



MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Djillali Liabes de Sidi Bel Abbès  
Faculté des sciences de la nature et de la vie  
Département de biologie

# Thèse

Pour l'obtention du diplôme de

## Doctorat 3<sup>ème</sup> cycle

Spécialité : **Biologie**

Option : **Biologie de la Cellule Normale et Pathologique**

### Intitulé

**Identification des cellules souches cancéreuses dans les cancers  
du sein et évaluation du niveau d'expression des marqueurs  
CD44 et ALDH1**

Présentée Par :

**Mme BENYELLES EL-HASSAR Meriem Kaouter**

**Soutenue le : 11/10/2018**

<b>Présidente :</b>	MOULESSEHOUL Soraya	<b>Professeur</b>	UDL Sidi Bel Abbès
<b>Examineurs :</b>	SAHRAOUI Toufik	<b>Professeur</b>	Université d'Oran
	HAOUD Khadidja	<b>MCA</b>	UDL Sidi Bel Abbès
	BOUBLENZIA Lamia	<b>MCA</b>	Université de Tlemcen
<b>Directrice de thèse :</b>	ADDOU-KLOUCHE Lynda	<b>MCA</b>	UDL Sidi Bel Abbès

**Année Universitaire : 2017-2018**

## REMERCIEMENTS

Je remercie sincèrement,

**Dr. ADDOU-KLOUCHE Lynda**, ma directrice de thèse, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la direction de ce travail, pour ses conseils, sa disponibilité et son soutien durant tout ce temps ou nous avons travaillé ensemble, veuillez trouver ici le témoignage de mon plus profond respect et de ma plus vive reconnaissance pour ce que vous m'avez permis d'accomplir.

**Pr. MOULESSEHOUL Soraya**, la présidente du jury, pour m'avoir accompagnée avec joie et bonne humeur tout au long de mes études, très fière d'avoir été son élève, je la remercie infiniment de me faire à présent l'honneur de présider le jury et d'avoir pris le temps de lire et de juger cette thèse. Qu'elle soit assurée de ma reconnaissance, de mon admiration et de mon profond respect.

**Pr. SAHRAOUI Toufik, Dr. HAUD Khadidja et Dr. BOUBLENZIA Lamia**, je tiens à leur témoigner toute ma reconnaissance et mes remerciements les plus sincères d'avoir accepté d'évaluer ce travail et de me faire l'honneur d'accepter de participer à mon jury de thèse, un grand merci pour leur gentillesse et leur disponibilité. Ils trouveront ici le témoignage de ma plus profonde estime et ma sincère gratitude.

Je remercie **Dr. MEDJAMIA Miloud**, chef du laboratoire d'anatomie et pathologie de l'hôpital militaire d'Oran pour avoir si aimablement accepté de m'accueillir au sein de son unité, ce qui m'a permis de réaliser toute la partie pratique de ma thèse.

Mes remerciements vont également à tous **les membres du laboratoire d'anatomie pathologie de l'hôpital militaire d'Oran**, techniciens et ingénieurs, une merveilleuse équipe bien soudée dont l'aide était précieuse tant sur la réalisation des coupes de lames que sur plan moral lors des nombreuses difficultés rencontrées lors de mes manip.

Je tiens à remercier vivement Monsieur le **Dr. BENAMMAR Hamid** pour son soutien durant mes années de thèse et pour l'aide précieuse qu'il a apporté à la lecture de mes résultats.

Mes derniers remerciements vont à mes « co-thésardes » **Amina BELHADJ, Amina BENDAOU** et **Ikram ZIANE**, avec qui une grande amitié s'est formée et grâce à qui j'ai énormément appris tout au long de notre travail de thèse. Nous avons traversé ces longues et laborieuses années de recherche ensemble, en équipe, avec de nombreuses aventures, de très bons moments, des fous rires, des larmes, des passages à vide, nous avons surmonté de nombreuses difficultés ensemble... Et tout cela à gravé de merveilleux souvenirs dans ma mémoire... Je suis fière d'avoir travaillé à vos côtés les filles!

## DEDICACE

A mes chers parents...

A mon cher papa, celui qui m'a aidé à découvrir le 'savoir' un trésor inépuisable.

De tous les pères, tu as été le meilleur, tu as su m'entourer d'attention, m'inculquer les valeurs nobles de la vie, m'apprendre le sens du travail, de l'honnêteté et de la responsabilité.

Tu as été et tu seras toujours un exemple à suivre pour tes qualités humaines, ta persévérance et ton perfectionnisme.

Des mots ne pourront jamais exprimer la profondeur de mon respect, ma considération, ma reconnaissance et mon amour éternel.

Ce travail est ton œuvre, toi qui m'a donné tant de choses et tu continues à le faire.

J'aimerais pouvoir te rendre tout l'amour et la dévotion que tu nous as offerts, mais une vie entière n'y suffirait pas. J'espère au moins que cette thèse y contribuera en partie.

A ma très chère maman, la plus douce et la plus merveilleuse de toutes les mamans.

Aucun hommage ne saurait transmettre à sa juste valeur l'amour et le respect que je te porte.

Je te dédie ce travail qui grâce à toi a pu voir le jour.

Tes prières ont été pour moi un grand soutien tout au long de mes études.

Puisse Dieu tout puissant vous protéger papa et toi et vous procurer longue vie, santé et bonheur afin que je puisse vous rendre un minimum de ce que je vous dois.

Je vous aime tant...

A mon cher et tendre époux, Younes

Mon meilleur ami, mon confident, mon pilier.

Aucune dédicace, aussi expressive qu'elle soit, ne saurait exprimer la profondeur de mes sentiments et de l'amour que je te porte.

Tu as toujours été la bouffée d'oxygène qui me ressourçait dans les moments difficiles et de solitude.

Ton soutien moral et matériel, ta gentillesse sans égal, ton sens du sacrifice et ton profond attachement m'ont permis de réussir mes études. Sans ton aide, tes conseils et tes encouragements ce travail n'aurait vu le jour.

Merci d'être toujours à mes côtés, par ta présence, par ton amour dévoué et ta tendresse, pour donner du goût et du sens à notre vie de famille.

Que dieu réunisse nos chemins pour un long commun serein et ce travail soit témoignage de mon amour profond de ma sincère admiration.

A ma petite perle, Lilya

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut. Tous les mots ne sauraient exprimer mon amour. Bref, tu es la joie de ma vie.

J'espère que ma thèse sera pour toi source de fierté et qu'elle sera un exemple à suivre.

Ta joie de vivre et ton sourire ont été pour moi le meilleur encouragement que je puisse avoir.

Que Dieu te garde et te protège.

A mes chers frères Salim, Chafik, Ryad et ma chère et précieuse sœur Yasmine. Pour toute la complicité et l'entente qui nous unissent, je ne vous remercierai jamais assez pour tous les bons conseils tout au long de mes études. Vous êtes tous les quatre de véritables exemples à suivre. Puisse nos liens fraternels se pérenniser et se consolider encore.

A mes belles-sœurs Hayet, Souhila et Wassila, à mon beau-frère Kamel, j'ai le grand plaisir de vous dédier ce modeste travail.

A tous mes neveux et nièces adorés.

A mes beaux-parents, mes deuxièmes parents que j'adore! Je vous dédie avec plaisir ce travail en reconnaissance de l'amour et de la bonté exceptionnelle dont vous avez fait preuve envers moi depuis mon mariage. Merci de m'avoir soutenu et encouragé tout au long de mon travail de thèse.

A mes beaux-frères Mehdi, Ilias, Hakim et mes belles-sœurs Zahra et Fella et leurs adorables enfants.

A tous mes oncles et mes tantes, mes cousins et cousines ainsi que mes amis. Je vous dédie cette thèse tout en vous souhaitant une longue vie pleine de réussite, de santé et de bonheur...

Que ce travail vous apporte l'estime, et le respect que je porte à votre égard, et soit la preuve du désir que j'avais depuis toujours de vous honorer.

A tous mes enseignants tout au long de mes études.

A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

**Meriem**

## RESUME

**Introduction :** Les cellules souches cancéreuses (CSC) se caractérisent par différents marqueurs moléculaires permettant leur identification dans de nombreux tissus cancéreux. Ces cellules sont considérées comme les cellules initiatrices du cancer et sont suspectées d'être responsables de la rechute et de la résistance aux protocoles classiques de chimio- et radiothérapie. Les cellules souches du cancer du sein pourraient exprimer des marqueurs de surface tels que l'aldéhyde déshydrogénase 1 (ALDH1) et les protéines Cluster de différenciation 44 (CD44). Notre recherche a consisté en l'identification des cellules souches du cancer du sein dans les tumeurs des patients de l'Ouest Algérien et à montrer que leur expression est particulièrement associée au phénotype agressif d'un sous-type de cancer du sein.

**Objectif :** Notre étude avait pour objectif d'explorer l'expression des protéines ALDH1 et CD44 dans les sous-types de cancer du sein d'une population algérienne et leurs associations avec les caractéristiques clinicopathologiques. En effet, comprendre comment les CSC contribuent à l'apparition et l'évolution du cancer du sein sera d'une grande utilité à l'élaboration de nouvelles thérapies visant à éliminer ces cellules.

**Matériel et méthodes :** Nous avons analysé les niveaux d'expression de ALDH1 et CD44 sur 46 échantillons de carcinome mammaire inclus en paraffine par des méthodes immunohistochimiques.

**Résultats :** Au total, 9 tumeurs (21%) ont exprimé ALDH1, tandis que 11 (28%) ont exprimé la protéine CD44. L'expression d'ALDH1 était associée à un jeune âge élevé ( $p = 0,05$ ), à la positivité du récepteur de la progestérone ( $p = 0,014$ ) et au cancer du sein triple négatif (TNBC) ( $p = 0,045$ ). D'autre part, l'expression de CD44 était associée aux sous-types HER2 ( $p = 0,001$ ) et TNBC ( $p = 0,049$ ).

**Conclusion :** Les données obtenues dans notre travail de recherche suggèrent que ALDH1 et CD44 pourraient servir de biomarqueurs pour identifier les cellules souches cancéreuses par la technique d'immunohistochimie afin de prédire le pronostic chez les patientes Algériennes atteintes d'un cancer du sein. Les sous-types enrichis en cellules souches cancéreuses, en particulier le cancer du sein triple négatif (TNBC), connu pour être agressif, sont souvent diagnostiqués chez les femmes jeunes, à un stade avancé; ils sont également étroitement associés à une absence de thérapie ciblée. Il est donc nécessaire de développer des thérapies ciblées spécifiques pour chaque sous-type pour améliorer la survie des patientes sans rechute.

**Mots-clés:** Cellules souches cancéreuses, sous-types moléculaires du cancer du sein, ALDH1, CD44, chimiorésistance.

## ABSTRACT

**Introduction:** Cancer stem cells (CSCs) are characterized by different molecular markers that can be identified in many cancerous tissues. These cells are considered cancer-initiating cells and are suspected to be responsible for relapse and resistance to conventional chemo- and radiotherapy protocols. Breast cancer stem cells could express surface markers such as aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) and differentiating Cluster Proteins 44 (CD44). Our research consisted of the identification of breast cancer stem cells in the tumors of West Algerian patients and to show that their expression is particularly associated with the aggressive phenotype of a subtype of breast cancer.

**Objective:** Our study aimed to explore the expression of ALDH1 and CD44 proteins in breast cancer subtypes of an Algerian population and their associations with clinicopathological features. Indeed, understanding how CSCs contribute to the progression of breast cancer will be of great value in developing new therapies to eliminate these cells.

**Material And Methods:** We analyzed ALDH1 and CD44 expression levels in 46 paraffin-embedded breast carcinoma samples using immunohistochemical methods.

**Results:** A total of 9 tumors (21%) expressed ALDH1, while 11 (28%) expressed the CD44 protein. ALDH1 expression was associated with elevated young age ( $p = 0.05$ ), progesterone receptor positivity ( $p = 0.014$ ) and triple negative breast cancer (TNBC) ( $p = 0.045$ ). On the other hand, CD44 expression was associated with the HER2 ( $p = 0.001$ ) and TNBC ( $p = 0.049$ ) subtypes.

**Conclusion:** The data obtained in our research suggests that ALDH1 and CD44 could be used as biomarkers to identify cancer stem cells by immunohistochemistry to predict the prognosis in Algerian patients with breast cancer. The subtypes enriched in cancer stem cells, in particular triple negative breast cancer (TNBC), known to be aggressive, are often diagnosed in young women, at an advanced stage; they are also closely associated with an absence of targeted therapy. Therefore, it is necessary to develop specific targeted therapies for each subtype to improve the survival of patients without relapse.

**Keywords:** Cancer stem cells, molecular subtypes of breast cancer, ALDH1, CD44, chemoresistance.

## الملخص :

**مقدمة :** يتم تمييز الخلايا الجذعية السرطانية بواسطة الكواشف الجزئية التي تمكننا من التعرف عليها ضمن العديد من الأنسجة السرطانية. تعتبر هذه الخلايا أولية للسرطان و يرجح أنها المسؤولة على الانتكاسة و مقاومة البروتوكول التقليدي (الكلاسيكي) للعلاج الكيميائي و الإشعاعي. تستطيع الخلايا الجذعية لسرطان الثدي أن تعبر عن كواشف السطحية كالألدهيد ديزيدروجيناز 1 (ALDH1) و البروتين كلوستر للتمايز 44 (CD44). اهتم بحثنا بالتعرف على الخلايا الجذعية لسرطان الثدي في أورام مرضى الجهة الغربية للجزائر و بين أن التعبير عنها مرتبط خاصة بالنمط الظاهري العدواني لفرع من سرطان الثدي .

**الأهداف :** يتمثل هدف دراستنا استكشاف عبارة البروتينات ALDH1 و CD44 في فروع سرطان الثدي لفئة من سكان الجزائر وارتباطهم بمواصفات المرض العيادي .بالفعل، فهم كيفية مساهمة الخلايا الجذعية السرطانية في ظهور و تطور سرطان الثدي سيكون ذو فائدة بالغة لاعداد علاج جديد يهدف إلى القضاء على هذه الخلايا.

**الوسائل و الطرق :** لقد قمنا بتحليل مستويات عبارة CD44 و ALDH1 على 46 عينة من سرطانات الثدي المدرجة في البرافين و ذلك بطرق النسيج المناعي الكيميائي .

**النتائج :** في المجموع، 9 أورام (21%) عبروا عن ALDH1 ، في حين 11 (28%) عبروا عن البروتين CD44. كانت عبارة ALDH1 مرتبطة بالسّن الصغير بنسبة عالية ( $p=0.05$ )، بإيجابية المتلقي للبروجيسترون (PR) ( $p=0.014$ ) و لسرطان الثدي الثلاثي السلبي (TNBC) ( $p=0.045$ ) من جهة أخرى ، كانت العبارة CD44 مرتبطة بفروع HER2+ ( $p=0.001$ ) و TNBC ( $p=0.049$ ) .

**الخلاصة :** تقترح المعطيات المحصل عليها في دراستنا هته أن CD44 و ALDH1 يمكن أن تستعمل كمؤشرات حيوية للتعرف على الخلايا الجذعية السرطانية عن طريق تقنية النسيج المناعي الكيميائي و ذلك للتعرف بتشخيص المرض لدى المصابات الجزائريات بسرطان الثدي. يتم تشخيص الفروع الغنية بالخلايا الجذعية السرطانية و خاصة سرطان الثدي الثلاثي السلبي (TNBC) المعروف بكونه عدواني عند النساء صغيرات السن في مرحلة متقدمة و كذا لديهم ارتباط و طيد بغياب علاج مستهدف فمن الضروري تطوير العلاج المستهدف المتخصص لكل فرع لتحسين حياة المرضى بدون انتكاسة.

**الكلمات المفتاحية:** الخلايا الجذعية السرطانية ، فروع جزئية لسرطان الثدي، ALDH1، CD44، المقاومة الكيميائية.

# TABLE DES MATIERES

RESUME

ABSTRACT

ملخص

## Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

<b>CHAPITRE I : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>2</b>
<b>1. Histopathologie du cancer du sein</b>	<b>2</b>
1.1 Morphologie du sein	2
1.2 Le cancer du sein	4
1.2.1 Déclenchement tumoral	4
1.2.2 Evolution	5
1.3 Caractéristiques des tumeurs	5
1.3.1 Les protéines ER, PR et HER2	5
✓ Récepteurs des oestrogènes	5
✓ Récepteurs de la progestérone	6
✓ L'Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2)	7
1.3.2 TNM	7
1.3.3 Grade SBR	7
1.3.4 Type histologique	8
1.3.5 Statut ganglionnaire	8
1.4 Autres marqueurs immunohistochimiques	9
<b>2. Classification des sous-types moléculaires</b>	<b>10</b>
2.1 Luminal A	10
2.2 Luminal B	11
2.3 Basal	12
2.4 ERBB2	12
2.5 «Normal-like»	13
<b>3. Les cellules souches</b>	<b>13</b>
3.1. Cellules souches normales	13
3.1.1 Définition	13

3.1.2	Autorenouvellement	15
3.1.3	Les niches cellulaires des cellules souches	16
✓	Fonctions de la niche	18
3.2.	Cellules souches cancéreuses	19
3.2.1	Définition du modèle des cellules souches cancéreuses	19
3.2.2	Hétérogénéité de la population des cellules souches cancéreuses	20
3.2.3	Les niches cellulaires des CSC	21
3.2.4	La niche des cellules souches cancéreuses : l'importance de l'hypoxie	23
3.2.5	Les spécificités de la cellule souche cancéreuse	24
3.2.6	Signification médicale des cellules souches cancéreuses	25
3.2.7	Les voies de signalisations des CSC	27
○	La voie Notch	27
○	La voie Sonic Hedgehog (Shh)	28
○	La voie wnt/ $\beta$ -catenin	29
3.2.8	Résistance aux traitements anti-tumoraux	31
<b>4.</b>	<b>Les cellules souches mammaires</b>	<b>33</b>
4.1.	Les cellules souches mammaires normales	33
4.2.	Les cellules souches du cancer du sein	34
✓	Implications thérapeutiques des cellules souches cancéreuses du sein	36
4.3	Les marqueurs des cellules souches du cancer du sein	37
4.1.1	Side Population : marqueur de cellules souches normales et cancéreuses	38
4.1.2	Marquage CD24-/CD44+	39
✓	Propriétés des cellules CD24-/CD44+ dans les cancers du sein	40
✓	CD44	40
✓	Le rôle de CD44 dans la progression tumorale	41
4.1.3	ALDH1	42
4.1.4	Autres marqueurs de CSC du sein et associations de marqueurs	43
✓	CD133/prominin1	43
✓	CD201/PROCR	44
<b>5.</b>	<b>Problématique et objectifs</b>	<b>45</b>
5.1	Problématique	45
5.2	Objectifs	46
<b>CHAPITRE II : PRESENTATION DES TRAVAUX</b>		<b>47</b>
<b>1.</b>	<b>Matériels et méthodes</b>	<b>49</b>
1.1	Etude clinicopathologique	49
1.2	Matériel Biologique : Prélèvements et traitements	49
1.3	Préparation des tissus	49
1.4	Histologie classique	49

1.5	Technique immunohistochimique	50
1.5.1	Anticorps primaires	50
1.5.2	Protocole de l'immunomarquage sur tumeur	50
1.6	Evaluation du statut immunohistochimique	51
1.7	Définition des sous types moléculaires	51
1.8	Analyse statistique	52
<b>2.</b>	<b>Résultats</b>	<b>53</b>
2.1	Parametres clinicopathologiques et moleculaires des tumeurs mammaires	53
2.2	Expression des marqueurs de cellules souches <i>aldh1</i> et <i>cd44</i> dans les sous types moléculaires des cancers du sein et leur corrélation avec les différents paramètres histocliniques et moléculaires	55
<b>3.</b>	<b>Discussion</b>	<b>69</b>
	<b>CHAPITRE III : CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>75</b>
	<b>PUBLICATION</b>	<b>78</b>
	<b>CHAPITRE IV : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>79</b>

## Liste des abréviations

**ABC** : ATP binding cassettes  
**ABCB1** : ATP-binding cassette type B  
**ABCG** : ATP-binding cassette type G  
**ADN**: Acide désoxyribonucléique  
**AH** : Acide hyaluronique  
**AKT** : Protein kinase B  
**ALDH**: Aldéhyde déshydrogénase  
**APC** : Adenomatous polyposis coli protein  
**ARN**: Acide ribonucléique  
**ARNm**: Acide ribonucléique messenger  
**ASCL1**: Achaete-scute complex homologue 1  
**ATP**: Adenosine triphosphate  
**AXIN**: Axis inhibition protein  
**Bcl-2**: B-cell lymphoma-2  
**BCM2**: Breast cancer cell line  
**BCRP**: Breast cancer resistance protein  
**Brca**: Breast cancer gene  
**CD**: Cluster of differentiation  
**CK**: Cytokeratin  
**CS**: Cellules souches  
**CSA**: Cellules souches adultes  
**CSC**: Cellules souches cancéreuses  
**CSE**: Cellules souches embryonnaires  
**CSL**: CBF1 suppressor of Hairless Lag-1  
**DAB**: Diaminobenzidine Tetrahydrochloride  
**Dhh**: Desert Hedgehog  
**Dll**: Delta-like Ligand  
**DSH**: phosphoprotéine «disheveled »  
**ECAD**: E-Cadherine  
**EGFR**: Epidermal growth factor receptor  
**EpCAM**: Epithelial cell adhesion molecule  
**ER**: Estrogen receptor (récepteurs aux œstrogènes)

**ErbB**: Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog (Her)  
**ESA**: Epithelial surface antigen  
**FDA**: US Food and Drug Administration  
**FISH**: Fluorescent Hybridation in Situ  
**FZD**: Récepteur Frizzled  
**GEP**: Granulin-epithelin precursor  
**Glis**: Glioma associated oncogene homologs  
**GSK3 $\beta$** : Glycogen synthase kinase 3 beta  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**: Peroxyde d'hydrogène  
**HER2**: Human epidermal growth factor receptor 2 (ErbB2)  
**HIF**: Hypoxia Inducible Factor  
**HRP** : Horseradish Peroxidase  
**Ihh**: Indian Hedgehog  
**Ki-67**: Index de prolifération mitotique  
**KO**: Souris knock-out  
**Lin**: Lineage  
**LRP**: Low-density lipoprotein Receptor- related Protein  
**MAML**: Co-factor Mastermind-like  
**MDAMB231**: Triple negative breast cancer cell line  
**MDR**: Multidrug resistance  
**MRP**: Multidrug resistance protein  
**MyD88**: Myeloid differentiation primary response gene (88)  
**NFYA**: Nuclear transcription factor Y subunit alpha  
**NICD**: Notch Intracellular Domain  
**NOD-SCID**: Non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency  
**Oct-4**: Octamer-binding transcription factor 4  
**P53**: Cellular tumor antigen  
**PBS**: Phosphate Buffered Saline  
**pH**: Potentiel Hydrogène  
**PKA**: Protéine kinase A  
**PR**: Progesterone receptor (récepteurs à la progestérone)  
**PROCR**: Protein C receptor, endothelial (CD201)  
**Ptc** : Récepteur transmembranaire Patched  
**SBR** : Scarff-Bloom-Richardson

**Sca1:** Stem cells antigen-1

**SMO:** Protéine G Smoothened

**Shh:** Sonic Hedgehog

**SP:** Side population

**Su(fu)** : Suppressor of fused homolog

**TCF:** T-cell specific transcription factor

**TNBC:** Triple negative breast cancer

**TNM:** Taille-Nodules-Métastases

**TP63:** Tumor protein p63

**Wnt:** Wingless-type MMTV integration site

## Liste des Figures

<b>Figure 1 :</b>	Représentation de la glande mammaire vue par Sir Cooper après injection de cires colorées dans le mamelon	<b>3</b>
<b>Figure 2 :</b>	Coupe sagittale du sein	<b>3</b>
<b>Figure 3:</b>	La survie des patientes atteintes du cancer du sein selon les sous-types moléculaires.	<b>11</b>
<b>Figure 4 :</b>	L'évolution des cellules souches	<b>14</b>
<b>Figure 5:</b>	Origine des cellules souches embryonnaires et adultes	<b>15</b>
<b>Figure 6 :</b>	Autorenouvellement des cellules souches par division asymétrique ou symétrique	<b>16</b>
<b>Figure 7 :</b>	Les différents types de niches cellulaires	<b>17</b>
<b>Figure 8 :</b>	Influence de la niche sur la division des cellules souches	<b>19</b>
<b>Figure 9 :</b>	Représentation schématique des deux théories de formation tumorale	<b>21</b>
<b>Figure 10 :</b>	Représentation schématique du modèle dynamique des cellules souches	<b>23</b>
<b>Figure 11 :</b>	Les 7 éléments-clés de l'oncogénèse selon <i>Hanabab et Weinberg</i>	<b>25</b>
<b>Figure 12 :</b>	Thérapies conventionnelles vs thérapies ciblant les cellules souches cancéreuses	<b>26</b>
<b>Figure 13 :</b>	Schéma de la voie de signalisation de Notch.	<b>28</b>
<b>Figure 14 :</b>	Schéma de la voie Sonic Hedgehog (Shh).	<b>29</b>
<b>Figure 15 :</b>	Schéma de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine	<b>30</b>
<b>Figure 16 :</b>	Représentation schématique des principales voies de régulation impliquées dans les mécanismes de chimiorésistance des CSC	<b>31</b>
<b>Figure 17 :</b>	Modèle de différenciation hiérarchique de l'épithélium mammaire	<b>34</b>
<b>Figure 18 :</b>	Schéma de la différenciation épithéliale mammaire normale et tumorale	<b>35</b>
<b>Figure 19 :</b>	Principaux marqueurs de CSC identifiés, en fonction de l'organe considéré	<b>38</b>
<b>Figure 20</b>	Distribution des cancers du sein selon les sous-types moléculaires sur 46 patientes de l'HMRUO	<b>55</b>
<b>Figure 21</b>	Niveau d'expression du marqueur de cellules souches cancéreuses (CSC) ALDH1 dans les cellules tumorales mammaires.	<b>56</b>
<b>Figure 22</b>	Expression du marqueur de CSC ALDH1 en fonction de l'âge des patientes	<b>57</b>
<b>Figure 23</b>	Expression du marqueur de CSC ALDH1 selon le type histologique	<b>57</b>
<b>Figure 24</b>	Expression du marqueur de CSC ALDH1 selon la taille de la tumeur	<b>58</b>
<b>Figure 25</b>	Expression du marqueur de CSC ALDH1 selon l'envahissement ganglionnaire	<b>58</b>
<b>Figure 26</b>	Expression du marqueur de CSC ALDH1 selon le grade SBR	<b>59</b>
<b>Figure 27</b>	Niveau d'expression du marqueur de CSC ALDH1 dans les différents sous-types moléculaires du cancer du sein	<b>59</b>
<b>Figure 28</b>	Niveau d'expression du marqueur de cellules souches cancéreuses (CSC) CD44 dans les cellules tumorales mammaires.	<b>62</b>
<b>Figure 29</b>	Expression du marqueur de CSC CD44 en fonction de l'âge des patientes	<b>63</b>
<b>Figure 30</b>	Expression du marqueur de CSC CD44 selon le type histologique	<b>63</b>

