers.

(F) AXL inhibition decreases TGF- β -induced cell migration.

(G) Staining of human samples classified as TGF- β signature High/AXL high (from Figure 3.6K) shows that pSmad is present in the nuclei of AXL positive cancer cells (n=3 tumors, scale bar : 25 μ m).

(H) Western blot of MMTV-NIC mice tumors treated with vehicle (corn oil) or R428 in vivo.

(I-L) Tumors of R428 treated mice have similar proliferation and apoptotic indexes as control animals (scale bar: 50 μ m).

Table 3. S1. Related to Figure 5. GSEA results of gene sets downregulated in *Neu*⁺:*Axl*^{-/-} tumor grafts in FVB and *Neu*⁺:*Axl*^{-/-} tumors.

Down in <i>Neu</i> ⁺ : <i>AXL</i> KO tumor grafts				
	NAME	NES	NOM p-val	FDR q-val
TGF- β	PLASARI_TGFB1_TARGETS_1HR_UP	2.20	0.00	0.00
	PLASARI_TGFB1_TARGETS_10HR_UP	2.17	0.00	0.00
	LABBE_TARGETS_OF_TGFB1_AND_WNT3A_UP	1.99	0.00	0.00
	MCBRYAN_PUBERTAL_TGFB1_TARGETS_UP	1.87	0.00	0.01
	LABBE_TGFB1_TARGETS_UP	1.86	0.00	0.01
	TGFB_UP,V1_UP	1.84	0.00	0.00
	TGFB_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	1.83	0.00	0.06
	KEGG_TGF_BETA_SIGNALING_PATHWAY	1.67	0.01	0.05
	KARLSSON_TGFB1_TARGETS_UP	1.41	0.02	0.14
	HALLMARK_TGF_BETA_SIGNALING	1.31	0.09	0.11
EMT	HALLMARK_EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION	2.44	0	0
	ANASTASSIOU_CANCER_MESENCHYMAL_TRANSITION_SIGNATURE	2.32	0.00	0.00
	GOTZMANN_EPITHELIAL_TO_MESENCHYMAL_TRANSITION_UP	1.88	0.00	0.01
Migration	WU_CELL_MIGRATION	2.11	0.00	0.00
	ACTIN_POLYMERIZATION_AND_OR_DEPOLYMERIZATION	1.63	0.01	0.16
	KEGG_FOCAL_ADHESION	1.58	0.00	0.09
	CELL_MIGRATION	1.53	0.01	0.25
	REGULATION_OF_CELL_MIGRATION	1.53	0.02	0.23
	ACTIN_FILAMENT_BASED_PROCESS	1.40	0.01	0.32
	ACTIN_CYTOSKELETON_ORGANIZATION_AND_BIOGENESIS	1.32	0.04	0.35
Stem cell	LIM_MAMMARY_STEM_CELL_UP	2.44	0.00	0.00
	BOQUEST_STEM_CELL_UP	2.18	0.00	0.00
	PECE_MAMMARY_STEM_CELL_UP	1.88	0.00	0.01

Metastasis	SCHUETZ_BREAST_CANCER_DUCTAL_INVASIVE_UP	1.96	0.00	0.00
	ALONSO_METASTASIS_UP	1.78	0.00	0.02
	PEDERSEN_METASTASIS_BY_ERBB2_ISOFORM_4	1.69	0.00	0.03
	JAEGER_METASTASIS_UP	1.70	0.01	0.03
	PEDERSEN_METASTASIS_BY_ERBB2_ISOFORM_1	1.53	0.02	0.08
	TAVAZOIE_METASTASIS	1.48	0.03	0.11
	NAKAMURA_METASTASIS_MODEL_UP	1.47	0.04	0.11
Down in <i>Neu</i>⁺:<i>AXL</i> KO tumors				
TGF- β	PLASARI_TGFB1_TARGETS_1HR_UP	1.86	0.00	0.01
	TGFB_UP,V1_UP	1.69	0.00	0.03
	LABBE_TGFB1_TARGETS_UP	1.60	0.01	0.05
	PLASARI_TGFB1_TARGETS_10HR_UP	1.48	0.01	0.10
	KEGG_TGF_BETA_SIGNALING_PATHWAY	1.44	0.03	0.30
	HALLMARK_TGF_BETA_SIGNALING	1.42	0.04	0.07
	LABBE_TARGETS_OF_TGFB1_AND_WNT3A_UP	1.34	0.05	0.19
EMT	GOTZMANN_EPITHELIAL_TO_MESENCHYMAL_TRANSITION_UP	1.61	0.00	0.05
	HALLMARK_EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION	1.57	0.00	0.03
	ANASTASSIOU_CANCER_MESENCHYMAL_TRANSITION_SIGNATURE	1.38	0.07	0.16
Migration	WU_CELL_MIGRATION	1.57	0.00	0.06
	KEGG_REGULATION_OF_ACTIN_CYTOSKELETON	1.19	0.11	0.48
	GO_ACTIN_FILAMENT_BASED_PROCESS	1.19	0.06	0.48
	KEGG_FOCAL_ADHESION	1.17	0.16	0.49
Stem cell	LIM_MAMMARY_STEM_CELL_UP	1.56	0.00	0.07
	PECE_MAMMARY_STEM_CELL_UP	1.50	0.01	0.09
Metastasis	TOMIDA_METASTASIS_UP	1.57	0.02	0.06
	JAEGER_METASTASIS_UP	1.40	0.07	0.15
	ALONSO_METASTASIS_UP	1.29	0.05	0.23

Table 3. S2. Related to Figure 1 and 6. Sequences of shRNA against AXL and genotyping primers.

shAXL sequences	
shAXL 1	CCGGGCGGTCTGCATGAAGGAATTTCTCGAGAAATTCCTTCATGC AGACCGCTTTTT
shAXL 2	CCGGCGAAATCCTCTATGTCAACATCTCGAGATGTTGACATAGAG GATTCGTTTTT
shAXL 3	CCGGGCGGTCTGCATGAAGGAATTTCTCGAGAAATTCCTTCATGC AGACCGCTTTTT
Genotyping primers	
Neu Forward	TTC CGG AAC CCA CAT CAG GCC
Neu Reverse	GTT TCC TGC AGC AGC CTA CGC
AXL KO Forward	AGA AGG GGT TAG ATG AGG
AXL KO MUT Reverse	TTT GCC AAG TTC TAA TTC CAT C
AXL KO WT Reverse	GCC GAG GTA TAG TCT GTC ACA G
Gas6 Forward	GAGTGCCGTGATTCTGGTC
Gas6 MUT Reverse	CCACTAAGGAAACAATAACTG
Gas6 WT Reverse	ATCTCTCGTGGGATCATT

Supplementary movies

Movie S1. Related to Figure 7. Live cell imaging of random cell migration of *NIC*⁺ with (top left) and without TGF- β (top right) and *NIC*+*Axl*^{-/-} cells with (bottom left) and without TGF- β (bottom right).

Movie S2. Related to Figure 7. Live cell imaging of random cell migration of HER2⁺ PDX cells shControl with (top left) and without TGF- β (top right) and shAXL with (bottom left) and without TGF- β (bottom right).

* Movies are available on the journal web site (Cell Reports)

Chapitre 4 - Targeting Axl favors an anti-tumorigenic microenvironment that enhances immunotherapy responses by decreasing Hif-1 α levels

Dans le chapitre précédent, les efforts ont été concentrés sur le rôle d'AXL dans l'invasion des cellules cancéreuses HER2⁺ pour expliquer son rôle dans la formation de métastases. Par contre, le microenvironnement tumoral a aussi un grand impact dans la progression métastatique et AXL émerge comme un joueur important dans ce contexte. Ainsi, le chapitre suivant a pour but de définir l'effet de la délétion d'AXL dans les cellules cancéreuses sur la dérégulation du microenvironnement dans le contexte de cancer du sein mené par HER2. De plus, de nouvelles approches pour traiter les patients résistants aux traitements anti-HER2 sont étudiées puisqu'une grande proportion de patients ne répond pas aux traitements ciblant HER2 ou développent une résistance. Une avenue maintenant étudiée est l'immunothérapie, mais peu de bénéfices sont observés chez ces patients. Comme le microenvironnement tumoral est un facteur déterminant pour la réponse à ce type de thérapie, le chapitre suivant explore l'effet de l'inhibition d'AXL dans un modèle HER2⁺ pour générer un cadre améliorant une réponse à l'immunothérapie. Cette étude propose donc une nouvelle approche thérapeutique impliquant la combinaison de l'immunothérapie et d'un agent ciblant AXL pour améliorer l'efficacité des traitements actuels.

Contributions

Figure 1-6 : Marie-Anne Goyette

Figure 6 E : Marie-Anne Goyette et Chloé Apcher

Figure 7 A-C : Marie-Anne Goyette et Hellen Kuasne

Figure 7 D-L : Marie-Anne Goyette

Figure S1-S7 : Marie-Anne Goyette

Figure S8 : Marie-Anne Goyette et Hellen Kuasne

Conceptualisation, M.-A.G., M.P., J.-P.G., and J.-F.C.; Méthodologie, M.-A.G. and J.-F.C.; Recherche et analyse, M.-A.G., I.E.E., C.A. and H.K.; Ressources, D.E.R., C.V.R., W.J.M., and J.-F.C.; Écriture – Brouillon original, M.-A.G. and J.-F.C.; Écriture – Revision & édition, M.-A.G., I.E.E., H.K., C.A., D.E.R., J.-P.G., and J.-F.C.; Visualisation: M.-A.G.; Supervision, J.-F.C.; Acquisition de financement, J.-P.G. and J.-F.C.

Targeting Axl favors an anti-tumorigenic microenvironment that enhances immunotherapy responses by decreasing Hif-1 α levels

Marie-Anne Goyette^{1,2}, Islam E. Elkholi^{1,2}, Chloé Apcher^{1,2}, Hellen Kuasne³, Carla V. Rothlin⁴, William J. Muller³, Darren E. Richard⁵, Morag Park³, Jean-Philippe Gratton⁶ and Jean-François Côté^{1,2,7,8,*}

¹ Montreal Clinical Research Institute (IRCM), Montréal, QC, H2W 1R7, Canada.

² Molecular Biology Programs, Université de Montréal, Montréal, QC, H3T 1J4, Canada.

³ Rosalind and Morris Goodman Cancer Research Centre, McGill University, Montréal, QC H3A 1A1, Canada

⁴ Department of Immunobiology and Pharmacology, School of Medicine, Yale University, New Haven, CT 06520, United States

⁵ Department of Molecular Biology, Medical Biochemistry and Pathology, Université Laval, Québec City, QC, G1R 3S3, Canada.

⁶ Department of Pharmacology and Physiology, Université de Montréal, Montréal, QC, H3C 3J7, Canada.

⁷ Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, H3C 3J7, Canada.

⁸ Department of Anatomy and Cell Biology, McGill University, Montréal, QC, H3A 0C7, Canada.

*Jean-François Côté

IRCM, 110 avenue des Pins Ouest, Montréal (QC) Canada, H2W 1R7

Email: jean-francois.cote@ircm.qc.ca

Keywords: AXL, HER2, hypoxia, tumor microenvironment, immunotherapy

** Manuscrit publié dans PNAS (2021)

Abstract

Hypoxia is an important phenomenon in solid tumors that contributes to metastasis, tumor microenvironment (TME) deregulation, and resistance to therapies. The receptor tyrosine kinase AXL is a HIF target, but its roles during hypoxic stress leading to the TME deregulation are not well defined. We report here that the mammary gland-specific deletion of Axl in a HER2⁺ mouse model of breast cancer leads to a normalization of the blood vessels, a pro-inflammatory TME, and a reduction of lung metastases by dampening the hypoxic response in tumor cells. During hypoxia, interfering with AXL reduces HIF-1 α levels altering the hypoxic response leading to a reduction of hypoxia-induced EMT, invasion, and production of key cytokines for macrophages behaviors. These observations suggest that inhibition of Axl generates a suitable setting to increase immunotherapy. Accordingly, combining pharmacological inhibition of Axl with anti-PD-1 in a preclinical model of HER2⁺ breast cancer reduces the primary tumor and metastatic burdens, suggesting an interesting therapeutic approach to manage HER2⁺ patients whose tumors present high hypoxic features.

Significance Statement

A significant pool of HER2⁺ breast cancer patients are either unresponsive or become resistant to standard of care. New therapeutic approaches exploiting the tumor microenvironment, including immunotherapies, are attractive. Hypoxia shapes the tumor microenvironment toward therapy resistance and metastasis. Here, we report a novel role for AXL receptor tyrosine kinase in the hypoxic response by promoting HIF-1 α expression. Interfering with Axl in a preclinical model of HER2⁺ breast cancer normalizes the blood vessels and promotes a pro-inflammatory microenvironment that enhances immunotherapy response to reduce the primary and metastatic tumor burdens. Clinical trials so far suggest that achieving immunotherapy responses in HER2⁺ cancers might be challenging, and our data might provide an important insight to circumvent a roadblock.

Introduction

Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) is overexpressed in about 20% of breast cancers, representing the HER2-positive (HER2⁺) subtype that is associated with metastasis and poor prognosis [7, 185]. While clinical success is partially achieved with the HER2-targeted therapies as a standard of care (e.g. Trastuzumab (Herceptin)), a significant pool of patients are either unresponsive or develop resistance to treatments. The development of new therapeutic approaches exploiting the tumor microenvironment, like immunotherapy, is an attractive modality [40, 151]. Indeed, combining immunotherapy and HER2-targeted agents is an emerging idea. Recently, clinical trials combined immune checkpoint blockade (Pembrolizumab (anti-PD-1)) with Trastuzumab, but so far, it shows modest benefits [42]. Indeed, there seems to have considerable roadblocks to hamper exploiting immunotherapies to treat HER2⁺-resistant breast cancer patients. Thus, there is a need to better understand the immune environment of HER2 tumors to develop more effective therapeutic strategies [40]. The tumor microenvironment (TME), and its associated stromal cells, significantly influence therapy responses and affect the metastatic progression that causes the majority of cancer-related deaths [3, 102]. Hypoxia is an integral component of the TME and is associated with a poor prognosis and increased risks of metastasis in various types of cancers, including breast cancer [106, 107]. The adaptive response to hypoxia involves the upregulation of a plethora of genes that are under the control of Hypoxia-inducible Factors (HIFs), and collectively, they contribute to angiogenesis, metabolic reprogramming, epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), invasion, and immune evasion [114]. In solid tumors, low oxygen (O₂) availability promotes cancer cell invasion, pro-tumoral immune responses, and abnormal angiogenesis [106, 113, 118]. In particular, the tumors' abnormal blood vessels are characterized by poor pericyte coverage and a noncontinuous basement membrane [119]. This leads to dysfunctionalities such as poor perfusion and leakiness that accentuate hypoxia, facilitate tumor cell dissemination, and change the immune infiltration profiles [118, 124]. Therefore, improving tumor blood vessel functionality, termed vessel normalization, has been suggested as a therapeutic goal [255]. Consequently, targeting the TME appears as an interesting avenue to overcome resistance to cancer therapies including chemotherapy, radiotherapy, and immunotherapy [104, 256, 257].

AXL is a member of the TAM family of receptor tyrosine kinases that is composed of TYRO3, AXL, and MERTK. AXL is broadly expressed in various cancers, where it correlates with poor

survival and increased risks of metastasis [178, 189, 221, 223]. More specifically, its expression in cancer cells supports the acquisition of mesenchymal features and provides advantages including cell invasion and resistance to drugs [188-190]. In HER2⁺ breast cancer cells, we previously reported a physical interaction between AXL and HER2 proteins that promoted invasion and metastasis [178]. Functionally, AXL expression correlated with the acquisition of EMT features and was linked to poor patients' outcome [178]. Additionally, *AXL* has been described as a HIF target and has been shown to act with cMET to mediate the hypoxia-induced invasion of clear cell renal cell carcinoma [175]. Nevertheless, the roles of AXL during hypoxic stress and in the TME deregulation remains poorly understood.

In this study, we aimed to directly test whether the TME of HER2⁺ tumors can be harnessed toward a novel therapeutic strategy, more specifically, whether AXL inhibition may favor an immunotherapy response. We found that genetic deletion of *Axl* in the mammary epithelial cells in a HER2⁺ breast cancer mouse models generated an anti-tumorigenic TME and reduced metastasis by altering the hypoxic response in tumor cells. Pharmacological inhibition of Axl then enhanced an anti-PD-1 immune checkpoint blockade as supported by reduced primary tumor and metastatic burdens. Collectively, these results indicate that targeting Axl in the context of immunotherapy in HER2⁺ resistant patients could be an innovative therapeutic strategy to improve the survival and quality of life of afflicted patients.

Results

Axl contributes to the deregulation of the tumor microenvironment in a model of HER2⁺ breast cancer.

Axl germline knockout (KO) mice were crossed with the HER2⁺ breast cancer model that expresses an activated form of the HER2 rat orthologue in the mammary gland under the control of mouse mammary tumor virus (MMTV; NeuNDL2-5). This *Neu*⁺ mouse model develops breast tumors that spontaneously metastasize to the lungs and we previously reported that *Neu*⁺:*Axl*^{-/-} are protected from this metastatic progression without affecting primary tumor growth [178]. Transcriptomic analyses of the *Axl*-null tumors five weeks after tumor onset suggested a dampening of “hypoxia” and “angiogenesis”, and an enhancement of “activation of immune response” by gene set enrichment analyses (Fig. 1 A-C, Table S1). We hypothesized that the *Axl*-deficient tumors exhibit an anti-tumorigenic tumor microenvironment (TME) that can contribute to the poor capacity of those tumors to metastasize.

To address this, we collected the primary tumors five weeks after the tumor onset to characterize their TME by immunostaining. *Neu*⁺:*Axl*^{-/-} tumors showed lower hypoxia levels as indicated by the decrease of the mean fluorescence intensity (MFI) of two independent hypoxia markers, pimonidazole and GLUT-1 (Fig. 1 D, Fig. S1 A). We next investigated the structural and functional changes in blood vessels and found that *Neu*⁺:*Axl*^{-/-} tumor blood vessels covered a larger area and had increased diameters when compared to control tumors (Fig. 1 E, Fig. S1 B). They were less permeable, as suggested by a reduction of extravascular fibrinogen leakiness, and were better perfused, as demonstrated by intravenous injection of labeled Lectin (Fig. 1 F-G). The vessels also presented increased coverage by α SMA⁺ pericytes and Laminin⁺ basement membrane (BM) (Fig. 1 H-I). Thus, the decrease in intratumoral hypoxia and the vessel normalization observed could contribute to the reduction of metastasis observed in *Neu*⁺:*Axl*^{-/-} mice.

Moreover, *Neu*⁺:*Axl*^{-/-} tumors showed a differential immune cells profile compared to control tumors, as assessed by a flow cytometry analysis of a panel of lymphoid and myeloid markers (Fig. 1 J). Interestingly, macrophages were less polarized toward an immune-suppressive phenotype (CD206⁺) and also presented an increase in the expression of MHC class II (I-A/I-E), consistent with a pro-inflammatory activation state in the *Neu*⁺:*Axl*^{-/-} tumors (Fig. 1 J). While CD3⁺

lymphocytes were recruited into the tumor core, as shown by staining of tumor sections, no significant increase of this infiltration in *Neu⁺:Axl^{-/-}* tumors was observed (Fig. S1 C). Nevertheless, the difference of infiltration suggested a possible enhancement of anti-tumor response with an increase of natural killer (NK) cells activation (as measured by higher CD44 expression) and a significant reduction in the number of regulatory T cells (Treg) in *Neu⁺:Axl^{-/-}* tumors (Fig. 1 J). Collectively, these results suggest that deleting Axl reduced the intratumoral hypoxia, normalized the blood vessels, and mediated a differential immune cells' representation in tumors.

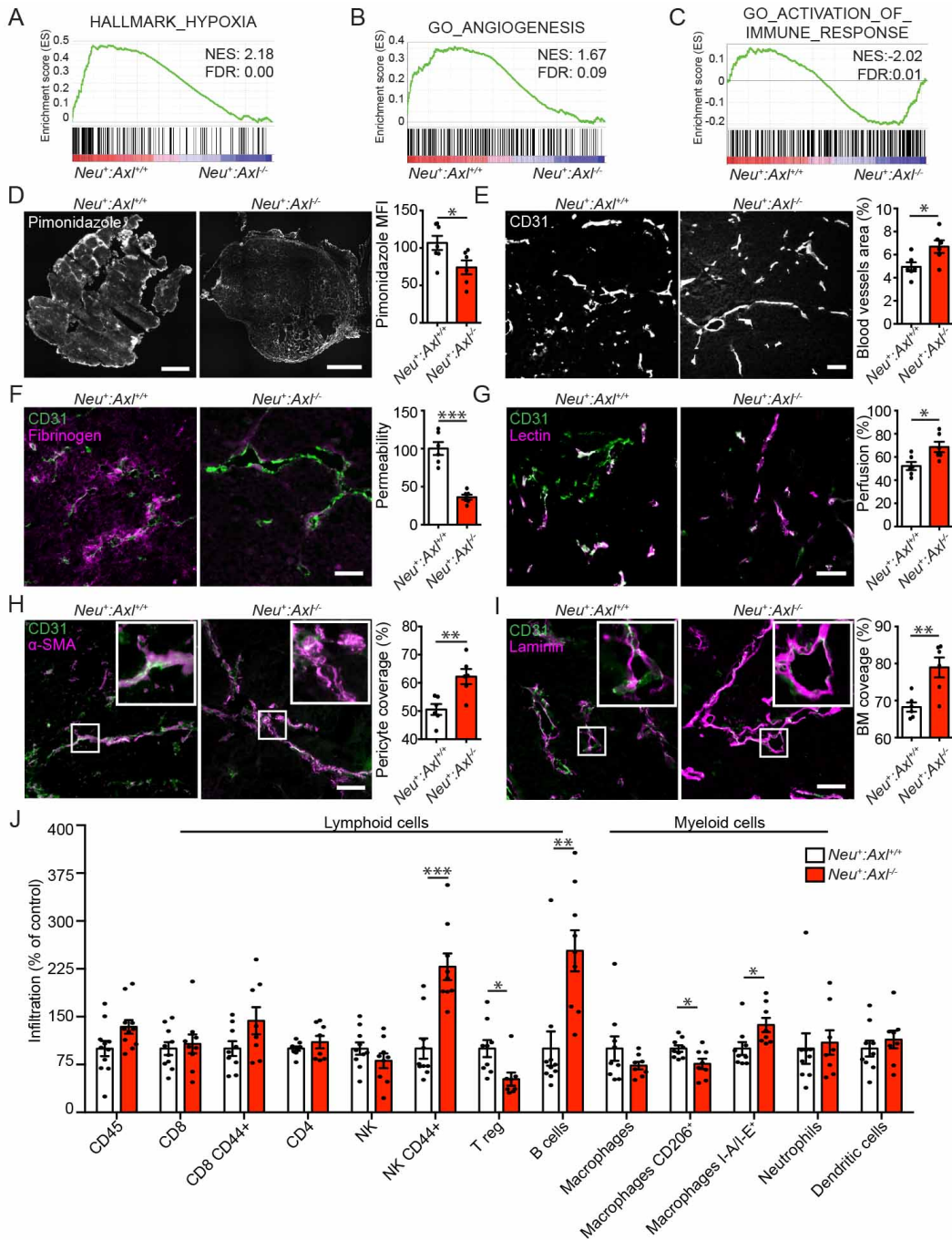


Figure 4.1. Axl contributes to the tumor microenvironment deregulation.

(A-C) Gene set enrichment analyses (GSEA) of transcriptomic data (RNA-seq) of *Neu⁺:Axl^{+/+}* and *Neu⁺:Axl^{-/-}* tumors shows upregulation of genes related to hypoxia (A) and angiogenesis (B), and a downregulation of genes related to activation of immune response (C).

(D) Pimonidazole staining reveals a reduction of hypoxia in *Neu⁺:Axl^{-/-}* tumors compared to control (n=7 tumors, mean fluorescence intensity (MFI), scale : 1 mm, p=0.0488).

(E) *Neu⁺:Axl^{-/-}* tumors present bigger blood vessels (CD31⁺) with an increased total area (n=6, *p=0.0264).

(F) Reduced blood vessels permeability is observed in *Neu⁺:Axl^{-/-}* tumors with a decrease of Fibrinogen leakage in tumor tissue (Fibrinogen/CD31 ratio) (n=6 tumors, ***p<0.0001).

(G) Intravenous injections of Rhodamine-labeled Lectin demonstrate a better perfusion of *Neu⁺:Axl^{-/-}* tumor blood vessels (Colocalization Lectin/ CD31) (n=6 tumors, *p=0.0168).

(H) Staining for CD31 and alpha Smooth Muscle Actin (α SMA) reveals a better pericyte coverage of blood vessels in $Neu^+ : Axl^{-/-}$ tumors (Colocalization α SMA/CD31) (n=6 tumors, **p=0.0055).

(I) Staining for CD31 and Laminin shows more mature vessels with better basement membrane (BM) coverage in $Neu^+ : Axl^{-/-}$ tumors (Colocalization Laminin/CD31) (n=6 tumors, **p=0.0048).

(J) $Neu^+ : Axl^{+/+}$ and $Neu^+ : Axl^{-/-}$ tumors present differences in immune cells profile as shown by FACS analyses of a panel of lymphoid and myeloid markers (n=8-12 tumors). Natural Killer cells (NK, CD3e⁻NK1.1⁺) are more activated (CD44⁺, ***p=0.0001) in $Neu^+ : Axl^{-/-}$ tumors and those tumors present a decrease in regulatory T cells (Treg, CD3e⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, *p=0.0137), an increase of B cells (CD19⁺B220⁺, **p=0.0018) and of macrophages (F4/80⁺) expressing MHCII (I-A/I-E⁺, *p=0.0253), and a decrease of macrophage expressing CD206 (*p=0.0205) in $Neu^+ : Axl^{-/-}$ tumors.

Data are presented as mean \pm SEM; scale bars in E-I represent 50 μ m.

Conditional deletion of Axl in the mammary epithelial cells generates an anti-tumorigenic microenvironment and reduces the metastatic burden.

We next asked whether the effects of *Axl* KO were driven by *Axl* deletion in the tumor cells intrinsically, or by its deletion in cells present in the microenvironment such as immune or endothelial cells. We generated primary tumor cell lines from $Neu^+ : Axl^{+/+}$ and $Neu^+ : Axl^{-/-}$ hosts and transplanted them into syngeneic wild-type FVB mice. Notably, RNA-seq of $Neu^+ : Axl^{-/-}$ tumor grafts recapitulated the gene expression signatures linked to the TME deregulation found initially in the tumors from $Neu^+ : Axl^{-/-}$ mice (Fig. S2 A-B, Table S2). $Neu^+ : Axl^{-/-}$ tumor grafts also presented less hypoxia and produced blood vessels with a decreased permeability, increased perfusion, and increased pericytes and basement membrane coverage (Fig. S2 C-I). Thus, the normalized blood vessel phenotype could be reproduced when $Neu^+ : Axl^{-/-}$ cells were grafted in a wild-type host, suggesting that this deregulation is a consequence of losing Axl in the cancer cells themselves. Furthermore, when we investigated the immune profile of $Neu^+ : Axl^{-/-}$ tumor grafts by flow cytometry, macrophages were polarized toward a pro-inflammatory activation state (CD206⁻, I-A/I-E⁺) and there was a reduction in neutrophils compared to the controls (Fig. S2 J). These myeloid cells are known to regulate the TME by producing various inflammatory cytokines and pro-angiogenic factors, suggesting that Axl expressing cancer cells could educate immune cells to contribute to the TME remodeling [131, 159]. Thus, this experiment indicated that the TME changes observed in $Neu^+ : Axl^{-/-}$ mice have been orchestrated by the cancer cells.

To confirm the cancer cell-autonomous role of Axl in the metastatic progression and the deregulation of the TME, *Axl* conditional knockout mice were crossed with MMTV-NIC mice (MMTV-NeuNDL2-5-IRES-Cre) to obtain a specific deletion in the mammary epithelial cells (Fig. S3 A). Weekly monitoring of cohorts of $NIC^+ : Axl^{wt/wt}$, $NIC^+ : Axl^{wt/fox}$, and $NIC^+ : Axl^{fox/fox}$ mice by

palpation suggested no difference in tumor initiation (Fig. 2 A). Moreover, there was no difference in the number of mammary intraepithelial neoplastic lesions (MINs) five weeks after tumor onset (Fig. S3 B). The tumor and metastatic burdens were also analyzed five weeks after the appearance of the first mass. No difference in the total tumor weight per mouse was observed and there were no important changes in the proliferative and apoptotic status in the tumors (Ki67 or TUNEL, respectively) (Fig. 2 B and Fig. S3 C-D). Importantly, the loss of Axl altered the lung metastatic frequency and burden, as we observed in total *Axl* KO mice [178], suggesting a strong cancer cell-autonomous role in the phenotype (Fig. 2 C, Fig. S3 E). Furthermore, the number of circulating tumor cells in the blood of the mice was reduced in *NIC⁺:Axl^{wt/flx}* and *NIC⁺:Axl^{flx/flx}* animals, suggesting that the cancer cells may be poorly invasive, as we have shown in [178], and/or that the TME is unfavorable for intravasation (Fig. 2 D). Thus, we decided to investigate whether the TME could also be rewired towards a tumor-suppressive phenotype in those tumors and consequently contribute to limit metastasis.

NIC⁺:Axl^{flx/flx} tumors displayed reduced hypoxia levels and the blood vessels looked functionally normalized (Fig. 2 E-I, Fig. S3 F-G). Similarly, vessels in *NIC⁺:Axl^{flx/flx}* tumors were less permeable, more perfused and they presented a better pericyte and basement membrane (BM) coverage as shown by immunostaining (Fig. 2 E-I). Furthermore, we investigated immune cell infiltration by flow cytometry to assess whether Axl deletion in the tumor cells could also generate a better immune response. Interestingly, macrophages and neutrophils were less present in *NIC⁺:Axl^{flx/flx}* tumors and again those macrophages showed a pro-inflammatory activation state with less CD206 and more I-A/I-E expression (Fig. 2 J). Moreover, *NIC⁺:Axl^{flx/flx}* tumor cells presented more CD45⁺ immune cells with an increase of cytotoxic CD8 T cells and CD4 T cells (Fig. 2 J). Globally, there was an increase in the recruitment of CD3⁺ lymphocytes in the core of *NIC⁺:Axl^{flx/flx}* tumors compared to the control (Fig. S3 H). Collectively, these data suggest that Axl expression in cancer cells contributes to deregulating the microenvironment to promote metastatic progression.

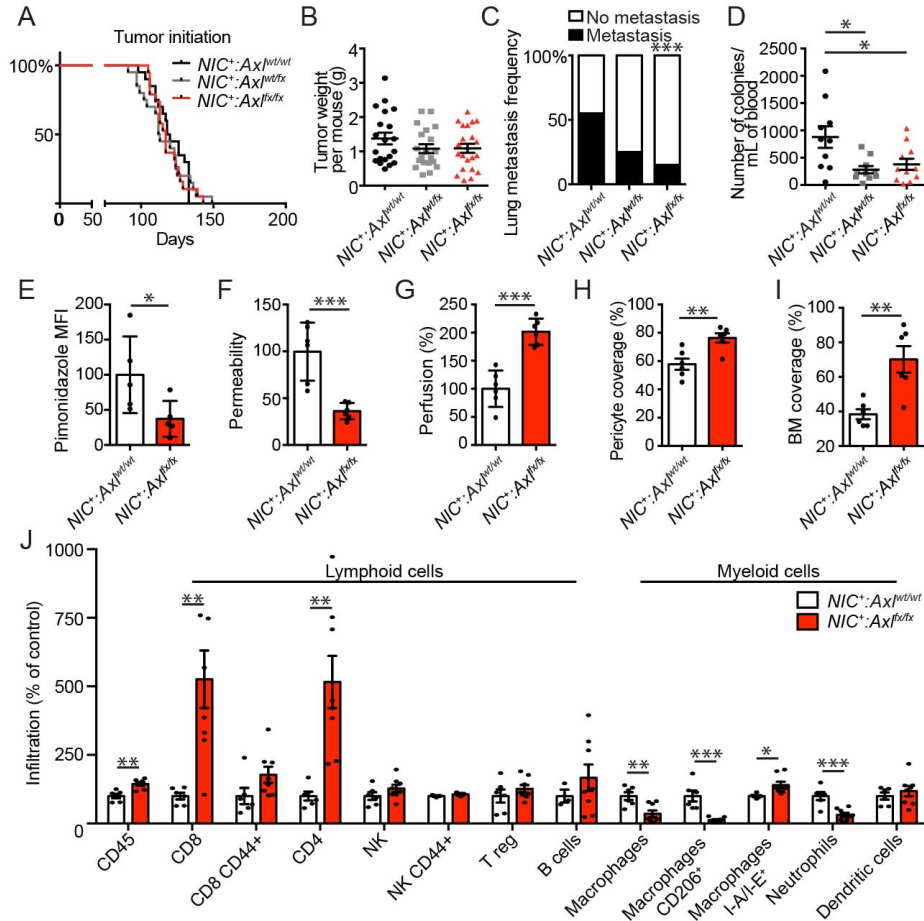


Figure 4.2. Conditional *Axl* deletion in the mammary epithelial cells generates an anti-tumorigenic microenvironment and reduces the metastatic burden.

(A-B) *NIC*⁺:*Axl*^{fx/fx} mice develop tumors at the same rate as control animals (A) and there is no difference in tumor mass (B) (n=20 mice).

(C) *Axl* deletion leads to a decrease of lung metastasis frequency (n=20 mice, ***p<0.0001).

(D) Less circulating tumor cells are present in the blood of *NIC*⁺:*Axl*^{wt/wt} and *NIC*⁺:*Axl*^{fx/fx} mice compared to controls (n=10-11 mice, *p= 0.0104 and *p= 0.0324)

(E) A reduction of hypoxia in *NIC*⁺:*Axl*^{fx/fx} tumors compared to control is seen using pimonidazole staining (n=5 tumors, *p=0.0483).

(F) Fibrinogen staining in *NIC*⁺:*Axl*^{fx/fx} tumors reveals a diminution of tumor blood vessels permeability (Fibrinogen/CD31 ratio) (n=6 tumors, ***p=0.0007).

(G) *NIC*⁺:*Axl*^{fx/fx} tumor blood vessels are more perfused by Rhodamine-labeled Lectin (Colocalization Lectin/ CD31) (n=6 tumors, ***p<0.0001).

(H) A better pericyte coverage is observed in *NIC*⁺:*Axl*^{fx/fx} tumors blood vessels via staining with anti-CD31 and anti- α SMA antibodies (Colocalization α SMA/CD31) (n=6 tumors, **p=0.0048).

(I) Staining for CD31 and Laminin reveals more mature blood vessels with better basement membrane (BM) coverage in *Neu*⁺:*Axl*^{-/-} tumors (Colocalization Laminin/CD31) (n=6 tumors, ***p=0.0031).