<b>Figure 31</b>	Expression du marqueur de CSC CD44 selon la taille de la tumeur	<b>64</b>
<b>Figure 32</b>	Expression du marqueur de CSC CD44 selon l'envahissement ganglionnaire	<b>64</b>
<b>Figure 33</b>	Expression du marqueur de CSC CD44 selon le grade SBR	<b>65</b>
<b>Figure 34</b>	Niveau d'expression du marqueur de CSC CD44 en fonction du statut Ki67	<b>65</b>
<b>Figure 35</b>	Niveau d'expression du marqueur de CSC CD44 dans les différents sous-types moléculaires du cancer du sein	<b>66</b>
<b>Figure 36</b>	Coloration immunohistochimique des marqueurs de CSC ALDH1 et CD44 dans les cancers du sein Gr X40	<b>68</b>

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 01</b>	Les marqueurs de surface des cellules souches cancéreuses identifiés dans les tumeurs humaines	<b>37</b>
<b>Tableau 02</b>	Critères utilisés dans notre étude pour la classification moléculaire du cancer du sein	<b>52</b>
<b>Tableau 03</b>	Description des caractéristiques histologiques, cliniques et moléculaires des 46 patientes atteintes de cancer du sein	<b>54</b>
<b>Tableau 04</b>	Corrélation entre l'expression de ALDH1 et les différents facteurs Histo-cloniques et moléculaires	<b>61</b>
<b>Tableau 05</b>	Corrélation entre l'expression de CD44 et les différents facteurs Histo-cloniques et moléculaires	<b>67</b>



**CHAPITRE I :**  
**Revue Bibliographique**

## INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

### 1- Histopathologie du cancer du sein

#### 1.1 Morphologie du sein

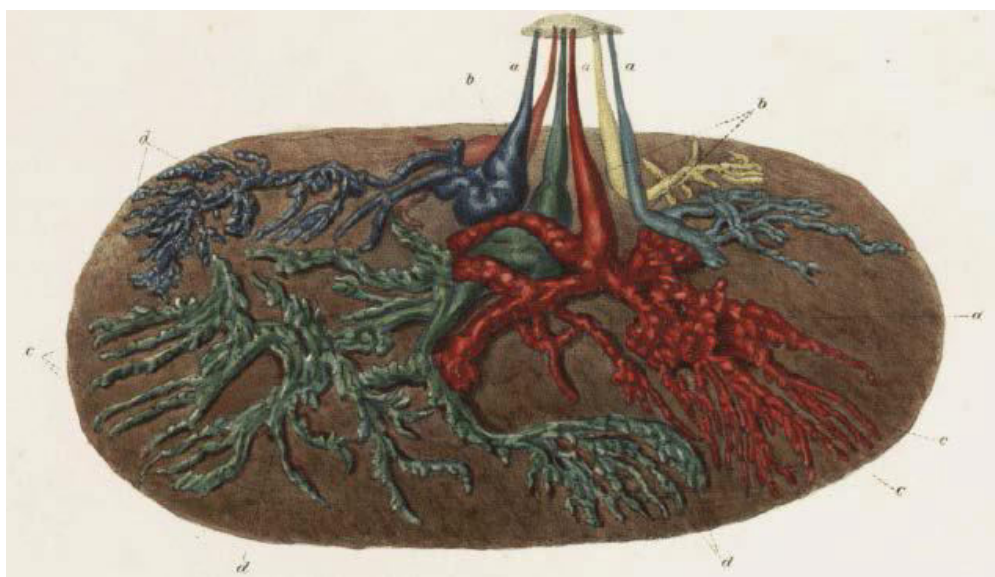
La glande mammaire est un organe dont le développement suit plusieurs stades de différenciation associés notamment à la puberté, la grossesse et la lactation, ainsi qu'à la ménopause, tout ceci, sous l'influence des hormones ovariennes et hypophysaires.

L'anatomie du sein humain a été décrite pour la première fois en 1840 par Sir Astley Paston Cooper, un chirurgien et anatomiste anglais qui a mis en évidence un réseau glandulaire enchevêtré dans du tissu adipeux en utilisant des injections de cires de différentes couleurs dans le mamelon (**Figure 1**) (Cooper 1840).

Chez la femme, le sein est composé de 12 à 20 lobes de glande mammaire, séparés et maintenus par des tissus conjonctif et adipeux. Chaque lobe est constitué de lobules desservis par des canaux galactophores qui se rejoignent au niveau du mamelon (**Figures 1 et 2**).

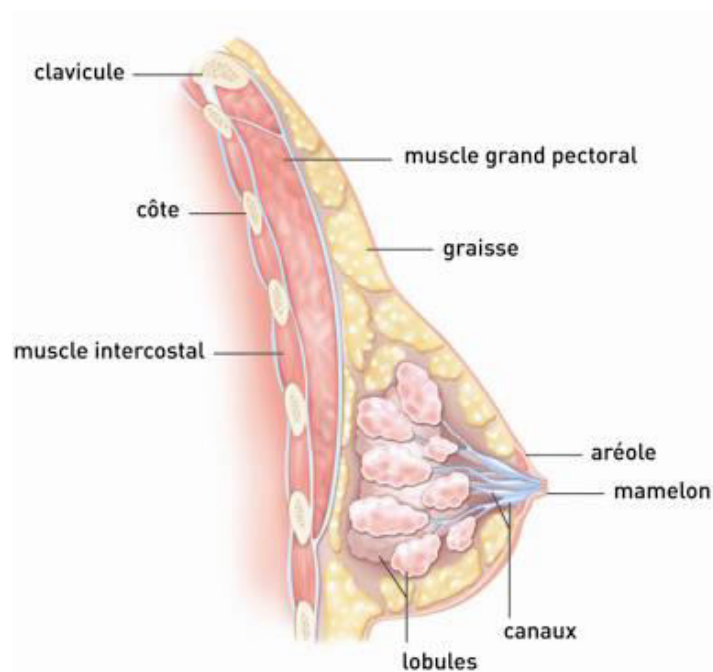
D'un point de vue microscopique, les canaux et lobules sont tous bordés de deux couches de cellules. La couche qui est en contact direct avec la lumière du canal est composée de cellules épithéliales (luminales), la deuxième couche est composée de cellules myoépithéliales (basales). Ces deux couches cellulaires reposent sur une membrane basale (Wellings *et al.*, 1980).

La fonction essentielle de la glande mammaire consiste en la production et la sécrétion des protéines et des lipides du lait, afin de nourrir les nouveau-nés au cours de la lactation. Outre l'apport de nourriture, la lactation permet également de fournir aux nourrissons une protection immunitaire efficace contre les pathogènes grâce aux facteurs immunitaires présents dans le lait (Russo *et al.*, 2004 ; Naccarato *et al.*, 2000 ; Howard *et al.*, 2000 ; Russo *et al.*, 2005).



**Figure 1 : Représentation de la glande mammaire vue par Sir Cooper après injection de cires colorées dans le mamelon (Cooper 1840)**

a. canaux lactifères excréteurs, b. sinus lactifères, c. galactophores, d. lobules



**Figure 2 : Coupe sagittale du sein.**

Source : <http://www.e-cancer.fr/publications/82-les-cancers/736-les-traitements-des-cancers-du-sein>

Les seins sont rattachés à la paroi thoracique au niveau des muscles pectoraux. Le tissu adipeux, composant essentiel du sein, entoure et maintient la glande mammaire. Celle-ci est

constituée de lobules capables de produire le lait qui va être acheminé jusqu'au mamelon par les galactophores. Un réseau veineux et artériel permet l'apport de sang et de nutriments au réseau glandulaire.

### **1.2 Le cancer du sein**

Le cancer du sein est une maladie très hétérogène. Il présente de grandes variations au niveau morphologique, génétique, phénotypique et de la réponse aux traitements. Il est donc difficile à caractériser. Dans ce contexte, il est donc possible de parler non pas du cancer du sein mais des cancers du sein.

Les cancers du sein peuvent être classés selon différents critères, qui peuvent aussi constituer des facteurs pronostiques (indicateurs du risque de décès par cancer du sein) et/ou prédictifs (indicateurs du bénéfice attendu des traitements de la maladie), comme nous le verrons par la suite.

La majorité des cas de cancer du sein se trouve chez la femme, mais il existe également un cancer du sein chez l'homme (Kornegoor *et al.*, 2012 ; Jain *et al.*, 2018). Il est cependant environ 100 fois moins fréquent, mais pour cause de diagnostic généralement plus tardif il a souvent un taux de survie moins élevé.

#### **1.2.1 Déclenchement tumoral**

La glande mammaire est un organe en évolution permanente sous l'influence des hormones et des facteurs de croissance. Ceci en fait un organe à part entière du point de vue du nombre de cellules en croissance et en différenciation, mais le rend plus susceptible aux transformations cancéreuses (Olsson 2000). Comme tout mécanisme tumoral, la carcinogenèse mammaire résulte de l'acquisition par les cellules d'un certain nombre de caractéristiques acquises par les cellules tout au long du développement tumoral. Après l'étape d'initiation, les cellules entrent dans la seconde étape dite de promotion, où elles acquièrent leur indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance grâce aux proto-oncogènes, et perdent leur capacité de communication intercellulaire. Cette acquisition d'indépendance peut se faire de plusieurs manières, avec notamment des pertes de fonctionnalité des anti-oncogènes, comme la protéine du rétinoblastome (pRb) qui peut bloquer le cycle cellulaire ou contrôler sa progression, et le produit du gène p53 qui contrôle lui aussi l'arrêt du cycle cellulaire en réponse aux dommages causés à l'ADN, ou encore une surexpression de

récepteurs transducteurs de signaux comme par exemple le récepteur HER2 (Neve *et al.* 2001).

### 1.2.2 Evolution

Le carcinome in situ est la phase la plus précoce du cancer du sein. La maladie localisée est encore au stade précoce et les cellules cancéreuses sont limitées au sein et les ganglions axillaires ne sont pas atteints. Dans le cas d'un cancer du sein localement avancé, les cellules cancéreuses se détachent de la tumeur d'origine et se propagent par les vaisseaux sanguins ou lymphatiques. Elles s'accumulent alors dans les ganglions lymphatiques voisins (notamment les ganglions axillaires). Dans le cas extrême où la maladie est métastatique, les cellules cancéreuses ont envahi le sein, ont pénétré dans les vaisseaux lymphatiques ou vasculaires de voisinage et se propagent par la circulation vasculaire et/ou lymphatique à distance du sein. Elles ont pu, dès lors, se fixer dans les organes comme les poumons, le foie, le cerveau ou les os (les plus fréquemment atteints) et y former une autre tumeur que l'on appelle métastase.

## 1.3 Caractéristiques des tumeurs

### 1.3.1 Les protéines RE, RP et HER2

La découverte des récepteurs des oestrogènes (RE) au début des années 1970, puis celle de la progestérone quelques années plus tard a été déterminante pour comprendre la notion d'hormonosensibilité des cancer du sein (Hahnel *et al.*, 1971 ; Edwards *et al.*, 1979).

Environ 70 à 80% des tumeurs expriment les récepteurs des oestrogènes (notés RE+). Près des deux tiers d'entre elles (65%) expriment également les récepteurs de la progestérone (RP+) (Burstain *et al.*, 2014)

La présence de ces récepteurs et leur niveau d'expression constituent un paramètre essentiel pour la prédiction de la réponse à l'égard d'un traitement par hormonothérapie (Huang *et al.*, 2015 ; Cottu 2013).

#### ✓ Récepteurs des œstrogènes

Le récepteur des œstrogènes est un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires dont la fonction, médiée par l'œstradiol, est l'activation de la transcription des gènes impliqués notamment dans la croissance, la différenciation cellulaire et la fonction reproductrice. Ce récepteur existe sous 2 formes nommées RE $\alpha$  et RE $\beta$ . Il s'agit de deux protéines distinctes correspondant à la traduction de deux gènes différents, portés respectivement par les

chromosomes 6 et 14. Ces récepteurs peuvent être détectés dans un grand nombre de tissus, avec toutefois des proportions variables. Ainsi, le RE $\alpha$  est essentiellement exprimé dans les organes génitaux féminins (ovaires, utérus) ainsi que la glande mammaire, alors que RE $\beta$  semble avoir une distribution plus large dans l'organisme (De Cremoux *et al.*, 2010).

La liaison de l'œstradiol sur le RE $\alpha$  intervient dans la prolifération des cellules tumorales. En revanche, l'isotype RE $\beta$  semble posséder une action anti-proliférative. En effet, il y aurait une prédominance de l'expression de RE $\beta$  dans le tissu mammaire normal, alors que dans le cas d'une tumeur maligne mammaire, c'est le récepteur RE $\alpha$  qui prédomine. Le récepteur RE $\beta$  est considéré comme un modulateur de la prolifération et de l'invasion des cellules cancéreuses (Haldosén *et al.*, 2014).

Cependant, l'isotype  $\beta$  n'est pas systématiquement présent dans les cellules cancéreuses mammaires. Malgré les nombreuses recherches réalisées ces dernières années, la réelle signification du RE $\beta$  n'est donc pas encore clairement établie. Actuellement, seule la recherche de l'expression du RE $\alpha$  est mise en œuvre dans l'exploration biologique des cancers du sein (Huang *et al.*, 2015).

### ✓ Récepteurs de la progestérone

Le récepteur de la progestérone (RP) fait également partie de la superfamille des récepteurs nucléaires, liant de façon spécifique la progestérone, hormone stéroïde à fonction principalement progestative. Il existe 2 isoformes principales du récepteur (RPA et RPB) issues du même gène. Ce récepteur est majoritairement exprimé dans les tissus des organes reproducteurs (ovaire, endomètre), mais aussi dans le placenta, la glande mammaire, les glandes surrénales.

La synthèse du récepteur de la progestérone est sous le contrôle des œstrogènes. Son expression est habituellement considérée comme un bon indicateur de la fonctionnalité du récepteur des œstrogènes (RE). Toutefois, dans le cas des cancers du sein, la valeur prédictive de l'expression du RP vis-à-vis de la réponse à une thérapie anti-hormonale reste à ce jour mal définie. Globalement, les résultats cliniques semblent indiquer que les patientes RE+/RP- répondent moins favorablement à un traitement hormonal que celles dont la tumeur est RE+/RP+ (De Cremoux *et al.*, 2010).

### ✓ L'Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2)

Le gène *HER2* est localisé sur le bras long du chromosome 17, il appartient à la famille des récepteurs aux facteurs de croissance à activité tyrosine kinase, constituée de quatre récepteurs membranaires : EGFR ou HER1, HER2, HER3 et HER4, impliqués dans les mécanismes de signalisation intracellulaire, contrôlant la croissance, la survie, l'adhésion et la différenciation de la cellule (Yarden *et al.*, 2001). Le gène est amplifié dans 20 à 25% des carcinomes invasifs du sein et cette amplification est corrélée avec une surexpression de la protéine HER2 (Stern *et al.*, 2015).

Le statut de HER2 est évalué par immunohistochimie et par FISH (Fluorescent Hybridation in Situ). Les cancers positifs pour HER2 vont répondre positivement à des thérapies qui le ciblent spécifiquement tels que l'anticorps monoclonal anti-HER2, le Trastuzumab et l'inhibiteur de tyrosine kinase, le Lapatinib (Baselga *et al.*, 2012).

### 1.3.2 TNM

Ce système est basé sur l'extension de la tumeur au niveau de son site primitif (Tumor T), sur l'envahissement des ganglions régionaux (Nodes N) et sur la présence de métastases (M). La lettre T symbolise la tumeur initiale. Elle est cotée de T0 (quand la lésion primitive n'est pas retrouvée) à T4 pour les tumeurs les plus étendues. Cette cotation dépend du volume tumoral, représenté par le diamètre maximum de la lésion, et de la fixation aux organes voisins (peau, vaisseaux, nerfs, os, etc.). La lettre N, de N0 à N3, dépend du territoire ganglionnaire, plus ou moins proche de la tumeur, des dimensions des adénopathies, de leur nombre et de leur éventuelle fixation aux tissus voisins, il s'agit du facteur pronostique individuel le plus important. La lettre M est cotée M0 en l'absence de métastases connues, ou M1 en leur présence, quel que soit leur siège, unique ou multiple (Sobin *et al.*, 2011).

### 1.3.3 Grade SBR

Les carcinomes invasifs vont être gradés. Le grade se base sur 3 critères : la formation de glandes, le pléomorphisme nucléaire, et le compte mitotique. Un score numérique allant de 1 à 3 est utilisé pour chacun des critères.

Le grade I, avec un score allant de 3 à 5, correspond à des carcinomes bien différenciés. Le grade II, avec un score de 6 à 7, correspond aux carcinomes moyennement différenciés.

Enfin le grade III, avec un score de 8 ou 9, correspond à des carcinomes peu différenciés. En conséquence, le grade I correspond aux carcinomes les moins agressifs et de bon pronostic et le grade III correspond aux carcinomes les plus agressifs et de mauvais pronostic. Le grade II correspond donc aux carcinomes modérément agressifs (Lakhani *et al.*, 2012).

Plusieurs études ont démontré une meilleure survie au cancer du sein pour les tumeurs de bas grade comparativement aux tumeurs de haut grade (Rakha *et al.*, 2008). Les tumeurs de haut grade sont plus souvent RE et RP négatifs et de grande taille (plus de 2 cm), elles ont davantage tendance à former des métastases dans les os et au foie et correspondent à un pronostic plus grave (Porter *et al.*, 2004 ; Volpi *et al.*, 2004). L'expression de la protéine HER2 est également plus élevée dans les tumeurs de haut grade que dans les tumeurs de bas grade (Masmood *et al.*, 2002).

### 1.3.4 Type histologique

Selon la dernière édition de la classification des tumeurs de l'Organisation Mondiale de la Santé, le cancer du sein infiltrant se présente sous 18 différents types histologiques (Tavassoli *et al.*, 2003). Parmi ceux-ci, deux types représentent près de 90 % de toutes les tumeurs, soit le carcinome canalaire infiltrant (75 %) et le carcinome lobulaire infiltrant (15 %). Le dernier 10 % est composé de tumeurs rares comme le carcinome mucineux et le carcinome tubulaire entre autres (Weigelt *et al.*, 2008).

Comme son nom l'indique, le carcinome canalaire origine des canaux mammaires et le carcinome lobulaire origine des lobules. Ces deux types de carcinomes se distinguent entre autres par le grade ; Plus de 42 % des carcinomes canaux sont de grade III alors que moins de 8 % des carcinomes lobulaires infiltrants sont de ce grade. Également, plus de 90 % des carcinomes infiltrants de type lobulaire sont RE+ alors que 74 % des carcinomes canaux infiltrants sont positifs à ces récepteurs (Bharat *et al.*, 2008). Malgré ces différences, plusieurs études ont démontré que, lorsqu'il y a ajustement pour les différents facteurs tels que l'âge, le grade, la taille et le statut métastatique, il n'y a pas de différence significative dans la survie des patientes atteintes de carcinome canalaire infiltrant ou de carcinome lobulaire infiltrant (Jayasinghe *et al.*, 2007 ; Moran *et al.*, 2009).

### 1.3.5 Statut ganglionnaire

Dans un stade avancé du cancer du sein, les cellules tumorales migrent par les vaisseaux sanguins et les vaisseaux lymphatiques. Le système lymphatique est la première voie de

circulation des cellules métastatiques qui vont affecter les tissus voisins les plus proches, les ganglions axillaires (Mumprecht *et al.*, 2009). Le statut ganglionnaire se définit par la quantité de ganglions présentant une métastase d'un cancer du sein (Amaral *et al.*, 2007). Le statut ganglionnaire est un des principaux marqueurs de pronostic dans le cancer du sein. La survie diminue en fonction du pourcentage de ganglions présentant une métastase (Atahan *et al.*, 2008) (Figure 3).

Plusieurs marqueurs du cancer du sein sont présents plus fréquemment dans les tumeurs primaires avec métastases ganglionnaires. On retrouve une taille plus élevée de la tumeur primaire, un grade combiné plus élevé et une densité plus élevée des microvaisseaux (Elston *et al.*, 2002. Carter *et al.*, 1989 ; Choi *et al.*, 2005). Le lien entre les récepteurs RE, RP et HER2 et les métastases axillaires n'est cependant pas constant entre les études (Mitsuyama *et al.*, 1999 ; Patani *et al.*, 2007).

### 1.4 Autres marqueurs immunohistochimiques

La recherche de nouveaux marqueurs est très active, particulièrement avec tous les nouveaux outils dans le domaine de la génomique développés ces dernières années. Toutefois, en clinique peu de ces marqueurs sont utilisés de façon routinière.

Il existe essentiellement deux groupes de marqueurs: 1) les marqueurs de pronostic qui permettent la caractérisation de la tumeur, le diagnostic clinique et donnent de l'information sur la survie; 2) les marqueurs prédictifs du choix du traitement.

Les marqueurs prédictifs du choix du traitement sont actuellement au nombre de trois: RE, RP et HER2. Dans le cas des protéines RE et RP, la positivité de l'un ou l'autre de ces deux marqueurs est suffisante pour obtenir une réponse à un traitement hormonal. Ce traitement est à base d'inhibiteur de l'action des œstrogènes, on peut citer comme exemple : Le Tamoxifène, le Raloxifène, l'Anastrozole, le Létrozole ou l'Exémestane (Pritchard *et al.*, 2003). Les patientes dont la tumeur du sein présente un HER2 positif bénéficient d'un traitement au Trastuzumab, un anticorps monoclonal humanisé spécifique à la protéine HER2 et approuvé par la *Food and Drug Administration* (FDA) depuis 1998 (Haq *et al.*, 2009).

Les marqueurs immunohistochimiques de pronostic, incluent une série de tests qui sont utilisés pour mieux caractériser le cancer du sein. Parmi ces marqueurs, 5 servent à l'identification du type cellulaire (épithéliale ou myoépithéliale) dont la tumeur est composée. Ce sont les cytokératines 5/6, 14, 17, 18 et 19. Les cytokératines 5/6, 14 et 17 sont positives dans les tumeurs de type myoépithéliales tandis que les cytokératines 18 et 19 sont positives

principalement dans les tumeurs de type épithélial (Villadsen *et al.*, 2005). Un autre marqueur important est E-Cadherine (ECAD) qui permet de différencier le type histologique. Il est positif dans les carcinomes canaux et négatif dans les carcinomes lobulaires (Varga *et al.*, 2009). Il y a également la protéine TP63 (p63) qui est positive dans les cellules myoépithéliales. Elle permet de mettre en évidence la couche de cellules myoépithéliales qui tapisse tous les canaux et les lobules du sein. Dans le cas des tumeurs cancéreuses qui envahissent le tissu stromal, cette couche de cellules myoépithéliales est absente (Werling *et al.*, 2003). Le marqueur récepteur de facteurs de croissance épidermoïde (EGFR) aussi appelé HER1 est un récepteur de la même famille que la protéine HER2 et joue un rôle dans la prolifération cellulaire. Cette protéine est fortement positive dans près de 50 % des tumeurs triple-négatives (RE-, RP- et HER2-) (Burness *et al.*, 2010). Ce type de carcinome est un des sous-types moléculaires ayant le plus mauvais pronostic.

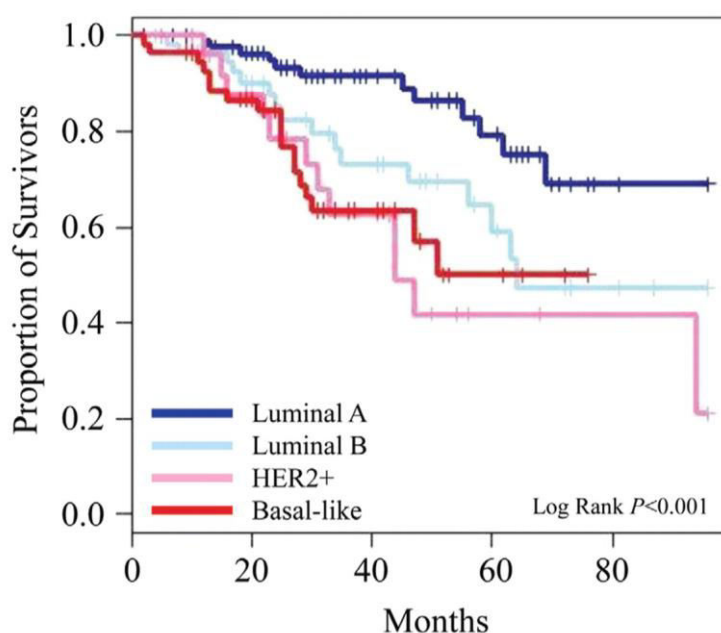
### **2- Classification des sous-types moléculaires**

Les tumeurs du sein sont classées selon des critères très précis déterminés par un pathologiste selon des lignes directrices établies. Depuis la mise au point des micropuces d'ARN, il est maintenant possible de classer les tumeurs du sein selon l'expression des ARNm de centaines de gènes en même temps. Cette classification a permis d'identifier 5 sous-types principaux de cancer du sein : le luminal A, le luminal B, l'ERBB2, le basal et le «normal-like» (Carey *et al.*, 2006). L'analyse des gènes exprimés dans ces cinq sous-types a permis d'identifier 5 marqueurs immunohistochimiques (RE, RP, HER2, CK 5/6 et EGFR) qui servent à identifier les quatre sous-types principaux (le luminal A, le luminal B, l'ERBB2 et le basal) avec 87 % de concordance (Carey *et al.*, 2006 ; De Ronde *et al.*, 2010). Certaines tumeurs ne possèdent aucun de ces marqueurs et sont donc non classifiées.

#### **2.1 Luminal A**

Les tumeurs de type luminal A sont typiquement RE et/ou RP positives ainsi que HER2 négatives (Sorlie *et al.*, 2001). Ce sous-type de carcinomes est le plus fréquent de tous et représente environ 60 à 70 % des tumeurs chez les femmes caucasiennes (Kwan *et al.*, 2009). Plus de 60 % des patientes atteintes de ce cancer sont âgées de plus de 60 ans (Spitale *et al.*, 2009). Les tumeurs sont généralement plus petites que dans les autres sous-types et sont plus fréquemment de bas grades (Calza *et al.*, 2006 ; Ihemelandu *et al.*, 2007). Les métastases ganglionnaires sont moins fréquentes chez les carcinomes de sous-type luminal A

comparativement aux carcinomes de sous-type ERBB2 (Voduc *et al.*, 2010 ; Wiechmann *et al.*, 2009). Les tumeurs de ce sous-type de cancer présentent une positivité des cytokératines CK18 et CK19 et sont négatives aux principaux marqueurs des cellules myoépithéliales, c'est-à-dire la CK5/6, CK14, CK17 et EGFR. Les carcinomes de sous-type luminal A ont le meilleur pronostic et la meilleure survie sans récurrence parmi tous les sous-types moléculaires du cancer du sein (Figure 3) (Carey *et al.*, 2006 ; Ihemelandu *et al.*, 2007 ; Voduc *et al.*, 2010 ; Fan *et al.*, 2006 ; Sandhu *et al.*, 2010).



**Figure 3: La survie des patientes atteintes du cancer du sein selon les sous-types moléculaires. (Sandhu *et al.* 2010).**

## 2.2 Luminal B

Les tumeurs de sous-type luminal B sont caractérisées par la présence de RE et/ou RP ainsi que par la présence de la protéine HER2 (Sorlie *et al.*, 2001 ; Kwan *et al.*, 2009). La proportion de luminal B est de 11 à 12 % (Kwan *et al.*, 2009 ; Millikan *et al.*, 2008). Près de 50 à 60 % des tumeurs lumineuses B sont des tumeurs de grade III (Spitale *et al.*, 2009 ; Ihemelandu *et al.*, 2007). La proportion des patientes présentant des métastases est légèrement plus élevée chez les tumeurs de sous-type luminal B par rapport à celles présentes chez les tumeurs de sous-type luminal A (Ihemelandu *et al.*, 2007 ; Voduc *et al.*, 2010). Les tumeurs de sous-type luminal B sont généralement plus grosses que les tumeurs de sous-type luminal A (Calza *et al.*, 2006).

Ces tumeurs présentent un profil de positivité des cytokératines identique à celui des tumeurs de sous-type luminal A. La survie sans récurrence est généralement plus faible dans le sous-type luminal B que dans le sous-type luminal A (Figure 4) (Carey *et al.*, 2006 ; Ihemelandu *et al.*, 2007 ; Voduc *et al.*, 2010 ; Fan *et al.*, 2006).

### 2.3 Basal

Ces carcinomes sont caractérisés par l'absence des protéines RE, RP et HER2 (Sorlie *et al.*, 2001 ; Kwan *et al.*, 2009). Pour cette raison, on les appelle également « carcinomes triple-négatifs ». Il existe cependant une différence entre ces deux appellations puisque contrairement aux carcinomes triple-négatifs, les carcinomes de sous-type basal doivent obligatoirement présenter des marqueurs des cellules myoépithéliales (Seal *et al.*, 2010). De récentes études démontrent que la présence de l'une ou l'autre des protéines EGFR et CK5/6 permet la classification d'un carcinome triple-négatif vers un carcinome de sous-type basal (Carey *et al.*, 2006). Les tumeurs négatives à ces deux marqueurs sont non classifiées (Carey *et al.*, 2006). Plus de 80 % de ces carcinomes sont de grade III, la moitié d'entre eux ont une taille de plus de 2 cm et sont plus fréquemment des carcinomes de type histologique canalaire (Carey *et al.*, 2006 ; Voduc *et al.*, 2010). Les tumeurs de type basal expriment au moins un des marqueurs des cellules basales/myoépithéliales (CK 5/6 ou EGFR) (Nielsen *et al.*, 2004 ; Rakha *et al.*, 2006). Le pronostic est mauvais en présence de ce cancer comparativement aux carcinomes de sous-type luminal mais est légèrement plus favorable que le type ERBB2 (Figure 3) (Carey *et al.*, 2006 ; Fan *et al.*, 2006).

### 2.4 ERBB2

Ce type de carcinome s'identifie par l'absence des RE et RP ainsi qu'une amplification du gène HER2 (Sorlie *et al.*, 2001 ; Kwan *et al.*, 2009). Ce groupe est très distinct des carcinomes de sous-type luminal pour plusieurs marqueurs. Les tumeurs de ce sous-type moléculaire sont généralement de plus grande taille, sont de hauts grades, présentent plus fréquemment des métastases ganglionnaires et sont presque exclusivement de type histologique canalaire (Carey *et al.*, 2006 ; Spitale *et al.*, 2009 ; Wiechmann *et al.*, 2009). Les différentes cytokératines analysées démontrent qu'ils peuvent avoir une positivité pour les marqueurs basal et myoépithélial (Laakso *et al.*, 2006 ; ). Les tumeurs ERBB2 ont la survie la moins élevée de tous les sous-types moléculaires du cancer du sein (Figure 3) (Carey *et al.*, 2006 ; Calza *et al.*, 2006 ; Ihemelandu *et al.*, 2007).

### 2.5 «Normal-like»

Ce type de carcinomes n'a été identifié que par les études de micropuces à ARNm. Il n'existe pas de marqueurs immunohistochimiques capables d'identifier les tumeurs de ce sous-type. Le profil d'expression par micropuces d'ARNm démontre que ces tumeurs se retrouveraient principalement dans le sous-type luminal A selon la classification par immunohistochimie (Carey *et al.*, 2006). Certaines études de micropuces d'ARNm démontrent un profil des normal-like ressemblant au carcinome de sous-type luminal A (Calza *et al.*, 2006 ; Hu *et al.*, 2006). D'autres études montrent un lien se rapprochant de ceux exprimés par le sous-type basal (Carey *et al.*, 2006 ; Sorlie *et al.*, 2001 ; Kaklamani *et al.*, 2006). L'analyse de micropuces d'ARN montre un profil d'expression en ARNm caractéristique des tissus normaux du sein (Sorlie *et al.*, 2001 ; Calza *et al.*, 2006 ; Fan *et al.*, 2006). Il a même été mentionné que ce type de carcinome est possiblement un artéfact causé par une grande contamination de tissus normaux dans certains échantillons de tumeurs du sein (Hu *et al.*, 2006). Puisqu'il n'existe pas de marqueurs immunohistochimiques qui permettent d'identifier les tumeurs correspondant à ce profil, il n'existe pas de données récentes les caractérisant. La survie semble néanmoins se rapprocher de celle des carcinomes de sous-type luminal A.

## 3. Les cellules souches

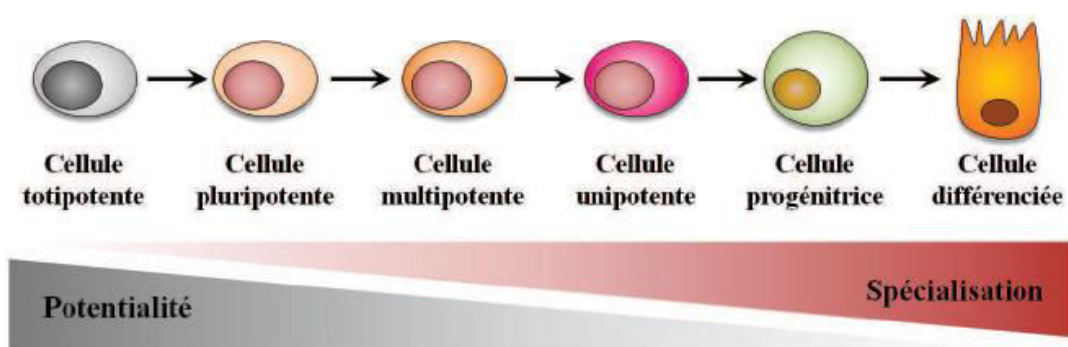
### 3.1. Cellules souches normales

#### 3.1.1 Définition

Les CS humaines, représentant 1 à 2% de toutes les cellules dans la plupart des tissus, elles représentent une population cellulaire indifférenciée ayant une grande capacité d'autorenouvellement et de prolifération. Des cellules capables d'aboutir à la formation de toutes les cellules du corps humain sont appelées **totipotentes** et correspondent à l'ensemble des cellules allant de l'ovocyte fertilisé jusqu'aux cellules de la morula. Lorsque la morula se transforme en blastocyste, les CS deviennent **pluripotentes** et correspondent aux **cellules souches embryonnaires** (CSE). Ces CSE sont à l'origine des trois feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme) et peuvent conduire à la formation de tous les tissus de l'organisme (Evans *et al.*, 1981 ; Thomson *et al.*, 1998). Lorsque le stade blastocyste est dépassé, les CS sont engagées dans un des feuillets embryonnaires et ne pourront se différencier que dans un des types cellulaires de ce feuillet. Chez l'adulte, ces cellules servent

à réparer les tissus lésés, malades ou simplement vieillissants. Ces cellules sont alors qualifiées de **multipotentes** et correspondent aux cellules souches adultes (CSA). Ces cellules vont alors continuer à se différencier en progéniteur pour devenir par la suite des CS **unipotentes** capables de ne donner qu'un seul type cellulaire tout en s'autorenouvelant (Kopper *et al.*, 2004).

Les cellules souches peuvent se distinguer selon leur origine : elles peuvent être embryonnaires, adultes ou induites à la pluripotence à des fins thérapeutiques (Maumus, 2009).



**Figure 4 : L'évolution des cellules souches**

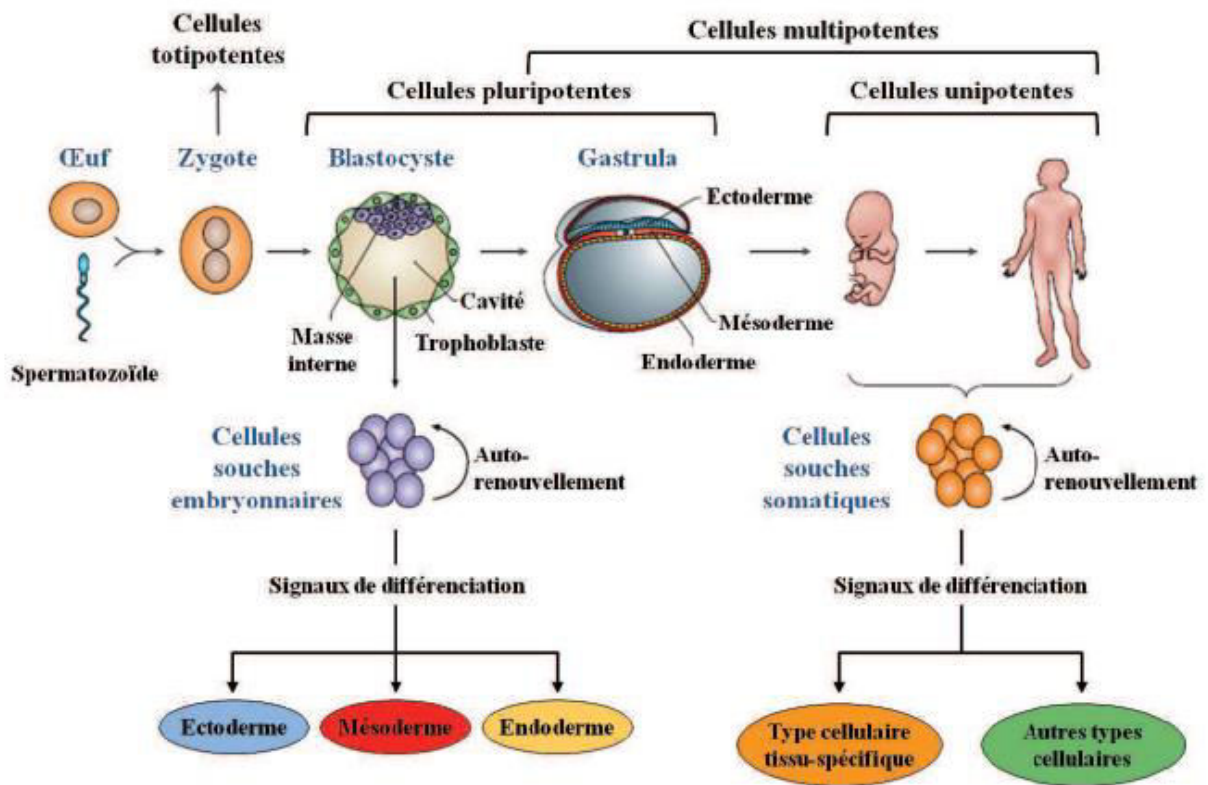


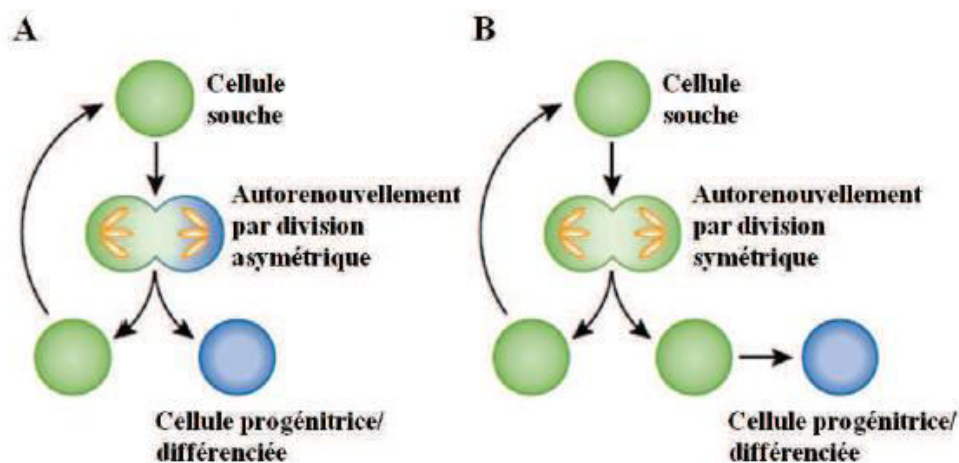
Figure 5: Origine des cellules souches embryonnaires et adultes (O'Connor & Crystal, 2006)

### 3.1.2 Autorenewement

L'autorenewement désigne la capacité des cellules souches à proliférer et à produire des copies d'elles-mêmes sur une période indéfinie, tout en gardant leur pluri/multipotence et leur potentiel régénératif. Pour cela, la cellule doit être capable d'entrer dans le cycle cellulaire et au moins une des cellules filles doit rester indifférenciée (Fuchs *et al.*, 2013). Cette capacité dérive du fait que les cellules souches peuvent se diviser soit de façon symétrique, soit asymétrique.

Au cours d'une division asymétrique, la cellule mère polarisée se divise perpendiculairement à son axe de polarité et les composants cellulaires ne sont pas distribués de manière égale entre les deux cellules filles qui sont donc différentes (une cellule souche et une cellule qui va se différencier). Dans le cas d'une division symétrique, la cellule mère se divise parallèlement à son axe de polarité et les deux cellules filles sont ainsi identiques, ce qui conduit à la formation de deux cellules souches ou de deux cellules différenciées (Siller *et al.*, 2009 ; Knoblich *et al.*, 2008).

La capacité d'autorenouvellement est essentielle aux cellules souches afin d'augmenter leur nombre au cours du développement, de maintenir leur nombre dans les tissus adultes et de restaurer leur pool après une blessure (Shenghui *et al.*, 2009).



**Figure 6 : Autorenewement des cellules souches par division asymétrique ou symétrique (Fuchs and Chen, 2013).**

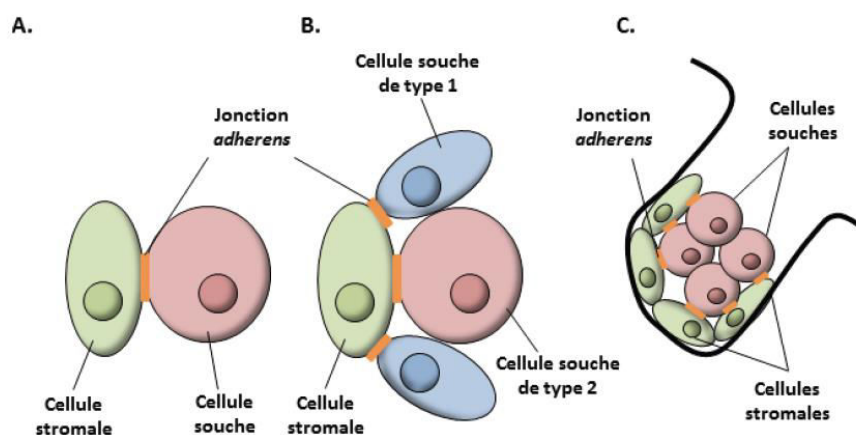
Selon l'orientation du plan de clivage, les cellules souches peuvent se diviser asymétriquement (A), pour donner une cellule souche et une cellule progénitrice qui entre en phase de différenciation, ou symétriquement (B) pour donner deux cellules souches

### 3.1.3 Les niches cellulaires des cellules souches

En 1978, Schofield évoque pour la première fois l'hypothèse de « niche » (Schofield, 1978). Dans les tissus, les CSA sont localisées dans un microenvironnement cellulaire appelé « niche cellulaire » servant de coque protectrice pour éviter la génération de mutations qui induiraient le déclenchement de la différenciation, de l'apoptose ou de la surproduction de CS pouvant induire des tumeurs (Mitsiadis *et al.*, 2007). Une niche cellulaire est définie par sa capacité à héberger et maintenir une ou plusieurs cellules souches (Morrison *et al.*, 2008). Au sein de ces niches, les CS sont maintenues à l'état quiescent ou à faible taux de prolifération dans un environnement hypoxique (Alvarez *et al.*, 2012). Cette théorie d'environnement hypoxique a été imaginée pour la première fois dans les niches de CS hématopoïétiques en 2001, selon un modèle mathématique (Chow *et al.*, 2001) qui a été confirmé par la suite lors de leur mise en évidence *in vivo* en 2007 (Parmar *et al.*, 2007).

Selon Ohlstein *et al.* (2004), il existe trois types de niches cellulaires :

- Les **niches simples**, constituées par l'association entre une CS et une cellule stromale reliées entre elles par une jonction *adherens*. Elles sont retrouvées dans la moelle osseuse notamment pour les CS hématopoïétiques qui sont associées à des ostéoblastes.
- Les **niches complexes**, correspondent à l'association d'au moins deux CS avec d'autres types cellulaires. Elles sont retrouvées, par exemple, au niveau des CS neurales présentes dans la zone sous ventriculaire.
- Les **niches de stockage**, qui contiendraient les CS quiescentes et sont représentées par le bulbe du follicule pileux.



**Figure 7 : Les différents types de niches cellulaires (Ohlstein *et al.*, 2004).**

A. Niche simple.

B. Niche complexe.

C. Niche de stockage.

Les composants primaires de la niche des cellules souches sont : (Jones *et al.*, 2008)

- Les cellules stromales de support, qui interagissent directement avec les cellules souches par l'intermédiaire de récepteurs membranaires, jonctions communicantes ou par l'intermédiaire de facteurs solubles.
- La matrice extracellulaire, qui fournit la structure et les signaux mécaniques à la niche.
- Des vaisseaux sanguins qui fournissent des signaux systémiques et permettent la mobilisation des cellules souches.
- Des fibres nerveuses.

### ✓ Fonctions de la niche

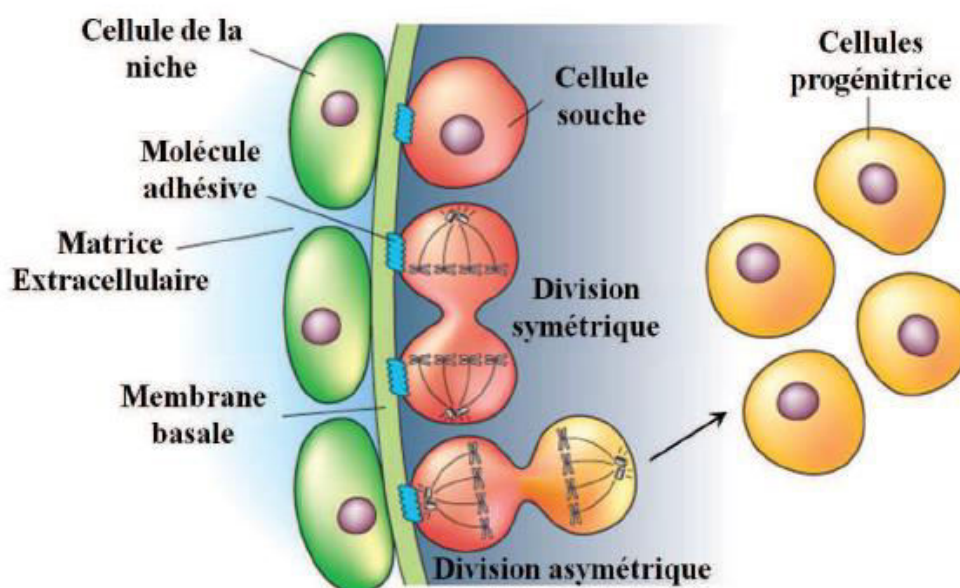
La niche permet de réguler la plupart des processus biologiques des cellules souches par l'intermédiaire d'interactions cellule-cellule et cellule-matrice.

· **L'adhésion.** La niche fournit aux cellules souches un site d'ancrage via l'établissement de contacts cellule-cellule avec les cellules de soutien ou via l'interaction avec la matrice extracellulaire. Les principaux récepteurs impliqués dans l'ancrage des cellules souches à leur niche sont les cadhérines et les intégrines (Brizzi *et al.*, 2012).

· **La division symétrique-asymétrique.** Lorsque les cellules souches sortent de leur état de quiescence, c'est dans le but de s'auto-renouveler pour ensuite se différencier. Une fine régulation de l'auto-renouvellement est une fonction essentielle de la niche pour la génération de nouvelles cellules qui ré-entreront en phase G0 ou qui se différencieront pour remplacer les cellules endommagées. Lorsque les cellules souches prolifèrent, elles subissent soit une division symétrique qui génère deux cellules filles identiques, soit une division asymétrique résultant en une cellule fille qui restera dans la niche et qui gardera son statut « souche » et en une cellule fille qui sortira de la niche et qui sera engagée dans une voie de différenciation spécifique.

· La niche a également un rôle dans le maintien de la vitalité des cellules souches. C'est elle qui sécrète les facteurs responsables de la dégénération d'une cellule souche en cas de dommage au niveau de l'ADN. Elle aurait également un rôle dans le vieillissement de l'organisme : le vieillissement est défini comme une réduction de la capacité de régénération des tissus. Il semble que ce phénomène soit en partie attribuable à des changements au sein de la niche des cellules souches (Morrison *et al.*, 2008).

· Dans les conditions normales, la niche, en contrôlant le renouvellement et donc la division des cellules souches, a un rôle anti-tumoral. Cependant, en cas de mutations des cellules souches, devenant ainsi réfractaires aux signaux envoyés par la niche, il peut y avoir apparition d'une tumeur (Li *et al.*, 2005). De la même façon, si c'est la niche qui devient anormale et qui entrainera la formation d'une tumeur en dérégulant les cellules souches.



**Figure 8 : Influence de la niche sur la division des cellules souches (Spradling *et al.*, 2001).**

Les cellules composantes la niche (en vert) envoient des signaux aux cellules souches (en rouge) qui bloquent leur différenciation et régulent leur division. Selon l'orientation du plan de clivage, les cellules souches peuvent se diviser symétriquement, pour donner deux cellules identiques, ou asymétriquement, pour donner une cellule souche et une cellule progénitrice (en jaune) qui entre en phase de différenciation.