(J) *NIC*⁺:*Axl*^{wt/wt} and *NIC*⁺:*Axl*^{fx/fx} tumors present differences in immune cells profile as shown by FACS analyses of a panel of lymphoid and myeloid markers (n=6-8 tumors). *NIC*⁺:*Axl*^{fx/fx} tumors present a general increase of CD45⁺ immune cells (**p=0.0014), an increase of CD8 and CD4 T cells (CD3e⁺CD8a⁺, **p=0.0047 and CD3e⁺CD4⁺, **p=0.0029) and a decrease of macrophages (F4/80⁺, **p=0.0054) and neutrophils (CD11b⁺Ly6G⁺, ***p=0.0007). Macrophages were also in a more pro-inflammatory activation state (CD206, ***p=0.0003, I-A/I-E, *p=0.0155).

Data are represented as mean \pm SEM.

AXL is required to sustain HIF-1 α levels under hypoxic conditions.

We found that removing Axl in the cancer cells *in vivo* reduced the circulating tumor cells and metastasis. This could be explained by the reduction of hypoxia found in the *NIC⁺:Axl^{-/-}* tumors that could lead to a decrease of tumor cell invasion, normalized blood vessels, and increased immunosurveillance. Furthermore, we previously reported the interaction and crosstalk between AXL and HER2 to promote metastasis [178]. This led us to explore their roles in hypoxic stress using tumor cell lines derived from the *NIC⁺:Axl^{+/+}* and *NIC⁺:Axl^{-/-}* mouse model, termed NIC WT and *Axl* KO. Various receptor tyrosine kinases are known to regulate HIF complex levels and activity via different downstream pathways including PI3K/AKT, JAK/STAT3, and MAPK [110]. For instance, HER2 regulates the synthesis of HIF-1 α subunits by directly activating the PI3K/AKT/FRAP pathway [112].

Under hypoxic conditions (1% O₂ for 24h), *Axl* KO cells showed drastically reduced Her2 and Hif-1 α protein levels when compared to control cells, while Hif-2 α was not affected (Fig. 3 A). Proteasome inhibition with MG132 rescued Her2 expression, suggesting a role for Axl in Her2 protein stability during hypoxia (Fig. S4 A). Therefore, Axl may modulate Hif-1 α levels by regulating Her2 stability or by directly influencing hypoxic signaling pathways. HIF-1 α subunit induction by hypoxia was also abrogated upon AXL depletion using siRNA in human MCF10A cells stably expressing HER2, validating in another system the results observed in our mouse-derived cells (Fig. S4 B). Furthermore, in human HER2⁺ breast cancer cells BT474 that do not express AXL, Axl overexpression potentiated HIF-1 α induction and stabilized HER2 under hypoxia (Fig. 3 B).

To demonstrate that AXL and HER2 activities are required for this effect, NIC WT cells were treated with Lapatinib (HER2 inhibitor) or R428 (AXL inhibitor). Single Her2 or Axl inhibition significantly decreased Hif-1 α expression under hypoxia indicating that Her2 and Axl activity regulates Hif-1 α levels under hypoxia in these cells. The combination of both inhibitors caused an additional reduction in Hif-1 α levels, suggesting that Her2 and Axl can contribute independently on Hif-1 α expression during hypoxia (Fig. 3 C). Furthermore, R428 decreased Her2 levels under hypoxia, confirming the role of Axl kinase activity on Her2 stability in hypoxic conditions (Fig. 3

C). As expected, Her2 and Axl inhibition reduced pAkt levels, indicating that the Pi3k/Akt pathway could be implicated in the signaling of these receptors under hypoxia. We found that Pi3k inhibition with LY294002 also reduced Hif-1 α levels in NIC WT cells (Fig. 3 D). Thus, our results show that both Axl and Her2 can regulate Hif-1 α levels under hypoxia potentially via activating the Pi3k/Akt pathway. Similar results were obtained in MCF10A-HER2 cells (Fig. S4 C-D). To further dissect the contribution of AXL independently of HER2 signaling, triple-negative breast cancer cells expressing high levels of AXL, Hs578T, were used. The reduction of AXL levels using an siRNA decreased HIF-1 α levels in hypoxia supporting a role for AXL independently of HER2 (Fig. 3 E). Furthermore, ectopic expression of Axl in *Axl* KO cells rescued Her2 and Hif-1 α expression (Fig. 3 F). However, Hif-1 α upregulation was not completely lost by Lapatinib treatment, suggesting that Axl partially contributes to this upregulation by stabilizing Her2 (Fig. 3 F). Furthermore, LY294002 completely abrogated Axl-dependent HIF-1 α upregulation, indicating that Pi3k/Akt acts downstream of Axl to increase Hif-1 α levels under hypoxic conditions (Fig. 3 F). Remarkably, *AXL* expression in breast cancer patient samples from the TCGA-BRCA cohort correlated with *HIF-1 α* gene expression independently of the subtype (Fig. S4 E). Taken together, these results indicate that Axl is required to ensure hypoxic Hif-1 α expression by stabilizing Her2 and promoting Pi3k/Akt signaling. Hence, Axl can promote the deregulation of the TME and metastatic progression by regulating the Hif-1 complex during hypoxia.

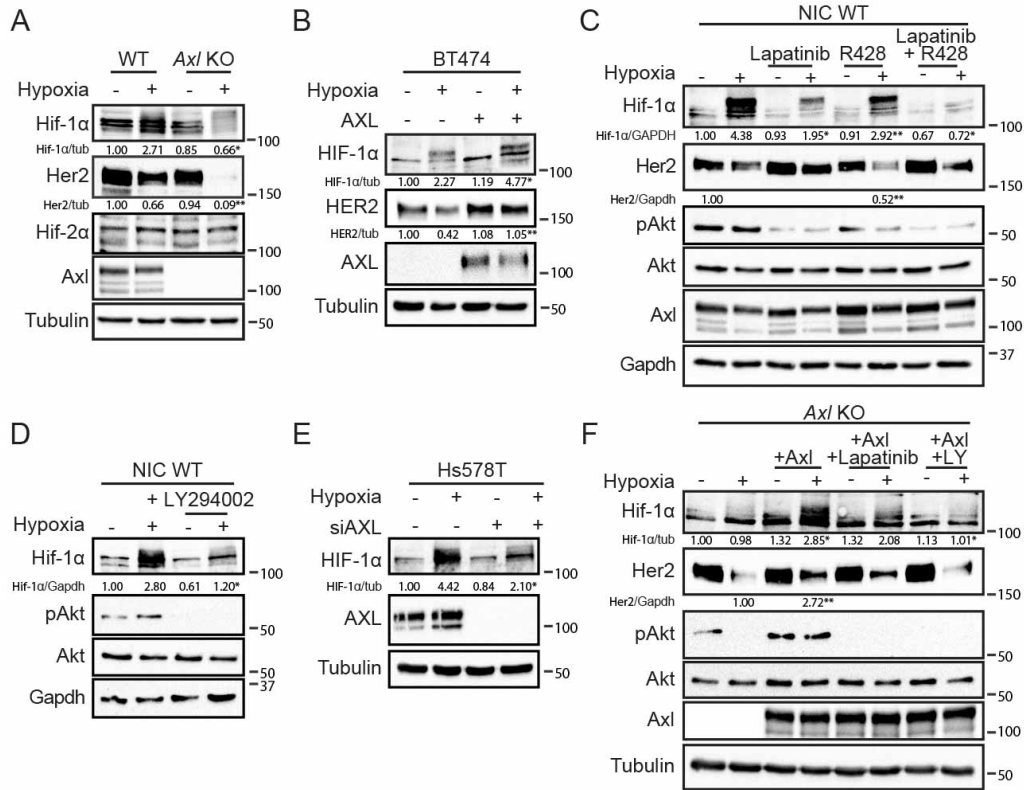


Figure 4.3. Axl regulates HIF-1α levels in hypoxia

(A) *Axl* KO cells present a decrease of Hif-1α and Her2 protein levels when subjected to hypoxia (24h, 1% O₂, the same hypoxic conditions are used throughout the figure) (*p=0.0282 and **p=0.0069, quantification from 3 independent experiments).

(B) *Axl* overexpression in BT474 leads to an increase of HIF-1α and HER2 levels in hypoxia (*p=0.0166 and **p=0.0031, quantification from 3 independent experiments).

(C) Inhibition of *Axl* (R428) or *Her2* (Lapatinib) leads to a decrease of Hif-1α expression in NIC WT cells (*p=0.0225, **p=0.0027, *p=0.0255). A decrease of *Her2* is also observed when cells are treated with R428 in hypoxia (**p=0.0026, quantification from 3 independent experiments)

(D) Inhibition of Pi3k with LY294002 decreases Hif-1α levels in hypoxia in NIC WT cells (*p=0.0279, quantification from 3 independent experiments).

(E) Reducing *Axl* expression in Hs578T cells reduced HIF-1α upregulation in hypoxia (*p=0.0133, quantification from 3 independent experiments).

(F) *Axl* overexpression in *Axl* KO cells increases *Her2* expression in hypoxia (**p=0.0024) and rescues Hif-1α levels (*p=0.0348). Inhibition of *Her2* or Pi3k decreases the rescue of Hif-1α levels (*p=0.0366, quantification from 3 independent experiments).

Axl is required for a complete hypoxic response.

Since *Axl* KO cells reduced Hif-1α levels under hypoxia, *Axl* deletion could have an impact on the hypoxic transcriptome. To test this and to better understand the role of *Axl* in hypoxic adaptation required for TME remodeling and metastasis, we sequenced RNA isolated from NIC WT and *Axl* KO cells under 1% O₂. We conducted a gene ontology analysis of hypoxia-upregulated genes that

revealed that NIC WT cells showed an expected hypoxic response that includes the upregulation of genes involved in migration, angiogenesis, and cytokine secretion. However, this response was reduced in *Axl* KO cells (Fig. 4 A and Fig. S5 A). Overall, there were more upregulated genes under hypoxia in NIC WT cells (Fig. 4 B). The genes specifically upregulated in *Axl* KO cells during hypoxia were linked to cell cycle, cellular metabolic process, cellular response to stress and programmed cell death, suggesting a harder adaptation to hypoxia (Fig. S5 B). On the other hand, the *Axl*-dependent genes upregulated under hypoxic conditions were principally associated with the processes mentioned in Fig. 4 A, but also specifically included the HIF-1 α signaling pathway (Fig. 4 C). Indeed, many HIF-1 α target genes, mainly related to EMT, invasion and immune evasion, were less expressed and/or differently modulated in the *Axl* KO compared to the WT cells (Fig. S5 C). This result suggests that *Axl* is essential for a complete hypoxic response. Therefore, these findings explain at least in part the changes in the TME and the reduced metastatic burden observed in our mouse models.

To investigate whether these observations can be clinically relevant, we analyzed the genes that correlate with *AXL* expression in breast cancer samples from METABRIC and TCGA breast cancer cohorts. In general, *AXL* correlated with the expression of genes linked to cell migration, inflammation, angiogenesis, and hypoxia, among others (Fig. S5 D). Interestingly, an important proportion of *Axl*-dependent genes induced under hypoxia and found in our RNA-seq analyses correlated with *AXL* expression in breast cancer patients (Fig. S5 E). These candidate genes were also related to processes linked to the TME and metastasis including response to O₂ levels, migration, angiogenesis, and inflammation, supporting a role for *AXL* in the hypoxic response and the TME deregulation *in vivo* (Fig. S5 F).

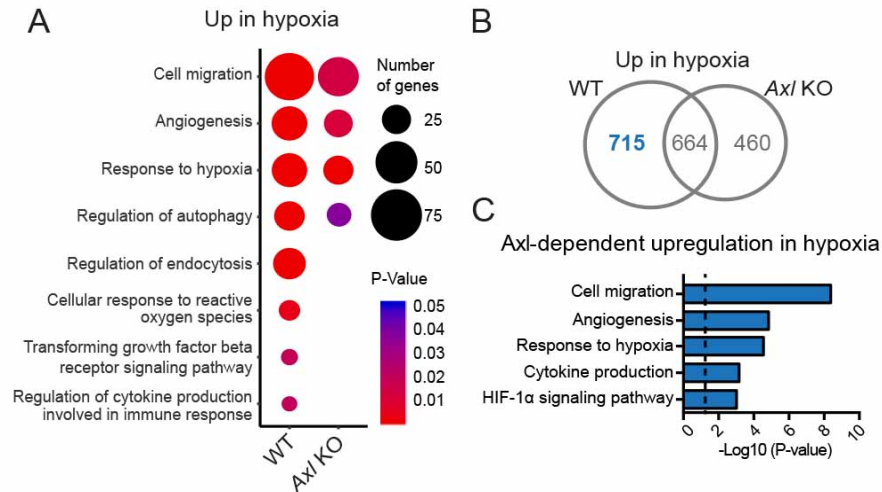


Figure 4.4. *Axl* is required for a complete hypoxic response.

RNA-seq analyses of NIC WT and *Axl* KO cells comparing gene modulation between normoxia and hypoxia conditions (72h, 1% O₂).

(A) Dot plot representing Gene Ontology (GO) analysis of upregulated genes in hypoxia shows that *Axl* KO cells present lower genes related to hypoxia features. Circle sizes represent the number of genes associated with the GO and the color represents the P-Value.

(B) Venn diagram analysis of genes upregulated in hypoxia in NIC WT and *Axl* KO cells. In blue are the genes that were used for the analysis in C.

(C) Gene ontology analyses of the *Axl*-dependent upregulated genes in hypoxia reveals genes linked to hypoxia-related features (in blue in B). Broken line indicates significance ($p=0.05$).

Axl is essential for hypoxia-induced changes that drive metastasis and TME remodeling.

Hypoxia can promote metastatic progression by increasing tumor cell EMT and invasion via the upregulation of EMT transcription factors that are themselves HIF targets [113, 114]. In our RNA-seq experiment, *Snai2* and *Twist1* were found to be upregulated under hypoxia in an *Axl*-dependent manner and correlated with *AXL* expression in human breast cancer samples (Fig. S6 A-C). This led us to hypothesize that *Axl* deletion could decrease the ability of cells to become more mesenchymal in a hypoxic environment. Accordingly, the increase of the mesenchymal marker Vimentin in NIC WT cells under hypoxic conditions was blunted in *Axl* KO cells, and this was rescued by re-expressing *Axl* (Fig. 5 A). The same phenomenon was observed in human MCF10A-HER2 cells where *AXL* levels were reduced by siRNA (Fig. S6 D). We next tested the role of *AXL* on hypoxia-induced cell motility. We found that hypoxia increased the invasion of NIC cells and MCF10A-HER2 cells in Boyden Matrigel invasion assays (Fig. 5 B and Fig. S6 E). In both cell lines, interfering with *AXL* by KO, siRNA or R428 treatment reduced the basal invasion in normoxia and inhibited the promotion of invasion by hypoxia (Fig. 5 B and Fig. S6 E). This was

also reproduced in wound healing assays where AXL was required for hypoxia-induced cell migration (Fig. 5 C-D and Fig. S6 F-G). These results demonstrate defects in hypoxia-induced EMT and invasion/migration when interfering with AXL. This further supports the notion that the ability of cancer cells to leave the primary site as circulating tumor cells (CTC) and to form metastasis is impaired in $NIC^+ : Axl^{flox/flox}$ mice.

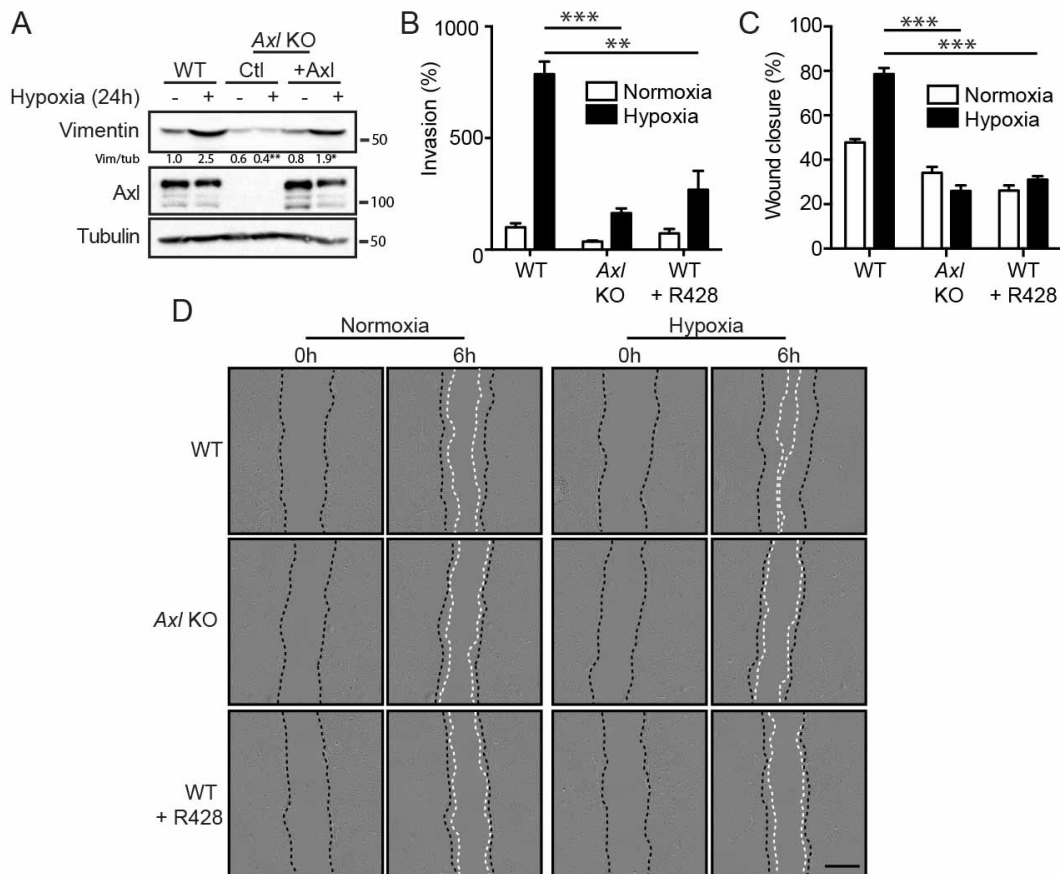


Figure 4.5. *Axl* is required for hypoxia-induced EMT and cell migration and invasion.

(A) In *Axl* KO cells, the mesenchymal marker Vimentin is not upregulated in hypoxia (1% O₂, 24h, **p=0.0081) and this is rescued by overexpressing Axl (*p=0.0421).

(B) Hypoxia-induced cell invasion is reduced in *Axl* KO cells and in the presence of the AXL inhibitor R428 in a Boyden Matrigel-invasion assay (**p=0.0005, **p=0.0070).

(C-D) Interfering with Axl reduces hypoxia-induced wound healing. The black lines represent the initial wounds, and the white lines indicate the migration fronts after 6h (p<0.0001, scale represents 500 μm).

Data are represented as mean ± SEM.

Furthermore, cancer cells boost the production of different cytokines to remodel the TME and promote immune suppression under hypoxic conditions [114, 258]. Interestingly, our RNA-seq data revealed that *Axl* removal affects the mRNA expression of some chemokines including *C-C Motif Chemokine Ligand 2 (Ccl2)*, *Colony-Stimulating Factor 1 (Csf1)*, *C-X-C Motif Chemokine Ligand 1 and 2 (Cxcl1, Cxcl2)* under hypoxia (Fig. S7 A). A cytokine profiling by a multiplex array was then done to assess the secretion by WT and *Axl* KO cells of a variety of chemokines (Table S3). Indeed, *Axl* KO cells secreted lower amounts of *Ccl2*, *Csf1*, *Cxcl1* and *Cxcl2* when subjected to hypoxic conditions (Fig. 6A, Fig. S7 B-D and Table S3). Interestingly, among these candidates, *CCL2* expression correlated with *AXL* expression in human breast cancer, suggesting a possible clinical relevance of this finding (Fig. S7 E). *CCL2* is a myeloid and lymphoid cell chemoattractant that promotes the recruitment of tumor-associated macrophages and affects their behavior in the TME [159, 162, 259]. Tumor-associated macrophages are a major stromal component and can be reprogrammed by environmental signals into specialized subtypes including a spectrum of anti-tumoral (pro-inflammatory) or pro-tumoral (immune-suppressive or wound healing) phenotypes [152-155]. Importantly, we observed a reduction in macrophage numbers and polarization toward a pro-tumoral phenotype in our *Axl* KO breast cancer mouse models (Fig. 1 J, Fig. S2 J, and Fig. 2 J). This infiltration was also validated by staining in the *NIC⁺:Axl^{wt/wt}* and *NIC⁺:Axl^{fx/fx}* tumors (Fig. 6 B). Furthermore, these infiltrated macrophages present a decrease of proliferation in *Axl*-null tumors as demonstrated by FACS analysis of staining against phospho-Histone 3 (pH3) (Fig. 6 C). Therefore, we tested *in vitro* the requirement of *Axl* in tumor cells for macrophages proliferation, invasion and polarization during hypoxia by treating bone marrow-derived macrophages with conditioned media (CM) from normoxic and hypoxic *NIC* WT and *Axl* KO cells. First, we observed that conditioned media from hypoxic *Axl* KO cells was less efficient to promote the proliferation of macrophages (Fig. 6 D). The addition of a neutralizing antibody against *Ccl2* in WT CM also moderately reduced their proliferation, suggesting a partial implication of *Ccl2* in this phenotype (Fig. 6 D). Furthermore, CM from hypoxic *NIC* WT cells increased macrophage invasion compared to normoxic CM (Fig. 6 E). However, CM from hypoxic *Axl* KO cells failed to stimulate invasion to the same extent, suggesting that *Axl* deletion in tumor cells can also affect the invasion and recruitment of macrophages in the tumor (Fig. 6 E). In this case, *Ccl2* was mainly implicated as shown by a reduction in invasion when anti-*Ccl2* was added to the hypoxic WT CM (Fig. 6 E). Finally, we investigated the effect of the hypoxic *NIC* CM on the polarization of bone marrow-

derived macrophages. First, the immunosuppressive macrophage marker CD206 was less expressed in macrophages treated with hypoxic CM from *Axl* KO cells compared to control, correlating with *in vivo* observations (Fig. 6 F). This phenotype was also partially recapitulated by the inhibition of Ccl2 (Fig. 6 F). Moreover, macrophages treated with hypoxic *Axl* KO CM secreted less factors known to promote TME deregulation and angiogenesis such as Vegfa, Cxcl1, and Cxcl2 (Fig. 6 G-I). These results suggest that Axl is required for the secretion of factors, such as Ccl2, leading to macrophage proliferation, invasion, and polarization when cancer cells are subjected to hypoxia. Consequently, this could affect their recruitment and reprogramming to promote angiogenesis and immune suppression to affect the TME and potentially the metastatic progression in our model of HER2⁺ breast cancer.

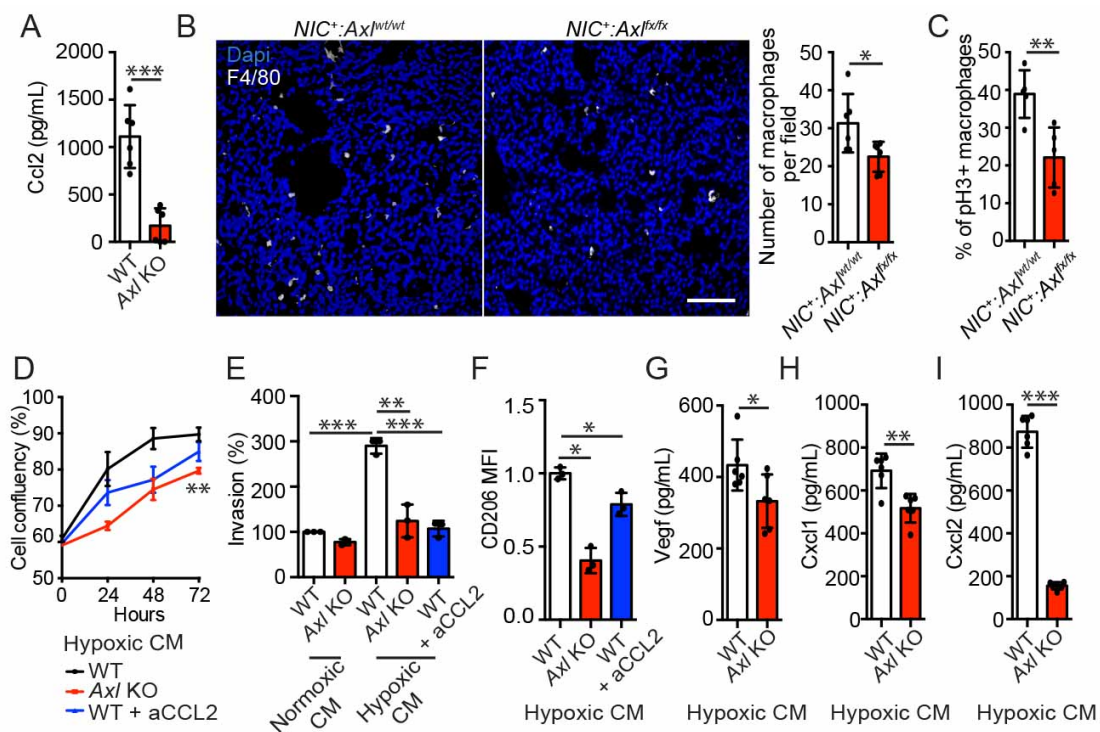


Figure 4.6. Axl is required for hypoxia-induced secretion of factors that leads to macrophage proliferation, invasion and polarization.

(A) *Axl* KO cells secrete less Ccl2 in hypoxia compared to WT cells (n=6, *** p=0.0001).

(B) Staining against F4/80 confirms the decrease of macrophages infiltration in *NIC*⁺:*Axl*^{fx/fx} tumors (n=6 tumors, *p=0.0313). The scale represents 50 μm.

(C) Levels of phospho-Histone 3 (pH3) by FACS analyses shows less proliferation in infiltrated macrophages (F4/80⁺) from *NIC*⁺:*Axl*^{fx/fx} tumors compared to *NIC*⁺:*Axl*^{wt/wt} tumors (n=6 tumors, **p=0.006).

(D) Hypoxic conditioned media (CM) from *Axl* KO cells reduces the proliferation of bone-marrow-derived macrophages compared to WT CM, as shown by an increase of cell confluency after 72h (**p=0.0081). The addition of anti-Ccl2 in the WT CM also decreases partially this proliferation.

(E) CM from hypoxic NIC cells induces the invasion of bone-marrow-derived macrophages in a Boyden Matrigel invasion assay and *Axl* is required for this increase. Neutralizing *Ccl2* in the hypoxic WT CM also decreases macrophages invasion (n=3, ***p<0.0001, **p=0.0092 and ***p=0.0002).

(F) The expression of CD206 is reduced in bone-marrow-derived macrophages treated with hypoxic CM from *Axl* KO compared to CM from WT cells. Neutralizing *Ccl2* also reduces CD206 expression (n=3, *p=0.0202, *p=0.0142).

(G-I) Macrophages treated with *Axl* KO hypoxic CM secrete less *Vegfa*, *Cxcl1* and *Cxcl2* (n=6, *p=0.0374, **p=0.0022 and ***p<0.0001).

***Axl* inhibition generates an anti-tumorigenic TME and enhances anti-PD-1 immunotherapy response.**

Clinical trials so far suggest that achieving responses to immunotherapy in HER2⁺ cancers is challenging [40, 151] and a better understanding of the HER2⁺ tumor microenvironment may help to better classify possible responders. Indeed, there is a growing clinical need to define factors that modulate response to immunotherapies and specifically checkpoint inhibitors [40, 141, 151]. The influence of hypoxia in the TME has been suggested to be one of those factors [137]. As such, we chose to investigate the landscape of hypoxia among different molecular subtypes of breast cancer. Towards this goal, we performed a single-sample gene set enrichment analysis (ssGSEA). Hypoxia signatures scores, when applied to data from TCGA-BRCA, GSE58644 and METABRIC breast cancer samples [243, 260, 261], demonstrated that basal and HER2⁺ subtypes present higher levels of hypoxia when compared to other breast cancer subtypes (Fig. 7 A-B and Fig. S8 A-D). Additionally, HER2⁺ patients whose tumors display higher hypoxia scores are associated with shorter overall and disease-free survival, suggesting that HER2⁺ tumors with evidence of elevated signatures of hypoxia are more aggressive (Fig. 7 C and Fig. S8 E-K). In our experiments, hypoxic response elements, identified to be regulated by *Axl*, EMT, and tumor cell-macrophages interactions, can promote immune evasion and have been established as roadblocks to efficient immunotherapy [143, 159]. Moreover, vascular normalization, as observed in *Neu*⁺:*Axl*^{-/-} and *NIC*⁺:*Axl*^{flx/flx} tumors, was demonstrated to enhance cancer immunotherapy [127, 256]. Collectively, our observations suggest AXL as a druggable candidate to generate an improved setting for immunotherapy. This could be promising for HER2⁺ patients that present prominent features of hypoxia.

Therefore, *Neu*⁺ mice were treated individually, and in combination, with anti-PD-1 and AXL small molecule inhibitor R428, as illustrated in Fig. S9 A. It was possible to confirm that R428 treatment efficiently modulated the TME similarly to what we observed in total and conditional

KO models. Indeed, there was a reduction of intratumoral hypoxia and a normalization of the blood vessels characterized by decreased permeability, increased perfusion, and improved pericyte coverage as shown by immunostaining (Fig. 7 D-G). Moreover, flow cytometry experiments showed that upon Axl inhibition, macrophages presented a pro-inflammatory activation state characterized by a reduction of CD206 and an increase of MCH-II (I-A/I-E) expression, confirming the effect of Axl inhibition on macrophages phenotype (Fig. 7 H). Furthermore, on analyzing the tumor and metastatic burden of treated mice, we determined that *Neu*⁺ mice were minimally responsive to anti-PD-1 therapy alone (Fig. 7 I-K). Only the combination of the anti-PD-1 immune checkpoint blockade and the Axl inhibitor was able to reduce the total tumor weight per mouse (Fig. 7 I). Importantly, R428 treatment alone reduced the metastatic burden and frequency, as we reported previously [178], and the combination with anti-PD-1 potentiated this effect (Fig. 7 J-K). Interestingly, tumors treated with the combination of the two therapeutic agents presented an increase of CD8 T cells which, with the NK cells, were more activated (CD44⁺), possibly explaining the effect of the combined therapy (Fig. 7 L). Indeed, an increase in CD3⁺ infiltrating cells was observed in the core of tumors co-treated with anti-PD-1 and R428 (Fig. S9 B). Furthermore, these tumors showed a significant increase in apoptosis, but no difference in proliferation (Fig. S9 C-D). These results suggest that AXL inhibition could be a powerful approach to generate an anti-tumorigenic microenvironment to improve immunotherapy and limit the metastatic spreading of breast cancer.

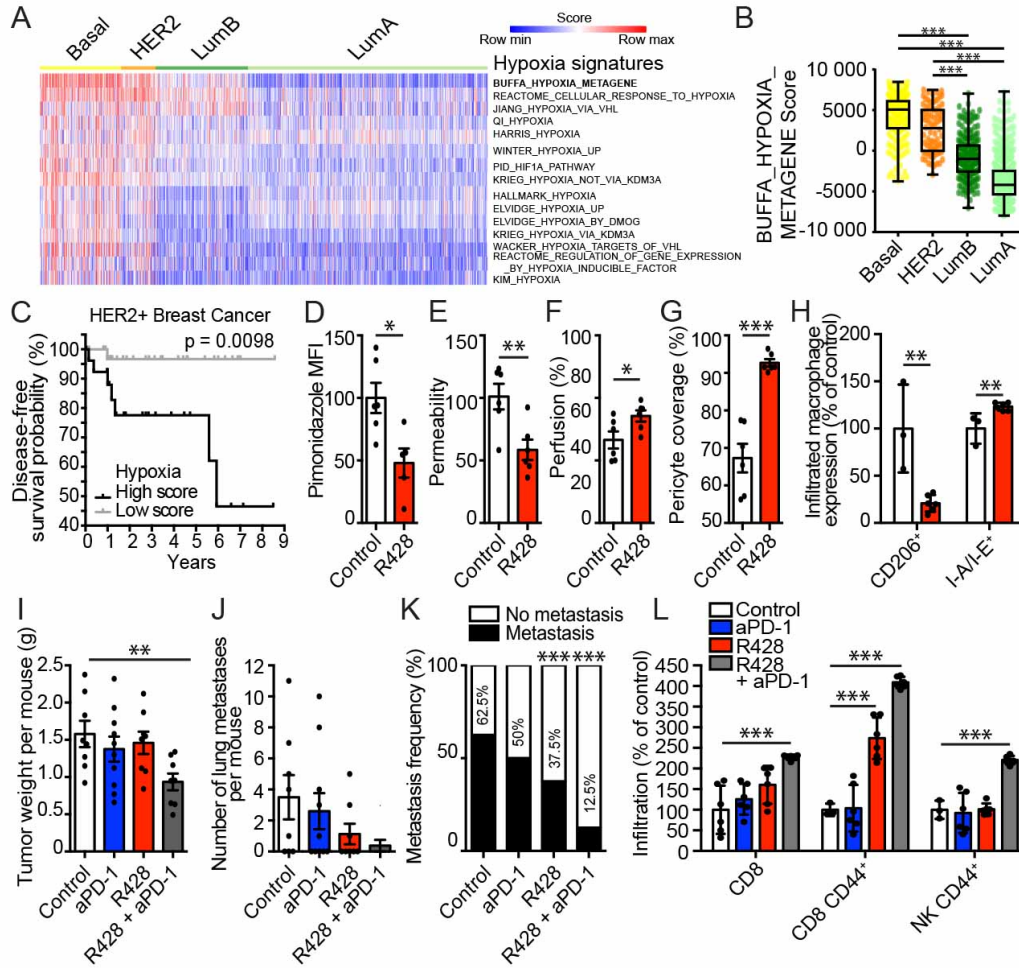


Figure 4. 7. Axl inhibition generates an anti-tumorigenic microenvironment that enhances anti-PD-1 therapy.

(A-B) Heatmap of hypoxia signatures scores on TCGA breast cancer samples classified into distinct molecular subtypes based on gene expression profiling (Basal, HER2, Luminal A, and Luminal B). Basal and HER2⁺ subtypes show higher hypoxia levels (** $p < 0.0001$).

(C) Kaplan–Meier curve of disease-free survival rate according to the hypoxia cluster indicates that HER2⁺ cases with higher hypoxia scores present poorer outcomes. See Fig. S8 E for related hierarchical clustering heatmap of HER2⁺ patients (n=156).

(D) Treatment with R428 reduces intratumoral hypoxia as shown by pimonidazole staining (n=6 tumors, * $p = 0.0135$).

(E-G) Inhibition of Axl leads to a reduction of tumor blood vessel permeability (E, Fibrinogen/CD31 staining ratio, ** $p = 0.0087$) and an increase of perfusion (F, Colocalization Lectin/ CD31 staining, * $p = 0.0412$) and pericyte coverage (G, Colocalization α SMA/ CD31 staining, *** $p < 0.0001$) (n=6 tumors).

(H) R428 treatment leads to the increase of pro-inflammatory activation state of tumor infiltrated macrophages (F4/80⁺CD206⁺, ** $p = 0.0036$ and F4/80⁺ I-A/I-E⁺, ** $p = 0.0096$) (n=3-6 tumors).