### 3.2. Cellules souches cancéreuses

#### 3.2.1 Définition du modèle des cellules souches cancéreuses

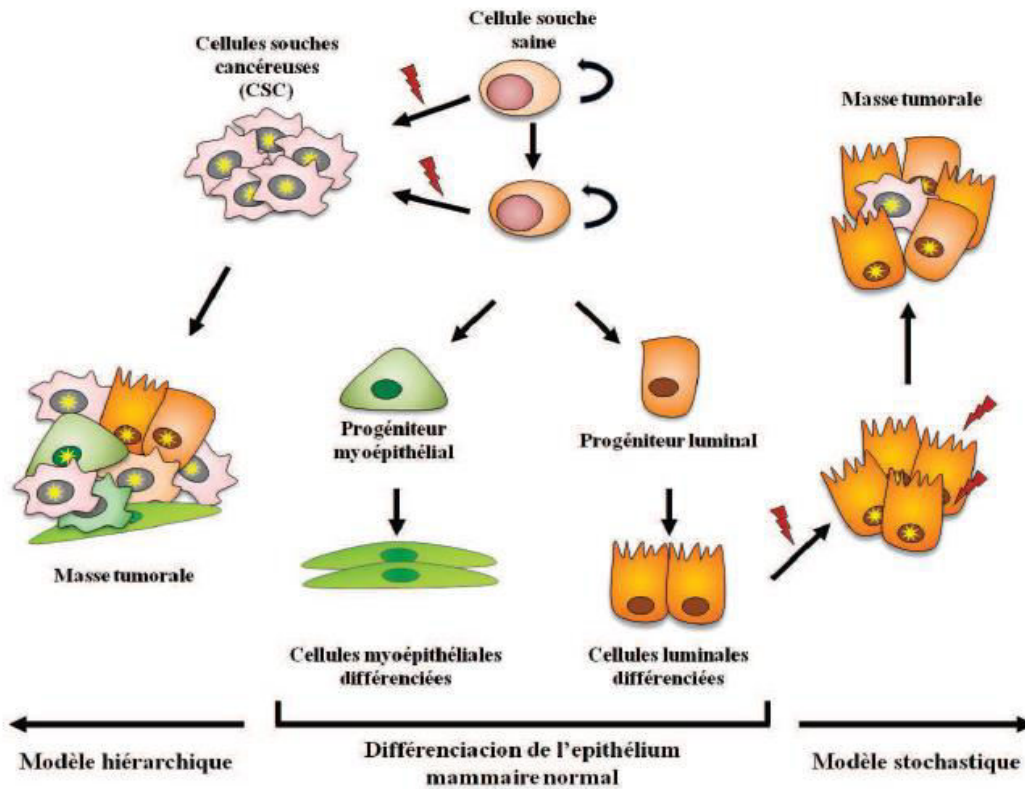
Les cellules impliquées dans le cancer sont de natures hétérogènes. Dans la masse tumorale coexistent des cellules cancéreuses et non-cancéreuses. Les cellules non-cancéreuses comprennent des cellules inflammatoires, des fibroblastes et des cellules immatures du myéloïde (Alison *et al.*, 2010). Une sous-population de cellules malignes, appelées cellules souches cancéreuses (CSC), prolifèrent et se différencient au sein de la tumeur en cellules cancéreuses et présentent plusieurs propriétés communes avec les cellules souches dont notamment une prolifération illimitée, une capacité à se différencier en un tissu spécifique et un haut potentiel clonogénique (Sugihara *et al.*, 2013).

Depuis quelques années, un nombre croissant de données expérimentales a démontré que les cellules dites initiatrices de tumeur ou cellules souches cancéreuses seraient non seulement à l'origine du développement tumoral de par leur capacité de renouvellement illimitée, mais elles résistent également aux thérapies conventionnelles et sont responsables des rechutes et de la formation des métastases (Tirino *et al.*, 2013 ; Islam *et al.*, 2015).

Depuis leur découverte par l'équipe de John Dick en 1997 dans les cancers hématopoïétiques (Bonnet *et al.*, 1997), des cellules souches cancéreuses putatives ont été isolées à partir de plusieurs cancers solides, elles ont pour la première fois été mise en évidence dans le cancer du sein par le groupe d'Al-Hajj en 2003, qui les ont identifié et isolé grâce à l'expression de marqueurs phénotypiques : CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>. Elles ont depuis été mises en évidence dans de nombreux autres cancers solides tels que le cancer du colon (O'Brien *et al.*, 2007), du pancréas (Li *et al.*, 2007), de la prostate (Ceder *et al.*, 2008) et du poumon (Eramo *et al.*, 2008).

### 3.2.2 Hétérogénéité de la population des cellules souches cancéreuses

Le premier modèle de développement tumoral décrit est le **modèle stochastique**. Ce dernier stipule que toutes les cellules (différenciées ou non) peuvent conduire à la formation de tumeurs par accumulation de mutations et prolifération incontrôlée. Cependant, la découverte des cellules souches cancéreuses et le fait qu'il est difficile pour les cellules différenciées d'accumuler des mutations, car elles se divisent moins et ont une durée de vie plus courte que les cellules souches, a permis d'établir un autre modèle de développement tumoral : le **modèle hiérarchique**. Selon ce modèle, seule une sous-population cellulaire, celle des cellules souches cancéreuses, est capable d'initier la formation de tumeurs, de proliférer de manière indéfinie et de donner naissance à toutes les cellules de la masse tumorale. Dans la réalité, ces deux modèles coexistent (Tirino *et al.*, 2013 ; Islam, 2015).



**Figure 9 : Représentation schématique des deux théories de formation tumorale**

A droite, la théorie stochastique, où chaque cellule présente dans la tumeur est capable de proliférer et contribuer à la croissance tumorale. A gauche, la théorie hiérarchique : il existe une hiérarchie entre les cellules (Shipitsin et al., 2008).

### 3.2.3 Les niches cellulaires des CSC

Des niches cellulaires semblent être présentes au sein des tumeurs et contiendraient les CSCs. Le microenvironnement (ou la niche) joue un rôle essentiel dans la régulation du comportement des cellules souches cancéreuses (2010). En effet, la niche est nécessaire au maintien de l'identité de la cellule souche cancéreuse et donc à sa capacité d'autorenouvellement, assurant ainsi la production des progéniteurs qui se différencieront (Clarke *et al.*, 2006 ; Borovski *et al.*, 2011).

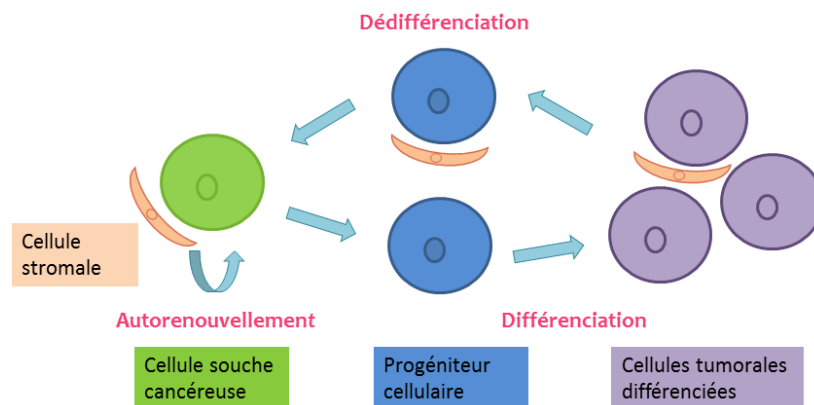
La niche cellulaire pour les CSC serait considérée comme cruciale pour la multiplication cellulaire et pourrait jouer un rôle central dans la réponse tumorale aux traitements. Elle se composerait de fibroblastes et de cellules endothéliales capables de maintenir les caractéristiques d'autorenouvellement et de statut indifférencié des CSC (Reya *et al.*, 2001 ; Calabrese *et al.*, 2007). Ces niches cellulaires sont importantes pour l'expansion d'une tumeur

puisque, selon un modèle mathématique, sa taille finale serait régulée par la taille ainsi que le nombre de niches contenant les CSC (Zhu *et al.*, 2011).

Le microenvironnement et les instabilités génétiques et épigénétiques influencent également l'hétérogénéité de cette sous-population de cellules souches cancéreuses. La plupart des tumeurs solides se développent à partir de cellules souches normales ayant subi des mutations successives. Progressivement, au cours de l'expansion clonale, les cellules souches acquièrent des mutations jusqu'à ce que le phénotype malin émerge. Puis, lors de la progression du cancer, la pression sélective (nutrition, oxygène, défenses immunitaires, thérapies) sera à l'origine de nouveaux clones qui résulteront d'altérations génétiques et épigénétiques (Clarke *et al.*, 2006).

Enfin, dans la masse tumorale, un équilibre dynamique, dû à la régulation par le microenvironnement, existerait entre les CSC et les cellules cancéreuses différenciées (non-CSC) (Li *et al.*, 2006) (Moore *et al.*, 2006). En effet, la niche de CSC contrôle le nombre de cellules et leur prolifération. Ainsi, les CSC et les non-CSC seraient mutuellement échangeables. Les cellules différenciées peuvent se dédifférencier, pour retrouver les caractéristiques des cellules souches cancéreuses, grâce à des signaux provenant de leur environnement et des cellules stromales. Cette restauration des CSC pourrait être la conséquence des rechutes après l'interruption des traitements.

Dans la grande majorité des cancers, la principale cause de décès est due aux métastases qui sont formées puis détachées de la tumeur primaire. Ces métastases vont coloniser des sites distants, après un long passage dans les vaisseaux sanguins et lymphatiques (Grotenhuis *et al.*, 2012).



**Figure 10 : Représentation schématique du modèle dynamique des cellules souches (Clarke *et al*, 2006 ; Li et Neaves, 2006 ; Moore et Lemischka, 2006 ; Vermeulen *et al*, 2012).**

### 3.2.4 La niche des cellules souches cancéreuses : l'importance de l'hypoxie

Un apport en oxygène faible caractérise une région hypoxique. Le développement d'une tolérance à l'hypoxie est associé à un mauvais pronostic pour le patient. Durant le développement tumoral, l'expansion rapide du cancer crée un microenvironnement hypoxique. Des périodes de réoxygénation consécutives à l'hypoxie incitent ensuite la progression tumorale.

La niche des CSC est capable de maintenir des conditions d'hypoxie favorables au développement tumoral. Puisque l'hypoxie est considérée comme un des facteurs majeurs de la niche qui promeut la croissance des tumeurs, Louie *et al.* (2010) ont émis l'hypothèse que des cycles d'hypoxie/réoxygénation pourraient jouer un rôle dans l'enrichissement en cellules souches cancéreuses mammaires et fournir un avantage sélectif à la tumeur.

Ils ont utilisé deux lignées cellulaires dérivées de cancer du sein métastatique humain (MDAMB231 et BCM2) afin d'optimiser les conditions hypoxiques. Après un cycle d'hypoxie (à 1% d'O<sub>2</sub> pendant 7 jours) suivi d'une réoxygénation (d'une durée comprise entre 1 et 3 semaines), une petite population cellulaire survivait à l'hypoxie et pouvait proliférer après réoxygénation. Louie *et al.* ont soumis la sous-population survivante à de nouveaux cycles et l'ont analysée par cytométrie de flux. Au premier cycle, 10% des cultures adhérentes sont devenues non adhérentes. Après un nouveau cycle, ce pourcentage est monté à 30% pour atteindre un maximum de 70% au troisième cycle. Autrement dit, le pourcentage de cellules agressives augmente avec le nombre de cycles. La sous-population obtenue présentait le phénotype CD44<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>ESA<sup>+</sup>, comparable à celui des CSC mammaires.

Ces résultats valident l'intérêt des nouveaux systèmes de culture associant hypoxie et réoxygénation. La régulation des CSC dans les lignées cellulaires de cancer du sein par des facteurs de la niche du microenvironnement tumoral est souvent examinée par cette méthode d'enrichissement.

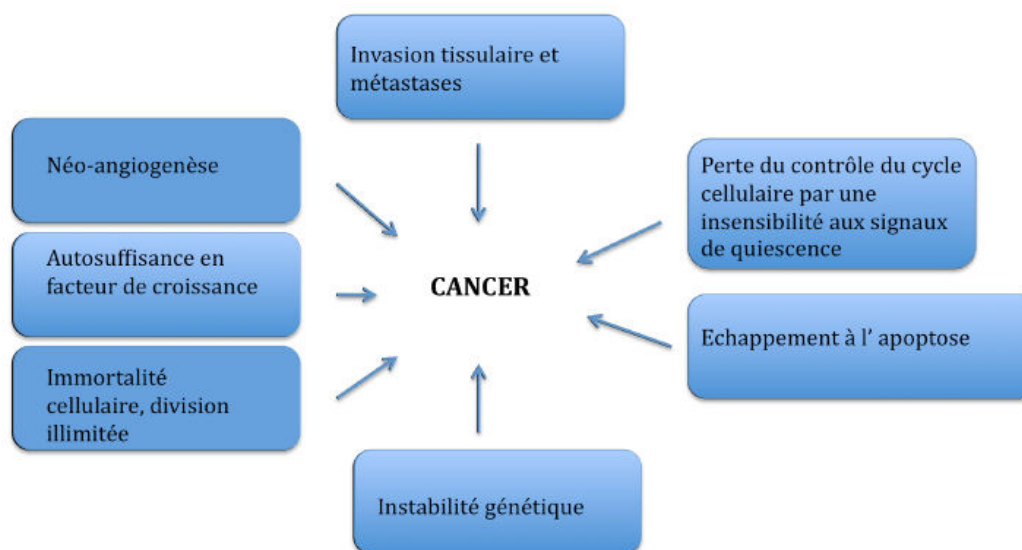
### 3.2.5 Les spécificités de la cellule souche cancéreuse

Les CSC présentent aussi des caractéristiques propres qui les distinguent des CS saines. Ce sont des propriétés le plus souvent acquises à la suite d'altérations génétiques.

Les CSC diffèrent ainsi par des critères inhérents à la transformation cancéreuse comme la prolifération anarchique guidée par des dysfonctionnements du programme d'auto-renouvellement ainsi qu'une différenciation anormale souvent partielle. Au moins quatre des sept traits suivants sont nécessaires pour obtenir une transformation tumorale (Hanahan *et al.*, 2000) :

1. L'autosuffisance en facteurs de croissance,
2. L'insensibilité aux facteurs inhibiteurs de croissance,
3. L'échappement à l'apoptose,
4. Le potentiel de réplication illimité,
5. Le maintien de l'angiogénèse,
6. L'invasion tissulaire et métastase,
7. L'instabilité du génome

Liste à laquelle il faut adjoindre, comme responsable de l'instabilité génétique, l'altération des capacités de réparation de l'acide désoxyribonucléique (ADN). Dans chaque cas, des altérations génétiques du type « gain de fonction » (oncogènes) ou du type « perte de fonction » (gènes suppresseurs de tumeurs) peuvent être rencontrées. La Figure 11 montre de manière visuelle ces éléments.



**Figure 11 : Les 7 éléments-clés de l'oncogenèse selon Hanahan et Weinberg (2000)**

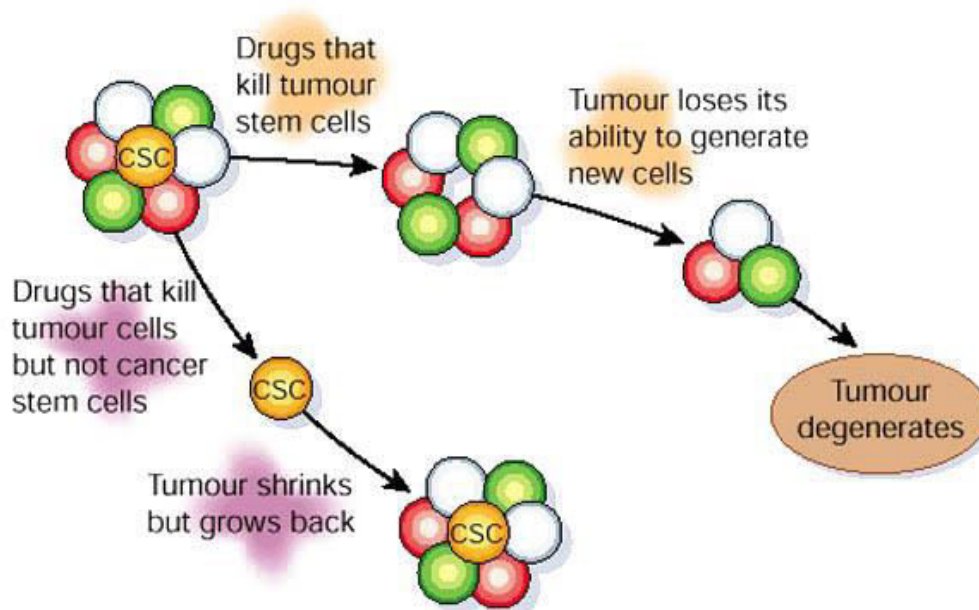
Chaque mécanisme sous-entend l'expression de chacun des autres. Par exemple, l'instabilité génétique permet à la cellule cancéreuse d'explorer avec succès les voies les plus diverses pour subsister, proliférer et envahir les tissus voisins et éloignés.

### 3.2.6 Signification médicale des cellules souches cancéreuses

Les cellules souches cancéreuses étant à l'origine des cancers, leur implication clinique est, de ce fait, très importante (Lobo *et al.*, 2007). En effet, les traitements actuels manquent de spécificité envers les cellules tumorales. Ils montrent une relative efficacité à éliminer la plupart des cellules cancéreuses se divisant rapidement mais ne sont pas capables d'éradiquer les cellules souches cancéreuses qui, de ce fait, reforment des tumeurs après le traitement (Lobo *et al.*, 2007 ; Mueller *et al.*, 2009 ; Dylla *et al.*, 2008).

Les cellules souches cancéreuses résistent à la chimiothérapie grâce à plusieurs mécanismes : la quiescence, leur capacité de réparation de l'ADN, la diminution de l'apoptose ou encore l'expression de transporteurs de type ABC (Dean, 2009).

Les traitements actuels ne permettent pas d'éliminer toutes les cellules cancéreuses (figure 12). Une combinaison de traitements ciblant toutes les sous-populations cellulaires, est essentielle afin d'éviter une nouvelle croissance tumorale et empêcher ainsi une rechute (Li *et al.* 2008). Cependant, il est difficile d'effectuer un criblage d'agents anticancéreux sur la population des cellules souches cancéreuses du fait de la rareté de ces cellules et de la difficulté de les maintenir en culture (Pattabiraman *et al.*, 2014).



**Figure 12 : Thérapies conventionnelles vs thérapies ciblant les cellules souches cancéreuses (Reya *et al.*, 2001).**

Les thérapies classiques éliminent les cellules n'ayant pas la capacité de s'autorenouveler et ayant une capacité de prolifération limitée. Les cellules souches cancéreuses ne sont pas éliminées suite à ce traitement et conduisent à la formation de nouvelles tumeurs et ainsi à la récurrence de la maladie. Cependant, les nouvelles stratégies ciblant les cellules souches cancéreuses, empêchent la formation de nouvelles tumeurs et les rechutes.

De nouvelles approches consistent à cibler les voies de signalisation clé des cellules souches cancéreuses. En effet, les cellules souches cancéreuses et les cellules souches adultes normales ont des propriétés communes c'est pourquoi cibler les voies de signalisation activées par Wnt, Notch ou Hedgehog, qui sont des voies essentielles pour l'autorenouvellement des cellules souches normales, constitue une nouvelle approche encourageante car leur inactivation pourrait permettre l'élimination des cellules souches cancéreuses (Pattabiraman *et al.*, 2014 ; Takebe *et al.*, 2015).

Actuellement, on compte plus de 60 essais cliniques en cours qui testent l'efficacité d'anticorps ou de molécules à éliminer les cellules souches cancéreuses (Kaiser, 2015).

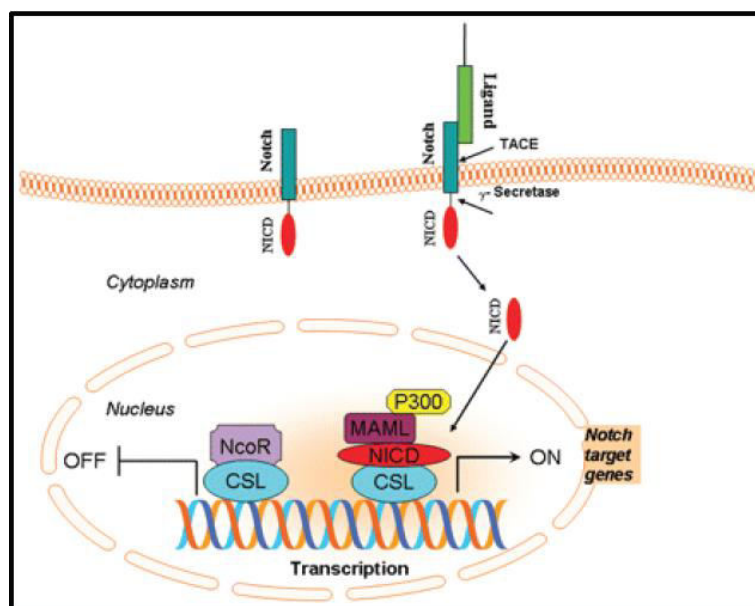
Les cellules souches tumorales résistantes aux traitements sont responsables des rechutes qui peuvent apparaître quelques mois à quelques années après la fin du traitement. Cette période pendant laquelle les cellules souches tumorales sont indétectables est appelée : dormance tumorale.

### 3.2.7 Les voies de signalisations des CSC

Les voies extrinsèques majeures qui régulent l'auto-renouvellement des CSs sont les voies wnt/ $\beta$ -catenin, Notch et Hedgehog.

#### ○ La voie Notch

La voie de signalisation Notch est impliquée dans la régulation de plusieurs processus cellulaires au cours du développement. Elle régule la prolifération, la différenciation et l'apoptose de divers types cellulaires (Fiúza *et al.*, 2007). Notch est un récepteur transmembranaire simple de type I qui fonctionne comme un facteur de transcription activé par un ligand. L'activation de Notch par l'un de ses ligands delta-like (Dll1, Dll2) ou Serratalike (Jagged1, Jagged2) induit la libération du domaine intracellulaire actif du récepteur "Notch intracellular domain" (NICD) par clivage par la  $\gamma$  secrétase (Gordon *et al.* 2007). NICD se transloque alors dans le noyau où il forme un complexe activateur en se liant au facteur de transcription de la famille CSL (CBF1 suppressor of Hairless Lag-1) et au cofacteur MAML (co-factor Mastermind-like). Ce complexe actif peut alors recruter des coactivateurs permettant de promouvoir la transcription de gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose cellulaire. En absence de NICD, le facteur de transcription CSL s'associe avec des co-represseurs pour induire la répression des gènes cibles (voir Figure 13) (Kopan *et al.*, 2009). Des changements dans les niveaux d'expression de Notch ont été observés dans de nombreux cancers tels que le cancer des poumons (Dang *et al.*, 2000), du col de l'utérus (Zagouras *et al.*, 1995) et du foie (Zhu *et al.* 2015). La répression de l'expression de Notch, Dll ou Jagged par des ARN interférents inhibe la prolifération et induit l'apoptose des lignées cellulaires de gliome (Purow *et al.*, 2005) et des CSCs issus de glioblastomes (Wang *et al.*, 2012). La voie Notch est également impliquée dans le cancer du sein, en effet, les récepteurs Notch favorisent la survie des cellules souches du cancer du sein et leur auto-renouvellement, et l'activation du ligand Jagged1 prédit un mauvais pronostic chez les femmes atteintes d'un cancer du sein (Hossain *et al.*, 2017 ; Shah *et al.*, 2017).



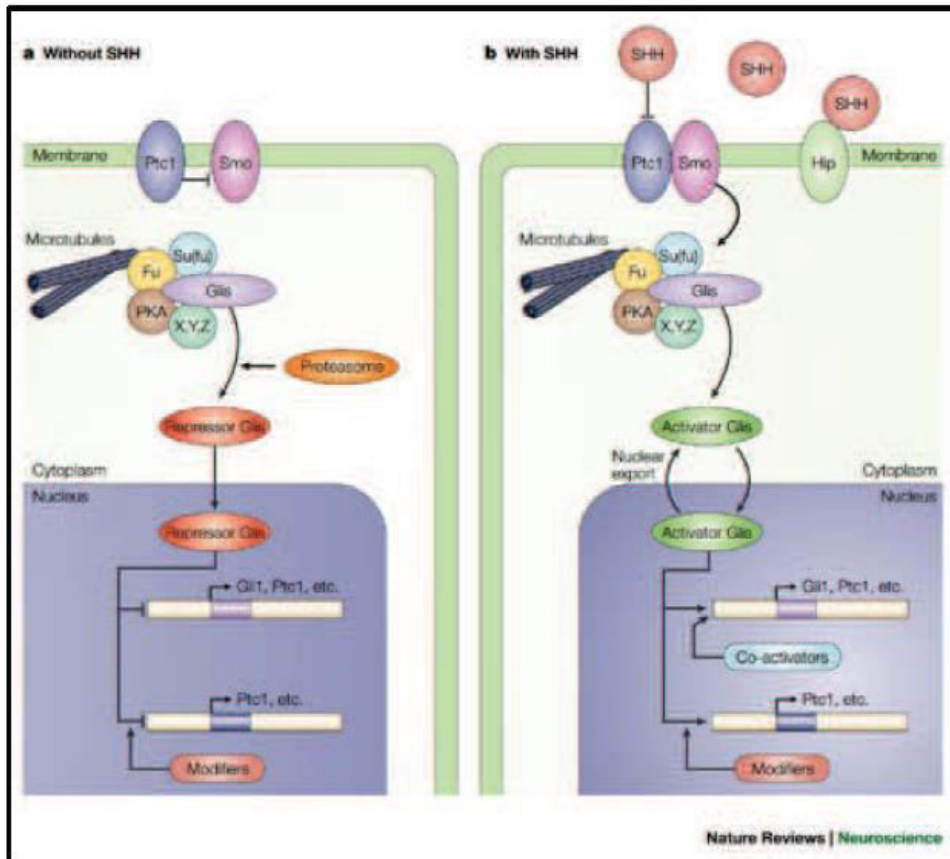
**Figure 13 : Schéma de la voie de signalisation de Notch.**

L'activation du récepteur Notch par ses ligands entraîne le clivage et la libération de NICD (domaine intracellulaire du récepteur). NICD se transloque alors dans le noyau où il forme un complexe actif avec CSL et MAML. Ce complexe induit l'activation des gènes cibles. En absence de ligands, NICD reste lié au récepteur et la transcription de gènes cibles de Notch est maintenue dans un état inactif (d'après Wang *et al.*, 2011).

#### ○ La voie Sonic Hedgehog (Shh)

L'activation de la voie de signalisation Shh est initiée par la liaison de l'un des trois ligands solubles (Sonic Hedgehog Shh, Desert Hedgehog Dhh ou Indian Hedgehog Ihh) au récepteur transmembranaire Patched (Ptc). En absence de ligand, Ptc réprime le récepteur transmembranaire couplé à la protéine G Smoothened (SMO). La liaison du ligand lève l'inhibition de SMO et entraîne la dissociation du complexe suppressor of fused (Sufu) - glioma associated oncogene homologs (Glis), ce qui permet la translocation de ces derniers dans le noyau et finalement l'activation de divers gènes (voir Figure 14) (McMillan *et al.*, 2012).

La voie de signalisation Shh est essentielle au développement de l'embryon (Ingham *et al.*, 2001). Une activation anormale de la voie Shh induit une progression tumorale en affectant les processus de prolifération et de migration (Altaba *et al.*, 2007). La voie Shh maintient les propriétés de souchitude des cellules normales et tumorales, en régulant l'auto-renouvellement et la différenciation. L'inhibition de la voie Shh réduit le nombre des CSCs et limite le potentiel tumorigène des leucémies myéloïdes chroniques (Zhao *et al.*, 2009) et du cancer du sein (Liu *et al.*, 2006).



**Figure 14 : Schéma de la voie Sonic Hedgehog (Shh).**

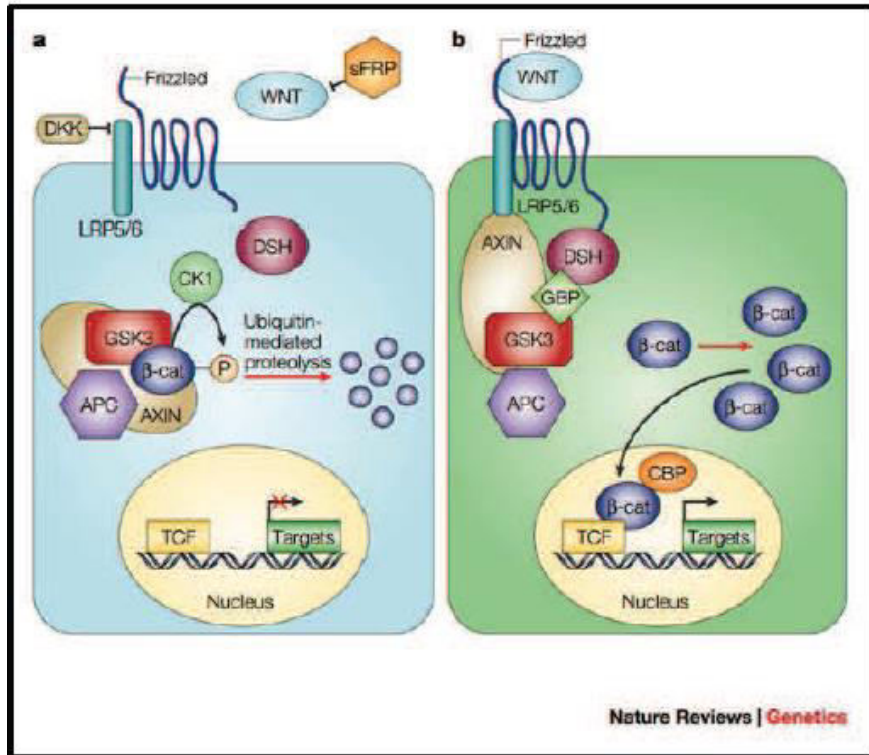
(a) En absence de Shh, Ptc inhibe SMO. Les protéines Glis sont phosphorylées par la protéine kinase A (PKA) conduisant à leur clivage par le protéasome et à la formation de répresseurs Glis qui transloquent dans le noyau pour réprimer la transcription de gènes cibles.

(b) La liaison de Shh à Ptc permet la libération de SMO et la formation d'activateurs Glis inducteurs de la transcription des gènes cibles (d'après Altaba *et al.*, 2002).

○ **La voie wnt/ $\beta$ -catenin**

En absence de ligand, la  $\beta$ -caténine est associée à un complexe multi-protéique, contenant l'APC (adenomatous polyposis coli), l'AXIN et la GSK3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3  $\beta$ ), ce qui induit sa phosphorylation, son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. La fixation de Wnt sur son récepteur «Frizzled » (FZD) permet le recrutement du corécepteur LRP 5/6, entraînant l'activation de la phosphoprotéine «disheveled » (DSH). L'activation de DSH induit l'inhibition de GSK3 $\beta$ , ce qui induit la phosphorylation et la dégradation de la caténine. La  $\beta$ -caténine non phosphorylée s'accumule dans le cytoplasme, puis se transloque dans le noyau pour se lier au facteur de transcription « T-cell specific transcription factor »

(TCF), avec pour conséquence une activation de la transcription du gène d'intérêt (voir figure 15) (Blank *et al.*, 2008 ; Moon *et al.* 2004).

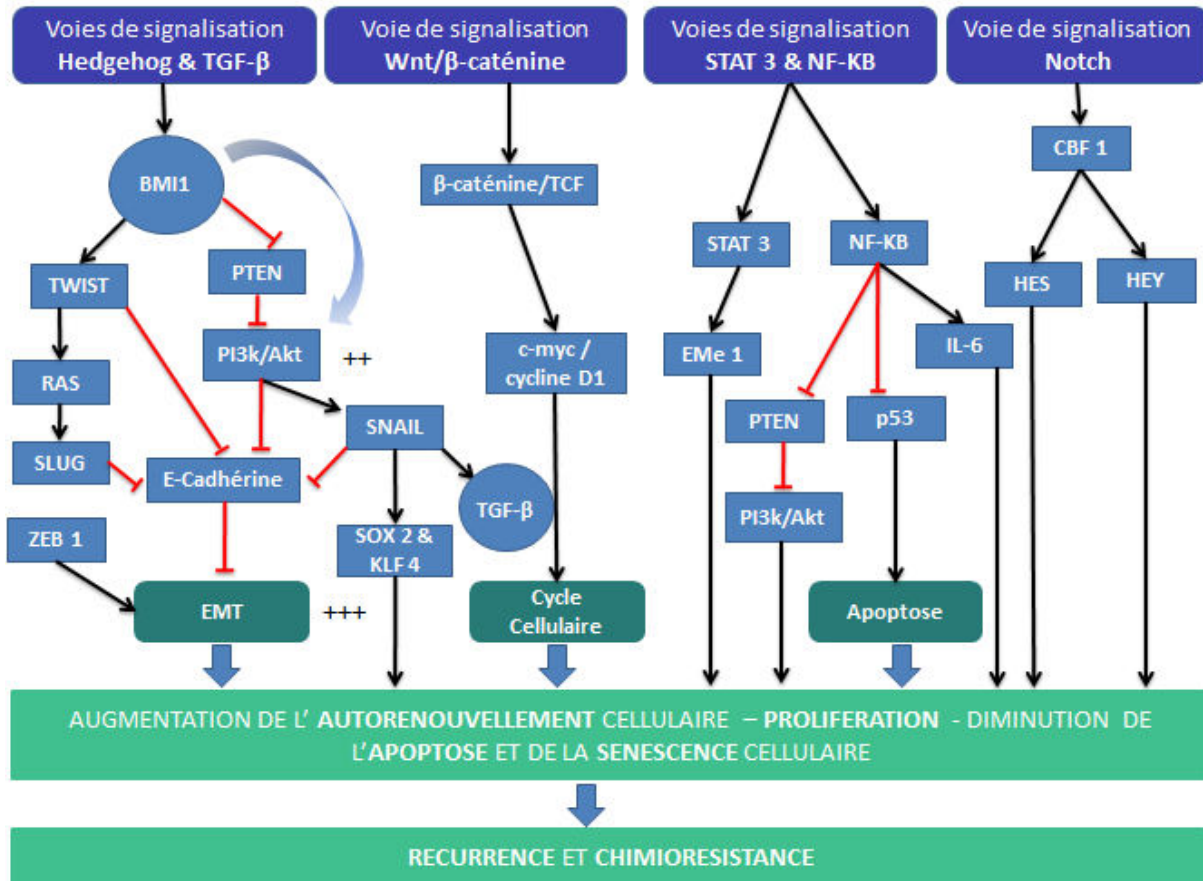


**Figure 15 : Schéma de la voie de signalisation Wnt/β-caténine (Moon *et al.*, 2004).**

- a) En l'absence de Wnt, la β-caténine est dégradée et les gènes cibles potentiels sont dans un état réprimé.
- b) La liaison de Wnt sur son récepteur Frizzled entraîne l'activation de DSH et l'inhibition de GSK3β. Ceci réduit la phosphorylation et la dégradation de la β-caténine. Comme la β-caténine s'accumule dans le cytoplasme, elle peut transloquer ultérieurement dans le noyau, se lier au TCF et induire la transcription des gènes cibles

La voie Wnt/β-caténine est impliquée dans la prolifération, la différenciation et la motilité cellulaire. L'activation de cette voie et ses conséquences transcriptionnelles est déterminée par l'accumulation nucléaire de β-caténine (Van de Wetering *et al.*, 2008). Plusieurs études ont démontré le rôle de la β-caténine dans la régulation de l'auto-renouvellement des CSC et dans le maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires (CSE) (Martello *et al.*, 2012 ; Qiu *et al.*, 2015) et des cellules souches hématopoïétiques (Dolnikov *et al.*, 2014). La surexpression de β-caténine consécutive à la suppression de GSK3β maintient les propriétés

délétères des CSC ; ceci a été décrit pour le cancer du côlon (Venugopal *et al.*, 2015), de la prostate (Chen *et al.*, 2014), du sein (Woodward *et al.*, 2007) et des poumons (Qi *et al.*, 2015). En conclusion, les trois voies de signalisation susmentionnées jouent un rôle majeur dans la régulation de la différenciation et de l'auto-renouvellement des CSC. Une perturbation de ces voies suite à des altérations génétiques ou épigénétiques favorise l'émergence du processus tumoral.



**Figure 16 : Représentation schématique des principales voies de régulation impliquées dans les mécanismes de chimiorésistance des CSC (Alison *et al*, 2010 ; Fan *et al*, 2010 ; Merchant *et al*, 2010 ; Park *et al*, 2005; Siddique et Saleem, 2012; Song *et al*, 2009).**

### 3.2.8 Résistance aux traitements anti-tumoraux

Les CSC résistent aux traitements anticancéreux actuels (radiothérapie et chimiothérapie) par différents mécanismes. Cette résistance est due à la surexpression ou à la répression des gènes clés qui permettent aux CSC d'échapper aux processus de différenciation et d'apoptose. Ainsi les transporteurs d'efflux ABC (ATP binding cassette) se trouvent surexprimés dans les

cancers résistants aux traitements actuels. Ces transporteurs actifs utilisent l'ATP pour faire sortir les molécules actives vers le milieu extracellulaire. Plusieurs transporteurs ont été identifiés dans les CSC, à savoir la glycoprotéine P (P-gp ou ABCB1), la protéine de résistance au cancer du sein (BCRP ou ABCG2) et la protéine liée à la résistance aux médicaments multiples (MRP). D'une façon plus exhaustive, le transporteur ABCB5 se trouve également surexprimé dans les mélanomes humains agressifs résistants à la doxorubicine (Frank *et al.*, 2005). Dans de nombreux cas, les CSC issues de glioblastome ont montré une forte résistance à un traitement anticancéreux à base d'étoposide. Le taux de survie des patients atteints de ce cancer est lié en fait au niveau d'expression de MRP (Jin *et al.*, 2010). La surexpression de BCRP (ABCG2) est associée à une augmentation de l'expression de CD133 et à une dérégulation de la voie AKT dans plusieurs sous populations (SP) de CSC résistantes aux médicaments. La même étude démontre que la voie de signalisation Akt est capable de réguler l'activité d'efflux de la SP des CSC, via une modification de la localisation subcellulaire du transporteur ABCG2. Par voie de conséquence, l'inhibition de la voie Akt non seulement supprime la prolifération des CSC, mais également améliore la sensibilité des cellules chimio-résistantes (Hu *et al.*, 2008). Les CSC possèdent une grande capacité de réparation des dommages causés à l'ADN et échappent alors aux processus apoptotiques.

Récemment, il a été observé que de nombreux types de CSC résistent à l'apoptose grâce à leur capacité de surexprimer les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) et les inhibiteurs des protéines apoptotiques (He *et al.*, 2014). A titre d'exemple, la surexpression de Bcl-2 inhibe l'apoptose et l'autophagie des CSC du côlon, contribuant ainsi à la chimiorésistance (Wu *et al.*, 2013).

L'épuisement des niveaux d'oxygène dans les tissus (hypoxie) a longtemps été considéré comme une caractéristique majeure du micro-environnement tumoral et un contributeur potentiel à la tumorigénicité accrue des CSC. Les facteurs de transcription qui répondent à l'hypoxie sont appelés des facteurs induits par l'hypoxie (HIF s). Ces facteurs empêchent la différenciation cellulaire, favorisent la formation de vaisseaux sanguins et surtout régulent de façon négative le processus pro-apoptotique, en activant des enzymes de réparation de cassures d'ADN et en induisant le développement de cellules tumorales résistantes aux agents thérapeutiques par activation des transporteurs d'efflux ABC (Harada *et al.*, 2007).

### 4. Les cellules souches mammaires

#### 4.1. Les cellules souches mammaires normales

La glande mammaire se développe chez l'embryon à partir de la formation de bourgeons mammaires primitifs. Après la naissance, elle subit un grand nombre de changements lors de la puberté, et chez l'adulte au cours de chaque cycle menstruel et des grossesses, ces processus nécessitent un autorenouvellement cellulaire continu garanti par la présence des cellules souches mammaires et impliquent aussi la participation d'une population cellulaire hétérogène incluant des progéniteurs précoces (luminales et myoépithéliales) ainsi que toutes les cellules constituant l'épithélium mammaire différencié (Visvader, 2009).

L'importante capacité proliférative et régénérative du tissu mammaire lors de chaque cycle reproductif et l'existence de différents lignages cellulaires ont suggéré l'existence de cellules souches de la glande mammaire à la fin des années 50 grâce à des travaux réalisés par *Deome* et son équipe qui ont effectué des expériences de transplantation de clones cellulaires capables de générer un réseau ductal et alvéolaire complet chez la souris (*Deome et al.*, 1959). Des expériences successives ont démontré que la greffe d'une seule cellule dans le tissu adipeux de la glande mammaire de souris peut conduire au développement d'une glande mammaire complète et fonctionnelle (*Kordon and Smith*, 1998; *Shackleton et al.*, 2006). Au courant de cette dernière décennie, on a exploré le potentiel de reconnaissance de la régénération des cellules épithéliales mammaires humaines (*Stingl*, 2009; *Villadsen et al.*, 2007). La glande mammaire est formée de deux types de cellules: les cellules myoépithéliales qui permettent la contraction des canaux pour expulser le lait vers le mamelon et les cellules luminales qui structurent la glande et peuvent se différencier soit en cellules canalaire, soit en cellules produisant du lait. Une sous-population présentant une forte expression de CD49f et une très faible expression de la molécule d'adhésion EpCAM a été récemment mise en évidence pour ses capacités d'autorenouvellement *in vivo* (*Eirew et al.*, 2008; *Lim et al.*, 2009). Grâce à des techniques de traçage cellulaire, la présence de cellules souches unipotentes a été démontrée à la fois dans des lignées luminales et myoépithéliales (*Van Keymeulen et al.*, 2011).

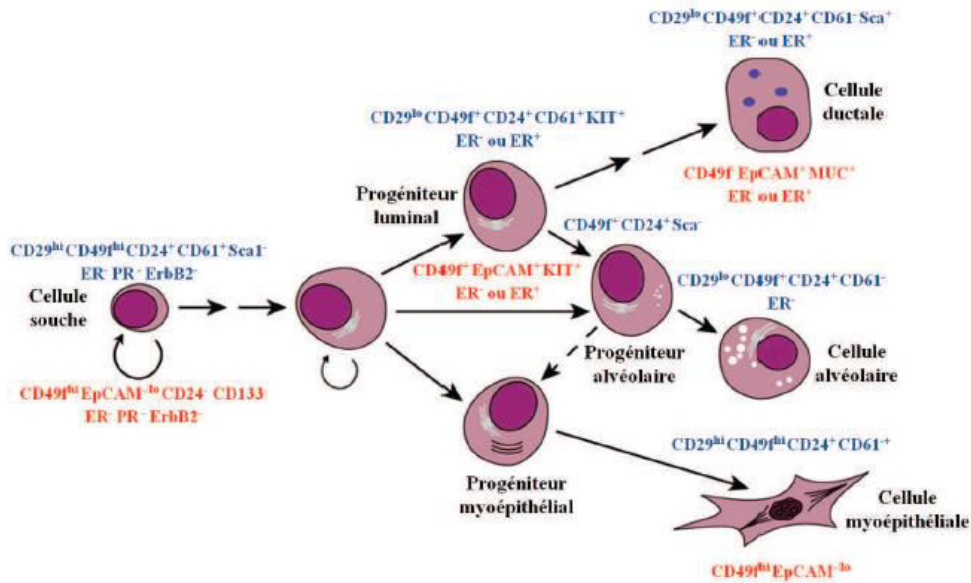
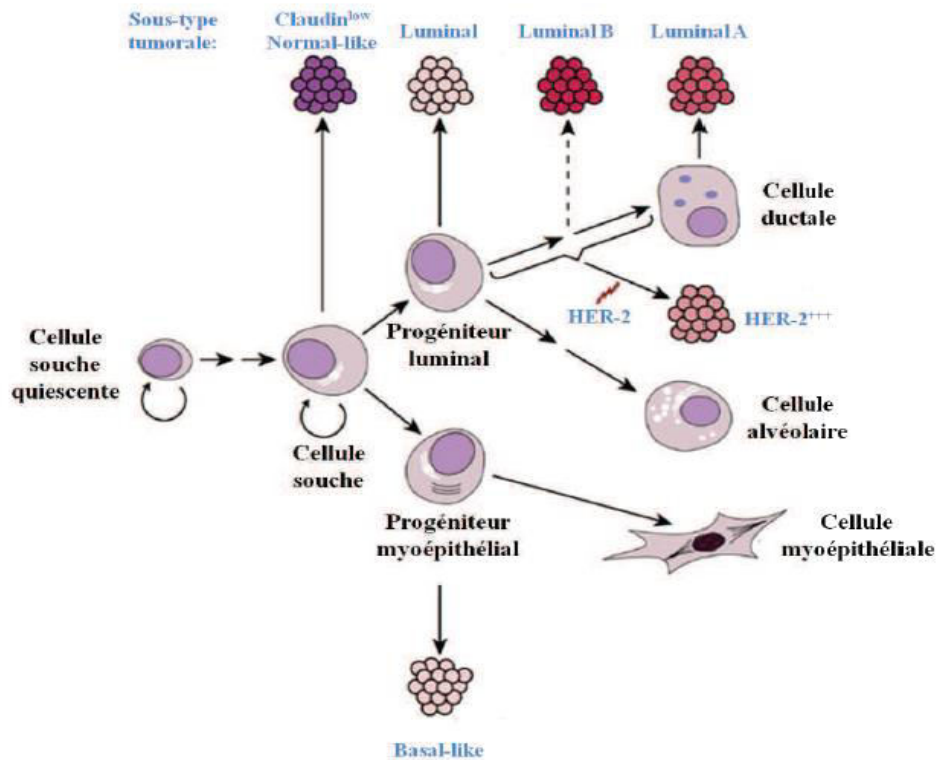


Figure 17 : Modèle de différenciation hiérarchique de l'épithélium mammaire (Visvader, 2009).

#### 4.2. Les cellules souches du cancer du sein

Le cancer du sein est un des premiers cancers solides dans lesquels les CSC ont pu être identifiées et isolées. Les CSC du sein proviendraient soit directement de cellules souches normales suite à une altération génétique, soit de cellules progénitrices, qui pourraient acquérir des propriétés d'auto-renouvellement. Selon les types d'altérations génétiques et de par leur capacité à s'auto-renouveler et à se différencier, ces cellules souches cancéreuses vont être à l'origine de la tumeur et de ses récives. La dichotomie luminal/basal-like des cancers du sein pourrait dériver des progéniteurs lumineux ou myoépithéliaux (Figure 18).



**Figure 18 : Schéma de la différenciation épithéliale mammaire normale et tumorale (Visvader, 2009).**

La première identification d'une CSC dans les tumeurs solides est issue du travail de Al-Hajj *et al.* en 2003. A partir de métastases issues de cancer du sein, une population de phénotype  $CD44^+CD24^{-/low}/ESA^{+/Lin-}$  a été initialement identifiée comme étant des cellules souches. Deux cents cellules présentant ce phénotype injectées dans le tissu adipeux de la glande mammaire de souris immunodéprimées NOD-SCID (*Nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency*), ont été capables de former une tumeur du sein, alors que des cellules provenant d'autres populations ne pouvaient pas former de tumeurs même lorsque des dizaines de milliers de cellules étaient injectées. (Al-Hajj *et al.*, 2003). En outre, ces cellules étaient capables de reconstituer l'hétérogénéité de la tumeur initiale.

Des techniques préalablement validées pour les cellules souches adultes normales ont également été utilisées pour isoler les cellules souches cancéreuses du sein, ces techniques s'appuient sur l'évaluation de l'activité de l'enzyme aldéhyde déshydrogénase (test ALDEFLUOR), la présence d'une *Side Population*, la formation de mammosphères (Dontu *et al.*, 2003b; Ponti *et al.*, 2005), leur quiescence ou encore sur d'autres marqueurs membranaires (Britton *et al.*, 2012; Ginestier *et al.*, 2007; Harnes and DiRenzo, 2009;

Katayama *et al.*, 2009). Les cellules positives pour ALDEFLUOR ont un potentiel métastatique accru. Ainsi, les cellules ALDH+ issues des tumeurs (cellules positives pour ALDEFLUOR) sont jusqu'à mille fois plus tumorigènes et ont une capacité invasive accrue par rapport aux cellules ALDH- (cellules négatives à ALDEFLUOR) (Charafe-Jauffret *et al.*, 2009). De tels marqueurs permettront d'isoler les CSC et de les étudier. Sur ces populations enrichies, il sera possible de pratiquer nombre d'études *in vitro* et *in vivo* (expression génique, protéomique, tests de tumorigénicité, de sensibilité aux drogues, obtention de lignées, étude du rôle des microARN, etc.) qui augmenteront notre compréhension de la maladie.

Il est à noter que différents cancers du sein pourraient dériver de CSC différentes en prenant en considération l'hétérogénéité cellulaire caractérisant la glande mammaire, avec la présence des deux types de cellules progénitrices (luminales et myoépithéliales). L'étude des cellules souches dans diverses lignées cellulaires représentant les différents sous-types moléculaires de cancer du sein a permis de prouver l'hétérogénéité des cellules souches mammaires. Bien que les CSC puissent provenir d'une cellule souche normale ayant subi des mutations cancéreuses, elles peuvent également provenir d'un progéniteur plus différencié ayant acquis des capacités d'auto-renouvellement. Malheureusement, en raison de la nature complexe de l'auto-renouvellement des cellules souches, il est peu probable qu'une voie unique soit responsable de l'autorenouvellement des CSC.

### - Implications thérapeutiques des cellules souches cancéreuses du sein

Malgré la complexité des cellules souches cancéreuses, il est clair que les propriétés «souches» contribuent aux aspects les plus néfastes de la malignité d'une tumeur et sont donc des cibles de choix pour les traitements anticancéreux. Cependant, les cellules souches du cancer du sein résistent à la plupart des thérapies prescrites et, en ciblant préférentiellement les cellules cancéreuses « non souches », la plupart des approches traditionnelles augmentent la proportion de cellules souches du cancer du sein. Par exemple, dans une lignée cellulaire de cancer du sein murin, une semaine de traitement avec du Paclitaxel et de l'Epirubicine a suffi pour constater la survie de la majorité des cellules exprimant le profil CD44<sup>+</sup> / CD24<sup>-</sup> (Li *et al.*, 2008). Des résultats similaires ont été rapportés avec le Docétaxol (Creighton *et al.*, 2009) et le Cisplatine pour les cancers du sein positifs au BRCA (Shafee *et al.*, 2008).

À l'heure actuelle, la résistance des cellules souches aux thérapies couramment utilisées pose un problème majeur pour le succès du traitement des patientes atteintes d'un cancer du sein. La capacité des cellules souches du cancer du sein de survivre à des traitements qui réduisent

en temps normal la croissance tumorale suggère qu'elles peuvent être responsables de la rechute de la tumeur après un traitement.