(I) The combination of Axl inhibition and anti-PD-1 immune checkpoint blockade reduces the primary tumor weight per mice (n=8-10 tumors, ** $p = 0.0085$).

(J-K) The combination of R428 and anti-PD-1 further decreases the reduced metastatic burden (J, $p = 0.0525$) and frequency (K, *** $p = 0.0004$ and *** $p < 0.0001$) observed with R428 treatment alone (n=8-10 tumors).

(L) Combining R428 and anti-PD-1 increases the number of intratumoral CD8 T cells (CD3e⁺CD8a⁺, *** $p = 0.0004$) and increased their activity (CD3e⁺CD8a⁺CD44⁺, *** $p = 0.0008$ and *** $p < 0.0001$) and the activity of NK cells (CD3e⁺ NK1.1⁺CD44⁺, *** $p < 0.0001$) (n=3-6 tumors).

Data are represented as mean \pm SEM.

Discussion

We previously reported the requirement of AXL in the metastatic progression of HER2⁺ breast cancer where a total KO of *Axl* in the MMTV-Neu model leads to a drastic reduction of the metastatic burden without affecting primary tumor growth [178]. AXL was required for the EMT and motility of HER2⁺ cancer cells, suggesting that the reduction of invasive properties of AXL-depleted cancer cells leads to decreases metastasis. Here, we show that *Axl* also plays a role in the tumor microenvironment (TME) that impacts the metastatic progression. More specifically, *Axl* deletion in the mammary epithelium decreased the metastasis burden and generated an anti-tumorigenic TME by altering the hypoxic response in cancer cells. This reduced adaptation of *Axl* KO cancer cells to low O₂ levels resulted in decreased hypoxia-induced EMT, invasion, and macrophage-related cytokine production. Thus, interfering with *Axl* in a preclinical model of HER2⁺ breast cancer generated an anti-tumorigenic TME that produced a suitable setting for immunotherapy and reduced the metastatic burden. Therefore, targeting AXL in the context of immunotherapy might be an interesting therapeutic strategy to treat HER2⁺ resistant patients that present high hypoxic features.

It was previously reported that AXL is a direct HIF target and that its expression is upregulated in clear cell renal cell carcinoma to promote invasion during hypoxia [175]. This led to the notion that AXL is a hypoxia-induced protein that drives EMT, invasion, and eventually metastasis. However, AXL was not upregulated in our HER2⁺ breast cancer cell models during hypoxic stress. Interestingly, HIF-1 α levels were reduced when AXL expression or activity was decreased, an effect that was further heightened upon hypoxia. During hypoxic stress, AXL was necessary for HIF-1 α expression and interfering with AXL led to an incomplete hypoxic response. This suggests that the AXL effect on HIF-1 α expression can be accentuated *in vivo* where low oxygen levels generate an adaptive response that has profound effects on the TME and metastasis. We propose a simple model where AXL acts on HIF-1 α levels via HER2 stabilization and PI3K/AKT pathway, but more studies will be required to completely understand the mechanisms at play. Various RTKs can impinge on HIF levels by affecting its transcription, synthesis or stability [110]. The PI3K/AKT/FRAP pathway was shown to affect HIF-1 α synthesis downstream of HER2 [112]. Thus, this can also be happening downstream of AXL since we found that interfering with AXL in hypoxia reduced HER2 levels and AKT phosphorylation. Another possibility would be AXL

regulating HIF-1 α , either directly or indirectly, on the transcriptional level. The latter possibility is supported by our RNA-seq data (Fig. S5 C), where *Hif-1 α* mRNA levels were lower in *Axl* KO cells during hypoxia compared to WT cells. Future investigations aiming at dissecting the AXL-HIF-1 α connection would be of great significance.

We previously highlighted the crosstalk of AXL and HER2 leading to invasion and we showed that the coupling of AXL to HER2 increased AXL stability and localization at the plasma membrane [178]. The results in the current report suggest that the latter crosstalk might be extended to hypoxic conditions. Indeed, interfering with AXL in low O₂ conditions reduced HER2 stability thus affecting the oncogenic signaling generated by HER2, possibly, including those leading to HIF-1 α expression. To explore the roles of AXL in the hypoxic response, we took advantage of the differential transcriptome between *Axl* WT and *Axl* KO cells during hypoxic stress. General gene ontology suggested a role for AXL in cell migration, angiogenesis and cytokine production among many other processes linked to hypoxia. Consequently, we selected gene candidates whose expression correlated with AXL expression in human breast cancer samples and found that AXL was required for the induction of important EMT transcription factors (*Snai2* and *Twist1*) and key cytokines for macrophage function such as *Ccl2*. Thus, we showed that AXL was required for hypoxia-induced EMT and invasion. AXL is a well-established context-specific driver of EMT and we previously showed in our model that AXL is required for TGF- β -induced EMT and cell invasion [178]. This study showed that AXL is also required for EMT induction and invasion downstream of hypoxic stress, reinforcing the idea that AXL is a major player in these processes in various contexts. The roles of EMT in the metastatic progression are still debated [100, 101]. Other than its role in tumor cell invasion, EMT could lead to chemoresistance and the secretion of cytokines that can affect the TME [143]. For example, a positive feedback loop was shown between hypoxia, Snail expression, CXCL2/CXCL5-induced neutrophils recruitment and impaired angiogenesis in tumors [262]. This suggests that AXL's role as EMT driver downstream of hypoxic stress can also be modulating secretion of factors that affects the TME and thus leading to resistance to treatment and metastasis. Furthermore, the macrophage-related cytokine *Ccl2* was found downregulated in *Axl* KO cells during hypoxia and conditioned media from these cells failed to enhance macrophage proliferation, invasion and polarization. *In vivo*, macrophages are recruited to hypoxic areas of the tumor where their pro-angiogenic and anti-inflammatory phenotypes are refined [156, 157]. Thus, the difference in immune profile and the normalization of the blood

vessels observed in $NIC^+ : Axl^{f^x/f^x}$ tumors could be explained by a reduction of macrophage-related cytokines production during hypoxia. Interestingly, the major angiogenic factor, *Vegfa*, was not differently modulated in *Axl* KO cells during hypoxia (Fig. S5 C and Table S3). This further suggested that immune cells, including macrophages, may play an important role in the vessel normalization observed in $NIC^+ : Axl^{f^x/f^x}$ tumors. In conclusion, the AXL depletion-mediated changes during the hypoxic response can collectively contribute to an anti-tumorigenic TME and to reduced metastatic burden *in vivo*.

Most patients afflicted with HER2⁺ breast cancer are treated with targeted therapies against HER2 such as Trastuzumab, a drug-conjugated variant of Trastuzumab (T-DM1) or the kinase inhibitor Lapatinib. Unfortunately, some patients will be unresponsive or develop resistance and different avenues are being explored to overcome these challenges [32, 216]. Our lab and others previously suggested that combining anti-HER2 and anti-AXL agents could be a good approach to enhance therapy and overcome resistance [178, 263]. Furthermore, immunotherapy emerges as a powerful avenue to treat resistant and unresponsive patients, but so far, the PANCEA trial proposing the combination of anti-PD-1 and Trastuzumab offers modest improvements [40]. This demonstrates the current clinical struggle of defining the group of patients that would benefit the most from anti-PD-1 therapy [141]. The improvement of the TME, including reduced hypoxia, vascular normalization, and increased immune response, is a clinical goal to overcome resistance to various therapies, such as immunotherapy [134, 143, 256]. Here, we show that basal and HER2⁺ tumors present stronger signatures of hypoxia than other breast cancer subtypes and these are associated with decreased survival in patients with HER2⁺ tumors. Thus, targeting hypoxia in these tumors could be beneficial and our experiments support that AXL inhibition could achieve this. AXL is an interesting druggable target because its loss or its inhibition appears to have no harmful effects in mice [178, 247]. Thus, numerous clinical trials are ongoing with the AXL inhibitor R428 also known as BGB324 or Bemcentinib [264]. Some trials are taking place in combination with immunotherapy, but only a few studies in preclinical models were done to support the possible efficiency of this combination [265, 266]. Indeed, radiation and checkpoint immunotherapy-resistant PyMT tumors have been shown to overexpress *Axl* [266]. In that study, *Axl* promotes an immune-suppressive microenvironment by reducing antigen presentation through MHC-I and enhancing immune suppressive cytokine release. Therefore, low *Axl*-expressing clones respond better to immune checkpoint blockade [266]. Furthermore, other studies link *Axl*/Pi3k signaling

with increased expression of PD-L1 by tumor cells and Axl inhibition potentiates PD-1 blockade in ID8 graft models [265, 267]. Thus, we describe here a novel underlying mechanism and offer additional proof of concept for AXL and immune checkpoint inhibitors combination in a spontaneous preclinical cancer model. These notions also raise the question of AXL expression as a reliable predictor of response to immunotherapies in advanced HER2 breast cancer patients or other aggressive highly hypoxic basal breast cancers. Indeed, exploring such avenues might open the gate for novel potential therapeutic opportunities.

Collectively, our data demonstrate that anti-AXL therapy is sufficient to generate an anti-tumorigenic microenvironment and reduce metastasis in HER2⁺ breast cancers by affecting the hypoxic response in cancer cells. This suggests a therapeutic opportunity where targeting AXL in the context of immunotherapy in HER2⁺ resistant patients could reduce the primary tumor and metastatic burdens.

Materials and Methods

Animal experiments, tumor progression studies, quantification of circulating tumor cells, and orthotopic grafts are described in SI Materials and Methods. Furthermore, detailed analysis of immunohistofluorescence, immunohistochemistry, and flow cytometry experiments, including the list of antibodies used, are described in SI Materials and Methods. RNA sequencing, bioinformatics, and human data analyses details are also included in the SI Materials and Methods. Detailed information about cell lines, culture conditions, treatments, cell invasion assay, wound healing assay, cytokine array, and proliferation assay were also described in SI Materials and Methods. Statistical analyses were performed using unpaired Student t tests where $p < 0.05$ is considered statistically significant and more details are provided in the SI Materials and Methods.

Acknowledgments

We thank Drs. Daniela Quail and Amélie Robert for critical reading of the manuscript. We also thank Dr. Tina Grusso for generous expert advice on FACS protocols and analyses and Philippe P. Roux for the MCF10A-HER2 cells. We thank Suzie Riverin and IRCM mouse technicians for their assistance with mice, Dr. Dominic Filion for microscopy assistance, Simone Terouz for histology, Eric Massicotte and Julie Lord for FACS analyses, and Dr. Virginie Calderon for bioinformatic analysis of RNA-seq data. This work was supported by operating grants from the Canadian Institute of Health Research (MOP- 142425 to J.-F.C. and J.-P.G), CIHR Foundation (#FDN-143281 to M.P.), Canadian Cancer Society (CCS #: 706878 to M.P.), Réseau Cancer banque de tumeurs (Fonds de la Recherche en Santé du Québec and the Quebec Breast Cancer Foundation to M.P.) and the National Institutes of Health (NIH-NCI R01 CA212376 to C.V.R). J.-F.C. holds the Transat Chair in Breast Cancer Research. C.V.R is a Howard Hughes Medical Institute Faculty Scholar. M.P. is a Distinguished James McGill Professor and holds the Diane and Sal Guerrera Chair in Cancer Genetics. M.-A.G. is a recipient of a CIHR Doctoral studentship. I.E.E. is a recipient of an FRQS Doctoral scholarship.

Supplemental information

SI Materials and Methods

Animal experiments

Neu FVB/NJ (MMTV-NeuNDL2-5) and NIC (MMTV-NeuNDL2-5-IRES-Cre) were previously described in [47, 55]. *Axl* KO mice were previously described in [247] and obtained from Jackson Laboratories. *Axl* cKO mice, previously described in [268], were backcrossed on FVB/NJ genetic background using the speed congenics method. Mice were housed in a specific pathogen-free (SPF) facility. All animal experimentations were approved by the Animal Care Committee of the Institut de Recherches Cliniques de Montréal and complied with the Canadian Council of Animal Care guidelines.

Tumor progression studies

Axl cKO mice were bred with NIC (MMTV-NeuNDL2-5-IRES-Cre) to generate large cohorts of females and tumor development and progression for each mouse was followed weekly by palpation under isoflurane (CDMV) anesthesia. 5 weeks after tumor onset, necropsy was done where mammary glands, primary tumors and lungs were harvested. The total weight of tumors per mouse was determined as described in [233]. Whole-mounts of tumor-free mammary glands (number 4 or 9) of mice 5 weeks after tumor onset were made to quantify mammary intraepithelial neoplastic lesions (MINs). Carmine red staining was performed after the fixation of the tissue in 10% formalin and removal of fat with acetone. The glands were dehydrated using ethanol gradients and xylene before mounting them with Permount (Fisher). To count lung metastases, lungs were perfused with 10% formalin and embedded in paraffin to be cut at 5 μm every 100 μm and stained with Hematoxylin and Eosin (H&E).

Quantification of circulating tumor cells (CTCs)

Blood burden assays were performed as described in [178]. Briefly, blood was drawn via heart puncture under anesthesia with a 25-gauge needle on a 1 mL syringe coated with and containing 100 μL of Heparin (100U/mL). The blood was plated directly in a 10 cm plate containing DMEM/F12 20% FBS and two days later and every other day, media was gently changed to remove the red blood cells. After 8 days, tumor cell colonies in the dishes were counted.

Orthotopic grafts

Grafts in the fat pads of FVB/NJ mice were performed as described previously [178]. 10^6 cells resuspended in 50 μ L of PBS were injected into the mammary fat pad (number 4 or 9) of 3 weeks old female mice under isoflurane (CDMV) anesthesia. Tumors were left to grow and reach 1,5 cm in diameter before they were harvested for analyses.

Immunohistofluorescence (IHF) and immunohistochemistry (IHC)

For pimonidazole and perfusion assays, mice were injected with 60 mg/kg of pimonidazole (Hypoxyprobe) or 150 μ L of Rhodamine-labeled Lectin (Vector Laboratories, RL-1102) via tail vein 1h before tumor collections. Tumors were embedded in OCT (Tissue-TEK compound) and frozen before being cut at 8 μ m. The sections selected for analyses were taken from the core of the tumors. Sections were fixed with 4% PFA and washed with PSB. For α SMA and F4/80 staining, cold acetone was used for the fixation instead of PFA. PBST (PBS 0,5% Triton-X100, 0,02% Tween) was used to permeabilize and blocking was performed using PBST 1% BSA for 1h. For F4/80 staining, 5% FBS was also added in the blocking buffer. Slides were incubated 1h at room temperature or overnight at 4°C with indicated antibodies (see “Antibodies” section). Fluorescent secondary antibodies were incubated for 1h at room temperature and Hoechst 33342 (Invitrogen) was used to stain the nuclei. Mowiol based media was used to mount the slides and image acquisition was done using Leica DM6 microscope, ORCAflash 4.0 V.2 camera (Hamamatsu) and Leica LAS X software.

For GLUT-1, CD3, Ki67 and TUNEL staining (DeadEnd Fluorometric TUNEL System, Promega), tumors were embedded in paraffin and cut at 5 μ m. The sections were deparaffinized with xylene, rehydrated in an ethanol gradients and antigen retrieval was done with boiling in 10 mM sodium citrate buffer (pH 6) before antibody probing as described above. For immunohistochemistry, DAB detection kit (Vector Laboratories) was used to reveal the staining and slides were counterstained using Mayer’s Hematoxylin solution (Sigma).

FIJI was used for the quantification of mean fluorescence intensity (MFI) and fluorescence area. For the quantification of permeability, Fibrinogen area was normalized by CD31 area per picture. For perfusion and coverage quantifications, the colocalization of CD31 with Lectin, α SMA or Laminin was measured with FIJI (Coloc2 tool). TUNEL and Ki67 staining were quantify using

Volocity software (PerkinElmer Life and Analytical Sciences) by counting the number of positive cells.

Flow cytometry experiments

Mechanical tumor dissociation was done using gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec) in RPMI media. After a first wash with RPMI, red blood cells were lysed with RBC lysis buffer (Gibco, A10492-01) 5 minutes on ice before resuspending the cells in PBS. An enrichment of viable cells was performed with the Dead Cell Removal Kit according to the manufactures protocol (Miltenyi Biotec). Cells were then rinsed one in PBS and viable cells were stained (FVS 510, BD Bioscience 564406). After a wash with FACS buffer (PBS 2% FBS), Fc blocking antibodies CD16/CD32 (eBioscience 14-0161-85) were incubated for 15 minutes on ice. Brilliant Stain Buffer (BD Horizon, 563794) and antibodies targeting extracellular proteins were then added and incubated for 30 minutes at room temperature (see “Antibodies” section). After a wash with FACS buffer, intracellular staining was performed according to eBioscience’s protocol using Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience, 00-5523) with an incubation with a fixation/permeabilization of 45 minutes on ice and the antibody for 30 minutes at room temperature. For compensation settings, cells and eBeads (eBioscience, 01-2222) were stained with every antibody individually. BD LSR Fortessa and DiVa v.8 was used for the acquisition and the analysis was performed using FlowJo v.9 (BD Biosciences).

Antibodies

Antibodies	Source	Purpose	Dilution
Pimonidazole	Hypoxyprobe	IHF	1:50
PECAM-1/CD31	BD Pharmingen clone MEC 13.3	IHF	1:50
Fibrinogen	Dako	IHF	1:100
α SMA	Sigma A2547	IHF	1:200
Laminin	Novus Biologicals NB300-144C	IHF	1:200
GLUT-1	Abcam ab115730	IHF	1:200
Ki67	Medicorp	IHF	1:250
F4/80 488	BioRad MCA 497	IHF	1:50
Fluorescent secondary antibodies	Life Technologies (Alexa Fluors)	IHF	1:1000
CD3	Abcam AB5690	IHC	1:200
Biotin-conjugated secondary antibody	Vector Laboratories BA-1000	IHC	1:150
Streptavidin-HRP ternary antibody	BD Pharmigen	IHC	1:1000

CD8a PerCP-Cy5.5	BD Bioscience 561109	FACS	1:200
CD25 BB515	BD Bioscience 564458	FACS	1:200
CD45 APC-Cy7	BD Bioscience 561037	FACS	1:400
CD19 APC-R700	BD Bioscience 565473	FACS	1:400
CD4 APC	BD Bioscience 561091	FACS	1:400
CD3e BV786	BD Bioscience 564379	FACS	1:100
CD44 BV711	BD Bioscience 563971	FACS	1:800
I-A/I-E BV650	BD Bioscience 563415	FACS	1:400
B220 PE-CF594	BD Bioscience 562313	FACS	1:800
NK1.1 PE-Cy7	BD Bioscience 562062	FACS	1:200
gt TCR PE-Cy7	BD Bioscience 562062	FACS	1:200
Foxp3 PE	eBioscience 48-5773-80	FACS	1:100
CD11b PerCP-Cy5.5	BD Bioscience 561114	FACS	1:400
Ly6G AF700	BD Bioscience 561236	FACS	1:400
CD206 AF647	BD Bioscience 565250	FACS	1:100
CD103 BV786	BD Bioscience 564322	FACS	1:200
F4/80 BV421	BD Bioscience 565411	FACS	1:400
CD11c PE-Cy7	BD Bioscience 561022	FACS	1:100
Ly6C PE-CF594	BD Bioscience 562728	FACS	1:200
CD317 PE	eBioscience 12-3172-81	FACS	1:200
CD19 FITC	BioLegend 115505	FACS	1:400
CD3e FITC	BioLegend 100305	FACS	1:200
NK1.1 FITC	BioLegend 108705	FACS	1:200
AXL	Santa Cruz C-20	Western blot	1:1000
HER2	Cell signaling 29D8	Western blot	1:1000
p-AKT Ser473	Cell signaling	Western blot	1:1000
AKT	Cell signaling	Western blot	1:1000
Vimentin	Cell signaling	Western blot	1:1000
HIF-1a	Richard lab [269]	Western blot	1:1000
HIF-2a	Richard lab [269]	Western blot	1:1000
Tubulin	Sigma	Western blot	1:5000
GAPDH	Santa Cruz FL-335	Western blot	1:1000
HRP secondary antibodies	Santa Cruz	Western blot	1:5000
Ccl2	R&D systems AB-479-NA	Neutralization	30 ug/mL

RNA sequencing

NIC WT and *Axl* KO cells were subjected to 1% O₂ for 72h and RNA was extracted using RNeasy columns following the kit protocol (QIAGEN). Expression libraries were generated using cBot clusters, and deep sequencing was performed using Illumina TruSeq RNA Sample Preparation Kit, Illumina TruSeq SR Cluster Kit v2, and Illumina TruSeq SBS Kit v2 (50 cycles) according to the manufacturer's procedures. Sequencing was performed at the Génome Québec Innovation Centre (McGill University) by using the Illumina HiSeq 2000 platform. Quality of the raw reads was assessed with FastQC 0.11.5 and no trimming was necessary. Reads were aligned to the GRCm38 genome with Star 2.5.1b, and the raw alignment counts were calculated with featureCounts 1.4.6. The differential expression measurements were performed with DESeq2 1.12.3. Gene ontology analyses were conducted using Gene Ontology Consortium [250] and Gene Set Enrichment analyses (GSEA) were performed using GSEA 4.0.0 [197, 270].

Accession numbers: GEO reference for RNA-seq. Mouse tumors from [178]: GSE102370. NIC cells in hypoxia: GSE15858 (token for reviewer access: ezqzisesrfghlsl)

Cell culture and treatments

NIC+ cell lines derived from MMTV-NIC transgenic mice with indicated genotypes were previously established in [178]. These lines were kept in DMEM with 5% FBS supplemented with 1X Mammary Epithelial Growth Supplement (MEGS). MCF10A-HER2 cells (gift from Dr. Philippe Roux) were cultured in Ham's F12 with 10% FBS and supplemented with hydrocortisone (0.5 mg/mL, Sigma), insulin (10µg/mL, Sigma) and EGF (20ng/mL, PeproTech). BT474 and Hs578T were maintained in DMEM with 10% FBS.

Cells were treated with Lapatinib (1µM, Selleckchem), R428 (1µM, Apexbio), LY294002 (100µM, Sigma) and MG132 (10µM, Sigma) for indicated times. Cells were transfected using lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific). pCMV-Sport6 murine *Axl* (gift from Dr. Rob Screaton) was used for expression. For siRNA experiments, cells were either transfected with a non-target siRNA or an ON-TARGET Smart Pool siRNA specific to AXL (Dharmacon).

1% O₂ hypoxic environment was generated using the Hypoxia Workstation InVivo300 (Baker) or hermetically sealed Hypoxia Incubator Chamber (StemCell Technologies) with a gas mixture (1% O₂, 5% CO₂ and 94% N₂, Praxair). For the production of conditioned media, equal numbers of

cells were plated, and fresh media was put before the hypoxic treatment of 36h. The conditioned media were pushed through a 0,4 μm filter and kept at -80°C for conservation. For macrophages experiments, Ccl2 neutralizing antibody was added to the conditioned media (see “Antibodies” section).

Invasion assays

8 μm pore Boyden Chambers (24-well, Costar) were used to do Boyden cell invasion assays where the upper chambers were coated with 6 μL of Matrigel (BD Biosciences) dissolved in 100 μL of DMEM. 50 000 cancer cells or 75 000 macrophages were seeded on the top chamber and invasion was allowed to proceed for 24h toward the bottom chamber containing the indicated conditioned medias. Cells that stayed in the upper chambers were removed using cotton swabs and cells from the bottom were washed with PBS and fixed with 4% PFA. Membranes were mounted on glass slides using the SlowFade Gold media (Invitrogen) and were imaged with a Leica DM6 microscope, ORCAflash 4.0 V.2 camera (Hamamatsu) and Leica LAS X software. The average number of cells in 5 independent 10x microscope fields was quantified using Volocity software (PerkinElmer Life and Analytical Sciences).

Wound healing assay

Cells were plated at confluency in 24 well plates and scratches were performed using a pipet tip. Cells were allowed to migrate in normoxic or hypoxic conditions for 6h. Pictures were taken at the beginning and end of the experiment using the IncuCyte (Sartorius). FIJI software (Wound Healing Tool) was used to quantify the wound closure.

Cytokine profiling by a multiplex cytokine/chemokine array

Conditioned media (CM) from NIC cells and macrophages were generated for profiling with a cytokine array. The same number of NIC cells were plated and subjected to 1% O_2 for 36h before the collection. The bone-derived macrophages were treated with the NIC CM for 48h before changing for fresh media and collecting the CM 36h later. The cytokine profiling was performed by Eve Technologies (Calgary, Canada) using their Mouse Cytokine Array/Chemokine Array 32-Plex. The multiplex immunoassay was done using MILLIPLEX (Millipore) and analyzed with a BioPlex 200 (Bio-Rad).

Bone marrow-derived macrophages preparation

Bone marrow-derived macrophages were prepared as described in [162]. Briefly, bone marrows of femurs and tibias of FVB/NJ mice were flushed with PBS using 21-gauge needle and 1 mL syringe. Cells were then washed and resuspended in RPMI containing 10% FBS and 10 ng/mL of M-CSF (CFS1) (PeproTech) to promote differentiation into macrophages. 3 days later, the primary macrophages were rinsed with media to remove nonadherent cells and cultured with equal parts of conditioned media and growth media for an additional 3 days like in [162].

Proliferation assay

Bone-marrow derived macrophages cultured in conditioned media were imaged every 6 hours for 72h using the IncuCyte (Sartorius). The IncuCyte specialized software was used to assess the confluency and to quantify proliferation.

Bioinformatics analyses on human breast cancer datasets

For gene correlation with AXL expression, METABRIC (1904 patients) [271] and TCGA (817 patients) [272] breast cancer mRNA expression databases were queried using cBioPortal [273, 274].

Enrichment scores were calculated by using Single-sample Gene Set Enrichment Analysis (ssGSEA) [275] in GenePattern [276]. We used gene expression of breast cancer tissues from TCGA [260], METABRIC [261] and GSE58644 [243] datasets. We restricted the enrichment to hallmark (H) [277] and curated canonical pathways (C2) collections of MySigDB database [197]. From hallmark and C2 collection we selected hypoxia-related signatures for evaluation. The 15 hypoxia signatures with the largest fold change differences from each molecular breast cancer subtype (Basal, HER2, Luminal A, Luminal B) are represented in the figures. Heatmaps were generated using Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>). Breast Cancer Intrinsic Molecular Subtype was assessed according to [278].

Hierarchical cluster analysis (Euclidean distance and complete linkage method) was performed on hypoxia scores of HER2⁺ samples. HER2⁺ samples were clustered in two groups (High score and Low score). For survival analyses, we used the cluster dendrogram to assign samples into groups.

Overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) were calculated using the Kaplan–Meier method and differences in survival rates were compared by the log-rank test using GraphPad Prism v.7.02.

***In vivo* treatments**

2 weeks after tumor onset, mice were treated with R428 (ApexBio) and/or anti-PD-1 antibody (RMP1-14, Bio-X-Cell) for 3 weeks. R428 was reconstituted in DMSO and 25 mg/kg/day was administered in corn oil by gavage once a day as we previously did in [178]. Anti-PD-1 was freshly diluted in PBS and 200 µg was injected intraperitoneally twice a week like in [266].

Statistics

Data are presented as mean ± SEM from at least 3 independent experiments and p-values <0.05 were considered as significant (*p < 0.05, **p < 0.001, ***p < 0.0001). Student's t test was used to compare two independent groups previously checked for normality using D'Agostino-Pearson test and were done assuming equal variances between groups. Chi-square contingency tests were done for the metastasis frequency analysis. Differences in hypoxia scores among the molecular breast cancer subtype (Basal, HER2, Luminal A, Luminal B) was analyzed by one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test. All statistics calculation were performed using GraphPad Prism Software.

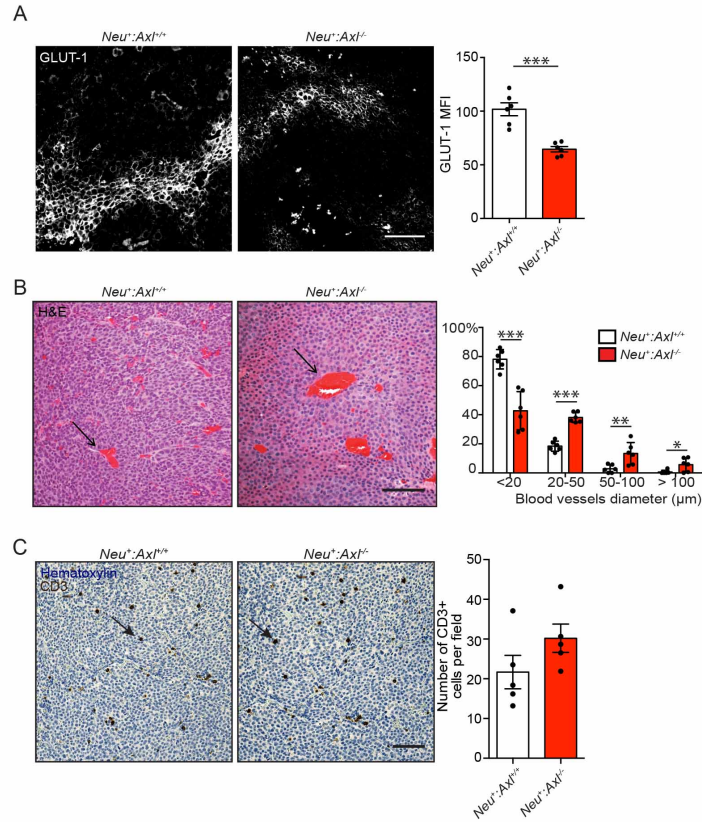


Figure 4. S1. Related to Fig. 4.1. Axl contributes to the tumor microenvironment deregulation.

(A) Reduced GLUT-1 expression is observed in Neu⁺:Axl^{-/-} tumors compared to wildtype (n=6, ***p=0.0002).

(B) Neu⁺:Axl^{-/-} tumors present larger blood vessels. Their diameters are measured on H&E images (n=6 tumors, ***p=0.0005, ***p < 0.0001, **p=0.0097 and *p=0.0259).

(C) A similar amount of CD3⁺ lymphocytes is infiltrated the tumor core of Neu⁺:Axl^{+/+} and Neu⁺:Axl^{-/-} tumors (n=5 tumors).

Data are represented as mean ± SEM, Scale bars represent 50 μm.

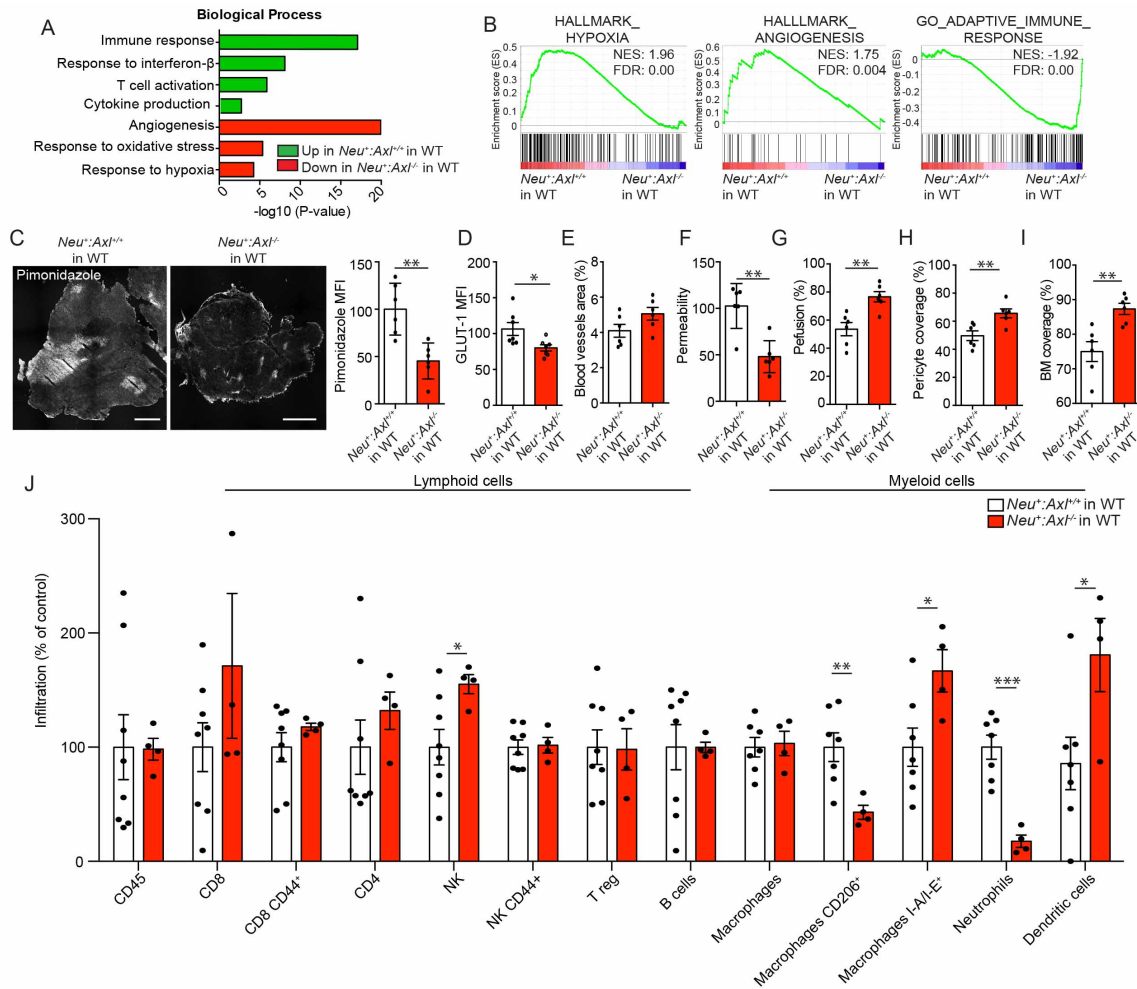


Figure 4. S2. Related to Fig. 4.1. Orthotopic grafts of *Axl* KO cancer cells in WT host leads to an anti-tumorigenic microenvironment.

(A-B) *Neu⁺:Axl^{+/+}* and *Neu⁺:Axl^{-/-}* tumor cells were transplanted in WT hosts and RNA-seq on the tumors reveals a tumor cell intrinsic role of *Axl* in hypoxia, angiogenesis and immune response in gene ontology analyses (A) and gene set enrichment analyses (GSEA) (B) (n=3 tumors).

(C-D) Pimonidazole (C) and GLUT-1 (D) staining in tumor grafts reveals that *Neu⁺:Axl^{-/-}* tumor cells generate less hypoxia (n=6 tumors, *p=0.0024 and *p=0.0212, scale bar represent 1 mm).

(E-I) *Neu⁺:Axl^{-/-}* tumor grafts present a normalization of blood vessels (E) with a decreased permeability (F, Fibrinogen/CD31 ratio, **p=0.0011), increased perfusion (G, Colocalization Lectin/CD31, **p=0.0030) and increased pericyte coverage (H, Colocalization α SMA/CD31, **p=0.0068) and basement membrane coverage (I, Colocalization Laminin/CD31, *p=0.0038) (n=6 tumors).