### 4.3 Les marqueurs des cellules souches du cancer du sein

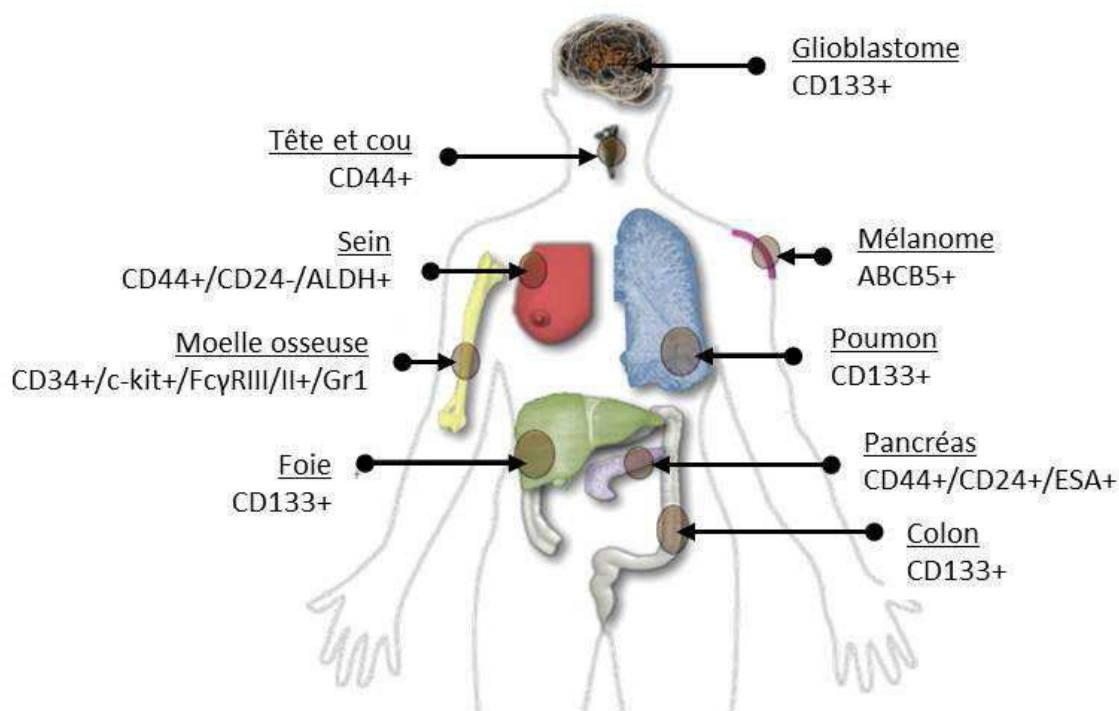
Les cellules souches cancéreuses sont identifiables et quantifiables grâce à deux types distincts de marqueurs tumoraux : Les marqueurs sécrétés qui permettent d'estimer le nombre de CSC, tandis que les marqueurs de surface (Tableau 01) révèlent l'identité de ces dernières.

**Tableau 01: Les marqueurs de surface des cellules souches cancéreuses identifiés dans les tumeurs humaines (Ákos et al, 2012 ; Alison et al, 2012 ; Grotenhuis et al, 2012).**

Type de tumeur	Marqueurs des CSCs
Cerveau	CD133+; SP, intégrine α6
Côlon	CD133+; CD133+/ CD133-; CD44+; EpCAM-/ CD44-/ CD166-; CD44+/ALDH1; ALDH1; EpCAM+/ ALDH1+
Endomètre	CD133+
Estomac	CD44+/ CD24+
Foie	CD133+ ; CD44+/ CD90+; ALDH/ CD133+; GEP; SP
Leucémies (LMA, LMC)	CD34+/ CD38-; ALDH+
Mélanome	ABCB5
Ovaires	CD133+; CD44+/ CD117+; CD44+/ MyD88; SP
Pancréas	CD44+/ CD24+/ EpCAM+ ; CD133+; c-met
Poumon	CD133+; SP; CD133+/ ASCL1/ ALDH1
Prostate	CD133+/ CD44+/ α2β1; CD44+; CD44+/ CD24; ALDH1
Rein	CD105+
Sein	CD44+/ CD24-/ ALDH+; ALDH+; CD90+
Tête et cou	CD44+; SP; CD44+/ ALDH1+
Thyroïde	SP

**ABCB5** : ATP-binding cassette sub-family B member 5 ; **ALDH** : aldéhyde déshydrogénase ; **ASCL1** : achaete-scute complex homologue 1 ; **EpCAM** : molécule d'adhésion épithéliale ; **GEP** : granulin-epithelin precursor ; **CD133 (prominin 1)**, **CD34**, **CD38**, **CD44**, **CD105**, **CD117 (c-kit)** : Glycoprotéines transmembranaires ; **CD90 (Thy1)**, **CD166** : immunoglobulines ; **α2β1** : intégrine α2β1 ; **MyD88** : myeloid differentiation primary response gene (88) ; **SP** : side population

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



**Figure 19 : Principaux marqueurs de CSC identifiés, en fonction de l'organe considéré**  
(Adapté de Morrison *et al.*, 2011)

#### 4.1.1 Side Population (SP) : marqueur de cellules souches normales et cancéreuses

Les populations SP sont enrichies en cellules primitives et indifférenciées. Il s'agit donc d'une source riche en cellules souches et un outil alternatif utile dans les situations dans lesquelles les marqueurs moléculaires des cellules souches ne sont pas connus.

Ces cellules ont été mises en évidence par une technique utilisée en 1996 par l'équipe de M. Goodell pour isoler les cellules souches normales et constituent depuis un modèle intéressant pour l'étude des cellules souches, notamment hématopoïétiques, murines et humaines.

En cherchant à identifier des cellules souches hématopoïétiques en cours de division cellulaire, à l'aide de l'intercalant de l'ADN Hoechst 33342, ces auteurs ont montré qu'une petite proportion de cellules détectable en cytométrie en flux possède la capacité d'exclure le Hoechst 33342 -toxique par ailleurs- à l'aide, notamment, des pompes membranaires ABCG2 et MDR1.

Dans un certain nombre de modèles tumoraux, les cellules SP sont considérées comme une population enrichies en cellules souches cancéreuses dont la capacité d'efflux des drogues pourrait constituer une des causes majeures de résistance aux traitements.

La fonctionnalité SP a été décrite dans de nombreux modèles de tumeurs solides, comme celle du sein, de la prostate, de la thyroïde, de l'estomac, et du poumon. Dans ces modèles, les cellules SP sont fortement enrichies en cellules souches cancéreuses. En effet, les cellules SP constituent l'essentiel de la capacité d'initiation des tumeurs après xénogreffe dans des souris NOD/SCID (Wu & Alman, 2008). Par ailleurs, ces cellules SP sont plus résistantes aux agents anti-cancéreux que le reste des cellules tumorales (Wu & Alman, 2008). La fraction SP dans l'épithélium mammaire normal, se compose de cellules relativement indifférenciées, ayant la capacité de former des structures mammaires différenciées canalaire et lobulaires lorsqu'elles sont transplantées *in vivo* (Alvi *et al*, 2003). Par la suite, il a été suggéré que la sous population SP pourrait permettre d'identifier et d'isoler les CSC. En 2010, Nakanishi *et al* ont mené la première étude décrivant des cellules SP dans des tumeurs mammaires primaires, ils ont également mis en évidence une corrélation entre la fraction SP et le sous type luminal, ainsi qu'un rôle de la voie HER2/AKT dans l'expansion de ces cellules (Nakanishi *et al*, 2010).

L'utilisation de la fraction SP pour étudier les CSC présente l'avantage d'être commune à tous les types de cancers, contrairement aux marqueurs de surface qui diffèrent selon les organes.

### **4.1.2 Marquage CD24-/CD44+**

Les marqueurs de surface CD24 et CD44 sont utilisés couramment depuis plusieurs années pour identifier les CSC dans différentes tumeurs solides, notamment dans les cancers du sein et du pancréas. La fiabilité et les certitudes quant à ces marqueurs dépendent du type de tumeur étudiée (Jaggupilli & Elkord, 2012).

### ✓ Propriétés des cellules CD24-/CD44+ dans les cancers du sein

En 2003, un groupe de chercheurs (Al-Hajj *et al.*, 2003) a montré que les tumeurs mammaires dérivent de cellules souches somatiques adultes. Afin de comprendre les mécanismes régissant l'hétérogénéité des tumeurs solides, AL HAJJ *et al.* (2003) ont utilisé des modèles murins immunodéficients : des souris femelles NOD/SCID de huit semaines d'âge.

Pour distinguer les cellules entre elles, les auteurs ont utilisé la cytométrie en flux, permettant ainsi de trier les cellules en fonction de l'expression différentielle de marqueurs de surface.

Les anticorps utilisés étaient dirigés contre les antigènes CD44, CD24, B38.1, l'antigène spécifique épithélial (ESA, pour *epithelial-specific antigen*) et l'antigène H2K de classe I. Ils ont ensuite injecté ces cellules à des souris NOD/SCID.

De leurs expériences, on retient que :

- D'après la cytométrie de flux, toutes les cellules de la tumeur n'ont pas le même pouvoir tumorigène. Les cellules initiatrices de cancer du sein sont ESA+ CD44+CD24-.
- Ces cellules sont capables de donner naissance à une tumeur et elles permettent de reproduire l'hétérogénéité de la tumeur de départ.
- Ces cellules initiatrices de cancer sont en petit nombre dans la tumeur d'où elles proviennent.

Des études ont confirmé par la suite les propriétés de CSC des cellules CD24-/CD44+ en montrant la possibilité de les enrichir *in vitro*. En effet, étant présent en faible nombre dans les tumeurs humaines, cela en fait un facteur limitant pour le développement de thérapies ciblées. Ainsi, il est possible de conserver à long terme une forte proportion de cellules CD24-/CD44+ présentant des caractères de CSC comme la capacité à induire des tumeurs ou l'expression de facteurs angiogéniques, grâce à la culture de tumeurs humaines sous forme de mammosphères *in vitro* (Ponti *et al.*, 2005). Le marquage CD24-/CD44+, couplé ou non au phénotype ESA+, est le plus couramment utilisé dans la littérature pour étudier les CSC mammaires.

### ✓ CD44

CD44 est une glycoprotéine transmembranaire qui a diverses fonctions dans la division cellulaire, la migration, l'adhésion et la signalisation. Le CD44 se lie à son ligand primaire, l'acide hyaluronique (HA). Cette liaison serait responsable de la signalisation cellulaire et de la régulation d'autres processus biologiques de la cellule. La particularité du gène de CD44 est de contenir 20 exons que l'on peut diviser en deux groupes. Les exons 1-5 et 16-20 codent pour la forme ubiquitaire de CD44, c'est la forme dite standard ou encore CD44s. Les exons

6-15 aussi appelés v1-v10 subissent un épissage alternatif. Il est estimé qu'en théorie, le gène de CD44 peut générer jusqu'à plus de 1000 variantes (CD44v) (Goodison *et al.* 1999).

CD44 a plus de 20 isoformes qui participent à la différenciation cellulaire. Celles communément connues comprennent 12 isoformes. Celles-ci sont connues sous le nom de variantes et sont symbolisées par "v". La nomenclature pour cela est CD44v #. Ces variantes peuvent également être observées dans des cellules pathologiques (Gee *et al.* 2004).

### ✓ Le rôle de CD44 dans la progression tumorale

Une dérégulation de l'expression de CD44 peut s'avérer très néfaste pour la cellule et conduire à différentes pathologies. Dans le cadre du cancer, il a été constaté que l'expression de CD44 est associée à un potentiel accru d'initiation, de progression tumorale et de formation de métastases. Des variantes spécifiques de CD44 ont été trouvées fortement exprimées dans certaines cellules souches de cellules métastatiques cancéreuses (Gee *et al.* 2004). Par exemple, on pense que le CD44v6 (possédant l'exon variant 6) est impliqué dans les cancers du sein et les cancers colorectaux (Akisik *et al.* 2002 ; Olsson *et al.* 2011). On le retrouve également dans les carcinomes pancréatiques, les lymphomes non-Hodgkiniens, les carcinomes du colon ou encore les cancers thyroïdiens papillaires (Rudzki & Jothy 1997) (Ohata *et al.* 2012 ; Du *et al.* 2008).

Même si ces altérations dans l'expression de CD44 ne sont pas à elles seules responsables des capacités métastatiques des cellules tumorales, il apparaît actuellement évident qu'elles y contribuent fortement. Ces effets peuvent s'expliquer de différentes manières et sont spécifiques d'un type cellulaire donné. Ainsi, l'affinité du récepteur pour l'acide hyaluronique pourrait conduire à un détachement facilité des cellules de leur support et faciliter ainsi leur migration. Une dégradation plus rapide de ce substrat pourrait quant à elle faciliter la progression des cellules tumorales jusqu'aux vaisseaux sanguins. Sans oublier l'influence que peut avoir CD44 sur différentes cascades de signalisation intracellulaire et sur l'expression de nombreuses protéines, elles-mêmes impliquées dans ces processus. Tous ces aspects rendent la compréhension du rôle de CD44 lors des processus de cancérisation extrêmement complexe et de nombreuses zones d'ombres restent encore à éclaircir.

### 4.1.3 ALDH1

Les aldéhyde déshydrogénases constituent une superfamille d'isoenzymes cytosoliques qui jouent un rôle clé dans le métabolisme des aldéhydes endogènes et exogènes. Les ALDH sont également impliqués dans la détoxification des aldéhydes intra-cellulaires en acides carboxyliques, et de l'oxydation du rétinol en acide rétinoïque. Ces enzymes jouent notamment un rôle critique dans la différenciation des cellules souches hématopoïétiques, en effet l'acide rétinoïque agit comme facteur de transcription, contrôlant des processus biologiques tels que la prolifération, la différenciation, l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Balicki, 2007; Douville *et al*, 2008; Marcato et al, 2011).

A ce jour, dix-neuf différentes isozymes d'ALDH humaines ont été identifiées, ALDH1 en est la principale isoforme. ALDH1 code une isoforme enzymatique distincte localisée dans le cytoplasme et joue un rôle clé non seulement dans la régulation du métabolisme des aldéhydes mais aussi dans la différenciation cellulaire, la prolifération (Matsuda *et al*. 2013) (Huang *et al*. 2009) et la motilité (Moreb *et al*. 2008).

Certaines CSC ont une ou plusieurs activités ALDH (Tanei et al. 2009) qui leur permettent de résister à certains traitements par des agents anti-cancéreux. L'activité ALDH devient alors un marqueur fiable, indicatif, de la présence de cellules souches au sein de tissus présentant des transformations malignes. L'ALDH1 a été suggérée comme marqueur du CSC, et une relation entre l'expression de ce marqueur et le pronostic du cancer a été proposée (Fedyanin *et al*. 2017 ; Zhou *et al*. 2016). Son activité a notamment été proposée comme marqueur potentiel de CSC du sein en 2007, par Ginestier *et al*. (Ginestier *et al*, 2007a). Ainsi, leurs travaux ont montré qu'une augmentation de l'activité de l'ALDH1 observée dans les cellules mammaires souches/progénitrices normales et malignes, peut servir d'indicateur de mauvais pronostic. L'expression ALDH1 est également désignée dans ces travaux comme un puissant facteur pronostique de survie globale (Balicki, 2007; Ginestier *et al*, 2007a). L'analyse des sous-populations cellulaires ALDH+ sur un panel de lignées de cancer du sein confirme ces caractéristiques de CSC, telles que la tumorigénicité accrue en souris NOD/SCID, l'auto-renouvellement et la différenciation (Charafe-Jauffret *et al*, 2009b). La sous-population ALDH+ surexprime de plus des gènes connus pour jouer un rôle dans la maintenance des cellules souches : NOTCH2, NFYA, RMB15/OTT, TPRXL, ST3GAL3.

La détection des ALDH est souvent réalisée par des techniques d'histologie, qui permettent de mettre en rapport les protéines suspectées. Cependant, cela peut s'avérer complexe, puisque des contributions de multiples isoenzymes d'ALDH distinctes peuvent être observées en

fonction du tissu tumoral considéré (Douville *et al.* 2009 ; Ginestier *et al.* 2007 ; Marcato *et al.* 2011). Quasiment toutes les isoenzymes ont été corrélées à des types de cancers (sein, prostate, colon, rectum, estomac, œsophage, pancréas, vessie, poumon, système hématopoïétique) et il est encore nécessaire de bien définir la nature de l'isoenzyme responsable de la forte activité ALDH dans chaque type de cancer (Pors *et al.* 2014).

### 4.1.4 Autres marqueurs de CSC du sein et associations de marqueurs

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

#### ✓ CD133/prominin1

CD133 ou prominine-1, une glycoprotéine de surface cellulaire à cinq domaines transmembranaires, initialement associée au cholestérol et décrite plus tard comme un biomarqueur spécifique pour sélectionner les cellules progénitrices hématopoïétiques humaines. CD133 est reconnu comme un biomarqueur important pour identifier et isoler la sous-population de CSC dans de nombreux types de néoplasmes. Elle est notamment utilisée pour isoler les CSC du glioblastome et du cancer colorectal, entre autres (Singh *et al.*, 2004) (Charafe-Jauffret *et al.*, 2009a). Les cellules CD133+ ont des propriétés souches telles que la résistance aux médicaments, l'auto-renouvellement, la capacité de différenciation; une prolifération élevée et sont également capables de former des tumeurs dans les xénogreffes. Ces cellules CD133+ sont plus résistantes au rayonnement et à la chimiothérapie standard que les cellules CD133 (Deonarain *et al.* 2009 ; Irollo *et al.* 2013).

La valeur clinique de CD133 dans le sein a été examinée par quelques études, parmi lesquelles celle de Zhao *et al.*, qui concluent à son intérêt dans la prédiction du pronostic des cancers triple-négatifs (Zhao *et al.*, 2011). Dans les études *in vitro*, CD133 est généralement utilisé en association avec d'autres marqueurs de CSC. Ainsi, Croker *et al.* ont étudié le pouvoir métastatique de cellules triées à partir de lignées cancéreuses mammaires humaines en fonction de leurs phénotypes ALDH, CD24, CD44 et CD133 (Croker *et al.*, 2008). Leurs travaux montrent que les cellules de type ALDH+/CD44+/CD24- et ALDH+/CD44+/CD133+ se divisent plus vite, forment plus de colonies, sont plus invasives *in vitro*, et sont plus métastatiques *in vivo* que les cellules de type ALDH+/CD44-.

### ✓ CD201/PROCR

Le récepteur de surface PROCR est un marqueur de cellules souches embryonnaires, neurales, hématopoïétiques et folliculaires (Ivanova *et al*, 2002). Dans le sein, ce marqueur serait étroitement associé à l'expression de la protéine CD44. Ainsi toutes les cellules CD44<sup>+</sup> sont également PROCR<sup>+</sup>, d'après l'étude de Shipitsin *et al.*, qui démontre les similarités moléculaires existant entre les cellules cancéreuses de type CD44<sup>+</sup>/PROCR<sup>+</sup> et les cellules souches normales (Shipitsin *et al*, 2007).

### 5. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS

#### 5.1. Problématique :

Les cancers du sein représentent la première cause de mortalité induite par cancer chez la femme. Parmi eux, il y a des tumeurs mammaires, notamment les triple-négatives, considérées comme les plus agressives, car elles ne répondent ni aux traitements hormonaux, ni aux thérapies ciblées. Ces cellules tumorales dérivent de cellules souches mammaires peu différenciées. Ainsi, les tumeurs mammaires triple-négatives sont enrichies en cellules souches cancéreuses mammaires. La chimiothérapie conventionnelle est le traitement de référence mais avec une efficacité relative et un fort taux de récurrence. Ces récurrences pourraient être liées au fait que la chimiothérapie affecte peu les cellules souches cancéreuses. Il est maintenant admis que cette population s'accroît au sein de la tumeur après utilisation des thérapies conventionnelles. Les cellules souches cancéreuses mammaires sont ainsi probablement à l'origine de la progression tumorale, de la récurrence et de la formation de métastases. Il est donc pertinent de développer des stratégies thérapeutiques qui ciblent les tumeurs mammaires enrichies en cellules souches cancéreuses.

Dans ce contexte, il est impératif de :

- Classer les cancers du sein en sous-types moléculaires selon l'expression des récepteurs hormonaux dans les tumeurs. Les cancers du sein seraient ainsi classés en groupes de bon pronostic et de mauvais pronostic. Ceci permettrait de traiter les patientes atteintes de sous-types moléculaires particulièrement agressifs de cancer du sein, tel que le triple-négatif, pour lequel aucune thérapie ciblée n'existe à ce jour.
- Inclure dans le diagnostic du cancer mammaire en routine l'analyse du statut des principaux marqueurs des cellules souches cancéreuses, tels que ALDH1 et CD44 par la technique d'immunohistochimie, permettant ainsi de faire bénéficier à chaque patiente d'une thérapie ciblée selon la présence ou non de cellules souches cancéreuses dans leurs tumeurs. Ainsi, le taux de survie sans rechute en serait fortement amélioré.

## 5.2. Objectifs :

L'objectif de notre recherche était :

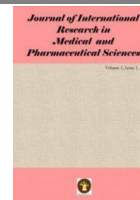
- D'étudier les caractéristiques histocliniques et moléculaires des tumeurs issues de patientes atteintes de cancer du sein dans la région du nord-ouest de l'Algérie.
- De classer les cancers du sein en sous-types moléculaires distincts par une approche immunohistochimique.
- D'identifier les cellules souches cancéreuses (CSC) par l'expression de marqueurs de surface spécifiques des CSC, ALDH1 et CD44 dans les tumeurs mammaires par une approche immunohistochimique.
- D'étudier la distribution des CSC dans les différents sous-types moléculaires du cancer du sein.
- De corréler l'expression de ALDH1 et CD44 avec les différents paramètres histocliniques et moléculaires.

A decorative border resembling a scroll, with a vertical strip on the left and a horizontal strip at the top, both ending in small circular curls.

# **CHAPITRE II :**

# **Présentation des Travaux**

Cette partie a fait l'objet d'une publication internationale auprès d'un journal scientifique avec comité de lecture spécialisé: **Journal of International Research in Medical and Pharmaceutical Sciences**



**ASSOCIATION OF CANCER STEM CELLS IDENTIFIED BY  
ALDH1 AND CD44 EXPRESSION WITH BREAST CANCER  
SUBTYPES IN WEST ALGERIAN PATIENTS**

**MERIEM KAOUTER BENYELLES<sup>1</sup>, LYNDIA ADDOU-KLOUCHE<sup>1,2\*</sup>, AMINA  
BENDAOU<sup>1</sup>, AMINA BELHADJ<sup>1</sup>, MILOUD MEDJAMIA<sup>3</sup>, MOHAMED  
BENALI<sup>1,4</sup> AND SORAYA MOULESSEHOUL<sup>1,4</sup>**

<sup>1</sup>Department of Biology, Djillali Liabes University of Sidi bel Abbes, Algeria.

<sup>2</sup>Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, University of Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, Algeria.

<sup>3</sup>Anatomy and Pathology Laboratory, Regional Military Hospital, Algeria.

<sup>4</sup>Laboratory of Biotoxicology, Djillali Liabes University of Sidi bel Abbes, Algeria.

**AUTHORS' CONTRIBUTIONS**

This work was carried out in collaboration between all authors. Author LAK designed the study. Authors LAK and MKB performed the statistical analysis, wrote the protocol and wrote the first draft of the manuscript. Authors LAK and MM managed the analyses of the study. Authors MKB and AB managed the literature searches. All authors read and approved the final manuscript.

**Received: 18<sup>th</sup> October 2017**

**Accepted: 3<sup>rd</sup> December 2017**

**Published: 1<sup>st</sup> January 2018**

**Original Research Article**

**ABSTRACT**

Breast cancer represents the most common malignancy and leading cause of death among women worldwide and particularly in Algeria. Some breast cancer subtypes are of poor prognosis causing drug resistance that has become the major cause of treatment failure. The cancer stem cell (CSC) hypothesis has important clinical implications for cancer therapeutics because of the proposed role of CSCs in chemoresistance. Putative breast cancer stem cells might express surface markers such as aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) and Cluster of differentiation 44 (CD44) proteins. The aim of this study was to explore the expression of these proteins in breast cancers from an Algerian population and their associations with the clinicopathological characteristics and breast cancer subtypes.

**Methods:** Clinical information was obtained by reviewing preoperative and postoperative medical records for 4 years, then 46 paraffin-embedded breast carcinoma samples were analyzed by immunohistochemical methods. Finally, statistical analyses were to evaluate associations between CD44 and ALDH1 expressions and various clinicopathological parameters including breast cancer subgroups

**Results:** In total, 9 tumors (21%) expressed ALDH1, whereas 11 (28%) expressed CD44 protein. Expression of ALDH1 was associated with high young age (P = 0.05), Progesterone receptor positivity (P = 0.014) and triple negative breast cancer (P = 0.045). On the other hand, CD44 expression was associated with SBR grade II (P = 0.057), HER2 subtype (P = 0.001) and the triple negative subtype (P = 0.049).