(J) A difference in the tumor immune profiles is observed in *Neu⁺:Axl^{-/-}* tumor grafts compared to control as shown by FACS analyses of a panel of lymphoid and myeloid markers (n=5-8 tumors). There is an increase of NK cells (CD3e⁻ NK1.1⁺, * p=0.0382) and dendritic cells (F4/80⁺ Ly6C⁻ I-A/I-E⁺, *p=0.0368), pro-inflammatory macrophages (F4/80⁺ CD206⁺, **p=0.0099 and F4/80⁺ I-A/I-E⁺, *p=0.0320), and a decrease of neutrophils (Ly6G⁺, ***p=0.0003).

Data are presented as mean \pm SEM

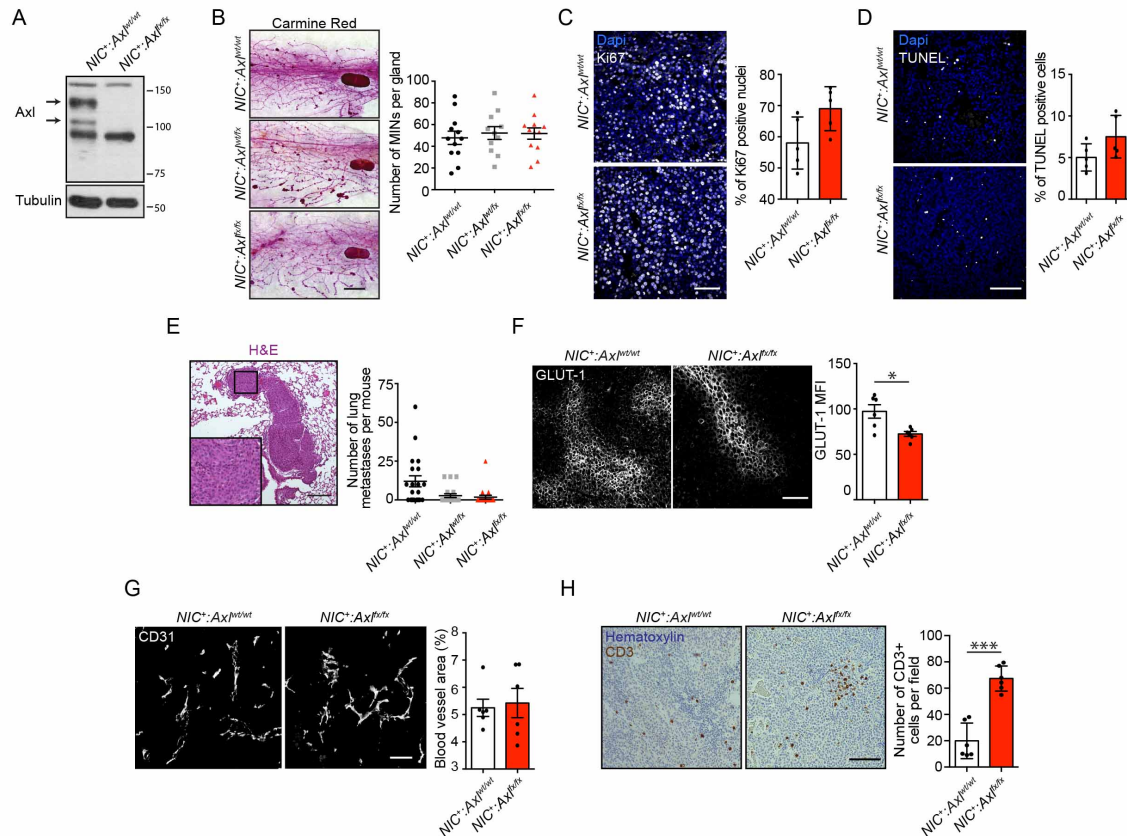


Figure 4. S3. Related to Fig. 4.2. Specific deletion of Axl in cancer cells leads to an anti-tumorigenic microenvironment.

(A) Western blot of lysates from isolated cancer cells of $NIC^+ : Axl^{wt/wt}$ and $NIC^+ : Axl^{fx/fx}$ tumors confirms the Axl knockout. Arrows point the 2 main form of Axl.

(B) 5 weeks after tumor onset, $NIC^+ : Axl^{fx/fx}$ tumors present the same amount of mammary intraepithelial neoplastic lesions (MINs) as shown by a Carmine red staining of mammary gland whole mounts (n=10-11 mice, scale represents 1mm).

(C-D) $NIC^+ : Axl^{fx/fx}$ tumors present no significant difference in proliferation (Ki67) (B) and apoptosis (TUNEL) (C) in comparison to control tumors (n=5 tumors).

(E) Less lung metastases per mouse are quantified in $NIC^+ : Axl^{fx/fx}$ mice (n=20 mice). Representative image of a lung metastasis stained with H&E (Scale represents 250 μ m).

(F) $NIC^+ : Axl^{fx/fx}$ tumors shows less intratumoral GLUT-1 staining compared to control tumors (n=6 tumors, *p=0.0105).

(G) Blood vessels area observed in $NIC^+ : Axl^{fx/fx}$ tumors is not significantly different from controls (n=6 tumors).

(H) There is an increase in CD3⁺ lymphocytes found in the core of $NIC^+ : Axl^{fx/fx}$ tumors compared to $NIC^+ : Axl^{wt/wt}$ tumors (n=6 tumors, ***p<0.0001).

Data are presented as mean \pm SEM, Scale from C, D, F, G and H represent 50 μ m.

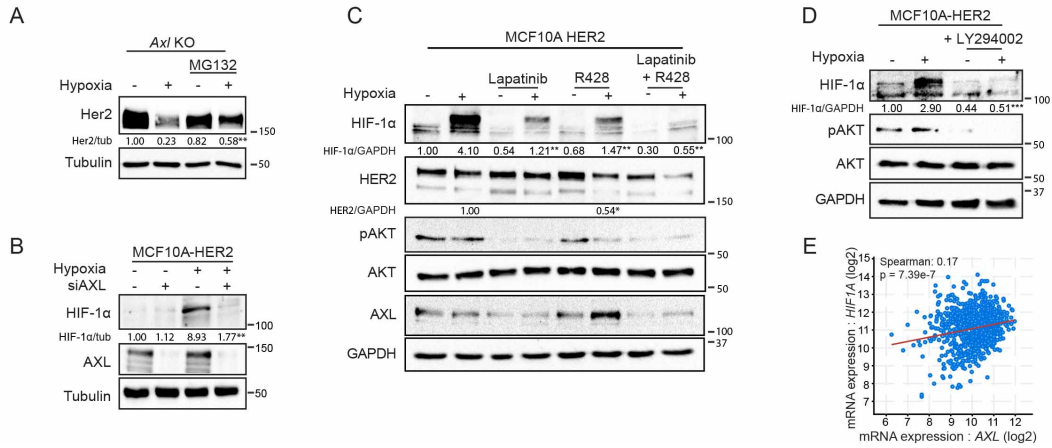


Figure 4. S4. Related to Fig. 4.3. AXL and HER2 activity regulates HIF-1α levels in hypoxia.

(A) Treatment with MG132 restores partially Her2 expression in the absence of Axl in hypoxia (1% O₂, 24h, the same conditions were used for the rest of the figure) (**p=0.0060, quantification from 3 independent experiments).

(B) Reducing AXL expression leads to a decrease of HIF-1α levels in hypoxia in MCF10A-HER2 cells (**p=0.0058, quantification from 3 independent experiments).

(C) Inhibition of HER2 (Lapatinib) and of AXL (R428) reduces HIF-1α levels and the combination of both further decreases it in MCF10A-HER2 cells (**p=0.0044, **p=0.0057, **p=0.0015). R428 also reduces HER2 levels in hypoxia (*p=0.0106, quantification from 3 independent experiments).

(D) Inhibition of PI3K with LY294002 reduced HIF-1α expression in hypoxia (**p=0.0008, quantification from 3 independent experiments).

(E) *AXL* expression correlates with *HIF1A* expression in human samples of breast cancer from TCGA.

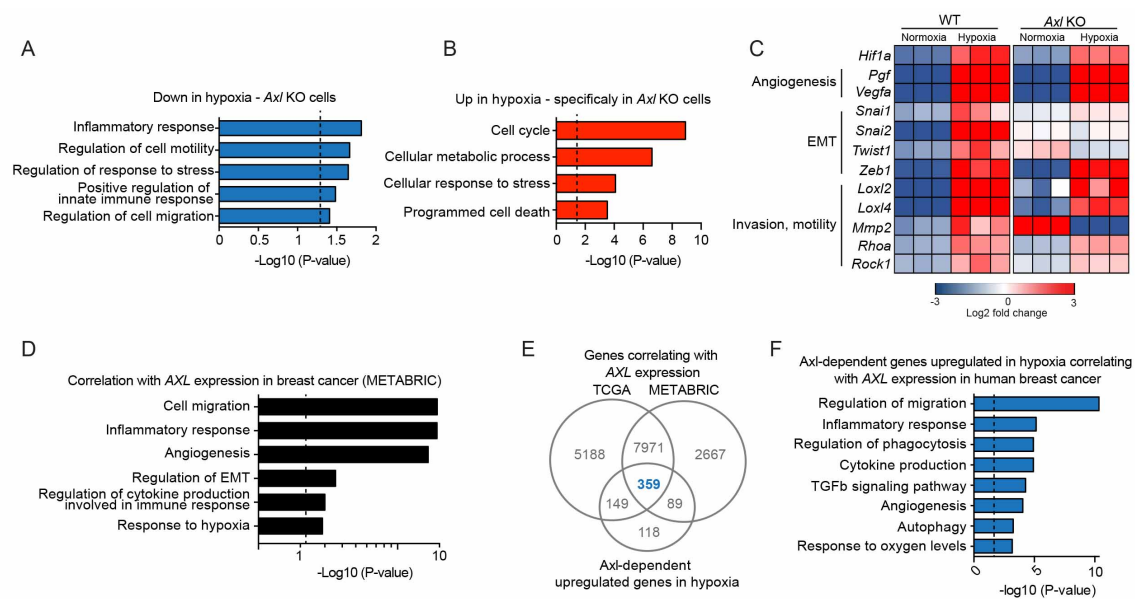


Figure 4. S5. Related to Fig. 4.4. Expression of *AXL* in human sample correlates with genes linked to the hypoxic response.

RNA-seq analysis of NIC WT and *Axl* KO cells comparing gene modulation between normoxia and hypoxia conditions.

(A) Gene ontology analyses of genes downregulated in *Axl* KO cells when comparing *Axl* WT and KO cells in hypoxia. Line indicates significance ($p=0.05$).

(B) Gene ontology analyses of genes found upregulated in hypoxia only in *Axl* KO cells (see figure 4 B). Line indicates significance ($p=0.05$).

(C) Heatmap of HIF target genes comparing their expression in WT and *Axl* KO cells during normoxia and hypoxia.

(D) Gene ontology analyses of genes correlating with *AXL* expression in human breast cancers from the METABRIC database. Line indicates significance ($p=0.05$).

(E) Venn diagrams analysis comparing the genes correlating with *AXL* expression in TCGA and METABRIC databases with *Axl*-dependent upregulated genes in hypoxia found in our RNA-seq (see Fig. 4 B in blue). The genes found in all categories (in blue) were used in the analysis in F.

(F) Gene ontology analyses of *AXL*-dependent genes induced in hypoxia that correlate with *AXL* expression in human breast cancer TCGA and METABRIC databases (in blue in E). Line indicates significance ($p=0.05$).

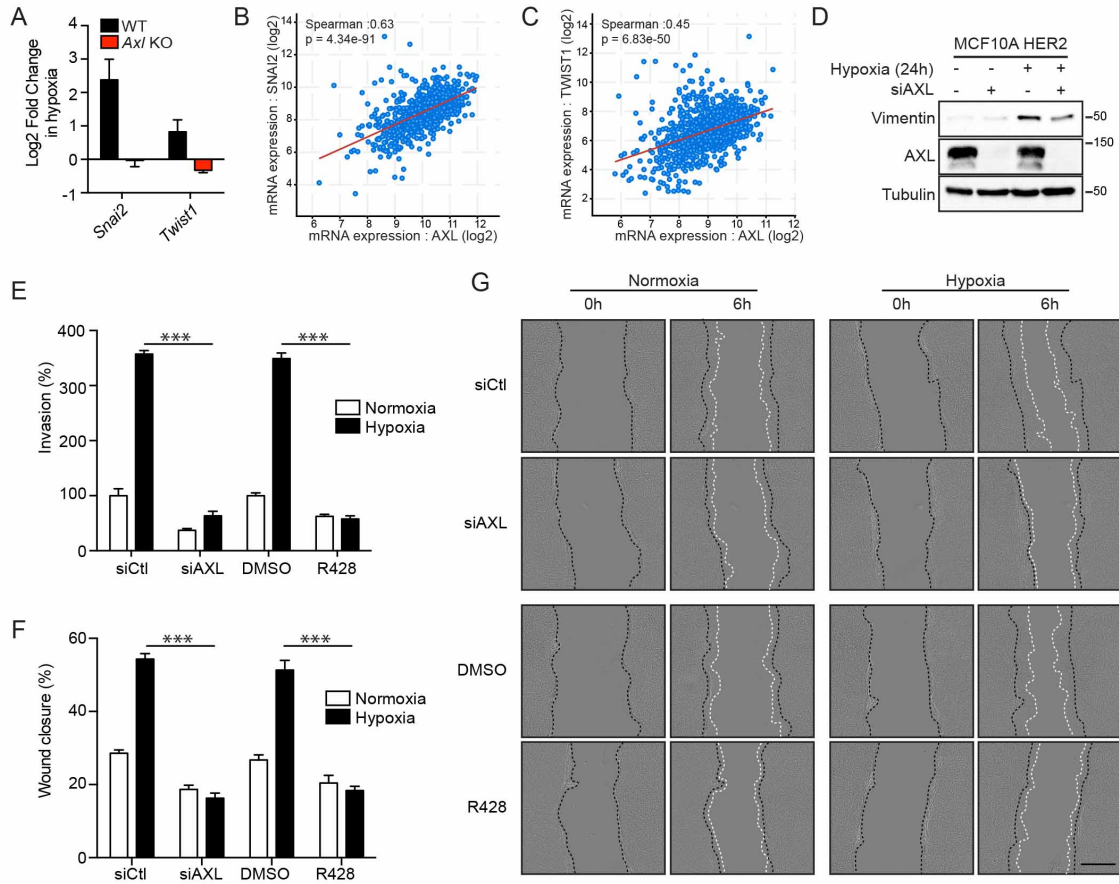


Figure 4. S6. Related to Fig. 4.5. AXL is necessary for hypoxia-induced EMT and cell invasion and migration.

(A) Results from RNA-seq of NIC cells reveal hypoxia-induced expression of the EMT transcription factors *Snai2* and *Twist1* to be dependent on *Axl*.

(B-C) *SNAI2* and *TWIST1* expression correlates with *AXL* in human breast cancer samples from TCGA database.

(D) Decreasing AXL expression with an siRNA reduces hypoxia-induced Vimentin upregulation in human MCF10A-HER2 cells (1% O₂, 24h).

(E-G) Interfering with AXL in MCF10A-HER2 cells with an siRNA or with R428 reduces hypoxia-induced cell invasion in a Boyden Matrigel invasion assay (E) and wound healing (F-G). The black lines represent the initial wounds, and the white lines indicate the migration fronts after 6h ($p < 0.0001$, scale represents 500 μm).

Data are represented as mean \pm SEM.

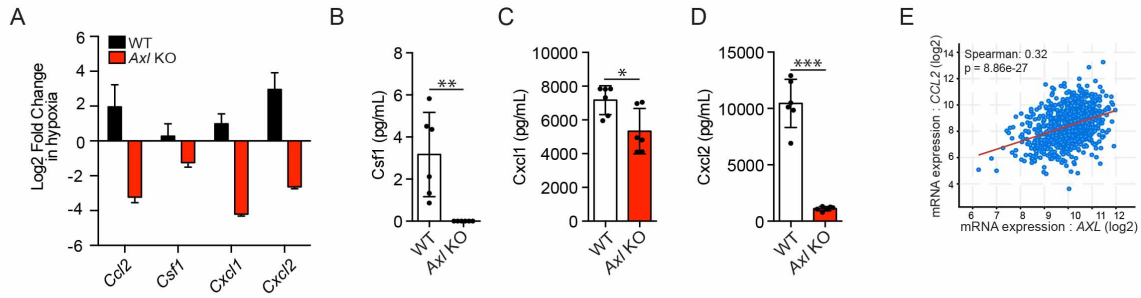


Figure 4. S7. Related to Fig. 4.6. Axl-dependent secretome from cancer cells in hypoxia.

(A) In the RNA-seq, *Ccl2*, *Csf1*, *Cxcl1* and *Cxcl2* mRNA expression is inversely regulated during hypoxia in *Axl* KO cells compared to WT cells (** $p=0.0031$, * $p=0.0181$, *** $p<0.0001$).

(B-D) *Axl* KO cells secrete less Csf1 (B), Cxcl1 (C) and Cxcl2 (D) (** $p=0.0031$, * $p=0.0181$, *** $p<0.0001$) compared to WT cells when subjected to hypoxia (n=6).

(E) *AXL* expression correlated with *CCL2* in TCGA human breast cancer samples.

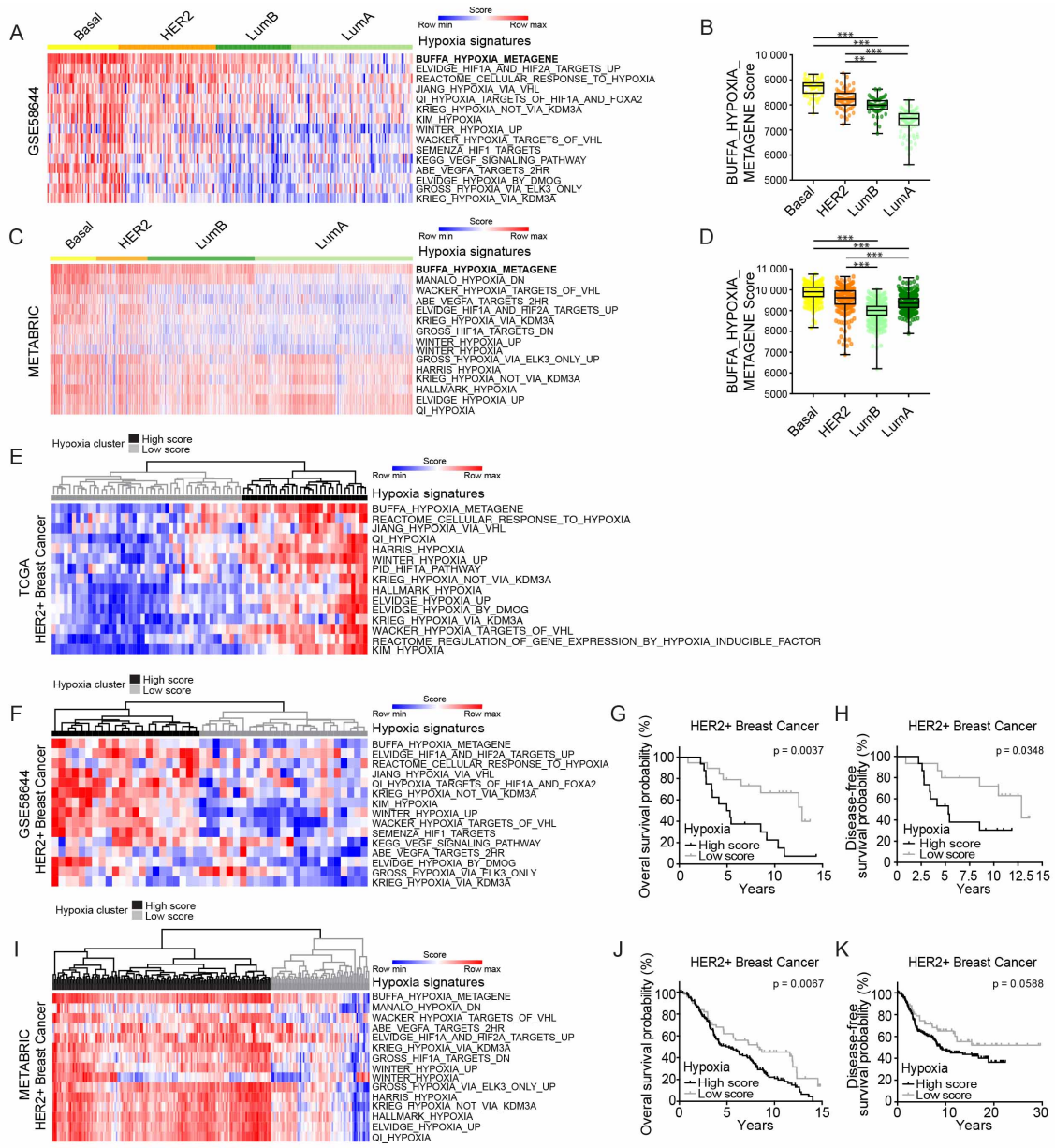


Figure 4. S8. Related to Fig. 4.7. Basal and HER2 subtypes presents more hypoxia and higher hypoxia score in HER2⁺ breast cancer patients correlates with poorer outcome.

(A-D) Heatmap of hypoxia signatures scores on GSE58644 (A-B) and METABRIC (C-D), databases where breast cancer samples were classified into distinct molecular subtypes based on gene expression profiling (Basal, HER2, Luminal A, and Luminal B). Basal and HER2 subtypes present higher hypoxia levels compared with other breast cancer subtypes (** $p < 0.0001$ and ** $p = 0.0044$). Data are presented as mean \pm SEM.

(E-K) Using Hypoxia signature scores, HER2⁺ patients were grouped into High and Low Hypoxia clusters using 3 distinct breast cancer datasets (TCGA (E, $n = 156$), GSE58644 (F, $n = 94$), METABRIC (I, $n = 440$)). Kaplan–Meier curves of overall survival rate and disease-free survival rate according to the hypoxia cluster indicate that HER2⁺ cases with higher hypoxia scores present poorer outcomes (TCGA see Fig.7 C, GSE58644 (G-H), METABRIC (J-K)).

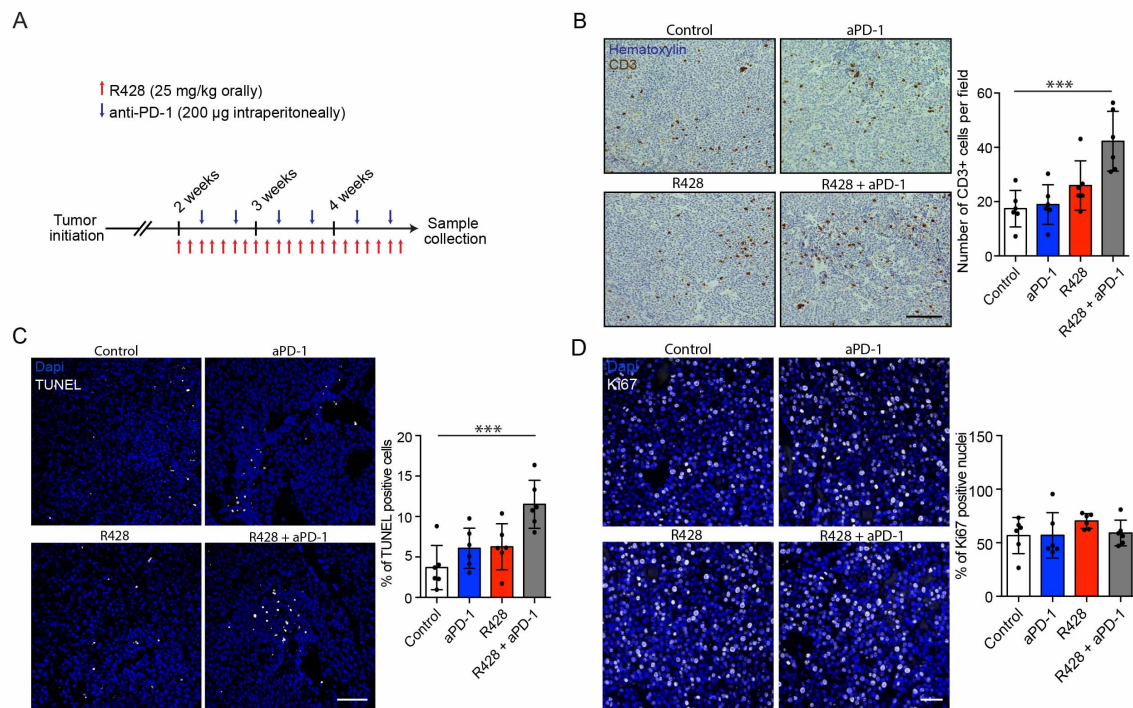


Figure 4. S9. Related to Fig. 4.7. AXL inhibition enhances the effect of anti-PD-1 treatment in MMTV-Neu mice.

(A) MMTV-Neu mice were treated with R428 and anti-PD-1 as depicted.

(B) R428 and anti-PD-1 treatment combination increases the number of CD3⁺ lymphocytes in the tumor core (n=6 tumors, ***p=0.0008).

(C-D) The combination of Axl inhibition and anti-PD-1 immune checkpoint blockade increases apoptosis (F, TUNEL, n=6 tumors, ***p=0.0008), but doesn't affect proliferation (G, Ki67) in tumors.

Table 4. S1. Related to Fig. 4.1. GSEA results of gene sets up and downregulated in *Neu*⁺:*Axl*^{-/-} tumors.

Down in <i>Neu</i> ⁺ : <i>Axl</i> ^{-/-} tumors				
		NES	NOM p-val	FDR q-val
Stroma	CROONQUIST_STROMAL_STIMULATION_UP	1,53	0,01	0,08
Angiogenesis	GO_ANGIOGENESIS	1,67	0,00	0,09
	LU_TUMOR_ANGIOGENESIS_UP	1,22	0,20	0,30
	GO_VASCULATURE_DEVELOPMENT	1,11	0,15	0,56
Hypoxia	QI_HYPOXIA	2,63	0,00	0,00
	HALLMARK_HYPOXIA	2,18	0,00	0,00
	WINTER_HYPOXIA_UP	1,98	0,00	0,00
	LEONARD_HYPOXIA	1,85	0,00	0,01
	HARRIS_HYPOXIA	1,83	0,00	0,01
	ELVIDGE_HYPOXIA_UP	1,66	0,00	0,04
	MANALO_HYPOXIA_UP	1,47	0,01	0,11
	KIM_HYPOXIA	1,47	0,06	0,11
Up in <i>Neu</i> ⁺ : <i>Axl</i> ^{-/-} tumors				
		NES	NOM p-val	FDR q-val
Inflammation	GO_POSITIVE_REGULATION_OF_INFLAMMATORY_RESPONSE	-1,94	0,00	0,01
	GO_INFLAMMATORY_RESPONSE	-1,78	0,00	0,04
	HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE	-1,39	0,02	0,08
Immune response	GO_INNATE_IMMUNE_RESPONSE	-2,56	0,00	0,00
	GO_ADAPTIVE_IMMUNE_RESPONSE	-2,29	0,00	0,00
	GO_ACTIVATION_OF_IMMUNE_RESPONSE	-2,02	0,00	0,01
	GO_POSITIVE_REGULATION_OF_IMMUNE_RESPONSE	-1,98	0,00	0,01
	KEGG_TOLL_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	-0,94	0,56	0,71
	KEGG_ANTIGEN_PROCESSING_AND_PRESENTATION	-1,30	0,13	0,28
Immune cells activation	GO_LEUKOCYTE_ACTIVATION	-1,90	0,00	0,01
	GO_POSITIVE_REGULATION_OF_ALPHA_BETA_T_CELL_ACTIVATION	-1,88	0,01	0,02
	GO_LYMPHOCYTE_ACTIVATION	-1,82	0,00	0,03
	GO_REGULATION_OF_B_CELL_ACTIVATION	-1,54	0,02	0,12
Cytokines Interleukine Interferons Signaling	HALLMARK_INTERFERON_ALPHA_RESPONSE	-3,02	0,00	0,00
	HALLMARK_INTERFERON_GAMMA_RESPONSE	-2,72	0,00	0,00
	GO_POSITIVE_REGULATION_OF_CYTOKINE_PRODUCTION	-1,93	0,00	0,01
	GO_CYTOKINE_PRODUCTION	-1,88	0,00	0,02
	GO_POSITIVE_REGULATION_OF_CYTOKINE_BIOSYNTHETIC_PROCESS	-1,53	0,02	0,12
	KEGG_CYTOKINE_CYTOKINE_RECEPTOR_INTERACTION	-1,29	0,06	0,27
	KEGG_JAK_STAT_SIGNALING_PATHWAY	-1,17	0,19	0,40

Table 4. S2. Related to Fig. 4. S2. GSEA results of gene sets up and downregulated in *Neu⁺:Axl^{-/-}* tumor grafts in wt hosts.

Down in <i>Neu⁺:Axl^{-/-}</i> tumor grafts				Up in <i>Neu⁺:Axl^{-/-}</i> grafts				
	NAME	NES	NOM p-val	FDR q-val	NAME	NES	NOM p-val	FDR q-val
Stroma	SUNG_METASTASIS_STROMA_UP	1,70	0,00	0,03	HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE	-1,85	0,00	0,001
Angiogenesis	HALLMARK_ANGIOGENESIS	1,75	0,01	0,01	INFLAMMATORY_RESPONSE	-1,44	0,01	0,20
	LU_TUMOR_ANGIOGENESIS_UP	1,3	0,082	0,07	IMMUNE_RESPONSE	-2,48	0,00	0,00
VEGF	VASCULATURE_DEVELOPMENT	1,40	0,04	0,32	IMMUNE_SYSTEM_PROCESS	-2,34	0,00	0,00
	WESTON_VEGFA_TARGETS	1,76	0,00	0,02	DEFENSE_RESPONSE	-1,93	0,00	0,01
	WESTON_VEGFA_TARGETS_6HR	1,60	0,01	0,06	ADAPTIVE_IMMUNE_RESPONSE	-1,75	0,00	0,03
	ABE_VEGFA_TARGETS_30MIN	1,61	0,01	0,05	HUMORAL_IMMUNE_RESPONSE	-1,70	0,01	0,04
	WESTON_VEGFA_TARGETS_12HR	1,58	0,02	0,06	POSITIVE_REGULATION_OF_IMMUNE_SYSTEM_PROCESS	-1,60	0,01	0,07
	WESTON_VEGFA_TARGETS_3HR	1,44	0,02	0,13	T_CELL_ACTIVATION	-2,23	0,00	0,00
Hypoxia	HALLMARK_HYPOXIA	1,94	0,00	0,00	BIOCARTA_CSK_PATHWAY	-2,15	0,00	0,00
	OL_HYPOXIA	2,16	0,00	0,00	REGULATION_OF_T_CELL_ACTIVATION	-1,96	0,00	0,01
	WINTER_HYPOXIA_UP	2,12	0,00	0,00	KEGG_T_CELL_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	-1,77	0,00	0,02
	HARRIS_HYPOXIA	2,09	0,00	0,00	POSITIVE_REGULATION_OF_T_CELL_ACTIVATION	-1,75	0,01	0,03
	ELVDGE_HYPOXIA_UP	2,01	0,00	0,00	BIOCARTA_TOB1_PATHWAY	-1,75	0,00	0,04
	FARDIN_HYPOXIA_11	1,93	0,00	0,00	BIOCARTA_TOR_PATHWAY	-1,74	0,00	0,04
	MANALO_HYPOXIA_UP	1,91	0,00	0,01	BIOCARTA_NKCELLS_PATHWAY	-1,65	0,01	0,07
	LEONARD_HYPOXIA	1,76	0,00	0,02	BIOCARTA_NKT_PATHWAY	-1,64	0,01	0,07
	KIM_HYPOXIA	1,65	0,01	0,04	KEGG_NATURAL_KILLER_CELL_MEDIATED_CYTOTOXICITY	-1,76	0,00	0,02
	MENSE_HYPOXIA_UP	1,45	0,02	0,13	LEUKOCYTE_ACTIVATION	-2,16	0,00	0,00
					LYMPHOCYTE_ACTIVATION	-2,14	0,00	0,00
					KEGG_ANTIGEN_PROCESSING_AND_PRESENTATION	-2,08	0,00	0,00
					REGULATION_OF_LYMPHOCYTE_ACTIVATION	-2,00	0,00	0,00
					POSITIVE_REGULATION_OF_LYMPHOCYTE_ACTIVATION	-1,71	0,01	0,04
					B_CELL_ACTIVATION	-1,69	0,02	0,04
					HALLMARK_INTERFERON_GAMMA_RESPONSE	-3,18	0,00	0,00
					HALLMARK_INTERFERON_ALPHA_RESPONSE	-3,16	0,00	0,00
					BIOCARTA_NO2IL12_PATHWAY	-2,35	0,00	0,00
					BIOCARTA_IL12_PATHWAY	-2,19	0,00	0,00
					KEGG_CYTOKINE_CYTOKINE_RECEPTOR_INTERACTION	-1,96	0,00	0,01
					BIOCARTA_IL2RB_PATHWAY	-1,91	0,00	0,01
					POSITIVE_REGULATION_OF_CYTOKINE_BIOSYNTHETIC_PROCESS	-1,83	0,00	0,02
					BIOCARTA_IL7_PATHWAY	-1,82	0,00	0,03
				BIOCARTA_IL10_PATHWAY	-1,76	0,01	0,04	
				BIOCARTA_IL2_PATHWAY	-1,72	0,01	0,04	
				KEGG_CHEMOKINE_SIGNALING_PATHWAY	-1,72	0,00	0,03	
				CYTOKINE_PRODUCTION	-1,59	0,01	0,08	
				CYTOKINE_METABOLIC_PROCESS	-1,61	0,03	0,07	
				CYTOKINE_BIOSYNTHETIC_PROCESS	-1,57	0,03	0,09	
				KEGG_JAK_STAT_SIGNALING_PATHWAY	-1,50	0,00	0,14	
				HALLMARK_IL6_JAK_STAT3_SIGNALING	-1,41	0,04	0,07	
				HALLMARK_IL2_STAT5_SIGNALING	-1,35	0,03	0,11	

Table 4. S3. Related to Fig. 4.6. Cytokine/chemokine array results on conditioned media from NIC WT and *Axl* KO cells in hypoxia (mean of n=6, result in pg/mL).