**Conclusion:** CD44<sup>+</sup> and ALDH1<sup>+</sup> phenotypes seem to identify CSC with distinct levels of differentiation. It seems that the biomarkers that identify breast CSC within the breast cancer subtypes need to be better explored,

\*Corresponding author: Email: [addouklouche.lynda@yahoo](mailto:addouklouche.lynda@yahoo)

### **1 Matériels et méthodes**

#### **1.1 Etude clinicopathologique**

46 patientes atteintes de cancer du sein ont été recrutées dans cette étude. Il s'agit de patientes diagnostiquées au Centre hospitalo-universitaire Hassani Abdelkader de Sidi Bel Abbes, au centre hospitalo-universitaire d'Oran et à l'Hôpital Militaire Universitaire et Régional d'Oran (HMRUO) entre Janvier 2009 et Décembre 2013. Les données histocliniques ont été recueillies à partir des dossiers des patientes du service d'oncologie.

#### **1.2 Matériel Biologique : Prélèvements et traitements**

L'étude a porté sur 46 patientes atteintes de cancer du sein et ayant subi une mastectomie. Les tumeurs ont été incluses en paraffine, les blocs obtenus découpés au microtome ont fait l'objet d'une étude histologique et immunohistochimique.

#### **1.3 Préparation des tissus**

Les prélèvements ont été fixés dans du formol à 10%, tamponné à la neutralité, pendant 24 heures et inclus en paraffine.

Pour notre étude, 6 lames par bloc (de coupes sériées) de 2 micromètres ont été réalisées à l'aide du microtome : 5 lames pour l'immunohistochimie et une lames pour l'histologie, ce qui correspond à 276 lames au total (230 lames immunohistochimiques et 46 lames histologiques). Les coupes ont été étalées sur des lames silanisées suivant la technique du bain-marie qui consiste à faire flotter le ruban de l'échantillon dans ce dernier, préchauffé à 40°C puis récupérer la coupe histologique sur la lame qui y adhère sans substance collante, les lames seront ensuite séchées à l'étuve à 56°C pendant 12 heures.

#### **1.4 Histologie classique**

Pour chaque prélèvement, une des coupes a été colorée à l'Hémalun-Eosine afin d'établir le type histologique exact de la tumeur selon les critères histologiques standards.

### 1.5 Technique immunohistochimique (IHC)

#### 1.5.1 Anticorps primaires

Différents anticorps ont ainsi été utilisés avec leurs dilutions correspondantes:

- Un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur de l'oestrogène  $\alpha$  (Dako; clone 1D5). **Dilution: 1/100**
- Un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur de la progestérone (Dako; clone PgR 636). **Dilution: 1/100**
- Un anticorps monoclonal dirigé contre HER2 (Dako, clone PN2A). **Dilution: 1/100**
- Un anticorps monoclonal dirigé contre ALDH1 (Thermo-Fisher scientific ; clone 5A11). **Dilution : 1/50**
- Un anticorps monoclonal dirigé contre CD44 (Thermo-Fisher scientific; clone 156-3C11). **Dilution : 1/100**

#### 1.5.2 Protocole de l'immunomarquage sur tumeur

- Des coupes histologiques d'une épaisseur de 2 micromètre ont été réalisées sur des lames silanisées afin d'éviter le décollement des coupes lors des différentes procédures immunohistochimiques. Les lames sont déparaffinées dans des bains de xylène (4 fois pendant 5 minutes) et réhydratées dans des bains successifs d'actone (2 fois pendant 5 minutes) puis dans de l'eau courante durant 5 minutes.
- Les échantillons passent au démasquage antigénique afin de restaurer l'immunoréactivité de l'antigène recherché (target retrieval solution Citrate pH 6.0. Ref S1699) dans un bain-marie bouillant pendant 50 minutes, puis sont mis à refroidir sur la paillasse à température ambiante pendant 20 minutes et rincés au Tampon Phosphate Salin (PBS. Ref. S3024 ; Dako, France).
- L'activité peroxydase endogène est inhibée par incubation des coupes dans une solution oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pendant 30 minutes puis rincée à l'eau pendant 5 minutes.
- Les coupes sont ensuite délimitées au stylo DakoPen (Dako SA, Trappes, France).
- Les lames sont incubées à l'anticorps primaire (les anticorps primaires sont appliqués aux dilutions indiquées plus haut) pendant 1 heure. Nous appliquons environ 250 microlitres d'anticorps dilué par lame ; nous effectuons ensuite 4 rinçages de 5 minutes dans du PBS.
- Les échantillons sont incubés avec l'anticorps secondaire HRP lapin/souris, Dako real envision; Réf.K5007, Dako, France) à température ambiante pendant 30 minutes.

- L'activité peroxydase est révélée par application du révélateur DAB (Diaminobenzidine Tetrahydrochloride) associé au chromogène incubés dans la chambre humide pendant 15 minutes (Ref. K5007 ; Dako, France). Un rinçage à l'eau est ensuite effectué. Le chromogène utilisé est oxydé par la peroxydase et donne un précipité brun insoluble dans l'eau et les solvants organiques.
- Les lames sont contre-colorées avec l'hématoxyline de Mayers pendant 15 secondes. Les noyaux se colorent en bleu.
- Enfin, les échantillons peuvent être montés et couverts avec des lamelles dans un médium de montage permanent et aqueux (Micromount mounting medium ; Labonord, France).

### 1.6 Evaluation du statut immunohistochimique

La lecture des lames a été faite séparément par deux médecins anatomopathologistes. Le niveau d'expression des marqueurs étudiés a été établi en se basant sur le pourcentage des cellules immunopositives et sur l'intensité du marquage:

- <10% étaient classées comme négatives et >10% comme positives pour les marqueurs nucléaires ER et PR.
- L'immunoréactivité membranaire du HER2 : 0 et 1+ marquage absent à faible ; 2+ marquage intermédiaire ; 3+ marquage positif avec surexpression.
- Pour CD44 et ALDH1 : Un système de scoring Allred a été utilisé pour l'intensité de la coloration (0 = négatif, 1 = faible, 2 = modéré, 3 = fort) et la proportion de cellules colorées (0 = 0%, 1 < 1%, 2 = 1 à 10%, 3 = 11 à 33%, 4 = 34 à 66%, 5 > 67%). L'intensité et la proportion sont additionnées pour un score final avec 8 valeurs possibles (les scores de 0 et 2 sont considérés comme négatifs. Les scores de 3 à 8 sont considérés comme positifs).

### 1.7 Définition des sous types moléculaires

Les sous types moléculaires du cancer du sein ont été définis sur la base de l'expression immunohistochimique des récepteurs hormonaux (RE, RP) et de HER2, le tableau suivant décrit nos critères de classification :

**Tableau 02 : critères utilisés dans notre étude pour la classification moléculaire du cancer du sein**

Sous type moléculaire	Critères utilisés
Luminal A	ER+ PR+/- HER2-
Luminal B	ER+ PR+/- HER2+
Triple négatif	ER- PR- HER2-
HER2+	ER- PR- HER2+

### 1.8 Analyse statistique

Nous avons d'abord établi la distribution des sous-types moléculaires des cancers du sein à partir des données histocliniques de chaque patiente recrutée de l'hôpital militaire régional d'Oran (HMRUO). Une étude de corrélation a ensuite été réalisée dans le but de rechercher la relation entre l'expression des marqueurs de cellules souches ALDH1 et CD44 et les différents sous-types moléculaires pour chaque patientes.

L'analyse statistique des données a été réalisée à l'aide du logiciel SPSS 20.0 (SPSS, Inc., Chicago IL, USA). En règle générale, l'ensemble des résultats est représenté par la moyenne du groupe étudié suivie de son écart type. Les résultats des comparaisons ont été considérés comme statistiquement significatifs dès lors où la valeur de la probabilité critique «*p*» est inférieure ou égale à 5%. Les intervalles de confiance des moyennes sont à 95% (IC95%).

Pour chaque test statistique utilisé, le test était considéré comme significatif lorsque *p* (degré de signification) était inférieur à 0,05.

## 2. Résultats

### 2.1 PARAMETRES CLINICOPATHOLOGIQUES ET MOLECULAIRES DES TUMEURS MAMMAIRES

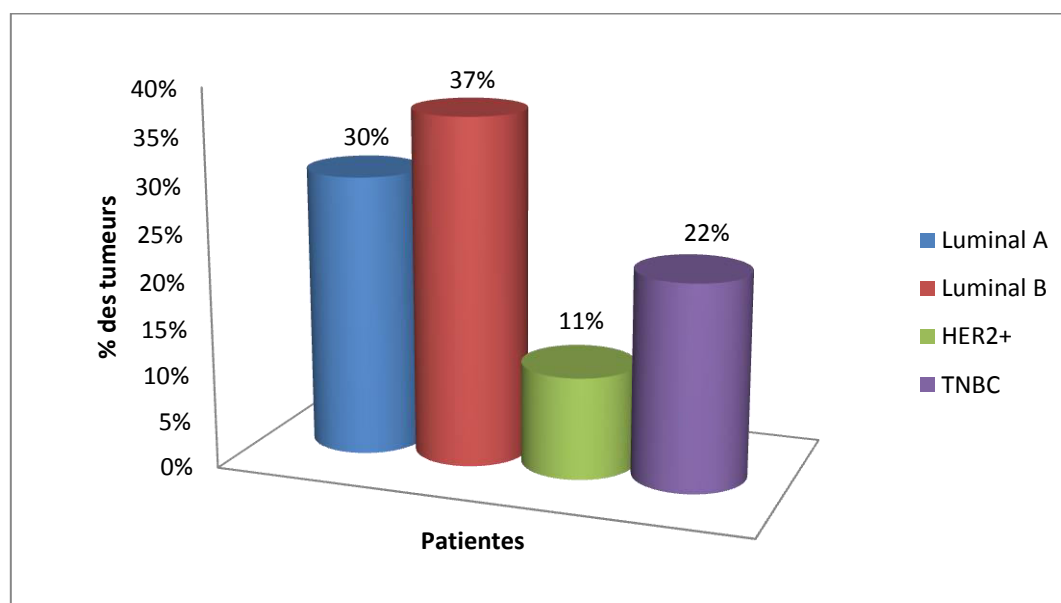
Avant de présenter les résultats, il est utile de donner un aperçu sur les données histocliniques des 46 patientes atteintes de cancer du sein, recrutées au niveau du service d'anatomopathologie de l'HUMRUO. Le tableau 03 résume les différentes données histocliniques et moléculaires des 46 patientes atteintes de cancer du sein.

Les patientes étaient âgées de 27 à 88 ans, l'âge médian est de 51 ans (**Tableau 3**). Nous avons observé que 61% des patientes avaient moins de 50 ans, 63% d'entre elles avaient un grade SBR II. Parmi les 46 patientes, 91% d'entre elles présentaient des tumeurs de type histologique canalaire infiltrant et 67% présentaient une infiltration des ganglions axillaires.

Nous avons défini et classé les cancers du sein en plusieurs sous-types moléculaires en utilisant le profil immunohistochimique des tumeurs mammaires étudiées. Nous avons classé ces carcinomes en 4 sous-types moléculaires, sur les 46 tumeurs étudiées, 30% étaient classées de type Luminal A, 37% de type Luminal B, 11% de type HER2+ et 22% de type Triple Négatif. (Figure 20)

**Tableau 03 Description des caractéristiques histologiques, cliniques et moléculaires des 46 patientes atteintes de cancer du sein**

<b>Paramètres clinicopathologiques</b>	<b>%</b>
Age (médian)	51 (27-88)
≤50	28 (61%)
> 50	18 (39%)
<b>T</b>	
T1	10 (22%)
T2	26 (56.5%)
T3	7 (15%)
T4	3 (6.5%)
<b>N</b>	
0	15 (33%)
1	14 (30%)
2	11 (24%)
3	6 (13%)
<b>M</b>	
X	32 (70%)
0	11 (24%)
1	3 (6%)
<b>Type histologique</b>	
CCI	42 (91%)
CLI	3 (7%)
Autre	1 (2%)
<b>Grade SBR</b>	
II	29 (63%)
III	16 (35%)
Autre	1 (2%)
<b>Infiltration des ganglions lymphatiques</b>	
Négatif	15 (33%)
Positif	31 (67%)
<b>RP</b>	
Négatif	19 (41%)
Positive	27 (59%)
<b>RE</b>	
Négatif	16 (35%)
Positif	30 (65%)
<b>HER2</b>	
Négatif	35 (76%)
Positif	11 (24%)
<b>Sous-types moléculaires du cancer du sein</b>	
HR+/HER2-	21 (46%)
HER2+	11 (24%)
TN	10 (22%)
<b>Chimiothérapie</b>	
Chimiothérapie adjuvante	41 (89%)
Chimiothérapie neoadjuvante	5 (11%)
<b>Radiothérapie</b>	
Non	25 (54%)
Oui	21 (46%)

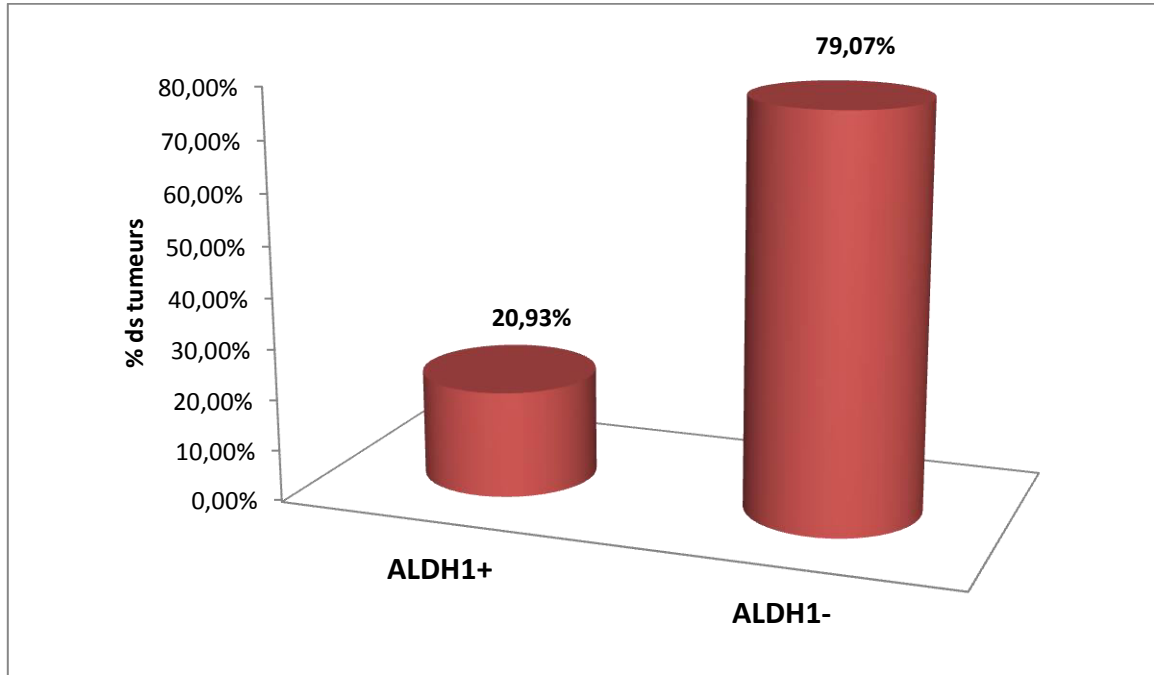


**Figure 20** Distribution des cancers du sein selon les sous-types moléculaires sur 46 patientes de l’HMRUO

## **2.2 EXPRESSION DES MARQUEURS DE CELLULES SOUCHES CANCEREUSES *ALDH1* ET *CD44* DANS LES SOUS TYPES MOLECULAIRES DES CANCERS DU SEIN ET LEUR CORRELATION AVEC LES DIFFERENTS PARAMÈTRES HISTOCLINIQUES ET MOLECULAIRES**

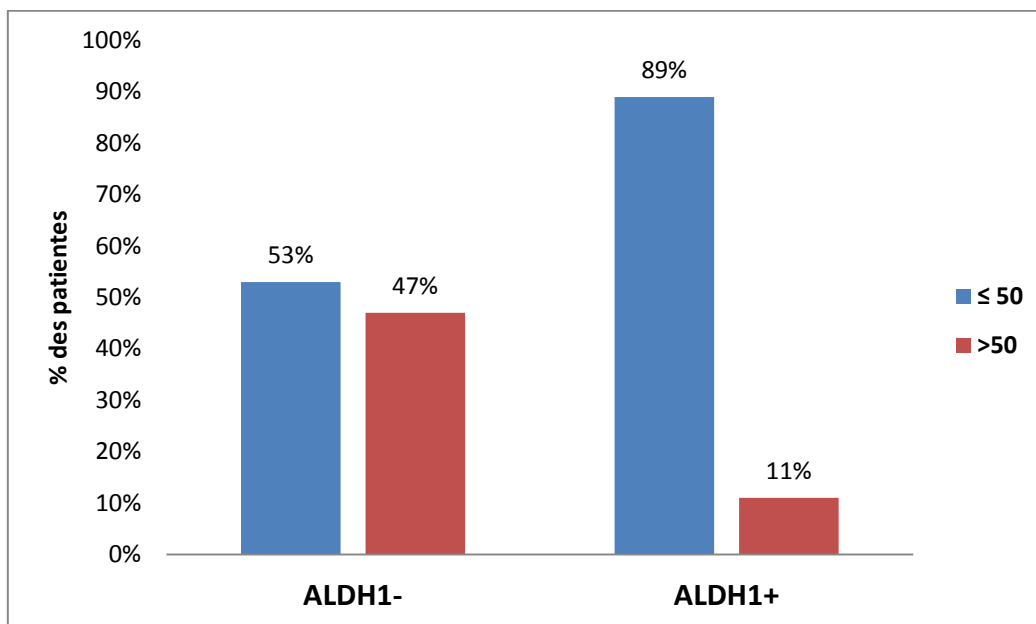
Notre travail a porté sur des échantillons de tumeurs mammaires. La technique d’immunohistochimie a été réalisée au sein du laboratoire d’anatomopathologie de l’HMRUO sur 43 lames afin de localiser l’expression du marqueur ALDH1 et sur 39 lames pour le marqueur CD44.

Sur les 43 tumeurs immunomarquées, ALDH1 était négatif dans 34 cas (79.07%) ; son score était de **1+** dans 3 cas (7%), **2+** dans 4 cas (9.25%) et **3+** dans 2 cas (4.68%). Les cancers mammaires présentant une coloration 1+ ou plus élevée de ALDH1 ont été considérés comme ALDH1 + dans l’analyse. De ce fait, sur les 43 cancers du sein, 9 (20.93%) se sont révélés être ALDH1 + (Figure 21).

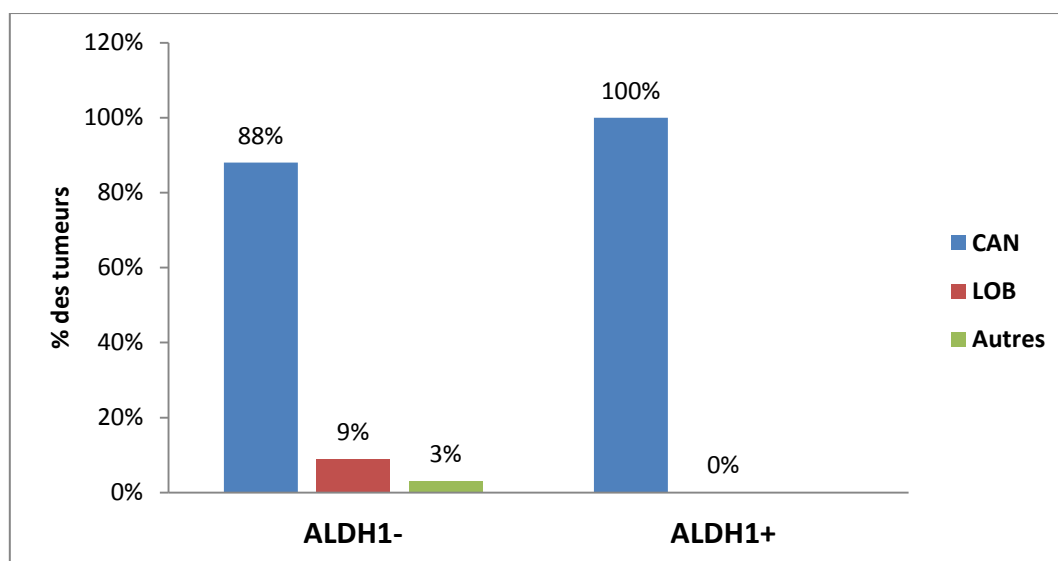


**Figure 21 Niveau d'expression du marqueur de cellules souches cancéreuses (CSC) ALDH1 dans les cellules tumorales mammaires.**

La surexpression de ALDH1 était principalement retrouvée chez les femmes pré ménopausées, de moins de 50 ans (89% des cas). Sur le plan histologique, 100% des tumeurs ALDH1+ étaient de type canalaire infiltrant. La taille tumorale représente un paramètre très important qui renseigne sur l'évolution du cancer du sein, dans notre analyse, seulement 11% des tumeurs ALDH1+ avaient une taille tumorale inférieure à 2 cm. Dans 44% des ALDH1+, on retrouvait une infiltration ganglionnaire. Les tumeurs de grade SBR II (sui représente le grade intermédiaire) étaient majoritaires, ils représentaient 56% des ALDH1+, 33% étaient de grade III (grade élevé). Quant aux sous-types moléculaires présentant un ALDH1+ ils étaient représentés comme suit : 11% de Luminal A, 22% de Luminal B, 22% de HER2+ et 44% de TNBC.



**Figure 22** Expression du marqueur de CSC ALDH1 en fonction de l'âge des patientes



**Figure 23** Expression du marqueur de CSC ALDH1 selon le type histologique

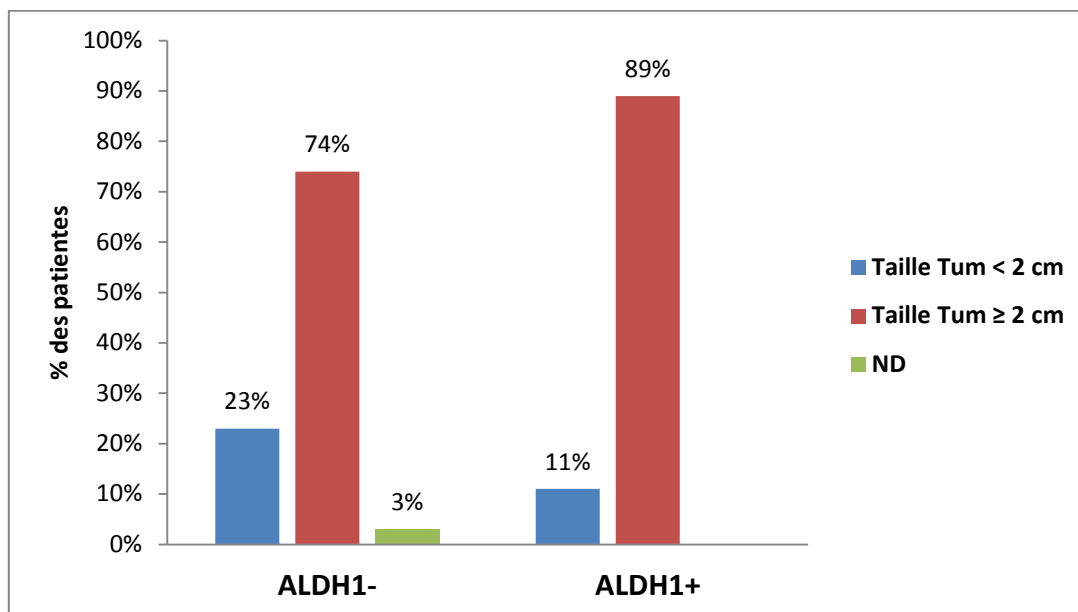


Figure 24 Expression du marqueur de CSC ALDH1 selon la taille de la tumeur

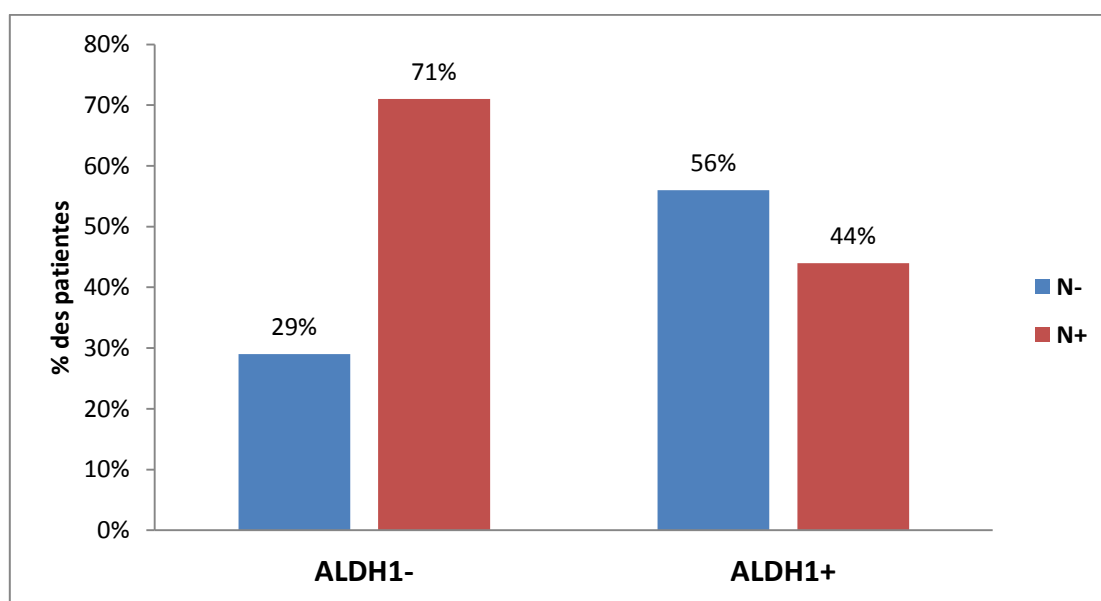


Figure 25 Expression du marqueur de CSC ALDH1 selon l'envahissement ganglionnaire