	WT	<i>Axl</i> KO	
Eotaxin/CCL11	0.15	0.00	
G-CSF/CSF3	7332.32	5792.26	
GM-CSF/CSF2	8.64	12.62	
IFN γ	0.18	0.00	
IL-1a	2.96	0.35	
IL-1b	0.00	0.00	
IL-2	0.37	0.00	
IL-3	0.14	0.01	
IL-4	0.00	0.00	
IL-5	0.68	0.06	
IL-6	5.06	6.18	
IL-7	0.18	0.00	
IL-9	0.24	0.18	
IL-10	0.11	0.00	
IL-12p40	0.00	0.00	
IL-12p70	1.07	0.29	
IL-13	0.00	0.00	
IL-15	3.77	1.29	
IL-17	0.08	0.01	
IP-10/CXCL10	20.77	2.82	**p=0.0060
KC/CXCL1	7167.84	5329.75	*p=0.0181
LIF	127.83	164.59	
LIX	3836.45	3586.57	
MCP-1/CCL2	1111.46	171.30	***p=0.0001
M-CSF/CSF1	3.17	0.01	**p=0.0031
MIG/CXCL9	0.43	0.37	
MIP-1a/CCL3	2.42	0.01	
MIP-1b/CCL4	0.01	0.01	
MIP-2/CXCL2	10444.97	1108.33	***p<0.0001
RANTES/CCL5	5.80	32.42	
TNF-a	0.49	0.10	
VEGF	481.69	439.98	

Chapitre 5 - Étude du rôle d'AXL dans le stroma tumoral

Introduction

Dans les chapitres précédents, nous avons exploré le rôle d'AXL dans les cellules cancéreuses. Or, AXL est aussi exprimé par plusieurs autres types cellulaires supportant les cellules cancéreuses et influençant le microenvironnement, le stroma. Particulièrement, il a été montré qu'AXL a un rôle dans les cellules immunitaires et vasculaires. Ces cellules ont une grande influence sur la progression du cancer et les rôles spécifiques d'AXL dans ce contexte sont encore méconnus. Étant donné l'engouement pour l'inhibition d'AXL dans le traitement du cancer, il est important de bien comprendre ces effets sur le système tumoral en entier, incluant les cellules stromales. Ce chapitre offre donc des résultats non publiés qui pavent la voie pour des projets futurs qui pourraient nous éclairer quant au rôle d'AXL dans ces cellules.

Premièrement, les récepteurs de la famille TAM (TYRO3, AXL, MER) sont essentiels à l'homéostasie immunitaire en réduisant l'inflammation [219]. Les cellules cancéreuses ont la capacité à se cacher du système immunitaire, à le garder inefficace et même l'activer pour qu'il fonctionne à son avantage [130]. L'augmentation d'une réponse immunitaire antitumorale est donc souhaitée pour combattre cette maladie. Puisqu'AXL est impliqué dans la régulation de l'activité immunitaire, l'inhibition d'AXL pourrait avoir l'effet d'augmenter la réponse antitumorale. De plus, les cellules immunitaires jouent un grand rôle dans la dérégulation du microenvironnement et l'angiogenèse [132, 164]. Ainsi, il est important de comprendre les rôles d'AXL dans ce compartiment, ce qui a peu été fait dans un contexte de cancer. Étant donné que l'inhibition d'AXL changeait grandement l'infiltration immunitaire (chapitre 4), il serait intéressant et important de comprendre la contribution de l'AXL immunitaire à ce phénotype.

Deuxièmement, avec son ligand GAS6, AXL a été impliqué dans la vasculogenèse et l'angiogenèse en favorisant la survie, la migration et la formation de tube par les cellules endothéliales [279-281]. Dans les tumeurs, les vaisseaux sanguins jouent un rôle crucial dans la croissance et la formation métastatique. Les vaisseaux tumoraux sont structurellement anormaux avec des jonctions peu étanches, ce qui diminue la perfusion et augmente la perméabilité, supportant l'intravasation des cellules tumorales et générant des zones hypoxiques [125]. Ces vaisseaux dysfonctionnels favorisent ainsi une dérégulation du microenvironnement, une réponse immunitaire protumorale et une augmentation des métastases [164]. Ainsi, des thérapies normalisant les vaisseaux sanguins sont recherchées pour traiter les cancers solides [255]. Nous

avons précédemment montré que l'inhibition d'AXL normalise le microenvironnement (chapitre 4), mais il est méconnu si l'expression d'AXL dans le compartiment endothélial contribue à cette normalisation et à la formation de métastases.

Dans ce chapitre, des modèles de souris transgéniques de cancer du sein HER2⁺ (MMTV-Neu) seront encore mis à contribution pour répondre à ces questions. D'abord, la délétion d'AXL dans le système immunitaire a mené à une réduction de la masse tumorale ainsi que la quantité de métastases. Des résultats préliminaires pointent vers un rôle d'AXL dans les macrophages où il aurait un rôle dans leur polarisation et fonction. Par la suite, la délétion d'AXL dans les cellules endothéliales a permis la diminution de la charge métastatique, possiblement en réduisant la perméabilité vasculaire en agissant avec son ligand GAS6. Subséquemment, il est possible de conclure qu'AXL dans ces compartiments est requis pour la formation de métastases.

Résultats

La délétion d'AXL dans le stroma mène à la normalisation du microenvironnement

Pour débiter, des cellules NIC WT ont été greffées dans des souris AXL KO pour déterminer l'effet de la délétion d'AXL dans le stroma tumoral. Ici, elles sont comparées aux souris WT injectées avec des cellules WT et aux souris WT ayant été greffées avec des cellules AXL KO utilisées dans le chapitre 4. Il est alors possible de constater qu'il n'y a pas de différence au niveau de la croissance tumorale (Figure 5.1 A-B). Par contre, lorsque le microenvironnement est caractérisé, il est possible d'observer une diminution de l'hypoxie dans les tumeurs où AXL est retiré de l'hôte ou des cellules cancéreuses (Figure 5.1 C-D). De plus, ces délétions compartimentées d'AXL menaient aussi à une normalisation des vaisseaux sanguins tumoraux tels que montré par une augmentation de la perfusion, une diminution de la perméabilité et une meilleure couverture par les péricytes et la membrane basale, sans toutefois affecter la taille des vaisseaux (Figure 5.1 E-I). Ainsi, il est possible de voir qu'AXL agit sur le microenvironnement, tant au niveau des cellules cancéreuses qu'au niveau de cellules stromales.

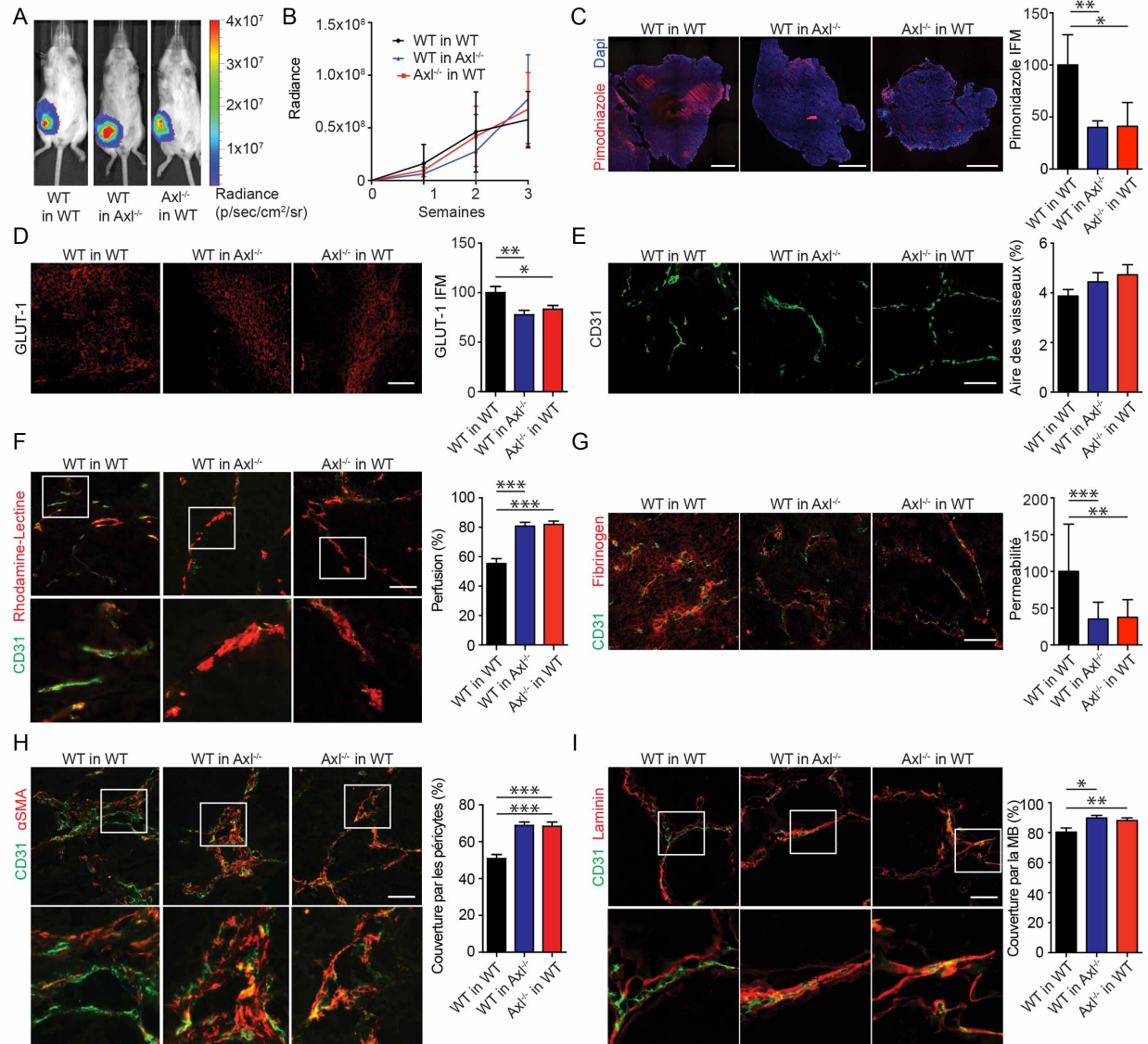


Figure 5.1 : La délétion d'AXL dans le stroma mène à la normalisation du microenvironnement

(A-B) La greffe orthotopique de cellules WT dans un hôte AXL KO ou de cellules AXL KO dans un hôte WT mène à aucune différence de croissance tumorale telle que montrée par la mesure de radiance de cellules Luciférase⁺.

(C-D) La délétion d'AXL dans les cellules cancéreuses ou dans l'hôte mène à une diminution de l'hypoxie intratumorale représentée par une coloration au Pimonidazole (C) (**p=0.0026 et *p=0.0188, l'échelle représente 1 mm) et contre GLUT-1 (D) (**p=0.0077 et *p=0.0379) - IFM : intensité de fluorescence moyenne.

(E) L'aire couverte par les vaisseaux sanguins n'est pas affectée par la délétion compartimentée d'AXL.

(F-I) La délétion d'AXL dans les cellules cancéreuses ou l'hôte mène à une augmentation de la perfusion vasculaire telle que montrée par un essai de perfusion avec de la Rhodamine-Lectine (Colocalisation Lectine/CD31, ***p<0.0001), une diminution de la perméabilité (Ratio Fibrinogène/CD31, ***p=0.0009 et **p=0.0025), ainsi qu'une augmentation de la couverture par les péricytes (Colocalisation αSMA/CD31, ***p<0.0001) et la membrane basale (MB) (Colocalisation Laminine/CD31, *p=0.0169 et **p=0.0048)

Les résultats sont présentés en moyenne ± erreur standard de moyenne. Les échelles de D-I représentent 50 μm.

La délétion d'AXL dans le système immunitaire diminue la croissance tumorale et la formation de métastases

Les cellules immunitaires peuvent grandement influencer le microenvironnement et les vaisseaux sanguins et de surcroît, AXL a été montré à jouer un rôle dans quelques une de ces cellules [219]. La délétion d'AXL dans ce compartiment a donc été effectuée pour en apprendre davantage sur son rôle dans la progression du cancer du sein métastatique. Pour ce faire, des souris MMTV-Neu ont été irradiées pour éliminer les cellules de la moelle osseuse progénitrices des cellules immunitaires. Des moelles osseuses isolées de souris WT et AXL KO ont alors été utilisées pour la remplacer, produisant des souris Neu⁺ avec un système immunitaire WT ou AXL KO (appelé ici BM Axl^{+/+} et BM Axl^{-/-} pour «Bone Marrow»). Pour vérifier la procédure, des cellules immunitaires ont été isolées de la rate (CD45⁺) et l'expression d'AXL a été vérifiée par immunobuvardage (Figure 5.2 A).

La progression tumorale de ces souris a alors été suivie par palpation comme nous l'avons fait précédemment au chapitre 3 et 4. La délétion d'AXL dans le système immunitaire a causé un délai dans l'initiation tumorale, sans affecter significativement le nombre de MINs (lésions néoplasiques intraépithéliales mammaires) par glande 5 semaines après l'apparition de la première tumeur (Figure 5.2 B-C). De plus, 5 semaines après l'apparition de la première tumeur, le poids tumoral par souris, ainsi que la quantité et la fréquence des métastases étaient significativement réduits dans les souris Neu⁺BM Axl^{-/-} (Figure 5.2 D-F). Conséquemment, il a été possible d'observer une augmentation de l'apoptose par l'essai TUNEL, mais aucun changement au niveau de la prolifération (Ki67) (Figure 5.2 G-H). Ceci suggère que le système immunitaire AXL KO s'attaquerait peut-être davantage aux cellules cancéreuses, réduisant ainsi la masse tumorale et la formation de métastases.

Ensuite, les tumeurs primaires ont été caractérisées pour déterminer si les cellules immunitaires AXL KO pouvaient altérer le microenvironnement. Ainsi, il a été possible de voir que les tumeurs des souris Neu⁺BM Axl^{-/-} présentaient des changements au niveau des vaisseaux sanguins, sans toutefois affecter significativement l'hypoxie (Figure 5.2 I). En effet, les vaisseaux sanguins semblaient plus gros, mieux perfusés, moins perméables et étaient mieux couverts par les péricytes et la membrane basale (Figure 5.2 J-N). De plus, une étude sur l'infiltration immunitaire dans ces tumeurs a été faite pour avoir une idée des cellules responsable de ce phénomène. Notre

attention s'est tournée vers les macrophages qui présentaient un phénotype modulé. En effet, la quantité de macrophages infiltrés n'était pas différente dans les tumeurs Neu⁺BM Axl^{-/-}, mais ceux-ci étaient moins polarisés vers le phénotype immunosuppresseur (CD206⁺) et présentaient une expression plus élevée de I-A/I-E (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II), une molécule responsable de la présentation d'antigène (Figure 5.2 O-Q). De plus, les macrophages ont une grande influence sur l'angiogenèse tumorale et la réponse immunitaire, ce qui suggère que les macrophages seraient de bons candidats pouvant contribuer au phénotype de normalisation observée.

Les macrophages ont aussi été montrés comme essentiel à la progression métastatique et sont reprogrammés dans la tumeur pour servir les cellules cancéreuses [159, 162]. En plus de sécréter plusieurs facteurs immunosuppresseurs et angiogéniques, ils migrent avec les cellules cancéreuses et permettent leur entrée dans la circulation sanguine [160, 162]. En effet, lorsqu'ils sont recrutés et transformés dans la tumeur, les macrophages périvasculaires se localisent aux vaisseaux sanguins où ils induisent localement une augmentation de la perméabilité pour faciliter l'entrée des cellules cancéreuses dans la circulation. Plus particulièrement, les cytokines CSF1 et CCL2 permettent le recrutement des macrophages dans la tumeur et ces macrophages sont alors recrutés vers l'intérieur de la tumeur où le TGF- β sécrété par les cellules cancéreuses induit l'expression du récepteur CXCR4. Ce récepteur stimule alors leur migration vers les vaisseaux, attirés par des fibroblastes sécrétant du CXCL12. Ainsi, bloquer l'axe CXCR4/CXCL12 diminue la formation de métastases [162]. De ce fait, il a été intéressant de tester le rôle d'AXL dans ce processus puisque nous avons vu que l'inhibition d'AXL affecte la signalisation du TGF- β dans les cellules cancéreuses (chapitre 3). Des macrophages isolés de la moelle osseuse de souris WT ou AXL KO ont donc été cultivés en présence de milieu conditionné provenant de cellules cancéreuses NIC. Les macrophages WT augmentaient alors l'expression de CXCR4, mais cette augmentation n'a pas eu lieu dans les macrophages AXL KO (Figure 5.2 R). Il est aussi intéressant de noter que l'expression de *CSF1*, *CCL2*, *TGFB1* et *CXCL12* corrèle avec l'expression d'*AXL* dans les tumeurs humaines de cancer du sein (Figure 4.S7 E, Figure 5.2 S-T). Ainsi, ces données suggèrent que l'inhibition d'AXL pourrait affecter la cascade d'activation des macrophages périvasculaires importants pour la formation de métastases en diminuant la production des molécules responsables en plus d'affecter directement la réponse des macrophages à ces signaux.

En conclusion, tous ces résultats ouvrent la porte à une étude plus approfondie du rôle d'AXL dans les macrophages et leur reprogrammation dans la tumeur.

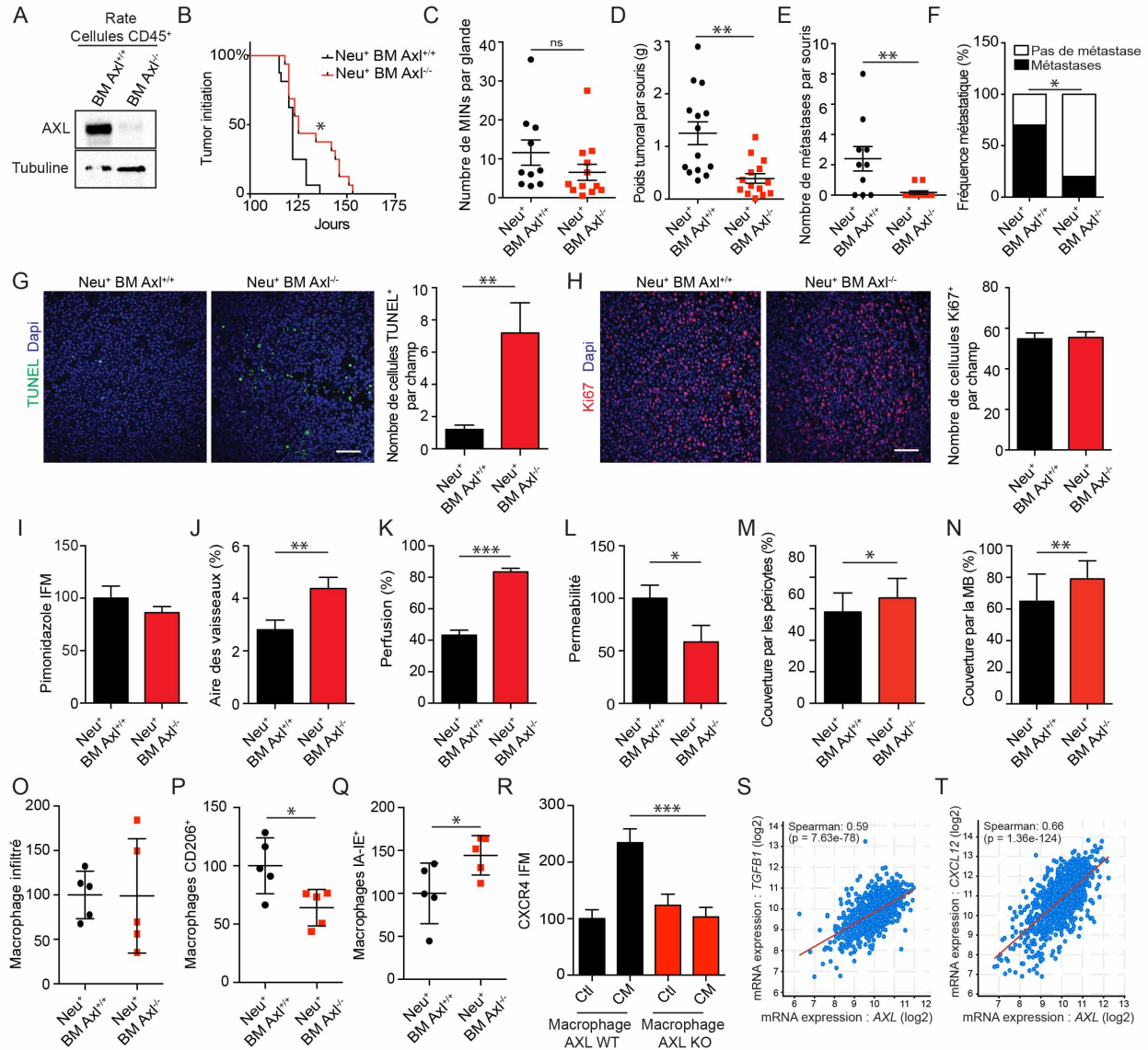


Figure 5.2 : La délétion d'AXL dans le système immunitaire diminue la croissance tumorale et la formation de métastases

(A) Des souris Neu+ ont été irradiées et leur moelle osseuse (BM) a été reconstituée avec celle de souris Axl KO. Un immunobuvardage de type Western montre la délétion d'AXL dans les cellules immunitaires CD45+ de la rate.

(B-C) Les souris Neu+ ayant un système immunitaire AXL KO ont un délai d'initiation tumoral (*p=0.0144), mais ne présentent aucune différence significative au niveau du nombre de MINs (lésions néoplasiques intraépithéliales mammaires) (n=10-15).

(D-F) Les tumeurs Neu+BM Axl-/- présentent une diminution du poids tumoral total par souris (**p=0.0012), ainsi qu'une diminution de la quantité (**p=0.0069) et la fréquence de métastases (*p=0.0274) n=15.

(G-H) Les tumeurs provenant de souris avec la moelle osseuse *Axl* KO présentent une augmentation de l'index apoptotique détecté par un essai TUNEL (** $p=0.0021$), mais aucune différence au niveau de la prolifération montrée par une coloration contre Ki67 (les échelles représentent 50 μ m).

(I) Les tumeurs venant de souris avec moelle osseuse *Axl* KO montrent une tendance non significative d'une diminution faible du niveau d'hypoxie détecté par Pimonidazole.

(J-N) Les souris ayant un système immunitaire *Axl* KO développent des tumeurs présentant des vaisseaux avec une plus grande aire (aire CD31⁺, ** $p=0.0082$), mieux perfusés (Colocalisation Lectine/CD31, *** $p<0.0001$), moins perméables (Ratio Fibrinogène/CD31, * $p=0.0424$) et ayant une meilleure couverture par les péricytes (Colocalisation α SMA/CD31, * $p=0.0348$) et la membrane basale (BM) (Colocalisation Laminine/CD31, ** $p=0.0066$).

(O-Q) Les tumeurs provenant de souris avec la moelle osseuse *Axl* KO ne présentent pas de différence au niveau total de macrophage, mais ces macrophages expriment moins le marqueur de phénotype immunosuppresseur CD206 (* $p=0.0227$) et montre une augmentation d'expression de la molécule de présentation d'antigène IA-IE (* $p=0.0460$).

(R) Des macrophages dérivés de la moelle osseuse *Axl* KO exprime moins le récepteur CXCR4 lorsque transformé par du milieu conditionné (CM) de cellules tumorales NIC (** $p<0.0001$).

(S-T) L'expression de *TGFBI* et *CXCL12* corrèle avec *AXL* dans les tumeurs humaines de cancer du sein de la base de données TCGA.

La délétion d'AXL dans les cellules endothéliales normalise les vaisseaux sanguins et réduit la charge métastatique

Il a été montré qu'*AXL* joue un rôle dans la vasculogénèse et l'angiogénèse [279, 281]. Ainsi, il est possible que l'effet observé sur les vaisseaux sanguins dans le modèle de greffes orthotopiques soit aussi en partie dû à la délétion d'*AXL* dans les cellules endothéliales elles-mêmes. Pour répondre à cette hypothèse, nous avons croisé des souris Tie2-Cre (qui ont préalablement été rétrocroisé en fond FVB) avec les souris MMTV-Neu et *Axl* cKO. Le modèle Tie2-Cre permet alors la délétion d'*AXL* dans les cellules endothéliales [282].

Le suivi des souris Neu⁺:Tie2-Cre :*Axl*^{wt/wt}, Neu⁺:Tie2-Cre :*Axl*^{wt/fx} et Neu⁺:Tie2-Cre :*Axl*^{fx/fx} a alors permis d'étudier l'effet de la délétion d'*AXL* dans les cellules endothéliales sur la progression tumorale et métastatique. Premièrement, il a été possible de voir un délai dans l'initiation tumorale dans les souris Neu⁺:Tie2-Cre :*Axl*^{fx/fx} (Figure 5.3 A). Ensuite, 5 semaines après l'apparition de la première tumeur, le nombre de MINs (lésions néoplasiques intraépithéliales mammaires) par glandes ainsi que le poids tumoral total par souris n'était pas différent entre les génotypes (Figure 5.3 B-C). Par contre, une diminution significative du nombre de métastases pulmonaires et de la fréquence métastatique a pu être observé chez les souris Neu⁺:Tie2-Cre :*Axl*^{fx/fx} (Figure 5.3 D-E). Ainsi, la délétion d'*AXL* dans les cellules endothéliales cause un délai dans la formation des tumeurs et réduit la progression métastatique sans affecter la croissance des tumeurs primaires.

Les vaisseaux sanguins de ces tumeurs ont alors été caractérisés plus en détail comme fait précédemment. Au départ, il est possible de remarquer une diminution de l'hypoxie intratumorale (Figure 5.3 F). Ensuite, les vaisseaux présentaient une diminution de leur perméabilité et une augmentation de leur couverture par les péricytes et la membrane basale (Figure 5.3 G-I). Ainsi, ces résultats suggèrent que la délétion d'AXL dans les cellules endothéliales induit une normalisation des vaisseaux qui peut expliquer la diminution de l'hypoxie et des métastases.

De plus, plusieurs études suggèrent que l'axe GAS6/AXL est important pour la vasculogénèse et l'angiogénèse [279, 281]. Puisque nous avons déjà croisé des souris Gas6 KO avec le modèle MMTV-Neu, des analyses préliminaires des vaisseaux de ces tumeurs ont été effectuées pour déterminer si GAS6 pourrait avoir un rôle dans ce phénomène. En effet, l'aire des vaisseaux était augmentée dans les tumeurs Neu⁺Gas6^{-/-} et ils étaient mieux couverts par les péricytes comme vu précédemment dans les tumeurs Neu⁺Axl^{-/-}, ce qui pourrait aussi suggérer une normalisation des vaisseaux en absence GAS6 (Figure 4.1 E, Figure 5.3 J-K). De plus, des essais de perméabilité vasculaire ont été effectués *in vitro* par un collaborateur (Laboratoire de Jean-Philippe Gratton, expérience réalisée par Malika Oubaha) pour déterminer l'effet de GAS6 sur ce phénomène (Figure 5.3 L). Le passage de Dextran fluorescent à travers une couche de cellules endothéliales a été mesuré lors de l'ajout de GAS6 en combinaison avec un facteur induisant la perméabilité (Vascular endothelial growth factor, VEGF) et un autre bloquant l'augmentation de la perméabilité causée par le VEGF (Angiopoitrine-1, Ang-1). De façon intéressante, l'ajout de GAS6 permettait l'augmentation de la perméabilité vasculaire au même niveau que le VEGF (Figure 5.3 M). Aussi, contrairement au VEGF, l'effet de GAS6 n'était pas aboli par l'Ang-1 (Figure 5.3 M). De plus, la combinaison de GAS6 avec le VEGF permettait une augmentation encore plus importante de la perméabilité, suggérant que le GAS6 présent dans les tumeurs permettrait un dérèglement de l'intégrité des vaisseaux. Ces résultats suggèrent que l'axe GAS6/AXL pourrait induire une hyperperméabilité vasculaire dans les tumeurs, menant à un dérèglement du microenvironnement et à une augmentation de l'intravasation de cellules cancéreuses. Ainsi, ces résultats offrent une avenue intéressante pour un futur projet portant sur le rôle de GAS6/AXL sur la perméabilité vasculaire. En effet, les voies de signalisation menant à l'augmentation de perméabilité vasculaire en aval de GAS6/AXL dans les cellules endothéliales pourraient être étudiées et permettre de mieux comprendre ce phénomène qui pourrait être bloqué pour diminuer la formation métastatique.

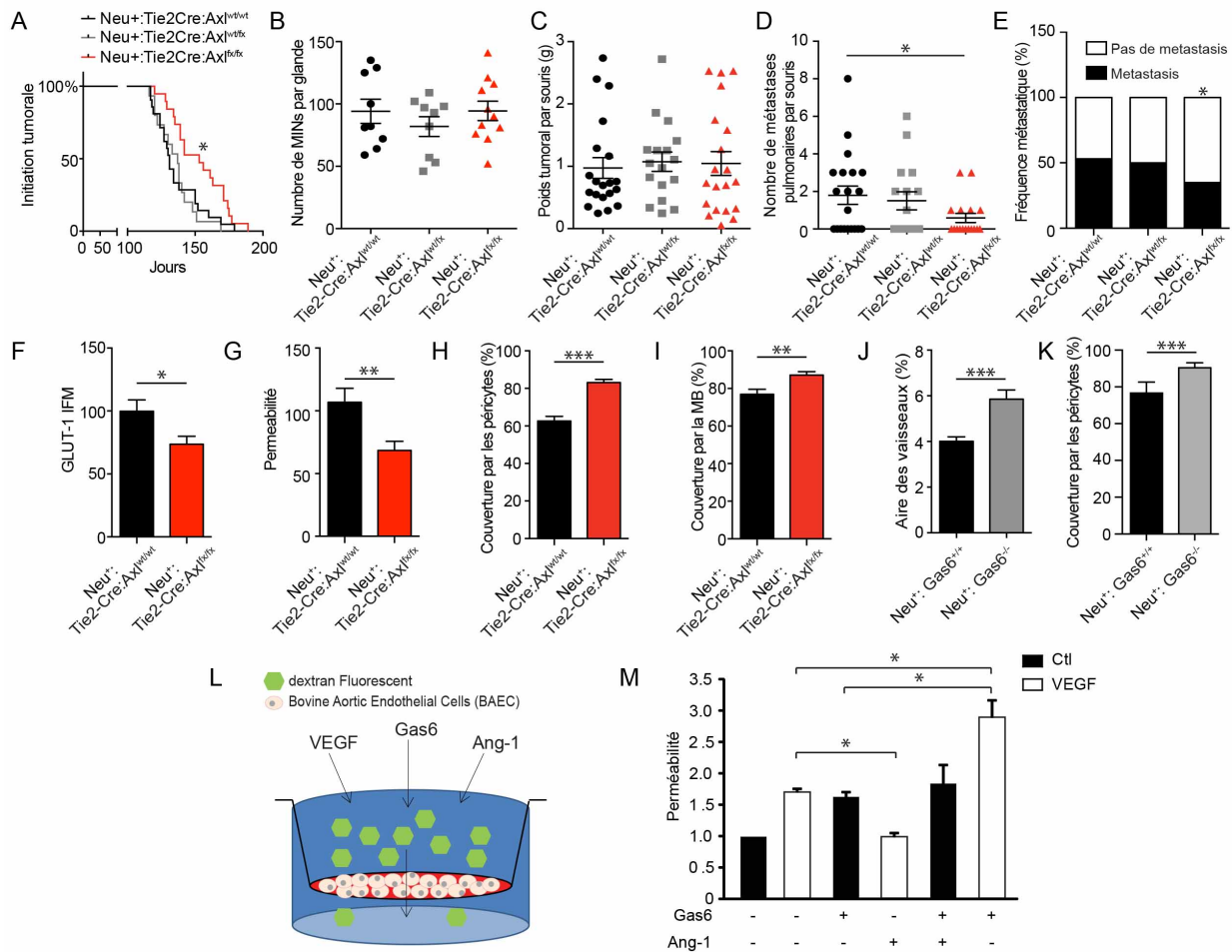


Figure 5.3 : La délétion d'AXL dans les cellules endothéliales normalise les vaisseaux sanguins et réduit la charge métastatique

(A-B) Les souris Neu⁺:Tie2-Cre:Ax1^{fx/fx} ont un délai d'initiation tumorale (n=17-20, *p=0.0207) en comparaison des souris contrôles, mais aucune différence au niveau du nombre de MINs (lésions néoplasiques intraépithéliales mammaires) n'est observé (n=9-11).

(C-E) Les souris Neu⁺:Tie2-Cre:Ax1^{fx/fx} développent une masse tumorale similaire au souris contrôles, mais présentent moins de métastases pulmonaires (* p=0.0414 et *p=0.0237)

(F) Les tumeurs provenant des souris Neu⁺:Tie2-Cre:Ax1^{fx/fx} présente une diminution de l'hypoxie telle que montrée par une coloration contre GLUT-1 (*p=0.0156).

(G-I) Les vaisseaux sanguins des tumeurs Neu⁺:Tie2-Cre:Ax1^{fx/fx} sont moins perméables (Ratio Fibrinogène/CD31, **p=0.0054) et mieux couverts par les péricytes (Colocalisation α SMA/CD31, ***p<0.0001) et la membrane basale (Colocalisation Laminine/CD31, **p=0.0025)

(J-K) Les tumeurs des souris Neu⁺Gas6^{-/-} présentent une augmentation de l'aire des vaisseaux sanguins (aire CD31⁺, ***p<0.0001) et ces vaisseaux sont mieux couverts par les péricytes (Colocalisation α SMA/CD31, ***p<0.0001)

(L) Une couche serrée de cellules endothéliales aortiques bovines (bovine aortic endothelial cells, BAEC) dans des « transwells » et le passage de Dextran fluorescent dans la chambre du bas a été monitoré suite à l'ajout de GAS6, VEGF et Ang-1.

(M) Tout comme le VEGF, GAS6 favorise la perméabilité endothéliale, mais en contrairement à celui-ci, l'effet du GAS6 n'est pas bloqué par l'Ang-1. La co-stimulation avec du VEGF et du Gas6 permet un effet additif sur la perméabilité.

Discussion et perspectives

Les résultats présentés dans ce chapitre montrent que l'AXL stromal a un rôle important dans la progression du cancer du sein. En effet, des greffes orthotopiques de cellules WT dans un hôte AXL KO produisent des tumeurs moins hypoxiques qui montrent une normalisation des vaisseaux sanguins. Plus particulièrement, la délétion d'AXL dans les cellules immunitaires et dans les cellules endothéliales a pu récapituler ce phénotype. Ainsi, lorsqu'AXL est retiré du système immunitaire, les souris développent moins rapidement des tumeurs et ces tumeurs sont plus petites et génèrent moins de métastases. De plus, les tumeurs résultantes présentent moins d'hypoxie, des vaisseaux normalisés et des macrophages avec un phénotype suggérant des fonctions antitumorales. Par la suite, la délétion d'AXL dans les cellules endothéliales mène à un délai d'initiation tumorale, mais n'affecte pas la croissance tumorale. Par contre, ces souris présentent moins de métastases et des tumeurs avec moins d'hypoxie et une normalisation des vaisseaux. De plus, GAS6 semble avoir un rôle dans ce phénotype en permettant l'augmentation de la perméabilité vasculaire *in vitro*.

Il est intéressant de noter que le délai tumoral présent dans les souris AXL total KO utilisées dans le chapitre 3, semble due à la composante stromale (soit cellules fibroblastiques, immunitaires et/ou endothéliales). En effet, les souris avec une délétion conditionnelle d'AXL dans les cellules cancéreuses (MMTV-NIC, chapitre 4) ne présentent pas de délai tandis qu'un délai peut être observé dans les souris avec une délétion totale d'AXL ou une délétion spécifiquement dans le système immunitaire ou dans les cellules endothéliales. Ceci suggère qu'AXL ne semble pas promouvoir l'initiation tumorale dans les cellules cancéreuses, mais ce serait plutôt les cellules supportant cette initiation qui requièrent AXL pour en faire la promotion. Ainsi, l'AXL stromal semble jouer un rôle important dans le développement tumoral, ce qui renforce l'importance d'étudier ces rôles dans ce compartiment. Nous avons commencé l'étude dans les cellules immunitaires et endothéliales, mais il est important de mentionner que ce ne sont pas les seules cellules stromales pouvant avoir un impact sur la progression tumorale. Par exemple, les fibroblastes sont aussi une partie non négligeable du stroma tumoral et sont importants dans la progression du cancer. En effet, les cellules cancéreuses transforment les fibroblastes environnants et les utilisent par exemple pour aider leur migration ou produire une variété de facteurs de croissance influençant le microenvironnement [283, 284]. Comme l'activation des fibroblastes tumoraux peut s'apparenter à une EMT, AXL pourrait y jouer un rôle. Il serait effectivement

intéressant d'étudier le rôle d'AXL qui est encore inconnu dans ces cellules dans un contexte de cancer et métastases.

Plusieurs types de cellules immunitaires pourraient être impliqués dans le phénotype observé dans la délétion d'AXL dans le système immunitaire. Une expérience similaire à la nôtre a été faite avec MER, un autre membre de la famille des TAMs. En effet, la délétion de MER dans le système immunitaire d'un modèle murin de cancer du sein a aussi mené à une réduction de la croissance tumorale. La transplantation de moelle osseuse *Mer^{-/-}* dans des souris MMTV-PyVmT change l'expression de cytokines clés à la réponse immunitaire par les leucocytes menant à un environnement favorable à la réponse immunitaire antitumorale [285]. Ainsi, il serait intéressant de voir si AXL aurait un rôle similaire dans les leucocytes et de comparer la différence qui peut exister entre ces deux récepteurs de même famille. Ensuite, lorsque nous avons regardé l'infiltration immunitaire des tumeurs *Neu⁺ BM Axl^{-/-}*, nous avons constaté un changement au niveau du phénotype des macrophages. Les macrophages représentent une grande population infiltrant les tumeurs solides et ils contribuent grandement à plusieurs aspects de la progression tumorale incluant la réponse immunitaire, l'invasion des cellules cancéreuses, l'angiogenèse et la résistance aux traitements [76, 131, 159]. De plus, AXL est important pour la fonction des macrophages en jouant un rôle dans la phagocytose et la production de cytokines inflammatoires [219]. Il sera alors intéressant de voir l'effet de la délétion d'AXL dans les macrophages sur l'initiation tumorale, la croissance et la progression métastatique. Pour ce faire, nous avons fait l'acquisition de souris *LysM-Cre* permettant une délétion conditionnelle dans les macrophages. Ces souris ont été rétrocroisées en fond FVB pour ensuite être croisé avec les souris MMTV-*Neu* et *Axl* cKO dans le futur, ce qui permettra de déterminer le rôle spécifique d'AXL dans les macrophages sur la progression du cancer du sein.

Pour terminer, nous avons observé que la délétion d'AXL dans les cellules endothéliales cause un délai dans la formation des tumeurs et réduit la progression métastatique sans affecter la croissance des tumeurs primaires. Les vaisseaux sanguins étaient normalisés ce qui a contribué à diminuer l'hypoxie et la formation de métastases. Il sera alors aussi intéressant de regarder la réponse immunitaire dans ces tumeurs puisque la normalisation vasculaire ainsi que la diminution de l'hypoxie permettent d'augmenter le recrutement et l'activité des cellules immunitaires antitumorales [129, 132]. Malheureusement, le modèle utilisé (*Tie2-Cre*) possède une limitation

majeure. En effet, Tie2 est requis pour l'hématopoïèse postnatale dans la moelle osseuse, donc la Tie2-Cre entraîne une délétion dans les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles comme les cellules dendritiques et les macrophages, ainsi que dans les neutrophiles [164, 286]. Comme nous avons vu que la délétion d'AXL dans le système immunitaire affecte la progression tumorale et que nous pensons que les macrophages pourraient être impliqués, il est possible qu'une partie du phénotype observé dans les souris Neu⁺: Tie2-Cre:Ax1^{fx/fx} soit due à ces cellules. Pour pallier à ce problème, un test préliminaire a été effectué en remplaçant la moelle osseuse des souris Neu⁺: Tie2-Cre:Ax1^{fx/fx} par des moelles osseuses WT, créant des souris ayant un système immunitaire WT. Dans ces souris, les mêmes tendances ont pu être observées. Le nombre de métastases était réduit et ces tumeurs montraient aussi une normalisation des vaisseaux, ce qui permet d'écarter que l'effet observé est causé uniquement par les cellules immunitaires affectées par la Tie2-Cre (données non montrées). D'autres systèmes Cre-LOX comme la PDGFb-Cre et des essais *ex vivo* ou *in vitro* pourront alors entrer en jeu pour clarifier les mécanismes.

De plus, il est intéressant de noter que les souris Neu⁺: Gas6^{-/-} présentait des vaisseaux mieux couverts par les péricytes. Ceci suggère une normalisation des vaisseaux, mais plus d'expériences devront être faites pour vérifier cette hypothèse. Or dans ces souris, la charge métastatique est semblable au contrôle. Ceci apporte donc des questions quant à l'effet d'une normalisation sur la progression métastatique. D'un autre côté, il est possible que GAS6 soit impliqué dans un processus qui viendrait contrebalancer cet effet positif, mais d'autres investigations seront nécessaires pour faire la lumière sur cette affaire. Il reste que GAS6 semble impliqué dans la perméabilité vasculaire et il serait intéressant d'étudier plus en détail les signaux en amont de GAS6/AXL et sa synergie avec le VEGF. Par ailleurs, il a été montré que l'activation d'AXL par GAS6 mène à une inhibition de la vascularisation dépendante du VEGF-A par un phénomène de boucle de rétroaction négative [287]. Ainsi, il serait intéressant de réconcilier cette étude avec nos observations dans un contexte de perméabilité.

De plus, au chapitre 4 nous avons décrit un rôle pour AXL dans la réponse hypoxique des cellules cancéreuses. L'hypoxie est un élément important dans le microenvironnement tumoral et la progression métastatique et les cellules stromales répondent aussi à la réduction du niveau d'oxygène dans les tumeurs. Par exemple, l'hypoxie contribue à reprogrammer les macrophages vers des fonctions protumorales et angiogéniques [156-158]. Aussi, l'hypoxie est un élément

majeur favorisant l'angiogenèse tumorale [123, 132]. Ainsi, l'étude de la réponse hypoxique dépendant d'AXL dans les macrophages et les cellules endothéliales pourraient aussi apporter des avenues intéressantes de recherche.

En conclusion, ces résultats offrent des bases intéressantes à développer visant à comprendre le rôle d'AXL dans les cellules stromales dans un contexte de cancer du sein. Étant donné l'enthousiasme généré par cette cible prometteuse, mieux comprendre les effets possibles de l'inhibition systémique d'AXL est important pour découvrir d'éventuels mécanismes de résistance ou effets secondaires non désirés.

Matériel et méthodes

Modèle de souris transgénique et knockout

Greffe dans le coussin adipeux de la glande mammaire

Immunohistofluorescence

Analyse de cytométrie en flux

Isolation de macrophages

Analyses de données humaines

Toutes ces expériences ont été réalisées telles que décrites dans le chapitre 4 [176].

Modèles de souris

Les souris Tie2-Cre (B6.Cg-Tg(Tek-cre)1Ywa/J) et LysM-Cre (B6.129P2-Lyz2^{tm1(cre)Jfo}/J) ont été obtenu chez Jackson Laboratory et rétrocroisé en fond FVB jusqu'à 10 générations.

Greffe de moelle osseuse

4 jours avant l'irradiation, des antibiotiques ont été ajoutés dans l'eau des souris et ils ont été gardés 2 semaines après l'irradiation. Des souris de 6 semaines ont été exposées à 1000 rads (¹³⁷Cesium Gamma) 2h avant la transplantation de moelles osseuses fraîchement isolées. Les tibias et fémurs des souris donneuses ont été vidés dans du RPMI 2% FBS avec 10 U/mL d'Héparine (Sigma) à l'aide d'une aiguille de 25G^{5/8}. Les cellules récoltées ont alors été filtrées à travers un filtre de 40 µm et lavées deux fois à l'aide de RPMI contenant 20 mM d'HEPES en centrifugeant à 2000 RPM (900 x g) pendant 5 minutes à 4°C. Puis, les cellules comptées ont été resuspendues dans du PBS et chaque souris a ensuite été injectée par la veine de la queue avec 5x10⁶ cellules dans un volume de 200 µL.

Isolation cellule CD45⁺ de la rate

Une suspension des cellules de la rate a été effectuée en frottant l'organe entre les parties rugueuses de deux lames de microscopie. Après filtration à travers un filtre de 40 µm, les cellules ont été culottées à 1500 RPM pendant 5 minutes. Les globules rouges ont alors été lysés à l'aide d'un tampon de lyse (Gibco, A1049-01) pendant 5 minutes avant de suspendre les cellules dans du PBS. Puis, l'isolation de cellules CD45⁺ a été effectuée à l'aide de microbilles CD45 et colonnes LS de sélection positive selon les instructions recommandées par la compagnie (Miltenyi Biotec).

Immunofluorescence (IF)

Trois jours après leur isolation, les macrophages primaires ont adhéré sur lamelles de verre pendant une nuit avant de commencer le traitement avec les milieux conditionnés pour 3 jours. Puis, ils ont été fixés pendant 10 minutes dans du 4% PFA. Une perméabilisation au PBS 0,2% Triton- X100 et un blocage dans du PBS 1% BSA 5% FBS, l'anticorps primaire a été incubé toute la nuit à 4°C. Après lavage, l'anticorps secondaire a été incubé pendant 30 minutes à température pièce. Les images ont alors été prises à l'aide du microscope DM6 (Leica), la caméra ORCAflash 4.0 V.2 camera (Hamamatsu) et le logiciel d'acquisition Leica LAS X. Les analyses de fluorescence ont été faites sur FIJI.

Anticorps

Anticorps	Source	Utilisation	Dilution
Pimonidazole	Hypoxyprobe	IHF	1:50
PECAM-1/CD31	BD Pharmingen clone MEC 13.3	IHF	1:50
Fibrinogen	Dako	IHF	1:100
a-SMA	Sigma A2547	IHF	1:200

Laminin	Novus Biologicals NB300-144C	IHF	1:200
GLUT-1	Abcam ab115730	IHF	1:200
Ki67	Medicorp	IHF	1:250
Fluorescent secondary antibodies	Life Technologies (Alexa Fluors)	IHF	1:1000
CD8a PerCP-Cy5.5	BD Bioscience 561109	FACs	1:200
CD25 BB515	BD Bioscience 564458	FACs	1:200
CD45 APC-Cy7	BD Bioscience 561037	FACs	1:400
CD19 APC-R700	BD Bioscience 565473	FACs	1:400
CD4 APC	BD Bioscience 561091	FACs	1:400
CD3e BV786	BD Bioscience 564379	FACs	1:100
CD44 BV711	BD Bioscience 563971	FACs	1:800
I-A/I-E BV650	BD Bioscience 563415	FACs	1:400
B220 PE-CF594	BD Bioscience 562313	FACs	1:800
NK1.1 PE-Cy7	BD Bioscience 562062	FACs	1:200
gt TCR PE-Cy7	BD Bioscience 562062	FACs	1:200
Foxp3 PE	eBioscience 48-5773-80	FACs	1:100
CD11b PerCP-Cy5.5	BD Bioscience 561114	FACs	1:400
Ly6G AF700	BD Bioscience 561236	FACs	1:400
CD206 AF647	BD Bioscience 565250	FACs	1:100
CD103 BV786	BD Bioscience 564322	FACs	1:200

F4/80 BV421	BD Bioscience 565411	FACs	1:400
CD11c PE-Cy7	BD Bioscience 561022	FACs	1:100
Ly6C PE-CF594	BD Bioscience 562728	FACs	1:200
CD317 PE	eBioscience 12-3172-81	FACs	1:200
CD19 FITC	BioLegend 115505	FACs	1:400
CD3e FITC	BioLegend 100305	FACs	1:200
NK1.1 FITC	BioLegend 108705	FACs	1:200
AXL	Santa Cruz C-20	Western blot	1:1000
Tubulin	Sigma	Western blot	1:5000
HRP secondary antibodies	Santa Cruz	Western blot	1:5000
CXCR4	Abcam UMB2	IF	1:200

Discussion

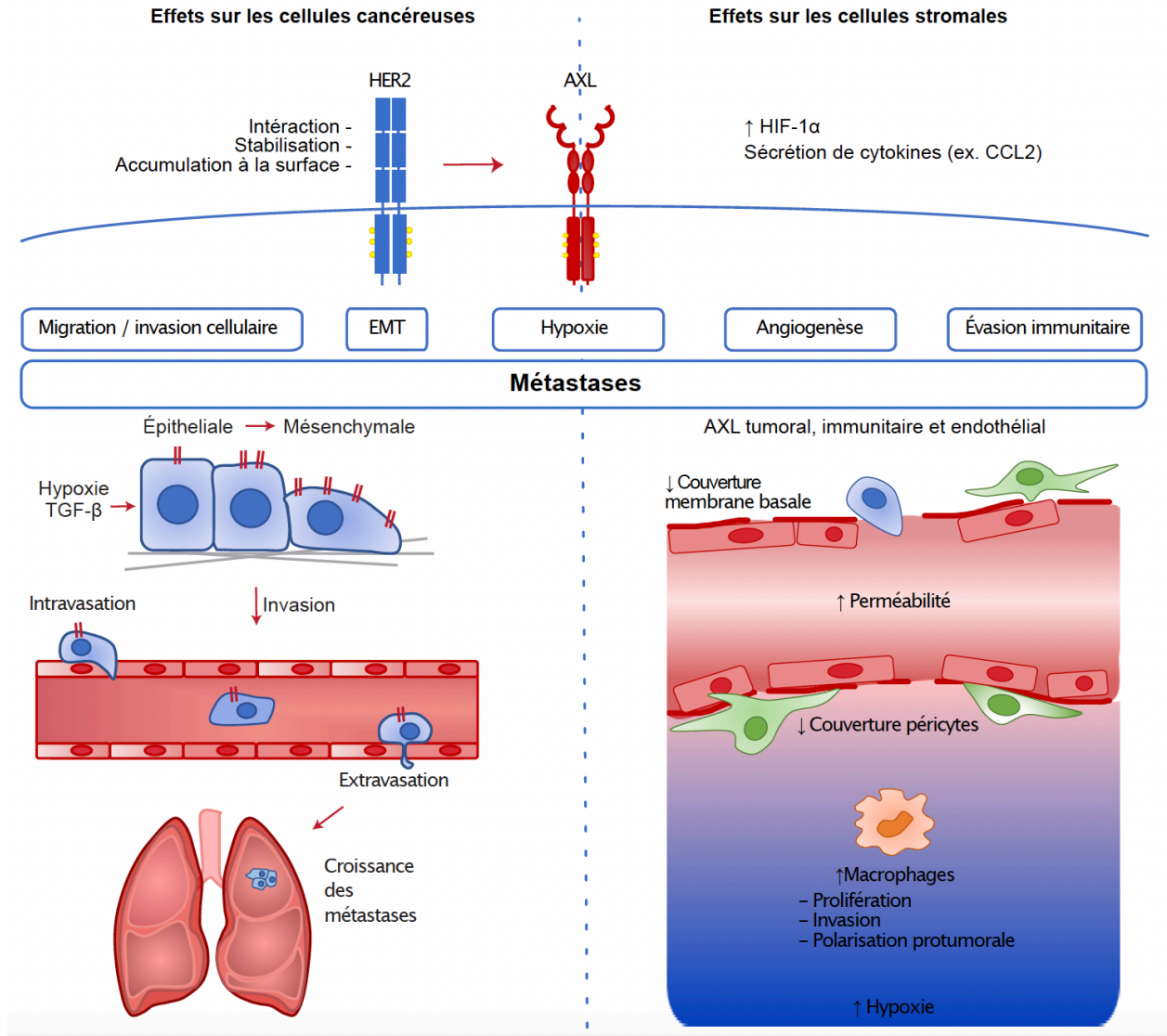


Figure 6.1. Découvertes sur le rôle d'AXL dans la progression du cancer du sein HER2⁺

Illustration des observations clés faites aux chapitres 3, 4 et 5 de cette thèse sur les différents rôles d'AXL sur les cellules cancéreuses et stromales menant à la formation de métastases. Dans les cellules HER2⁺, HER2 permet la transphosphorylation d'AXL et son interaction augmente sa stabilité et son accumulation à la surface cellulaire. L'activation d'AXL mène alors à une augmentation de la migration et de l'invasion cellulaire. Dans les cellules tumorales, l'expression d'AXL peut être augmentée en présence de TGF- β et d'hypoxie, rendant les cellules plus mésenchymales, permettant l'intravasation et l'extravasation, ainsi que la croissance au poumon. Ensuite, AXL permet une réponse hypoxique qui augmente l'angiogenèse et influence la réponse immunitaire, grâce à son rôle sur l'expression d'HIF-1 α . Aussi, par son rôle sur les cellules tumorales, immunitaires et endothéliales, le microenvironnement tumoral est dérégulé. Ceci inclut une baisse de la couverture par la membrane basale et les péricytes des vaisseaux sanguins, ainsi qu'une augmentation de la perméabilité et de l'hypoxie. De plus, il y a une plus grande infiltration de macrophages dus à une augmentation de leur prolifération et invasion par la sécrétion de CCL2 par les cellules tumorales. Ces macrophages sont aussi plus polarisés vers un phénotype protumoral.

AXL est un récepteur tyrosine kinase dont l'activation contribue à plusieurs processus biologiques tels que la migration cellulaire, la transition épithélio-mésenchymateuse, l'angiogenèse et l'inflammation. AXL a été montré comme un acteur important dans plusieurs cancers solides, incluant le cancer du sein. Son expression corrèle avec la présence de métastases et un mauvais pronostic chez les patients. Ainsi, AXL devient une cible thérapeutique avec un intérêt grandissant et plusieurs essais cliniques sont en cours. Ce récepteur tyrosine kinase est effectivement une cible idéale puisque sa délétion ou son inhibition *in vivo* ne cause pas d'effets secondaires majeurs. Malgré cet engouement, les mécanismes sous-jacents demeurent méconnus. Il est donc important de bien comprendre l'effet d'un traitement systémique anti-AXL pour découvrir d'éventuels mécanismes de résistance ou effets secondaires non désirés et même découvrir de nouvelles applications prometteuses. Au cours des études réalisées dans cette thèse, il a ainsi été possible d'apporter des connaissances quant aux rôles variés d'AXL dans la progression métastatique du cancer du sein (Figure 6.1). Ces découvertes ont alors mené à l'étude d'opportunités de traitements incluant l'utilisation de médicament déjà sur le marché comme des antipsychotiques ou à la combinaison de traitement anti-AXL avec d'autres traitements connus comme l'inhibition de HER2 et l'immunothérapie. Dans cette section, je discuterai les résultats présentés dans cette thèse en proposant des opinions, hypothèses et perspectives liés aux travaux réalisés.

Nouvelles stratégies pour le traitement du TNBC

Les cancers du sein triple-négatif (TNBC) représentent un défi clinique considérable puisqu'aucune thérapie ciblée n'est encore utilisée de routine pour ces cancers et les patients sont traités à l'aide de chimiothérapie. Ces traitements engendrent de nombreux effets secondaires et résultent souvent à de la résistance et une rechute. Conséquemment, il y a besoin criant de trouver des traitements alternatifs pour traiter ce type de cancer du sein agressif. Ainsi, la recherche pour trouver de nouveaux marqueurs moléculaires pouvant être ciblé pharmacologiquement est en cours. Dans les lignées de cancer du sein, AXL apparaît comme un marqueur du TNBC et il corrèle avec un état mésenchymale qui favorise l'invasion et la résistance aux médicaments [180, 188, 189]. De plus, l'expression d'AXL dans les tumeurs humaines est liée à un mauvais pronostic et il est essentiel pour la formation de métastases *in vivo* [189]. Ainsi, une littérature importante établis AXL comme une cible prometteuse pour le traitement du cancer du sein TNBC. D'ailleurs, l'inhibiteur d'AXL, le R428, est actuellement sous investigation dans un essai clinique de phase II pour les TNBC non opérables et métastatiques [192]. L'inhibiteur d'AXL pourrait donc bientôt être approuvé pour gérer les cancers du sein métastatique TNBC, mais sa tolérabilité et la possibilité de résistance sont encore peu décrits. La route est longue entre la découverte d'une nouvelle cible et l'utilisation de routine d'un médicament contre cette cible. Ainsi, l'utilisation de médicaments déjà approuvé pour le traitement chez l'humain permettent d'accélérer le processus et réduire les coûts liés aux développements et aux essais cliniques. En effet, le repositionnement de médicaments approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) ou autres organisations permettent d'avoir déjà accès à des données quant à leur sécurité, toxicité et propriétés pharmacologiques.

Une base de données d'expression génique provenant de cellules humaines traitées avec une variété de drogue approuvé par la FDA a alors été bâti pour permettre un criblage pharmacogénomique afin de découvrir de nouvelles utilisations à ces composés. Ainsi, au chapitre 2, nous avons utilisé la signature d'inhibition de l'expression d'AXL pour découvrir des traitements alternatifs potentiels grâce à une approche de pharmacogénomique. Notre criblage a révélé une classe d'antipsychotiques qui pouvait limiter la croissance et la progression métastatique des cellules TNBC en réduisant l'invasion cellulaire, la prolifération, la viabilité et en augmentant l'apoptose. Le mécanisme d'action sur les cellules TNBC de ces composés est par contre encore inconnu, puisque les cellules que nous avons utilisées n'exprime pas le récepteur dopaminergique

ciblé par ces drogues. Ainsi, il serait important de déterminer à quelle dose ces antipsychotiques peuvent avoir des effets anticancéreux puisqu'ils pourraient engendrer des effets secondaires importants notamment en agissant sur le cerveau qui est sensible aux antipsychotiques. Étant donné que nous avons montré que ces traitements augmentent l'efficacité de la chimiothérapie traditionnelle, l'utilisation de ces médicaments pourrait être une avenue intéressante pour réduire les doses de chimiothérapies utilisées chez les patients. Ainsi, l'utilisation de ces composés en combinaison avec la chimiothérapie de base pourrait réduire la progression métastatique et améliorer la survie des patients TNBC.

Aussi prometteuse et attrayante que puisse paraître le repositionnement de médicaments, la recherche fondamentale demeure essentielle. En effet, il est important de continuer de repousser les limites de nos connaissances pour développer de nouvelles avenues de traitements qui pourront mieux répondre aux besoins des patients et déjouer le pronostic. Principalement pour le cancer du sein triple-négatif qui n'as pas encore de traitements ciblés, la recherche de biomarqueurs et de cibles thérapeutiques restent très importante. Les thérapies ciblées sont plus puissantes, intelligentes, spécifiques et donc moins toxiques. À mon avis, l'avenir du traitement du cancer repose alors sur de la médecine ciblée et surtout personnalisée. Puisque chaque cas est différent, le développement de biomarqueurs sera essentiel pour trouver la bonne stratégie de traitement pour chaque patient. Pour les cancers du sein, la caractérisation en sous-type moléculaire a permis d'augmenter considérable l'espérance de vie au cours de dernières décennies. Par contre, même dans les cancers ayant une cible comme HER2, il y a un grand nombre de patients qui ne répondent pas ou développent une résistance aux thérapies ciblées. À cause de la grande hétérogénéité dynamique des cancers, je crois que de la co-thérapie sera nécessaire pour éviter des résistances et des rechutes. Ainsi, le repositionnement de médicaments pourra être une approche intéressante pour trouver des avenues de traitements plus accessibles et abordables qui pourront être utiliser en complément aux thérapies de précision.

Cibler AXL pour le traitement du cancer

À ce jour, plusieurs approches permettent de réduire l'activation d'AXL incluant des petites molécules inhibitrices de l'activité kinase, des anticorps monoclonaux ou des stratégies ciblant GAS6 comme un ectodomaine soluble d'AXL servant de « récepteur leurre » (permettant de trapper GAS6) ou des antagonistes de la Vitamine K (rendant GAS6 inefficace) [239, 254, 288-292]. Certaines nouvelles études ont aussi décidé d'exploiter AXL comme cible antigénique de cellule T exprimant un récepteur AXL-CAR-T [293, 294]. Par contre, AXL peut être activé de différentes façons dépendamment du contexte et il est possible que les signaux en aval d'AXL dépendent aussi de ce contexte. Par conséquent, pour cibler efficacement AXL pour le traitement de cancers métastatiques, il est important de comprendre comment AXL signale, se comporte et est activé.

Dans le but de mieux comprendre comment AXL joue un rôle important dans l'invasion et la progression métastatique, nous nous sommes demandé quels signaux spécifiques en aval d'AXL génère cette activité biologique. Les signaux documentés en aval d'AXL sont des voies de signalisation établies telles que la signalisation MAPK, JNK et ERK. Ces voies de signalisation sont également utilisées par d'autres RTK et ne sont pas suffisantes pour expliquer les activités biologiques uniques à AXL. Ainsi, au cours de mon doctorat, j'ai pu contribuer à un projet du laboratoire qui visait à répondre à cette question [174]. Dans cette étude, des cellules TNBC ont été utilisé comme modèle où l'activation d'AXL a pu être stimulée par l'ajout de GAS6. L'identification par spectrométrie de masse de protéines phosphomodulées à différent temps de stimulation a alors permis de déterminer des voies et intermédiaires de signalisations en aval d'AXL. Cette approche a donc permis de mettre en lumière le rôle d'AXL dans un processus important de la migration cellulaire, le renouvellement des points d'adhésions focales. Ce criblage pourrait révéler encore plusieurs éléments de signalisation en aval d'AXL, contribuant grandement à mieux comprendre ce récepteur et permettant de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour traiter les cancers métastatiques.

Par contre, le résultat signalétique de l'activation d'AXL pourrait fortement dépendre du contexte. Ainsi, l'approche utilisée pose la limitation que l'activation d'AXL par GAS6 était artificielle et ne représente pas exactement le contexte oncogénique des cellules TNBC. En effet, AXL est déjà fortement activé au niveau basal dans ces cellules et il a fallu retirer le sérum du

milieu pour faire la stimulation au GAS6. De plus, comme GAS6 n'est pas toujours nécessaire à l'activation d'AXL, il serait intéressant d'étudier les signaux en aval d'AXL dans différents contextes pour ainsi être en mesure de mieux le comprendre comment le cibler et découvrir de potentielles avenues de résistances.

Nos études du chapitre 3 ont révélé que la progression métastatique du cancer du sein HER2⁺ est indépendante de GAS6 dans le modèle préclinique MMTV-Neu. Par conséquent, les approches ciblant ce ligand pourraient être peu utiles dans le contexte de cancer du sein HER2⁺. Par contre, ce modèle pose la limitation qu'il développe principalement des métastases au niveau des poumons, ainsi il n'est pas exclu que GAS6 soit requis pour la formation de métastases dans d'autres organes. Par exemple, il a été montré que lors de la progression du cancer de la prostate dans les os, les ostéoblastes sécrètent du GAS6 pour activer AXL et favoriser la survie et la dormance des cellules cancéreuses [182, 183]. Comme l'os est un site fréquent de métastases du cancer du sein, ils seraient importants de comprendre si GAS6 est requis pour ce processus. De plus, dans le modèle HER2⁺, nous avons montré qu'AXL interagit physiquement avec HER2 contournant la nécessité de GAS6 pour être activé. Il est aussi possible qu'AXL n'ait pas besoin de son ligand pour être activé dans d'autres types de cancer où il pourrait simplement être surexprimé ou interagirait avec d'autres RTKs. Ainsi, plus de recherche seront requises pour préciser dans quel contexte cibler AXL via GAS6 pourrait être utilisé puisque l'activation indépendante ligand pourrait être un événement commun dans les cancers conduits par des RTKs.

De plus, certaines stratégies ciblant AXL nécessitent sa présence à la membrane cellulaire, comme l'utilisation d'anticorps monoclonaux. Par contre, la façon dont AXL est localisé et trafiqué n'est pas encore très bien définie. Pour la majorité des RTK, l'endocytose est une façon de réguler leur activation, signalisation et dégradation [295, 296]. Par exemple, pour l'EGFR, le récepteur le mieux caractérisé à ce niveau, son internalisation suite à la liaison de son ligand mène à sa dégradation ou son recyclage à la membrane pour permettre un second cycle d'activation et signalisation. De plus, celui-ci est capable d'engendrer une signalisation distincte lorsqu'il est à l'intérieur versus à la surface de la cellule et cette signalisation mène à une résistance aux traitements [297]. Pour AXL, ce domaine est encore inexploré et il serait important de s'y attarder. En fait, nos observations mènent à penser qu'AXL serait trafiqué de façon différente d'EGFR. En effet, dans le chapitre 3, des marquages contre AXL dans des cellules en culture et dans des tumeurs

humaines ont montré qu'il est présent à la membrane en petite quantité et qu'il y a un bassin important à l'intérieur de la cellule en contraste avec HER2 par exemple (Figure 3.2 et Figure 3. S3). En effet, HER2 est clairement fortement localisé à la surface des cellules dans nos marquages de tumeurs humaines. C'est d'ailleurs pour cette raison que le traitement principal le ciblant en clinique est un anticorps contre son domaine extracellulaire. En apprendre davantage sur le trafic d'AXL permettrait alors de choisir la meilleure façon de le cibler. De plus, une meilleure compréhension de son trafic et sa dégradation pourrait permettre de développer de nouvelles stratégies pour cibler AXL par exemple en modulant sa dégradation. Il est intéressant de noter que de nouvelles stratégies sont en cours de développement pour permettre d'inactiver une protéine en la dégradant [298, 299]. Environ 80% du protéome humain est considéré comme «indruggable», mais cette approche révolutionnaire permettrait de cibler ces protéines à l'aide de petites molécules pouvant détourner la machinerie de dégradation en recrutant des ubiquitine ligases E3. La technique est encore très récente, mais je crois qu'elle a beaucoup de potentiel pour élargir notre banque de cible potentiel dans le traitement du cancer en plus de constituer une nouvelle méthode thérapeutique qui serait très spécifique. Les premières études se montrent concluantes pour dégrader une grande variété de kinases, ce qui suggère qu'AXL pourrait éventuellement être cibler de cette façon.

En conclusion, il est important de mieux comprendre le comportement d'AXL pour être en mesure de choisir la meilleure stratégie pour le cibler. Nos observations suggèrent que les petites molécules inhibitrices seraient la meilleure option à ce jour puisqu'elles permettent de cibler le récepteur s'il est activé indépendamment de son ligand et s'il est localisé et signale de l'intérieur de la cellule.

AXL et HER2 : partenaires importants dans la progression métastatique

AXL a été longtemps considéré comme un marqueur de cancer du sein triple-négatif puisque ces lignées expriment fortement AXL contrairement aux autres sous-types. Par contre, nous avons pu voir dans le chapitre 3 que dans les tumeurs de patients, AXL est plutôt exprimé dans tous les sous-types, incluant le sous-type HER2⁺. Dans ce sous-type en particulier, AXL corrèle même avec des caractéristiques mésenchymales, la survie et la formation de métastases. Nos études ont donc montré que dans le cas d'AXL, les modèles cellulaires «sur plastique» ne reflètent pas la réalité clinique *in vivo*. En effet, nous avons pu voir que dans les cellules HER2⁺, qui ont majoritairement un phénotype épithélial, des signaux transformateurs comme le TGF- β ou l'hypoxie permettent d'induire l'expression d'AXL suite à une transition épithélio-mésenchymateuse. À mon avis, l'expression d'AXL refléterait donc l'état mésenchymal des cellules cancéreuses et sa capacité à former des métastases. Dans une tumeur qui est majoritairement épithéliale comme les HER2⁺, c'est une petite proportion de cellules qui seront reprogrammées par l'EMT pour entreprendre la colonisation d'organes distants [179]. Ce sont ces cellules métastatiques qui devront être ciblées pour arriver à réduire la charge métastatique mortelle. Comme AXL agit dans ce processus plastique, il est un joueur important dans la progression métastatique de ce type de cancer. Ainsi, nous avons pu nouvellement définir AXL comme cible thérapeutique intéressante pour le traitement de patients dans un contexte HER2⁺.

Nous avons montré qu'HER2 et AXL sont des partenaires importants pour la progression métastatique du cancer du sein HER2⁺. Par contre, plusieurs choses sont encore inconnues par rapport à leur interaction. Par exemple, il serait intéressant d'étudier plus en détails leur trafic, leur interaction physique ainsi que leur signalisation. Premièrement, un criblage fait dans le laboratoire de notre collaborateur Philippe Roux a identifié qu'AXL était plus fortement présent à la membrane cellulaire en présence d'HER2 (chapitre 3). Nous avons aussi montré qu'HER2 permet la stabilisation d'AXL en augmentant sa présence dans les vésicules RAB11⁺ de recyclage et en la diminuant dans les vésicules RAB7⁺ d'endosome tardif. Il a d'ailleurs été montré que la formation de dimère HER2/EGFR augmente la stabilisation de EGFR à la surface cellulaire, ce qui augmente sa signalisation oncogénique [240, 241]. Ainsi, cela pourrait être aussi le cas pour AXL lorsqu'HER2 est présent et principalement lorsqu'il est surexprimé comme dans le cancer du sein HER2⁺. Ainsi, HER2 semble stabiliser son partenaire pour diversifier sa signalisation et augmenter l'invasion cellulaire.

De cette façon, découvrir une façon de découpler ces récepteurs pourraient être une avenue intéressante de traitement. Nous avons donc eu l'idée de déterminer quelle partie de ces récepteurs pouvait médier leur interaction physique en faisant des chimères d'AXL dont nous remplaçons seulement la portion extracellulaire, transmembranaire ou intracellulaire. De cette façon, il a été possible de conclure que le domaine extracellulaire n'était pas nécessaire, mais que les domaines transmembranaire et intracellulaire individuellement étaient suffisant pour conserver une interaction avec HER2 (données non montrées). Pour faire cette expérience, le mutant Neu a été utilisé pour répliquer ce qui se passe dans notre modèle murin et qui ressemble fortement à un variant de HER2 chez l'humain dont l'expression corrèle avec une résistance au Trastuzumab et une augmentation de l'invasion [51, 52, 54]. Par contre, ce récepteur présente une délétion dans la région juxtamembranaire qui permet une homodimérisation constitutive (Figure 1.6), ce qui pourrait le rendre aussi plus accessible et «collant» pour d'autres récepteurs comme AXL. D'autres expériences seront alors nécessaires pour vérifier cette hypothèse et générer un mutant d'AXL qui ne pourrait pas interagir avec HER2/Neu. Il serait également possible de découpler AXL et HER2 en utilisant des anticorps qui empêcherait leur rapprochement, en supposant que leur interaction efficace se passe à la surface de la cellule. Nous avons d'ailleurs l'idée de cribler une banque d'anticorps contre AXL pour en trouver qui aurait cet effet. Ces outils pourraient alors, entre autres, être utilisé pour étudier les signaux spécifiques en aval d'un hétérodimère AXL-HER2 pour mieux comprendre les signaux menant à la formation de métastases et être en mesure d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

En conclusion, nous avons montré qu'HER2 peut exploiter AXL pour augmenter l'invasion cellulaire et favoriser la progression métastatique. Ainsi, nos études proposent que la combinaison de traitement anti-HER2 et anti-AXL pourraient être envisager pour cibler la croissance de la tumeur primaire tout en réduisant la progression métastatique.

AXL et l'EMT dans la progression métastatique

Au cours des études sur le rôle d'AXL dans la cellule cancéreuse, nous avons pu définir AXL comme un acteur important dans l'induction de l'EMT induit par le TGF β et par le stress hypoxique. L'EMT induit une augmentation de la migration et invasion cellulaire, ce qui suggère qu'il serait important pour la formation métastatique. Or, un débat fait rage dans la communauté puisque quelques études ont montré des évidences que l'EMT ne serait pas nécessaire pour la formation métastatique. En effet, deux études publiées simultanément dans la prestigieuse revue Nature ont émis des évidences montrant que la transition mésenchymale n'était pas nécessaire à la formation de métastases, mais que ce processus contribuerait surtout à la résistance aux drogues [100, 101]. La première faite dans un modèle de souris de cancer du pancréas mutant pour KRAS montre que la délétion des facteurs de transcription Twist ou Snail n'altère pas la progression métastatique ni la survie des souris [100]. Étant donné que l'EMT peut être induite par plusieurs facteurs de transcription, il est possible que dans ce modèle, la délétion d'un de ces facteurs n'ait pas d'influence sur le phénotype métastatique *in vivo*. Ensuite, dans le deuxième papier, les auteurs ont utilisé un modèle de souris transgénique MMTV-PyMT avec un rapporteur GFP devenant RFP sous le promoteur de *Fsp1*, un gène rapidement activé lors de l'EMT ce qui permet un traçage des cellules ayant entrepris ce processus [101, 300]. Ainsi, ils ont vu que la majorité des cellules produisant des métastases n'était pas RFP⁺, suggérant que l'EMT n'était pas requise pour la colonisation métastatique. Par contre, l'EMT n'est pas contraint à un seul marqueur, ce qui me fait me demander si les cellules suivies étaient nécessairement toutes celles ayant généré un EMT productif en termes d'invasion et métastases. D'ailleurs, comme il a été discuté dans l'introduction, plusieurs évidences montre que le TGF- β , un activateur important de l'EMT, est essentiel à la progression métastatique [94-97]. Pour conclure, à mon avis, l'EMT est complexe et n'est pas un processus qui peut être mené ou être décrit par une seule ou une poignée de molécules. De plus, ce processus est très plastique et peut montrer une variété d'état partiel, ce qui rend l'étude *in vivo* assez complexe. L'EMT peut être induite par une grande variété de signaux *in vivo* comme le traitement avec des drogues, l'hypoxie, l'inflammation ou les stresses mécaniques qui peuvent avoir des issues différentes et une combinaison de ces facteurs sont fréquentes dans une tumeur. Ainsi, il est difficile de prédire, tracer et reproduire les conditions exactes menant à l'EMT dans les tumeurs pour bien comprendre les résultats de son activation. Le débat est donc encore ouvert,

mais je ne suis pas prête à mettre de côté les décennies de recherches et évidences cliniques qui ont mené à la conclusion du rôle de l'EMT dans la progression métastatique.

Dans le chapitre 3, nous avons disséqué le rôle d'AXL au cours de la cascade métastatique et avons déterminé qu'il était requis pour l'intravasation, l'extravasation et la croissance au site secondaire. Nous pouvons d'ailleurs expliquer le rôle d'AXL lors de l'intravasation et l'extravasation grâce à son effet sur l'EMT et l'invasion des cellules tumorales. Par contre, pour ce qui est de la croissance au site métastatique, l'invasion n'est pas une caractéristique souhaitée, ce qui laisse entendre qu'AXL aurait un autre rôle à ce niveau. Comme nous avons déterminé qu'AXL corrèle avec un état mésenchymal, il est possible que son rôle réside dans une caractéristique mésenchymale autre que l'invasion. En effet, les cellules mésenchymales peuvent sécréter divers facteurs pouvant influencer les cellules les entourant [88]. Par exemple, des cellules mésenchymales AXL⁺ ont été montrées comme sécrétant du THSB2, une molécule permettant l'activation des fibroblastes dans la niche métastatique. En retour, ces fibroblastes génèrent un environnement qui favorise la plasticité des cellules cancéreuses vers un état épithélial et prolifératif [181]. Ainsi, dans notre expérience, la réduction d'expression d'AXL induite après l'arrivée dans le poumon peut diminuer l'adaptation de la niche métastatique et réduire la capacité des cellules arrivées à retourner à un état épithélial pour croître. En effet, les cellules mésenchymales ont des capacités de cellules souches et sont peu prolifératives. Ainsi, cet état cellulaire favorise la dormance, ce qui permet de poser l'hypothèse que les cellules arrivées pourraient nécessiter AXL au départ pour extravaser et remodeler la niche métastatique, mais que son expression doit être réduite plus tard pour sortir de cet état et permettre la croissance. AXL a d'ailleurs été impliqué dans la dormance au niveau de la moelle osseuse où l'activation d'AXL est soutenu par la sécrétion de GAS6 par les ostéoblastes [182, 183]. Ainsi, il est possible de poser l'hypothèse que l'effet de la délétion d'AXL pourrait avoir des résultats différents dépendamment du contexte et de la niche métastatique. Par exemple, si cette niche présente beaucoup de GAS6 permettant de préserver la signalisation d'AXL, ce qui favorise la dormance. D'ailleurs, une étude récente montre qu'inhiber AXL entraîne la sortie de dormance de cellules de myélome et conduit à leur prolifération [184].

Lors de notre expérience montrant le rôle d'AXL dans la croissance des métastases dans les poumons, nous avons diminué l'expression d'AXL rapidement après l'extravasation (2 jours), mais

que serait-il arrivé si nous l'avions fait plus d'une semaine plus tard alors que la niche métastatique était bien établie ? Il est possible alors que les métastases auraient poussé plus rapidement due à une diminution des caractéristiques mésenchymales. Ceci amène donc une question clinique importante sur l'effet d'un traitement anti-AXL. En effet, les cellules cancéreuses peuvent coloniser des organes et rester en dormance et ceci peut commencer bien avant l'apparition des premiers signes cliniques [70, 79]. Ainsi, l'inhibition d'AXL pourrait réduire une possible nouvelle colonisation métastatique, mais augmenter la résurgence de lésions prémétastatiques préexistantes et favoriser une rechute. Cette avenue reste donc à être explorée plus en détail pour bien choisir la façon d'utiliser un traitement anti-AXL. La combinaison d'un traitement anti-AXL avec une autre thérapie peut lors être utilisée pour pallier aux problèmes que pourrait causer la sortie de dormance. Ainsi, un traitement contre AXL pourrait réveiller les cellules disséminées dormantes qui pourront ensuite être plus facilement ciblées par d'autres thérapies comme la chimiothérapie, dont elles étaient résistantes dues à leur état de dormance.

En conclusion, le rôle d'AXL comme facteur influençant l'EMT et donc le statut mésenchymale des cellules tumorales peut expliquer des rôles variés tout au long de la cascade menant à la formation de métastases.

AXL, l'hypoxie et le microenvironnement tumoral

Dans une tumeur, la croissance rapide des cellules cancéreuses mène à des régions mal irriguées par les vaisseaux sanguins qui présentent une faible concentration d'oxygène. Ces zones hypoxiques influencent profondément le microenvironnement et la progression tumorale. Malheureusement, les cultures cellulaires traditionnelles ne permettent pas de récapituler ce genre d'environnement, particulièrement parce qu'elles sont faites en présence de 21% d'oxygène, ce qui ne représente pas la réalité *in vivo*. Les mécanismes hypoxiques ont d'ailleurs fait l'objet du prix Nobel de physiologie et médecine en 2019, mettant en lumière l'importance de ce processus dans l'évolution des maladies. Ainsi, la culture en hypoxie permet l'étude dans un contexte plus physiologique, ce qui est important pour bien comprendre ce qui se passe réellement dans la tumeur puisque l'hypoxie est un élément essentiel favorisant la progression tumorale.

De cette façon, il est important de comprendre le rôle d'AXL, son trafic et sa signalisation en hypoxie pour pouvoir mieux le cibler dans les zones tumorales pauvres en oxygènes où il joue un rôle important. Des pistes intéressantes ont pu être découvertes en générant l'interactome AXL en utilisant une approche de marquage dépendant de la proximité (BioID). Cette expérience a initialement été réalisée dans le cadre du chapitre 4, mais ces résultats ont été conservés pour un projet futur et ne sont malheureusement pas présentés dans cette thèse. Des cellules Flp-In T-REx Hela exprimant GFP ou AXL marquées avec miniTurbo ont été générées et soumises à une normoxie ou une hypoxie pendant 24h. 6h de biotinylation ont permis l'identification de plusieurs protéines à proximité d'AXL. Il y avait un chevauchement entre les deux conditions, mais une bonne quantité de protéines a également été spécifiquement augmentée dans l'un ou l'autre d'entre eux, ce qui suggère qu'AXL peut avoir des partenaires différents et se localiser différemment en fonction des niveaux d'oxygène. Aussi, dans les deux conditions, nous avons pu capter sans surprise des protéines liées à l'organisation du cytosquelette, à la migration cellulaire et à la réponse cellulaire au stimulus de croissance. De plus, plusieurs des protéines identifiées dans le transport endosomal et dans la dynamique des radeaux lipidiques, notamment EHD2, FLOT1, FLOT2, CAV1 et CAVIN1, ont été retrouvées plus à proximité d'AXL en hypoxie. De plus, ces protéines se sont révélées phosphomodulées en aval d'AXL dans notre précédent phosphocriblage [174]. Ceci suggère qu'AXL pourrait moduler la fonction de ces protéines et avoir un rôle dans le trafic protéique, suggérant un rôle indépendant de HIF-1 α en condition hypoxique. L'hypoxie est connue pour déréguler la localisation, l'endocytose, le recyclage et la dégradation des protéines pour

favoriser plusieurs fonctions comme la survie et la migration [301-303]. Par exemple, il a été démontré que HER2 se localise dans des radeaux lipidiques membranaires (rafts) en hypoxie où il serait moins internalisé par un mécanisme dépendant de CAV1 pour réduire sa dégradation et promouvoir sa signalisation oncogénique, ce qui constituerait un obstacle à l'efficacité d'un traitement anti-HER2 comme le T-DM1 [301, 304]. Ainsi, il est possible qu'AXL joue sur ces voies et puisse réguler le trafic de HER2 en hypoxie, ce qui expliquerait pourquoi nous observons une perte de HER2 en absence d'AXL en hypoxie. De plus, HER2 a été retrouvé à proximité d'AXL dans les deux conditions de notre criblage, suggérant que ces RTK peuvent aussi interagir ensemble en condition hypoxique pour mener à la formation de métastases.

De plus, l'effet d'une délétion d'AXL dans les cellules cancéreuses sur la réponse à un stress hypoxique a été abordé au chapitre 4 pour expliquer son rôle dans la dérégulation du microenvironnement tumoral. Ceci nous a alors permis de découvrir un nouveau rôle d'AXL dans la régulation d'expression du facteur de transcription clé à la réponse hypoxique, HIF-1 α . Il est aussi intéressant de noter que plusieurs RTK utilise la machinerie de réponse hypoxique même en normoxie. En effet, plusieurs récepteurs comme EGFR, HER2/HER3, VEGFR, MET, IGF1R et PDGFR peuvent engager la machinerie de HIF en normoxie pour conférer des avantages aux cellules cancéreuses [110]. Nous avons vu qu'AXL aussi pouvait jouer sur les niveaux de HIF-1 α en normoxie, mais cet effet était bien amplifié en conditions hypoxiques, des conditions récapitulant mieux ce qu'on observe *in vivo*. Ce nouveau signal en aval d'AXL révèle alors un rôle important pour AXL dans la dérégulation du microenvironnement, mais suggère aussi un autre mécanisme par lequel il peut affecter l'EMT et l'invasion cellulaire. Ainsi, inhiber AXL *in vivo* mène à une reprogrammation du microenvironnement tumorale et une diminution de la formation de métastases, suggérant un nouveau mécanisme d'action d'un traitement anti-AXL.

L'hypoxie mène à une grande variété de changements dans tous les types cellulaires et ces changements sont bénéfiques pour la progression tumorale. Par exemple, l'hypoxie change drastiquement le métabolisme cellulaire, génère d'avantage d'instabilité génomique, active ou amplifie des signaux oncogéniques et dérégule le microenvironnement tumoral [114, 257, 305]. Tous ces processus sont alors des voies potentielles de résistance ou d'inefficacité de traitements. Ainsi, l'hypoxie constitue une barrière à l'efficacité de plusieurs thérapies, incluant la radiothérapie, la chimiothérapie et l'immunothérapie. Puisqu'AXL est requis pour générer une

réponse hypoxique complète dans les cellules cancéreuses, l'inhibition d'AXL pourrait parvenir à générer un cadre positif pour améliorer l'efficacité d'une grande variété de traitements.

Au cours de nos études, nous avons alors décidé de vérifier l'effet de l'inhibition d'AXL dans un contexte d'immunothérapie. Effectivement, une forte proportion de patients répond faiblement à ce type de thérapie dues à une variété de mécanismes de résistances permettant l'évasion immunitaire [134, 143]. Ainsi, plusieurs experts commencent à envisager la combinaison de ces traitements avec d'autres thérapies pour améliorer leur efficacité et normaliser le microenvironnement émerge comme une solution intéressante [137, 145]. Étant donné qu'interférer avec AXL génère un microenvironnement anti-tumorale, nous avons pensé que l'utilisation d'un inhibiteur d'AXL pourrait améliorer un traitement d'immunothérapie. Ainsi, la combinaison de l'inhibiteur d'AXL et d'un traitement de point de contrôle immunitaire anti-PD-1 a été validée. Cette étude a d'ailleurs été réalisé dans le modèle préclinique de cancer du sein HER2⁺ MMTV-Neu. Il est alors intéressant de noter que l'immunothérapie émerge comme une avenue de traitement pour les patients résistants aux thérapies standards ciblant HER2. En effet, une forte proportion de patients ne répond pas aux traitements ciblant HER2 ou développe des résistances. Le développement de nouvelles approches thérapeutiques exploitant le microenvironnement tumoral, y compris l'immunothérapie, commence à être envisager pour contourner ce problème [40]. Par contre, les premiers essais cliniques combinant le Trastuzumab avec le Pembrolizumab (anti-PD-1) se révèlent peu concluant pour l'instant et suggère qu'une meilleure classification des patients selon leur statue PD-L1 pourrait prédire un effet positif [42]. L'inhibition d'AXL réduit l'expression de PD-L1 dans nos modèles et d'autres [265, 267], en plus de générer un microenvironnement anti-tumoral, ce qui suggère que l'inhibition d'AXL pourrait être bénéfique dans ce contexte. Il est alors possible d'imaginer qu'une trithérapie ciblant AXL-HER2-PD-1 pourrait améliorer la réponse et la survie des patients résistants.

Ainsi, le nouveau rôle d'AXL découvert dans la réponse hypoxique amène une rationnelle pour utiliser un traitement ciblant AXL dans un contexte d'immunothérapie, mais apporte aussi de nouveaux mécanismes par lequel AXL contribue à la progression métastatique en dérégulant le microenvironnement.

AXL dans le stroma

Pour clore cette thèse, une étude préliminaire des rôles d'AXL dans les cellules stromales a été entamée. Comme l'expression d'AXL est ubiquitaire, il est fort possible qu'il joue un rôle dans plusieurs cellules supportant la progression tumorale et métastatique autre que les cellules cancéreuses elles-mêmes. D'ailleurs, l'infiltration immunitaire des tumeurs des souris $Neu^+ : Axl^{-/}$ et $NIC^+ : Axl^{flox/flox}$ n'est pas similaire, ce qui suggère que la délétion d'AXL ailleurs que dans les cellules tumorales joue un rôle (Chapitre 4, Figure 4.1 et 4.2). Par exemple, contrairement aux tumeurs $NIC^+ : Axl^{flox/flox}$, les tumeurs $Neu^+ : Axl^{-/}$ montre une différence au niveau des cellules Treg, cellules B et cellules NK activés où AXL a été montré jouer un rôle [292, 306, 307]. Par contre, l'effet de la délétion d'AXL dans ces compartiments est encore méconnu, surtout dans un contexte de progression cancéreuse.

Les expériences du chapitre 5 ont permis de déterminer que l'expression d'AXL dans des cellules stromales, incluant les cellules immunitaires et les cellules endothéliales, avaient une incidence sur la progression tumorale et métastatique. Effectivement, l'activation d'AXL dans les cellules stromales du site primaire ou des sites secondaires (comme les niches métastatiques) permettrait de supporter les cellules tumorales. Plusieurs méthodes émergentes comme le «single cell sequencing» et ces dérivés pourront être utile pour mieux comprendre la contribution du AXL stromale. Grâce à ces méthodes, il sera possible de déterminer l'impact sur l'expression génique de l'inhibition d'AXL ou de sa délétion dans des compartiments spécifiques pour chaque type cellulaire d'une tumeur *in vivo* individuellement, comme les macrophages ou les cellules endothéliales. Dans le contexte où l'inhibition systémique d'AXL est envisagée pour traiter les cancers métastatiques, il est important d'avoir une meilleure idée de l'effet d'un tel traitement sur les cellules non tumorales pour découvrir d'éventuels mécanismes de résistance ou effets secondaires non désirés. Une étude de l'expression d'AXL et ces rôles dans tous les types cellulaires supportant la progression tumorale pourraient même éventuellement permettre d'utiliser AXL comme biomarqueur. En effet, déterminer l'expression d'AXL dans divers types cellulaires pourrait permettre d'extrapoler une réponse à un traitement donnée et orienter l'approche thérapeutique des patients.

Conclusion

Au cours de cette thèse, plusieurs rôles d'AXL à divers niveaux du processus métastatique ont pu être mis en lumière et des opportunités de traitements ont pu être proposées basées sur ces découvertes. Premièrement, étant donné qu'AXL est une cible déjà établie dans le cancer du sein TNBC, l'utilisation de la signature de délétion d'AXL a permis d'identifier une opportunité de traitement qui pourrait permettre d'offrir une option pour ces cancers agressifs où des traitements ciblés font défaut. Par la suite, nous avons découvert qu'AXL est exprimé dans tous les sous-types de cancer du sein, incluant le sous-type HER2⁺, où son expression corrèle avec des caractéristiques mésenchymales, le développement de métastases et la survie des patients. Dans un modèle préclinique de cancer du sein HER2⁺ nous avons alors montré qu'AXL est essentiel dans la progression métastatique et qu'il est requis à plusieurs étapes de la cascade métastatique grâce à son rôle de partenaire de HER2 qui favorise l'invasion cellulaire. Ainsi, ces travaux proposent de co-cibler AXL et HER2 pour améliorer le pronostic des patients atteints. De plus, nous avons décrit un rôle nouveau pour AXL dans la réponse hypoxique menant à une dérégulation du microenvironnement incluant une promotion anormale de l'angiogenèse, une diminution de la réponse immunitaire antitumorale et une augmentation des métastases. Ainsi, l'inhibition d'AXL permet de générer un environnement idéal à la réponse d'un traitement immunothérapie anti-PD-1. Pour terminer, nous avons aussi pu déterminer que l'expression d'AXL dans les cellules stromales est aussi importante pour la progression métastatique, suggérant un mécanisme d'action additionnel de l'inhibition systémique d'AXL. Ainsi, ceci met en évidence l'importance des avancées des connaissances translationnelles réalisées au cours de cette thèse pour mieux comprendre le rôle d'AXL dans le processus métastatique et utiliser ces connaissances à des fins thérapeutiques. En effet, AXL apparaît comme une cible prometteuse pour réduire la progression métastatique du cancer du sein et améliorer l'efficacité de divers traitements connus. Ainsi, son inhibition pourrait permettre d'améliorer la survie et la qualité de vie des patients atteints de cette maladie complexe.

Références bibliographiques

1. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
2. Hanahan, D., *Hallmarks of Cancer: New Dimensions*. Cancer Discovery, 2022. **12**(1): p. 31-46.
3. Lambert, A.W., D.R. Pattabiraman, and R.A. Weinberg, *Emerging Biological Principles of Metastasis*. Cell, 2017. **168**(4): p. 670-691.
4. Tabassum, D.P. and K. Polyak, *Tumorigenesis: it takes a village*. Nat Rev Cancer, 2015. **15**(8): p. 473-83.
5. Wiederschain, D., et al., *Single-vector inducible lentiviral RNAi system for oncology target validation*. Cell Cycle, 2009. **8**(3): p. 498-504.
6. Visvader, J.E. and J. Stingl, *Mammary stem cells and the differentiation hierarchy: current status and perspectives*. Genes Dev, 2014. **28**(11): p. 1143-58.
7. Visvader, J.E., *Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis*. Genes Dev, 2009. **23**(22): p. 2563-77.
8. Vargo-Gogola, T. and J.M. Rosen, *Modelling breast cancer: one size does not fit all*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(9): p. 659-72.
9. Makki, J., *Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance*. Clin Med Insights Pathol, 2015. **8**: p. 23-31.
10. Paget, S., *The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889*. Cancer Metastasis Rev, 1889. **8**(2): p. 98-101.
11. Lim, B. and G.N. Hortobagyi, *Current challenges of metastatic breast cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2016. **35**(4): p. 495-514.
12. Fadoukhaïr, Z., et al., *Evaluation of targeted therapies in advanced breast cancer: the need for large-scale molecular screening and transformative clinical trial designs*. Oncogene, 2016. **35**(14): p. 1743-9.
13. Waks, A.G. and E.P. Winer, *Breast Cancer Treatment: A Review*. Jama, 2019. **321**(3): p. 288-300.
14. Harbeck, N. and M. Gnant, *Breast cancer*. Lancet, 2017. **389**(10074): p. 1134-1150.
15. Al-Mahmood, S., et al., *Metastatic and triple-negative breast cancer: challenges and treatment options*. Drug Deliv Transl Res, 2018. **8**(5): p. 1483-1507.
16. Ullrich, A. and J. Schlessinger, *Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity*. Cell, 1990. **61**(2): p. 203-12.
17. Lemmon, M.A. and J. Schlessinger, *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. Cell, 2010. **141**(7): p. 1117-34.
18. Fleuren, E.D., et al., *The kinome 'at large' in cancer*. Nat Rev Cancer, 2016. **16**(2): p. 83-98.
19. Du, Z. and C.M. Lovly, *Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer*. Mol Cancer, 2018. **17**(1): p. 58.
20. Drake, J.M., J.K. Lee, and O.N. Witte, *Clinical targeting of mutated and wild-type protein tyrosine kinases in cancer*. Mol Cell Biol, 2014. **34**(10): p. 1722-32.
21. Lai, A.Z., J.V. Abella, and M. Park, *Crosstalk in Met receptor oncogenesis*. Trends Cell Biol, 2009. **19**(10): p. 542-51.

22. van der Veecken, J., et al., *Crosstalk between epidermal growth factor receptor- and insulin-like growth factor-1 receptor signaling: implications for cancer therapy*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2009. **9**(6): p. 748-60.
23. Yamaguchi, H., et al., *Signaling cross-talk in the resistance to HER family receptor targeted therapy*. *Oncogene*, 2014. **33**(9): p. 1073-1081.
24. Yarden, Y. and G. Pines, *The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology*. *Nat Rev Cancer*, 2012. **12**(8): p. 553-63.
25. Russo, A., et al., *Heterogeneous Responses to Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Tyrosine Kinase Inhibitors (TKIs) in Patients with Uncommon EGFR Mutations: New Insights and Future Perspectives in this Complex Clinical Scenario*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(6).
26. Westover, D., et al., *Mechanisms of acquired resistance to first- and second-generation EGFR tyrosine kinase inhibitors*. *Ann Oncol*, 2018. **29**(suppl_1): p. i10-i19.
27. Scalvini, L., et al., *Fighting tertiary mutations in EGFR-driven lung-cancers: Current advances and future perspectives in medicinal chemistry*. *Biochem Pharmacol*, 2021. **190**: p. 114643.
28. Siegel, P.M., et al., *Elevated expression of activated forms of Neu/ErbB-2 and ErbB-3 are involved in the induction of mammary tumors in transgenic mice: implications for human breast cancer*. *EMBO J*, 1999. **18**(8): p. 2149-64.
29. Moasser, M.M., *The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis*. *Oncogene*, 2007. **26**(45): p. 6469-87.
30. Holbro, T. and N.E. Hynes, *ErbB Receptors: Directing Key Signaling Networks Throughout Life*. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2004. **44**(1): p. 195-217.
31. Vu, T. and F.X. Claret, *Trastuzumab: updated mechanisms of action and resistance in breast cancer*. *Front Oncol*, 2012. **2**: p. 62.
32. Mukohara, T., *Mechanisms of resistance to anti-human epidermal growth factor receptor 2 agents in breast cancer*. *Cancer Sci*, 2011. **102**(1): p. 1-8.
33. Rye, I.H., et al., *Intratumor heterogeneity defines treatment-resistant HER2+ breast tumors*. *Mol Oncol*, 2018. **12**(11): p. 1838-1855.
34. Pernas, S. and S.M. Tolaney, *HER2-positive breast cancer: new therapeutic frontiers and overcoming resistance*. *Ther Adv Med Oncol*, 2019. **11**: p. 1758835919833519.
35. Wehrman, T.S., et al., *A system for quantifying dynamic protein interactions defines a role for Herceptin in modulating ErbB2 interactions*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006. **103**(50): p. 19063-19068.
36. Shattuck, D.L., et al., *Met Receptor Contributes to Trastuzumab Resistance of Her2-Overexpressing Breast Cancer Cells*. *Cancer Research*, 2008. **68**(5): p. 1471-1477.
37. Lu, Y., et al., *Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin)*. *J Natl Cancer Inst*, 2001. **93**(24): p. 1852-7.
38. Goel, S., et al., *Overcoming Therapeutic Resistance in HER2-Positive Breast Cancers with CDK4/6 Inhibitors*. *Cancer Cell*, 2016. **29**(3): p. 255-69.
39. Goel, S., et al., *CDK4/6 Inhibition in Cancer: Beyond Cell Cycle Arrest*. *Trends Cell Biol*, 2018. **28**(11): p. 911-925.
40. Costa, R.L.B. and B.J. Czerniecki, *Clinical development of immunotherapies for HER2+ breast cancer: a review of HER2-directed monoclonal antibodies and beyond*. *npj Breast Cancer*, 2020. **6**(1): p. 10.

41. Killock, D., *Pembrolizumab for HER2+ gastric cancer*. Nature Reviews Clinical Oncology, 2022. **19**(3): p. 150-150.
42. Loi, S., et al., *Pembrolizumab plus trastuzumab in trastuzumab-resistant, advanced, HER2-positive breast cancer (PANACEA): a single-arm, multicentre, phase 1b-2 trial*. Lancet Oncol, 2019. **20**(3): p. 371-382.
43. Fantozzi, A. and G. Christofori, *Mouse models of breast cancer metastasis*. Breast Cancer Res, 2006. **8**(4): p. 212.
44. Kim, I.S. and S.H. Baek, *Mouse models for breast cancer metastasis*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **394**(3): p. 443-7.
45. Dobrolecki, L.E., et al., *Patient-derived xenograft (PDX) models in basic and translational breast cancer research*. Cancer Metastasis Rev, 2016. **35**(4): p. 547-573.
46. Bruna, A., et al., *A Biobank of Breast Cancer Explants with Preserved Intra-tumor Heterogeneity to Screen Anticancer Compounds*. Cell, 2016. **167**(1): p. 260-274 e22.
47. Muller, W.J., et al., *Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene*. Cell, 1988. **54**(1): p. 105-15.
48. Ursini-Siegel, J., et al., *Insights from transgenic mouse models of ERBB2-induced breast cancer*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(5): p. 389-97.
49. Hutchinson, J.N. and W.J. Muller, *Transgenic mouse models of human breast cancer*. Oncogene, 2000. **19**(53): p. 6130-7.
50. Treisman, R., et al., *Transformation of rat cells by an altered polyoma virus genome expressing only the middle-T protein*. Nature, 1981. **292**(5824): p. 595-600.
51. Kwong, K.Y. and M.C. Hung, *A novel splice variant of HER2 with increased transformation activity*. Mol Carcinog, 1998. **23**(2): p. 62-8.
52. Turpin, J., et al., *The ErbB2DeltaEx16 splice variant is a major oncogenic driver in breast cancer that promotes a pro-metastatic tumor microenvironment*. Oncogene, 2016. **35**(47): p. 6053-6064.
53. Wada, R., S. Yagihashi, and Z. Naito, *mRNA expression of delta-HER2 and its clinicopathological correlation in HER2-overexpressing breast cancer*. Mol Med Rep, 2016. **14**(6): p. 5104-5110.
54. Mitra, D., et al., *An oncogenic isoform of HER2 associated with locally disseminated breast cancer and trastuzumab resistance*. Mol Cancer Ther, 2009. **8**(8): p. 2152-62.
55. Ursini-Siegel, J., et al., *ShcA signalling is essential for tumour progression in mouse models of human breast cancer*. EMBO J, 2008. **27**(6): p. 910-20.
56. Moody, S.E., et al., *Conditional activation of Neu in the mammary epithelium of transgenic mice results in reversible pulmonary metastasis*. Cancer Cell, 2002. **2**(6): p. 451-61.
57. Celia-Terrassa, T. and Y. Kang, *Distinctive properties of metastasis-initiating cells*. Genes Dev, 2016. **30**(8): p. 892-908.
58. Gomez-Cuadrado, L., et al., *Mouse models of metastasis: progress and prospects*. Dis Model Mech, 2017. **10**(9): p. 1061-1074.
59. Valastyan, S. and R.A. Weinberg, *Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms*. Cell, 2011. **147**(2): p. 275-92.
60. Kedrin, D., et al., *Cell motility and cytoskeletal regulation in invasion and metastasis*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2007. **12**(2-3): p. 143-52.

61. Lauffenburger, D.A. and A.F. Horwitz, *Cell migration: a physically integrated molecular process*. Cell, 1996. **84**(3): p. 359-69.
62. Ridley, A.J., et al., *Cell migration: integrating signals from front to back*. Science, 2003. **302**(5651): p. 1704-9.
63. Wirtz, D., K. Konstantopoulos, and P.C. Searson, *The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(7): p. 512-22.
64. Friedl, P. and K. Wolf, *Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model*. Journal of Cell Biology, 2009. **188**(1): p. 11-19.
65. Dive, C. and G. Brady, *SnapShot: Circulating Tumor Cells*. Cell, 2017. **168**(4): p. 742-742 e1.
66. Friedl, P. and D. Gilmour, *Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2009. **10**(7): p. 445-457.
67. Cheung, K.J., et al., *Collective invasion in breast cancer requires a conserved basal epithelial program*. Cell, 2013. **155**(7): p. 1639-51.
68. Reymond, N., B.B. d'Agua, and A.J. Ridley, *Crossing the endothelial barrier during metastasis*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(12): p. 858-70.
69. Massague, J. and A.C. Obenauf, *Metastatic colonization by circulating tumour cells*. Nature, 2016. **529**(7586): p. 298-306.
70. Sosa, M.S., P. Bragado, and J.A. Aguirre-Ghiso, *Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(9): p. 611-22.
71. Giancotti, F.G., *Mechanisms governing metastatic dormancy and reactivation*. Cell, 2013. **155**(4): p. 750-64.
72. Prunier, C., et al., *TGF-beta Family Signaling Pathways in Cellular Dormancy*. Trends Cancer, 2019. **5**(1): p. 66-78.
73. Psaila, B. and D. Lyden, *The metastatic niche: adapting the foreign soil*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(4): p. 285-93.
74. Fidler, I.J., *The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited*. Nature Reviews Cancer, 2003. **3**(6): p. 453-458.
75. Liu, Y. and X. Cao, *Characteristics and Significance of the Pre-metastatic Niche*. Cancer Cell, 2016. **30**(5): p. 668-681.
76. Linde, N., et al., *Macrophages orchestrate breast cancer early dissemination and metastasis*. Nature Communications, 2018. **9**(1): p. 21.
77. Harper, K.L., et al., *Mechanism of early dissemination and metastasis in Her2+ mammary cancer*. Nature, 2016.
78. Klein, C.A., *Cancer progression and the invisible phase of metastatic colonization*. Nature Reviews Cancer, 2020. **20**(11): p. 681-694.
79. Hosseini, H., et al., *Early dissemination seeds metastasis in breast cancer*. Nature, 2016.
80. Yang, J., et al., *Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020. **21**(6): p. 341-352.
81. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 442-54.
82. Nieto, M.A., et al., *Emt: 2016*. Cell, 2016. **166**(1): p. 21-45.
83. Acloque, H., et al., *Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1438-49.

84. Shibue, T. and R.A. Weinberg, *EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications*. Nat Rev Clin Oncol, 2017.
85. Nicola Aceto, M.T., Shyamala Maheswaran, and Daniel A. Haber, *En Route to Metastasis: Circulating Tumor Cell Clusters and Epithelial-to-Mesenchymal Transition*. Trends in Cancer, 2015. **Vol. 1, No. 1**.
86. Ye, X., et al., *Distinct EMT programs control normal mammary stem cells and tumour-initiating cells*. Nature, 2015. **525**(7568): p. 256-60.
87. Yu, M., et al., *Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition*. Science, 2013. **339**(6119): p. 580-4.
88. Suarez-Carmona, M., et al., *EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression*. Mol Oncol, 2017. **11**(7): p. 805-823.
89. Massagué, J., *TGF β in cancer*. Cell 2008.
90. Batlle, E. and J. Massague, *Transforming Growth Factor-beta Signaling in Immunity and Cancer*. Immunity, 2019. **50**(4): p. 924-940.
91. French, R., Y. Feng, and S. Pauklin, *Targeting TGF β Signalling in Cancer: Toward Context-Specific Strategies*. Trends Cancer, 2020. **6**(7): p. 538-540.
92. Padua, D. and J. Massague, *Roles of TGF β in metastasis*. Cell Res, 2009. **19**(1): p. 89-102.
93. Muraoka, R.S., et al., *Increased malignancy of Neu-induced mammary tumors overexpressing active transforming growth factor beta1*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(23): p. 8691-703.
94. Siegel, P.M., et al., *Transforming growth factor beta signaling impairs Neu-induced mammary tumorigenesis while promoting pulmonary metastasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8430-5.
95. Giampieri, S., et al., *Localized and reversible TGF β signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(11): p. 1287-96.
96. Oshimori, N., D. Oristian, and E. Fuchs, *TGF-beta promotes heterogeneity and drug resistance in squamous cell carcinoma*. Cell, 2015. **160**(5): p. 963-976.
97. Labelle, M., S. Begum, and R.O. Hynes, *Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis*. Cancer Cell, 2011. **20**(5): p. 576-90.
98. Mariathasan, S., et al., *TGF β attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells*. Nature, 2018. **554**(7693): p. 544-548.
99. De Wever, O. and M. Mareel, *Role of tissue stroma in cancer cell invasion*. J Pathol, 2003. **200**(4): p. 429-47.
100. Zheng, X., et al., *Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer*. Nature, 2015. **527**(7579): p. 525-530.
101. Fischer, K.R., et al., *Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance*. Nature, 2015. **527**(7579): p. 472-6.
102. Quail, D.F. and J.A. Joyce, *Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis*. Nat Med, 2013. **19**(11): p. 1423-37.
103. Friedl, P. and S. Alexander, *Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity*. Cell, 2011. **147**(5): p. 992-1009.

104. Valkenburg, K.C., A.E. de Groot, and K.J. Pienta, *Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy*. Nat Rev Clin Oncol, 2018. **15**(6): p. 366-381.
105. Rodrigues, J., et al., *3D In Vitro Model (R)evolution: Unveiling Tumor-Stroma Interactions*. Trends Cancer, 2021. **7**(3): p. 249-264.
106. Rankin, E.B., J.M. Nam, and A.J. Giaccia, *Hypoxia: Signaling the Metastatic Cascade*. Trends Cancer, 2016. **2**(6): p. 295-304.
107. Schindl, M., et al., *Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is associated with an unfavorable prognosis in lymph node-positive breast cancer*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(6): p. 1831-7.
108. Huang, L.E., et al., *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.
109. Lee, J.W., et al., *Hypoxia signaling in human diseases and therapeutic targets*. Exp Mol Med, 2019. **51**(6): p. 68.
110. Gluck, A.A., et al., *Interplay between receptor tyrosine kinases and hypoxia signaling in cancer*. Int J Biochem Cell Biol, 2015. **62**: p. 101-14.
111. Kietzmann, T., D. Mennerich, and E.Y. Dimova, *Hypoxia-Inducible Factors (HIFs) and Phosphorylation: Impact on Stability, Localization, and Transactivity*. Front Cell Dev Biol, 2016. **4**: p. 11.
112. Laughner, E., et al., *HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(12): p. 3995-4004.
113. Rankin, E.B. and A.J. Giaccia, *Hypoxic control of metastasis*. Science, 2016. **352**(6282): p. 175-80.
114. Schito, L. and G.L. Semenza, *Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Cancer Progression*. Trends Cancer, 2016. **2**(12): p. 758-770.
115. Zhang, H., et al., *HIF-1-dependent expression of angiopoietin-like 4 and L1CAM mediates vascular metastasis of hypoxic breast cancer cells to the lungs*. Oncogene, 2012. **31**(14): p. 1757-1770.
116. Rohwer, N., et al., *Hypoxia-Inducible Factor 1 α Mediates Anoikis Resistance via Suppression of $\alpha 5$ Integrin*. Cancer Research, 2008. **68**(24): p. 10113-10120.
117. Wong, C.C.-L., et al., *Inhibitors of hypoxia-inducible factor 1 block breast cancer metastatic niche formation and lung metastasis*. Journal of Molecular Medicine, 2012. **90**(7): p. 803-815.
118. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases*. Nat Rev Drug Discov, 2011. **10**(6): p. 417-27.
119. Morikawa, S., et al., *Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors*. Am J Pathol, 2002. **160**(3): p. 985-1000.
120. Dewhirst, M.W. and T.W. Secomb, *Transport of drugs from blood vessels to tumour tissue*. Nat Rev Cancer, 2017. **17**(12): p. 738-750.
121. Sennino, B. and D.M. McDonald, *Controlling escape from angiogenesis inhibitors*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(10): p. 699-709.
122. Jain, R.K., *Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy*. Science, 2005. **307**(5706): p. 58-62.

123. Jain, R.K., *Antiangiogenesis strategies revisited: from starving tumors to alleviating hypoxia*. *Cancer Cell*, 2014. **26**(5): p. 605-22.
124. Munn, L.L. and R.K. Jain, *Vascular regulation of antitumor immunity*. *Science*, 2019. **365**(6453): p. 544-545.
125. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis*. *Nature*, 2011. **473**(7347): p. 298-307.
126. Zheng, X., et al., *Increased vessel perfusion predicts the efficacy of immune checkpoint blockade*. *J Clin Invest*, 2018. **128**(5): p. 2104-2115.
127. Huang, Y., et al., *Vascular normalization as an emerging strategy to enhance cancer immunotherapy*. *Cancer Res*, 2013. **73**(10): p. 2943-8.
128. Park, J.S., et al., *Normalization of Tumor Vessels by Tie2 Activation and Ang2 Inhibition Enhances Drug Delivery and Produces a Favorable Tumor Microenvironment*. *Cancer Cell*, 2016. **30**(6): p. 953-967.
129. Schmittnaegel, M. and M. De Palma, *Reprogramming Tumor Blood Vessels for Enhancing Immunotherapy*. *Trends Cancer*, 2017. **3**(12): p. 809-812.
130. Palucka, A.K. and L.M. Coussens, *The Basis of Oncoimmunology*. *Cell*, 2016. **164**(6): p. 1233-47.
131. Murdoch, C., et al., *The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis*. *Nat Rev Cancer*, 2008. **8**(8): p. 618-31.
132. De Palma, M., D. Biziato, and T.V. Petrova, *Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis*. *Nat Rev Cancer*, 2017. **17**(8): p. 457-474.
133. Gil Del Alcazar, C.R., M. Alečković, and K. Polyak, *Immune Escape during Breast Tumor Progression*. *Cancer Immunology Research*, 2020. **8**(4): p. 422-427.
134. Sharma, P., et al., *Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy*. *Cell*, 2017. **168**(4): p. 707-723.
135. Waldman, A.D., J.M. Fritz, and M.J. Lenardo, *A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice*. *Nature Reviews Immunology*, 2020. **20**(11): p. 651-668.
136. Palazon, A., et al., *HIF transcription factors, inflammation, and immunity*. *Immunity*, 2014. **41**(4): p. 518-28.
137. Noman, M.Z., et al., *Improving Cancer Immunotherapy by Targeting the Hypoxic Tumor Microenvironment: New Opportunities and Challenges*. *Cells*, 2019. **8**(9).
138. Vermaelen, K., *Vaccine Strategies to Improve Anti-cancer Cellular Immune Responses*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 8.
139. Labanieh, L., R.G. Majzner, and C.L. Mackall, *Programming CAR-T cells to kill cancer*. *Nat Biomed Eng*, 2018. **2**(6): p. 377-391.
140. Li, B., H.L. Chan, and P. Chen, *Immune Checkpoint Inhibitors: Basics and Challenges*. *Curr Med Chem*, 2019. **26**(17): p. 3009-3025.
141. Doroshow, D.B., et al., *PD-L1 as a biomarker of response to immune-checkpoint inhibitors*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021.
142. Ayoub, N.M., K.M. Al-Shami, and R.J. Yaghan, *Immunotherapy for HER2-positive breast cancer: recent advances and combination therapeutic approaches*. *Breast cancer (Dove Medical Press)*, 2019. **11**: p. 53-69.
143. Horn, L.A., K. Fousek, and C. Palena, *Tumor Plasticity and Resistance to Immunotherapy*. *Trends Cancer*, 2020. **6**(5): p. 432-441.

144. Fukumura, D., et al., *Enhancing cancer immunotherapy using antiangiogenics: opportunities and challenges*. Nat Rev Clin Oncol, 2018. **15**(5): p. 325-340.
145. Chouaib, S., et al., *Hypoxic stress: obstacles and opportunities for innovative immunotherapy of cancer*. Oncogene, 2017. **36**(4): p. 439-445.
146. Emens, L.A., *Immunotherapy in Triple-Negative Breast Cancer*. Cancer J, 2021. **27**(1): p. 59-66.
147. Emens, L.A., *Breast Cancer Immunotherapy: Facts and Hopes*. Clin Cancer Res, 2018. **24**(3): p. 511-520.
148. Stagg, J., et al., *Anti-HER2 mAb therapy requires type I and II interferons and synergizes with anti-PD-1 or anti-CD137 mAb therapy*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(17): p. 7142-7147.
149. Kreutzfeldt, J., et al., *The trastuzumab era: current and upcoming targeted HER2+ breast cancer therapies*. Am J Cancer Res, 2020. **10**(4): p. 1045-1067.
150. Arab, A., R. Yazdian-Robati, and J. Behravan, *HER2-Positive Breast Cancer Immunotherapy: A Focus on Vaccine Development*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2020. **68**(1): p. 2.
151. Adams, S., et al., *Current Landscape of Immunotherapy in Breast Cancer: A Review*. JAMA Oncology, 2019. **5**(8): p. 1205-1214.
152. Qian, B.Z. and J.W. Pollard, *Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis*. Cell, 2010. **141**(1): p. 39-51.
153. Yang, M., et al., *Diverse Functions of Macrophages in Different Tumor Microenvironments*. Cancer Res, 2018. **78**(19): p. 5492-5503.
154. Franklin, R.A., et al., *The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages*. Science, 2014. **344**(6186): p. 921-5.
155. De Palma, M. and C.E. Lewis, *Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies*. Cancer Cell, 2013. **23**(3): p. 277-86.
156. Laoui, D., et al., *Tumor hypoxia does not drive differentiation of tumor-associated macrophages but rather fine-tunes the M2-like macrophage population*. Cancer Res, 2014. **74**(1): p. 24-30.
157. Casazza, A., et al., *Impeding macrophage entry into hypoxic tumor areas by Sema3A/Nrp1 signaling blockade inhibits angiogenesis and restores antitumor immunity*. Cancer Cell, 2013. **24**(6): p. 695-709.
158. Ke, X., et al., *Hypoxia modifies the polarization of macrophages and their inflammatory microenvironment, and inhibits malignant behavior in cancer cells*. Oncol Lett, 2019. **18**(6): p. 5871-5878.
159. DeNardo, D.G. and B. Ruffell, *Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy*. Nature Reviews Immunology, 2019.
160. Harney, A.S., et al., *Real-Time Imaging Reveals Local, Transient Vascular Permeability, and Tumor Cell Intravasation Stimulated by TIE2^{hi} Macrophage-Derived VEGFA*. Cancer Discovery, 2015. **5**(9): p. 932-943.
161. Patsialou, A., et al., *Invasion of human breast cancer cells in vivo requires both paracrine and autocrine loops involving the colony-stimulating factor-1 receptor*. Cancer Res, 2009. **69**(24): p. 9498-506.
162. Arwert, E.N., et al., *A Unidirectional Transition from Migratory to Perivascular Macrophage Is Required for Tumor Cell Intravasation*. Cell Rep, 2018. **23**(5): p. 1239-1248.

163. De Palma, M. and R.K. Jain, *CD4+ T Cell Activation and Vascular Normalization: Two Sides of the Same Coin?* *Immunity*, 2017. **46**(5): p. 773-775.
164. Tian, L., et al., *Mutual regulation of tumour vessel normalization and immunostimulatory reprogramming.* *Nature*, 2017. **544**(7649): p. 250-254.
165. Halmos, B. and E.B. Haura, *New twists in the AXL(e) of tumor progression.* *Sci Signal*, 2016. **9**(448): p. fs14.
166. Hafizi, S. and B. Dahlback, *Signalling and functional diversity within the Axl subfamily of receptor tyrosine kinases.* *Cytokine Growth Factor Rev*, 2006. **17**(4): p. 295-304.
167. Allen, M.P., et al., *Adhesion-related kinase repression of gonadotropin-releasing hormone gene expression requires Rac activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway.* *J Biol Chem*, 2002. **277**(41): p. 38133-40.
168. Dunne, P.D., et al., *AXL is a key regulator of inherent and chemotherapy-induced invasion and predicts a poor clinical outcome in early-stage colon cancer.* *Clin Cancer Res*, 2014. **20**(1): p. 164-75.
169. Giles, K.M., et al., *Axl mediates acquired resistance of head and neck cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib.* *Mol Cancer Ther*, 2013. **12**(11): p. 2541-58.
170. Linger, R.M., et al., *TAM receptor tyrosine kinases: biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer.* *Adv Cancer Res*, 2008. **100**: p. 35-83.
171. Yang, B., et al., *Mechanosensing Controlled Directly by Tyrosine Kinases.* *Nano Lett*, 2016. **16**(9): p. 5951-61.
172. Rea, K., et al., *Novel Axl-driven signaling pathway and molecular signature characterize high-grade ovarian cancer patients with poor clinical outcome.* *Oncotarget*, 2015. **6**(31): p. 30859-75.
173. Abu-Thuraia, A., et al., *Axl phosphorylates Elmo scaffold proteins to promote Rac activation and cell invasion.* *Mol Cell Biol*, 2015. **35**(1): p. 76-87.
174. Abu-Thuraia, A., et al., *AXL confers cell migration and invasion by hijacking a PEAK1-regulated focal adhesion protein network.* *Nat Commun*, 2020. **11**(1): p. 3586.
175. Rankin, E.B., et al., *Direct regulation of GAS6/AXL signaling by HIF promotes renal metastasis through SRC and MET.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(37): p. 13373-8.
176. Goyette, M.A., et al., *Targeting Axl favors an antitumorigenic microenvironment that enhances immunotherapy responses by decreasing Hif-1 α levels.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021. **118**(29).
177. D'Alfonso, T.M., et al., *Axl receptor tyrosine kinase expression in breast cancer.* *J Clin Pathol*, 2014. **67**(8): p. 690-6.
178. Goyette, M.A., et al., *The Receptor Tyrosine Kinase AXL Is Required at Multiple Steps of the Metastatic Cascade during HER2-Positive Breast Cancer Progression.* *Cell Rep*, 2018. **23**(5): p. 1476-1490.
179. Wu, Y., M. Sarkissyan, and J.V. Vadgama, *Epithelial-Mesenchymal Transition and Breast Cancer.* *J Clin Med*, 2016. **5**(2).
180. Wilson, C., et al., *AXL inhibition sensitizes mesenchymal cancer cells to antimitotic drugs.* *Cancer Res*, 2014. **74**(20): p. 5878-90.

181. Del Pozo Martin, Y., et al., *Mesenchymal Cancer Cell-Stroma Crosstalk Promotes Niche Activation, Epithelial Reversion, and Metastatic Colonization*. Cell Rep, 2015. **13**(11): p. 2456-69.
182. Shiozawa, Y., et al., *GAS6/AXL axis regulates prostate cancer invasion, proliferation, and survival in the bone marrow niche*. Neoplasia, 2010. **12**(2): p. 116-27.
183. Yumoto, K., et al., *Axl is required for TGF-beta2-induced dormancy of prostate cancer cells in the bone marrow*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 36520.
184. Khoo, W.H., et al., *A niche-dependent myeloid transcriptome signature defines dormant myeloma cells*. Blood, 2019. **134**(1): p. 30-43.
185. Seal, M.D. and S.K. Chia, *What is the difference between triple-negative and basal breast cancers?* Cancer J, 2010. **16**(1): p. 12-6.
186. Brenton, J.D., et al., *Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application?* J Clin Oncol, 2005. **23**(29): p. 7350-60.
187. Graham, D.K., et al., *The TAM family: phosphatidylserine sensing receptor tyrosine kinases gone awry in cancer*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(12): p. 769-85.
188. Asiedu, M.K., et al., *AXL induces epithelial-to-mesenchymal transition and regulates the function of breast cancer stem cells*. Oncogene, 2014. **33**(10): p. 1316-24.
189. Gjerdrum, C., et al., *Axl is an essential epithelial-to-mesenchymal transition-induced regulator of breast cancer metastasis and patient survival*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(3): p. 1124-9.
190. Vuoriluoto, K., et al., *Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer*. Oncogene, 2011. **30**(12): p. 1436-48.
191. ClinicalTrials.gov. *BGB324, R428 or bemcentinib in clinical trials*. https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=bgb324+OR+r428&Search=Clear&age_v=&gn_dr=&type=&rslt= Accessed June 29, 2018.
192. Rashdan, S., et al., *A phase 1/2 dose escalation and expansion study of bemcentinib (BGB324), a first-in-class, selective AXL inhibitor, with docetaxel in patients with previously treated non-squamous NSCLC*. Journal of Clinical Oncology, 2018. **36**(15_suppl): p. e21043-e21043.
193. Ludwig, K.F., et al., *Small-Molecule Inhibition of Axl Targets Tumor Immune Suppression and Enhances Chemotherapy in Pancreatic Cancer*. Cancer Res, 2018. **78**(1): p. 246-255.
194. Smirnov, P., et al., *PharmacoGx: an R package for analysis of large pharmacogenomic datasets*. Bioinformatics, 2016. **32**(8): p. 1244-6.
195. Lamb, J., et al., *The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease*. Science, 2006. **313**(5795): p. 1929-35.
196. Subramanian, A., et al., *A Next Generation Connectivity Map: L1000 Platform and the First 1,000,000 Profiles*. Cell, 2017. **171**(6): p. 1437-1452.e17.
197. Subramanian, A., et al., *Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(43): p. 15545-50.
198. Elkabets, M., et al., *AXL mediates resistance to PI3Kalpha inhibition by activating the EGFR/PKC/mTOR axis in head and neck and esophageal squamous cell carcinomas*. Cancer Cell, 2015. **27**(4): p. 533-46.

199. Seeman, P. and T. Lee, *Antipsychotic drugs: direct correlation between clinical potency and presynaptic action on dopamine neurons*. *Science*, 1975. **188**(4194): p. 1217-9.
200. Gil-Ad, I., et al., *Phenothiazines induce apoptosis in a B16 mouse melanoma cell line and attenuate in vivo melanoma tumor growth*. *Oncol Rep*, 2006. **15**(1): p. 107-12.
201. Jiang, X., et al., *Psychotropic agent thioridazine elicits potent in vitro and in vivo anti-melanoma effects*. *Biomed Pharmacother*, 2018. **97**: p. 833-837.
202. Rho, S.B., B.R. Kim, and S. Kang, *A gene signature-based approach identifies thioridazine as an inhibitor of phosphatidylinositol-3'-kinase (PI3K)/AKT pathway in ovarian cancer cells*. *Gynecol Oncol*, 2011. **120**(1): p. 121-7.
203. Park, M.S., et al., *Thioridazine inhibits angiogenesis and tumor growth by targeting the VEGFR-2/PI3K/mTOR pathway in ovarian cancer xenografts*. *Oncotarget*, 2014. **5**(13): p. 4929-34.
204. Yin, T., et al., *Dopamine receptor antagonist thioridazine inhibits tumor growth in a murine breast cancer model*. *Mol Med Rep*, 2015. **12**(3): p. 4103-8.
205. Tegowski, M., C. Fan, and A.S. Baldwin, *Thioridazine inhibits self-renewal in breast cancer cells via DRD2-dependent STAT3 inhibition, but induces a G1 arrest independent of DRD2*. *J Biol Chem*, 2018.
206. Kang, S., et al., *Thioridazine induces apoptosis by targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in cervical and endometrial cancer cells*. *Apoptosis*, 2012. **17**(9): p. 989-97.
207. Yeh, C.T., et al., *Trifluoperazine, an antipsychotic agent, inhibits cancer stem cell growth and overcomes drug resistance of lung cancer*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012. **186**(11): p. 1180-8.
208. Shen, J., et al., *Thioridazine has potent antitumor effects on lung cancer stem-like cells*. *Oncol Lett*, 2017. **13**(3): p. 1563-1568.
209. Sachlos, E., et al., *Identification of drugs including a dopamine receptor antagonist that selectively target cancer stem cells*. *Cell*, 2012. **149**(6): p. 1284-97.
210. Kim, S. and C.M. Alexander, *Tumorsphere assay provides more accurate prediction of in vivo responses to chemotherapeutics*. *Biotechnol Lett*, 2014. **36**(3): p. 481-8.
211. Rycaj, K. and D.G. Tang, *Cell-of-Origin of Cancer versus Cancer Stem Cells: Assays and Interpretations*. *Cancer Res*, 2015. **75**(19): p. 4003-11.
212. Mortensen, P.B., *The occurrence of cancer in first admitted schizophrenic patients*. *Schizophr Res*, 1994. **12**(3): p. 185-94.
213. Grinshpoon, A., et al., *Cancer in schizophrenia: is the risk higher or lower?* *Schizophr Res*, 2005. **73**(2-3): p. 333-41.
214. Seo, S.U., et al., *Thioridazine enhances sensitivity to carboplatin in human head and neck cancer cells through downregulation of c-FLIP and Mcl-1 expression*. *Cell Death Dis*, 2017. **8**(2): p. e2599.
215. Li, H., et al., *Thioridazine Sensitizes Esophageal Carcinoma Cell Lines to Radiotherapy-Induced Apoptosis In Vitro and In Vivo*. *Med Sci Monit*, 2016. **22**: p. 2624-34.
216. De Laurentiis, M., et al., *Targeting HER2 as a therapeutic strategy for breast cancer: a paradigmatic shift of drug development in oncology*. *Ann Oncol*, 2005. **16 Suppl 4**: p. iv7-13.

217. O'Bryan, J.P., et al., *axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(10): p. 5016-31.
218. Rothlin, C.V., et al., *TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response*. Cell, 2007. **131**(6): p. 1124-36.
219. Lemke, G. and C.V. Rothlin, *Immunobiology of the TAM receptors*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(5): p. 327-36.
220. Shieh, Y.S., et al., *Expression of axl in lung adenocarcinoma and correlation with tumor progression*. Neoplasia, 2005. **7**(12): p. 1058-64.
221. Lozneau, L., et al., *Computational and Immunohistochemical Analyses Highlight AXL as a Potential Prognostic Marker for Ovarian Cancer Patients*. Anticancer Res, 2016. **36**(8): p. 4155-63.
222. Yu, H., et al., *Axl receptor tyrosine kinase is a potential therapeutic target in renal cell carcinoma*. Br J Cancer, 2015. **113**(4): p. 616-25.
223. Rankin, E.B., et al., *AXL is an essential factor and therapeutic target for metastatic ovarian cancer*. Cancer Res, 2010. **70**(19): p. 7570-9.
224. Mc Cormack, O., et al., *Growth arrest-specific gene 6 expression in human breast cancer*. Br J Cancer, 2008. **98**(6): p. 1141-6.
225. Wu, X., et al., *AXL-GAS6 expression can predict for adverse prognosis in non-small cell lung cancer with brain metastases*. J Cancer Res Clin Oncol, 2017.
226. Ruan, G.X. and A. Kazlauskas, *Axl is essential for VEGF-A-dependent activation of PI3K/Akt*. EMBO J, 2012. **31**(7): p. 1692-703.
227. Meyer, A.S., et al., *The receptor AXL diversifies EGFR signaling and limits the response to EGFR-targeted inhibitors in triple-negative breast cancer cells*. Sci Signal, 2013. **6**(287): p. ra66.
228. Salian-Mehta, S., M. Xu, and M.E. Wierman, *AXL and MET crosstalk to promote gonadotropin releasing hormone (GnRH) neuronal cell migration and survival*. Mol Cell Endocrinol, 2013. **374**(1-2): p. 92-100.
229. Leconet, W., et al., *Therapeutic activity of anti-AXL antibody against triple-negative breast cancer Patient Derived Xenografts and metastasis*. Clin Cancer Res, 2016.
230. Jin, G., et al., *Expression of Axl and its prognostic significance in human breast cancer*. Oncol Lett, 2017. **13**(2): p. 621-628.
231. Wu, X., et al., *Global phosphotyrosine survey in triple-negative breast cancer reveals activation of multiple tyrosine kinase signaling pathways*. Oncotarget, 2015. **6**(30): p. 29143-60.
232. Yousef, E.M., et al., *MMP-9 expression varies according to molecular subtypes of breast cancer*. BMC Cancer, 2014. **14**: p. 609.
233. Laurin, M., et al., *Rac-specific guanine nucleotide exchange factor DOCK1 is a critical regulator of HER2-mediated breast cancer metastasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(18): p. 7434-9.
234. Bose, R., et al., *Phosphoproteomic analysis of Her2/neu signaling and inhibition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(26): p. 9773-8.
235. Li, W. and Y. Kang, *Probing the Fifty Shades of EMT in Metastasis*. Trends Cancer, 2016. **2**(2): p. 65-67.

236. Tsai, J.H. and J. Yang, *Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis*. Genes Dev, 2013. **27**(20): p. 2192-206.
237. Patel, S. and P. Rameshwar, *Tumorsphere Passage for Breast Cancer Stem Cells*. 2013.
238. Antony, J., et al., *The GAS6-AXL signaling network is a mesenchymal (Mes) molecular subtype-specific therapeutic target for ovarian cancer*. Sci Signal, 2016. **9**(448): p. ra97.
239. Kariolis, M.S., et al., *An engineered Axl 'decoy receptor' effectively silences the Gas6-Axl signaling axis*. Nat Chem Biol, 2014. **10**(11): p. 977-83.
240. Lenferink, A.E., et al., *Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers*. EMBO J, 1998. **17**(12): p. 3385-97.
241. Hendriks, B.S., et al., *Coregulation of epidermal growth factor receptor/human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) levels and locations: quantitative analysis of HER2 overexpression effects*. Cancer Res, 2003. **63**(5): p. 1130-7.
242. Wu, F., et al., *The role of Axl in drug resistance and epithelial-to-mesenchymal transition of non-small cell lung carcinoma*. Int J Clin Exp Pathol, 2014. **7**(10): p. 6653-61.
243. Tofigh, A., et al., *The prognostic ease and difficulty of invasive breast carcinoma*. Cell Rep, 2014. **9**(1): p. 129-42.
244. Hanzelmann, S., R. Castelo, and J. Guinney, *GSVA: gene set variation analysis for microarray and RNA-seq data*. BMC Bioinformatics, 2013. **14**: p. 7.
245. Andrechek, E.R., et al., *Amplification of the neu/erbB-2 oncogene in a mouse model of mammary tumorigenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3444-9.
246. Angelillo-Scherrer, A., et al., *Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis*. Nat Med, 2001. **7**(2): p. 215-21.
247. Lu, Q., et al., *Tyro-3 family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis*. Nature, 1999. **398**(6729): p. 723-8.
248. Safran, M., et al., *Mouse reporter strain for noninvasive bioluminescent imaging of cells that have undergone Cre-mediated recombination*. Mol Imaging, 2003. **2**(4): p. 297-302.
249. Boimel, P.J., et al., *Contribution of CXCL12 secretion to invasion of breast cancer cells*. Breast Cancer Res, 2012. **14**(1): p. R23.
250. Ashburner, M., et al., *Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium*. Nat Genet, 2000. **25**(1): p. 25-9.
251. Huang da, W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki, *Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources*. Nat Protoc, 2009. **4**(1): p. 44-57.
252. Gene Ontology, C., *Gene Ontology Consortium: going forward*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(Database issue): p. D1049-56.
253. Savage, P., et al., *A Targetable EGFR-Dependent Tumor-Initiating Program in Breast Cancer*. Cell Rep, 2017. **21**(5): p. 1140-1149.
254. Holland, S.J., et al., *R428, a selective small molecule inhibitor of Axl kinase, blocks tumor spread and prolongs survival in models of metastatic breast cancer*. Cancer Res, 2010. **70**(4): p. 1544-54.
255. Goel, S., et al., *Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases*. Physiol Rev, 2011. **91**(3): p. 1071-121.
256. Huang, Y., et al., *Improving immune-vascular crosstalk for cancer immunotherapy*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(3): p. 195-203.

257. Jing, X., et al., *Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment*. Mol Cancer, 2019. **18**(1): p. 157.
258. Petrova, V., et al., *The hypoxic tumour microenvironment*. Oncogenesis, 2018. **7**(1): p. 10.
259. Gschwandtner, M., R. Derler, and K.S. Midwood, *More Than Just Attractive: How CCL2 Influences Myeloid Cell Behavior Beyond Chemotaxis*. Frontiers in Immunology, 2019. **10**(2759).
260. Koboldt, D.C., et al., *Comprehensive molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2012. **490**(7418): p. 61-70.
261. Curtis, C., et al., *The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups*. Nature, 2012. **486**(7403): p. 346-52.
262. Faget, J., et al., *Neutrophils and Snail Orchestrate the Establishment of a Pro-tumor Microenvironment in Lung Cancer*. Cell Rep, 2017. **21**(11): p. 3190-3204.
263. Liu, L., et al., *Novel mechanism of lapatinib resistance in HER2-positive breast tumor cells: activation of AXL*. Cancer Res, 2009. **69**(17): p. 6871-8.
264. ClinicalTrials.gov. *BGB324, R428 or bemcentinib in clinical trials*. https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=bgb324+OR+r428&Search=Clear&age_v=&gn_dr=&type=&rslt= Accessed 2020.
265. Guo, Z., et al., *Axl inhibition induces the antitumor immune response which can be further potentiated by PD-1 blockade in the mouse cancer models*. Oncotarget, 2017. **8**(52): p. 89761-89774.
266. Aguilera, T.A., et al., *Reprogramming the immunological microenvironment through radiation and targeting Axl*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 13898.
267. Skinner, H.D., et al., *Integrative Analysis Identifies a Novel AXL-PI3 Kinase-PD-L1 Signaling Axis Associated with Radiation Resistance in Head and Neck Cancer*. Clin Cancer Res, 2017. **23**(11): p. 2713-2722.
268. Schmid, E.T., et al., *AXL receptor tyrosine kinase is required for T cell priming and antiviral immunity*. Elife, 2016. **5**.
269. Lauzier, M.C., et al., *(2R)-[(4-Biphenyl)sulfonyl]amino-N-hydroxy-3-phenylpropionamide (BiPS), a matrix metalloprotease inhibitor, is a novel and potent activator of hypoxia-inducible factors*. Mol Pharmacol, 2008. **74**(1): p. 282-8.
270. Mootha, V.K., et al., *PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes*. Nature Genetics, 2003. **34**(3): p. 267-273.
271. Pereira, B., et al., *The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refines their genomic and transcriptomic landscapes*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 11479.
272. Ciriello, G., et al., *Comprehensive Molecular Portraits of Invasive Lobular Breast Cancer*. Cell, 2015. **163**(2): p. 506-19.
273. Cerami, E., et al., *The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data*. Cancer Discov, 2012. **2**(5): p. 401-4.
274. Gao, J., et al., *Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal*. Sci Signal, 2013. **6**(269): p. p1.
275. Barbie, D.A., et al., *Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1*. Nature, 2009. **462**(7269): p. 108-12.
276. Reich, M., et al., *GenePattern 2.0*. Nat Genet, 2006. **38**(5): p. 500-1.

277. Liberzon, A., et al., *The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection*. Cell Syst, 2015. **1**(6): p. 417-425.
278. Paquet, E.R. and M.T. Hallett, *Absolute assignment of breast cancer intrinsic molecular subtype*. J Natl Cancer Inst, 2015. **107**(1): p. 357.
279. Holland, S.J., et al., *Multiple roles for the receptor tyrosine kinase axl in tumor formation*. Cancer Res, 2005. **65**(20): p. 9294-303.
280. Li, Y., et al., *Axl as a potential therapeutic target in cancer: role of Axl in tumor growth, metastasis and angiogenesis*. Oncogene, 2009. **28**(39): p. 3442-55.
281. Melaragno, M.G., Y.W. Fridell, and B.C. Berk, *The Gas6/Axl system: a novel regulator of vascular cell function*. Trends Cardiovasc Med, 1999. **9**(8): p. 250-3.
282. Kisanuki, Y.Y., et al., *Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo*. Dev Biol, 2001. **230**(2): p. 230-42.
283. De Jaeghere, E.A., H.G. Denys, and O. De Wever, *Fibroblasts Fuel Immune Escape in the Tumor Microenvironment*. Trends Cancer, 2019. **5**(11): p. 704-723.
284. Chen, X. and E. Song, *Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts*. Nat Rev Drug Discov, 2019. **18**(2): p. 99-115.
285. Cook, R.S., et al., *MerTK inhibition in tumor leukocytes decreases tumor growth and metastasis*. J Clin Invest, 2013. **123**(8): p. 3231-42.
286. Finisguerra, V., et al., *MET is required for the recruitment of anti-tumoural neutrophils*. Nature, 2015. **522**(7556): p. 349-53.
287. Gallicchio, M., et al., *Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated endothelial cell activation by Axl tyrosine kinase receptor*. Blood, 2005. **105**(5): p. 1970-6.
288. Leconet, W., et al., *Therapeutic Activity of Anti-AXL Antibody against Triple-Negative Breast Cancer Patient-Derived Xenografts and Metastasis*. Clin Cancer Res, 2017. **23**(11): p. 2806-2816.
289. Ye, X., et al., *An anti-Axl monoclonal antibody attenuates xenograft tumor growth and enhances the effect of multiple anticancer therapies*. Oncogene, 2010. **29**(38): p. 5254-64.
290. Myers, S.H., V.G. Brunton, and A. Unciti-Broceta, *AXL Inhibitors in Cancer: A Medicinal Chemistry Perspective*. J Med Chem, 2015.
291. Kirane, A., et al., *Warfarin Blocks Gas6-Mediated Axl Activation Required for Pancreatic Cancer Epithelial Plasticity and Metastasis*. Cancer Res, 2015. **75**(18): p. 3699-705.
292. Paolino, M., et al., *The E3 ligase Cbl-b and TAM receptors regulate cancer metastasis via natural killer cells*. Nature, 2014. **507**(7493): p. 508-12.
293. Wei, J., et al., *A novel AXL chimeric antigen receptor endows T cells with anti-tumor effects against triple negative breast cancers*. Cell Immunol, 2018. **331**: p. 49-58.
294. Zhao, Z., et al., *Engineered IL-7 Receptor Enhances the Therapeutic Effect of AXL-CAR-T Cells on Triple-Negative Breast Cancer*. Biomed Res Int, 2020. **2020**: p. 4795171.
295. Goh, L.K. and A. Sorokin, *Endocytosis of receptor tyrosine kinases*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(5): p. a017459.
296. Wiley, H.S. and P.M. Burke, *Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by endocytic trafficking*. Traffic, 2001. **2**(1): p. 12-8.
297. Tomas, A., C.E. Futter, and E.R. Eden, *EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer*. Trends Cell Biol, 2014. **24**(1): p. 26-34.
298. Mullard, A., *First targeted protein degrader hits the clinic*. Nat Rev Drug Discov, 2019.

299. Donovan, K.A., et al., *Mapping the Degradable Kinome Provides a Resource for Expedited Degradation Development*. Cell, 2020.
300. Strutz, F., et al., *Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1*. J Cell Biol, 1995. **130**(2): p. 393-405.
301. Bourseau-Guilmain, E., et al., *Hypoxia regulates global membrane protein endocytosis through caveolin-1 in cancer cells*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 11371.
302. Wang, Y. and M. Ohh, *Oxygen-mediated endocytosis in cancer*. J Cell Mol Med, 2010. **14**(3): p. 496-503.
303. Wang, Y., et al., *Regulation of endocytosis via the oxygen-sensing pathway*. Nat Med, 2009. **15**(3): p. 319-24.
304. Indira Chandran, V., et al., *Hypoxia Attenuates Trastuzumab Uptake and Trastuzumab-Emtansine (T-DM1) Cytotoxicity through Redistribution of Phosphorylated Caveolin-1*. Mol Cancer Res, 2020. **18**(4): p. 644-656.
305. Muz, B., et al., *The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy*. Hypoxia (Auckl), 2015. **3**: p. 83-92.
306. Nundel, K., C. Rothlin, and A. Marshak-Rothstein, *Role of the TAM receptor Axl in differentiation and activation of B cells (P4058)*. The Journal of Immunology, 2013. **190**(1 Supplement): p. 44.14-44.14.
307. Zhao, G.J., et al., *Growth Arrest-Specific 6 Enhances the Suppressive Function of CD4+CD25+ Regulatory T Cells Mainly through Axl Receptor*. Mediators Inflamm, 2017. **2017**: p. 6848430.