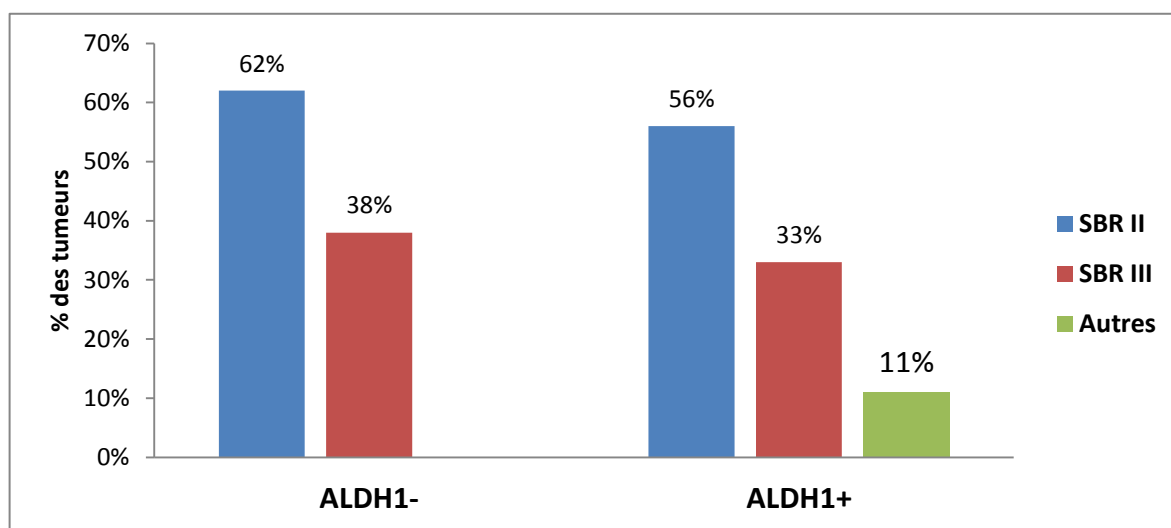


Figure 26 Expression du marqueur de CSC ALDH1 selon le grade SBR

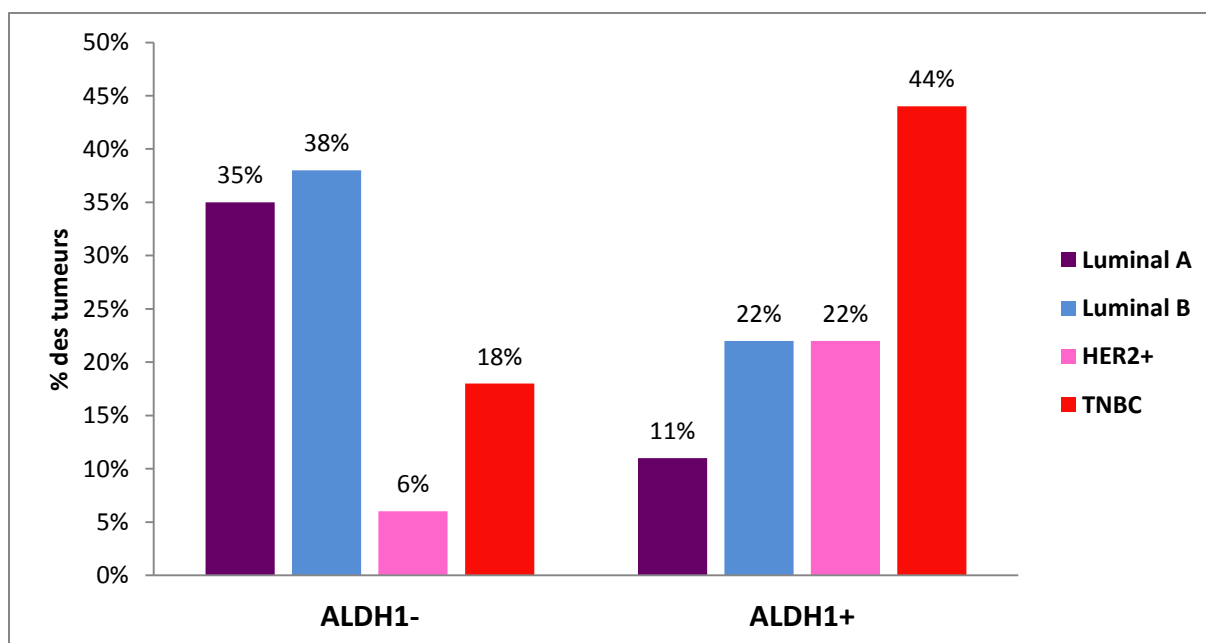


Figure 27 Niveau d'expression du marqueur de CSC ALDH1 dans les différents sous-types moléculaires du cancer du sein

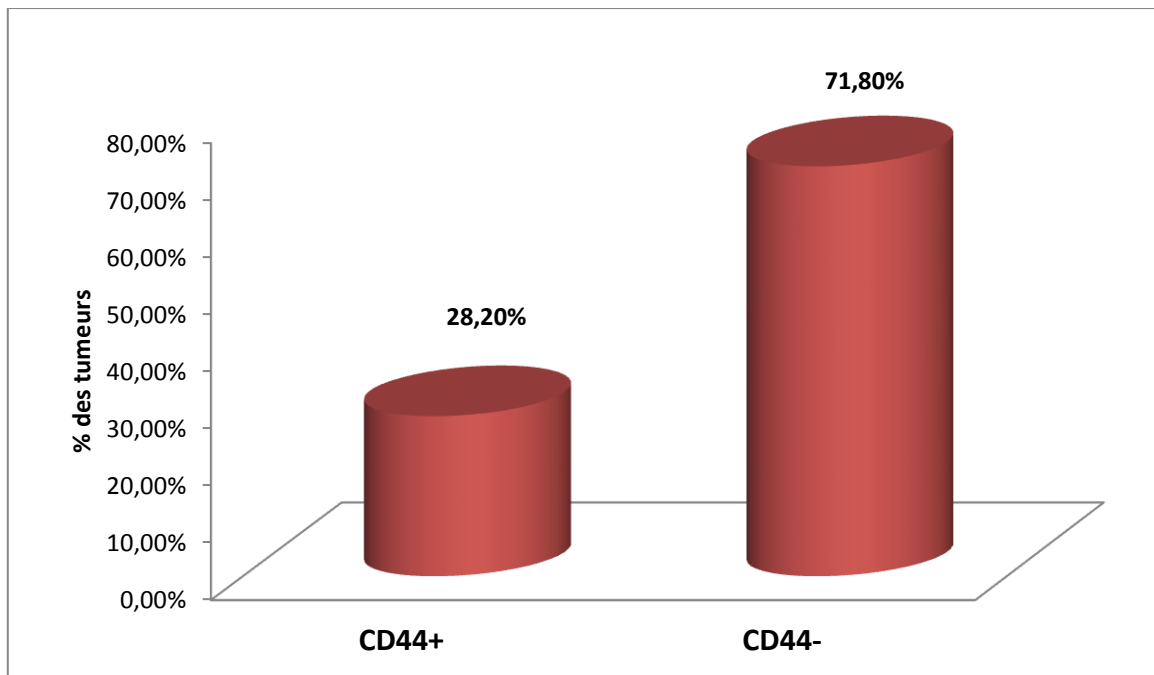
La surexpression du marqueur de cellules souches ALDH1 était significativement associée aux jeunes femmes ( $p = 0,05$ ) et était significativement corrélée aux tumeurs PR + ( $p = 0,014$ ) et aux TNBC ( $p = 0,045$ ) (Tableau 04). Aucune association significative n'a été

observée entre la surexpression de l'ALDH1 et le type histologique, la taille de la tumeur, le statut des ganglions lymphatiques, l'état de SBR, ER, HER2 et Ki67.

**Tableau 04** Corrélation entre l'expression de ALDH1 et les différents facteurs histocloniques et moléculaires

Caractéristiques	ALDH1 Négatif	ALDH1 positif	p -VALUE
<b>Age</b>			
≤ 50	18 (53%)	8 (89%)	<b>0.050</b>
>50	16 (47%)	1 (11%)	
<b>Type histologique</b>			
CAN	30 (88%)	9 (100%)	0.558
LOB	3 (9%)		
Autre	1 (3%)		
<b>Taille tumorale</b>			
< 2CM	8 (23%)	1 (11%)	0.395
≥ 2 CM	25 (74%)	8 (89%)	
<b>Infiltration des ganglions lymphatiques</b>			
N-	10 (29%)	5 (56%)	0.143
N+	24 (71%)	4 (44%)	
<b>Grade SBR</b>			
II	21 (62%)	5 (56%)	0.969
III	13 (38%)	3 (33%)	
<b>RE</b>			
RE-	10 (29%)	5 (56%)	0.143
RE+	24 (68%)	4 (44%)	
<b>RP</b>			
RP-	11 (32%)	7 (78%)	<b>0.014</b>
RP+	23 (68%)	2 (22%)	
<b>HER2</b>			
HER2-	26 (76%)	8 (89%)	0.415
HER2+	8 (24%)	1 (11%)	
<b>KI67</b>			
KI67 < 14%	12 (35%)	1 (11%)	0.278
KI67 ≥ 14%	14 (41%)	4 (44%)	
<b>Sous-types moléculaires des cancers du sein</b>			
RH+ (29)	26 (90%)	3 (10%)	<b>0,045</b>
HER2 (4)	2 (50%)	2 (50%)	
TNBC (10)	6 (60%)	4 (40%)	

La surexpression CD44 était observée chez 11 patientes (28.20%) parmi les 39 tumeurs analysées dont 73% avaient moins de 50 ans. 82% des cas positifs étaient de type histologique canalaire. Nous avons noté que 64% des CD44+ avaient une taille tumorale supérieure ou égale à 2 cm. Un envahissement ganglionnaire était observé dans 64% des CD44+, il était également présent dans 75% des tumeurs avec une absence d'expression de CD44. La grande majorité des cas positifs étaient de grade SBR II (avec 91%) et 9% de grade III. Le Ki67 est un marqueur de prolifération qui, lorsqu'il est élevé, est associé à un risque élevé de rechute, notre étude révèle que Ki67 était supérieur ou égal à 14% dans 54% des CD44+. Les sous-types moléculaires étaient distribués sur les tumeurs présentant une surexpression de CD44 comme ceci: 15% luminal A, 22% luminal B et 9% TNBC.



**Figure 28** Niveau d'expression du marqueur de cellules souches cancéreuses (CSC) CD44 dans les cellules tumorales mammaires.

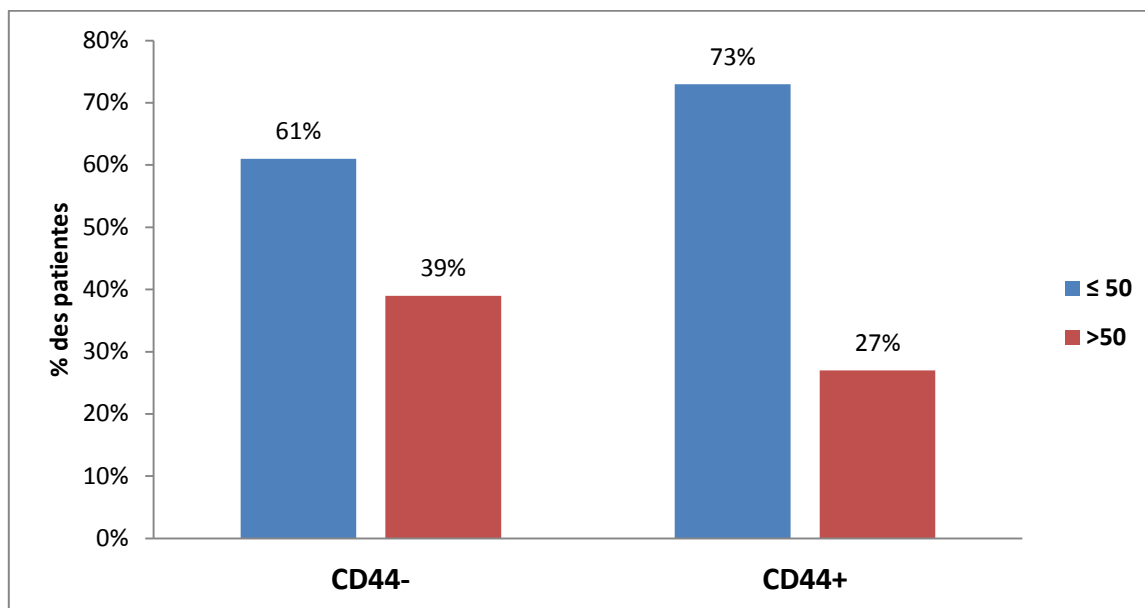


Figure 29 Expression du marqueur de CSC CD44 en fonction de l'âge des patientes

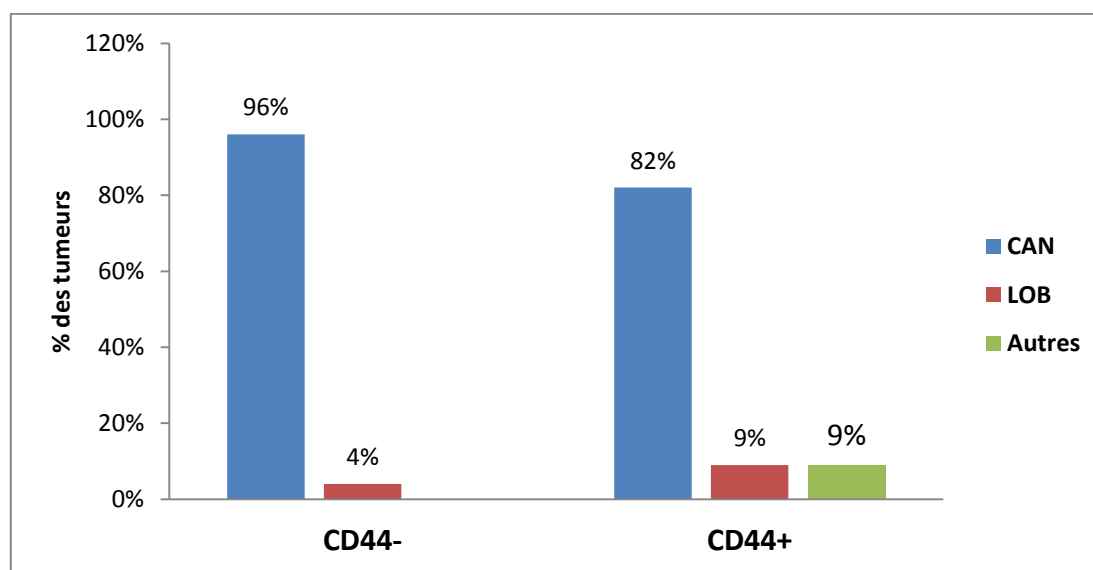


Figure 30 Expression du marqueur de CSC CD44 selon le type histologique

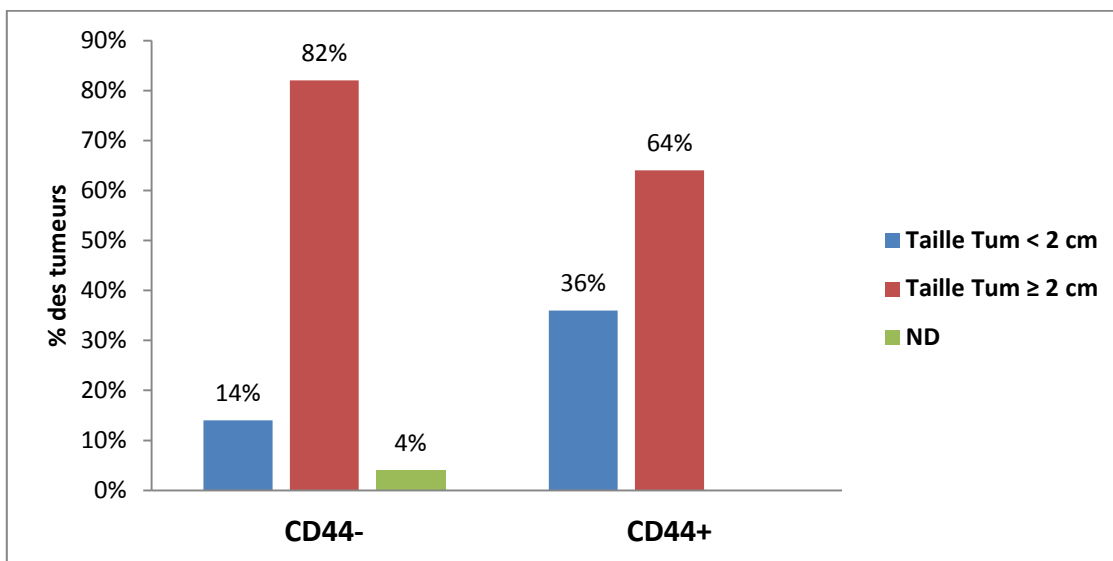


Figure 31 Expression du marqueur de CSC CD44 selon la taille de la tumeur

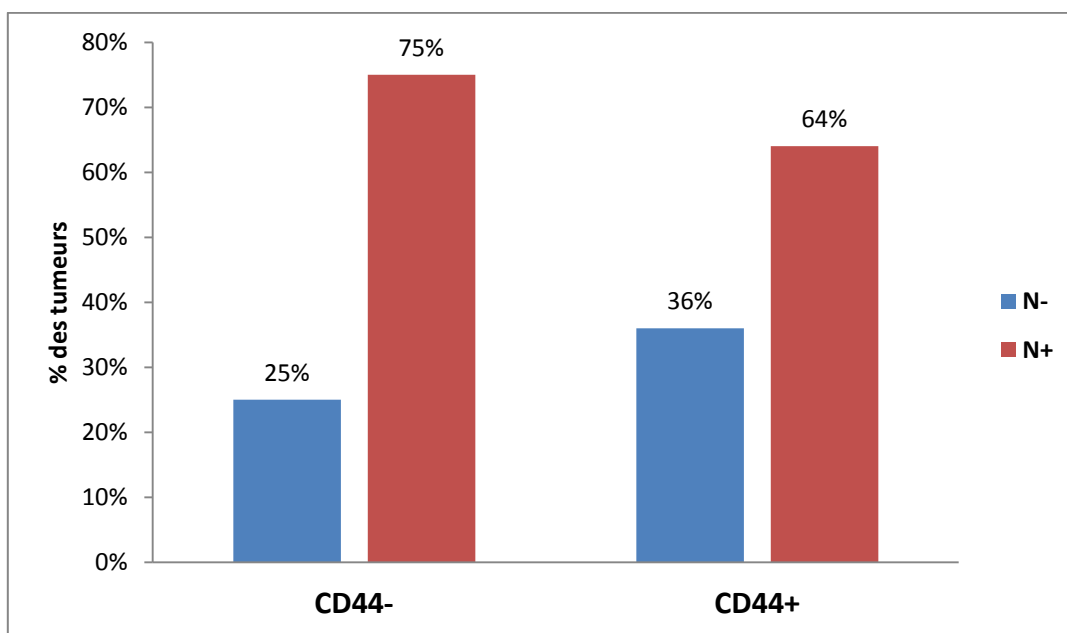


Figure 32 Expression du marqueur de CSC CD44 selon l'envahissement ganglionnaire

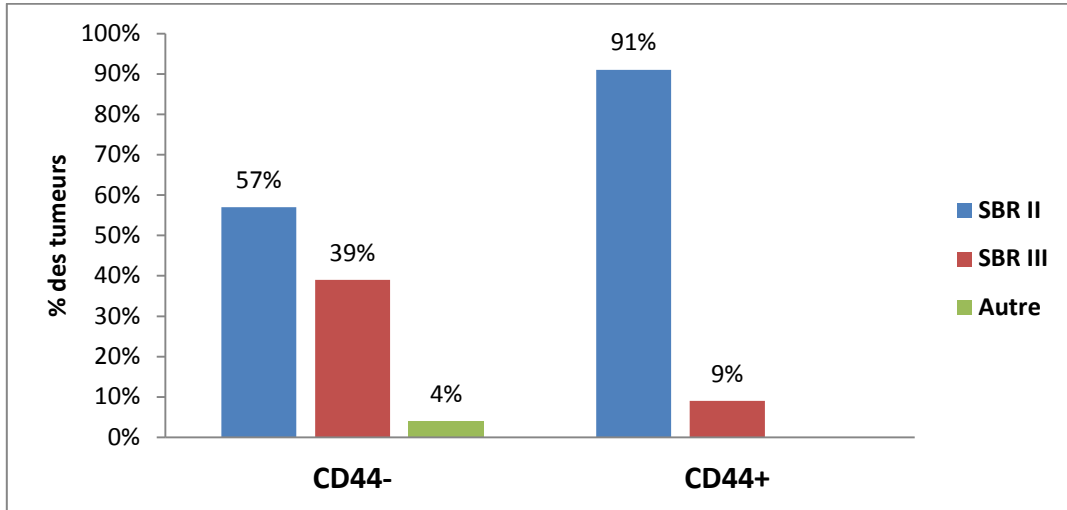


Figure 33 Expression du marqueur de CSC CD44 selon le grade SBR

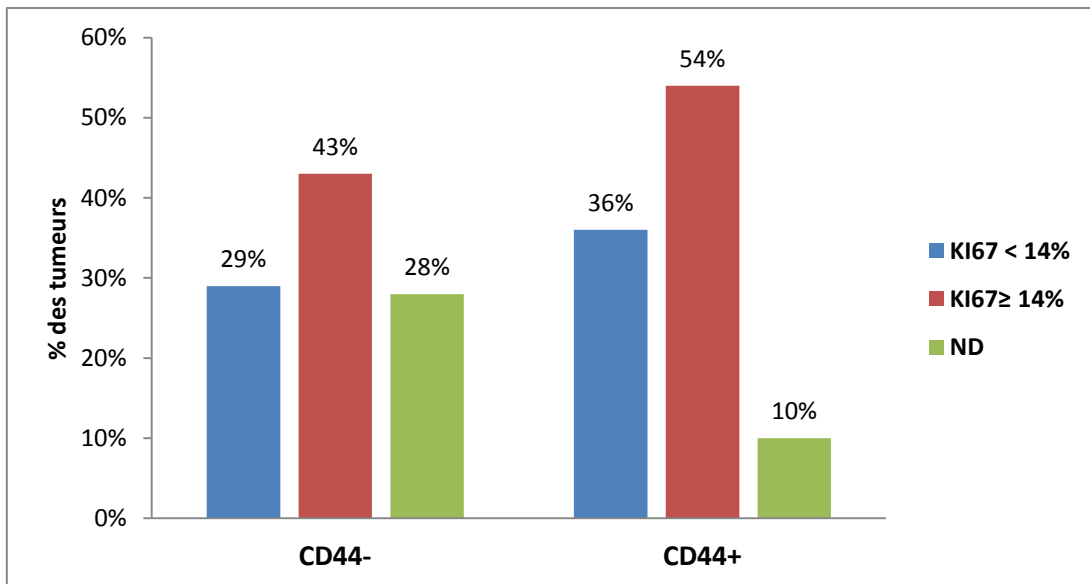
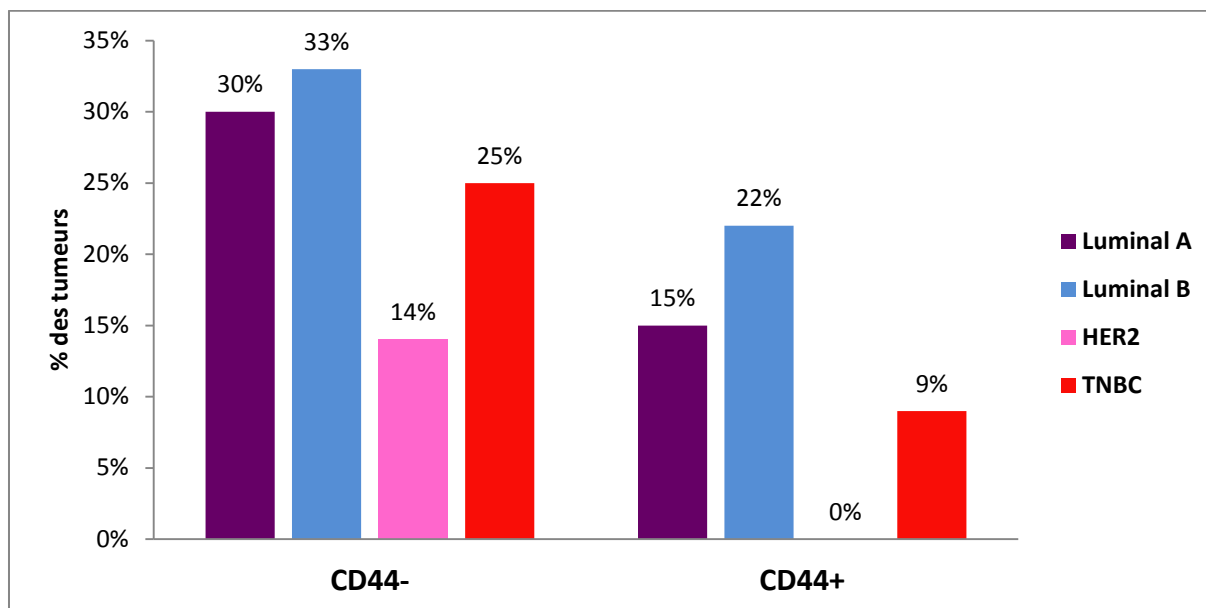


Figure 34 Niveau d'expression du marqueur de CSC CD44 en fonction du statut Ki67

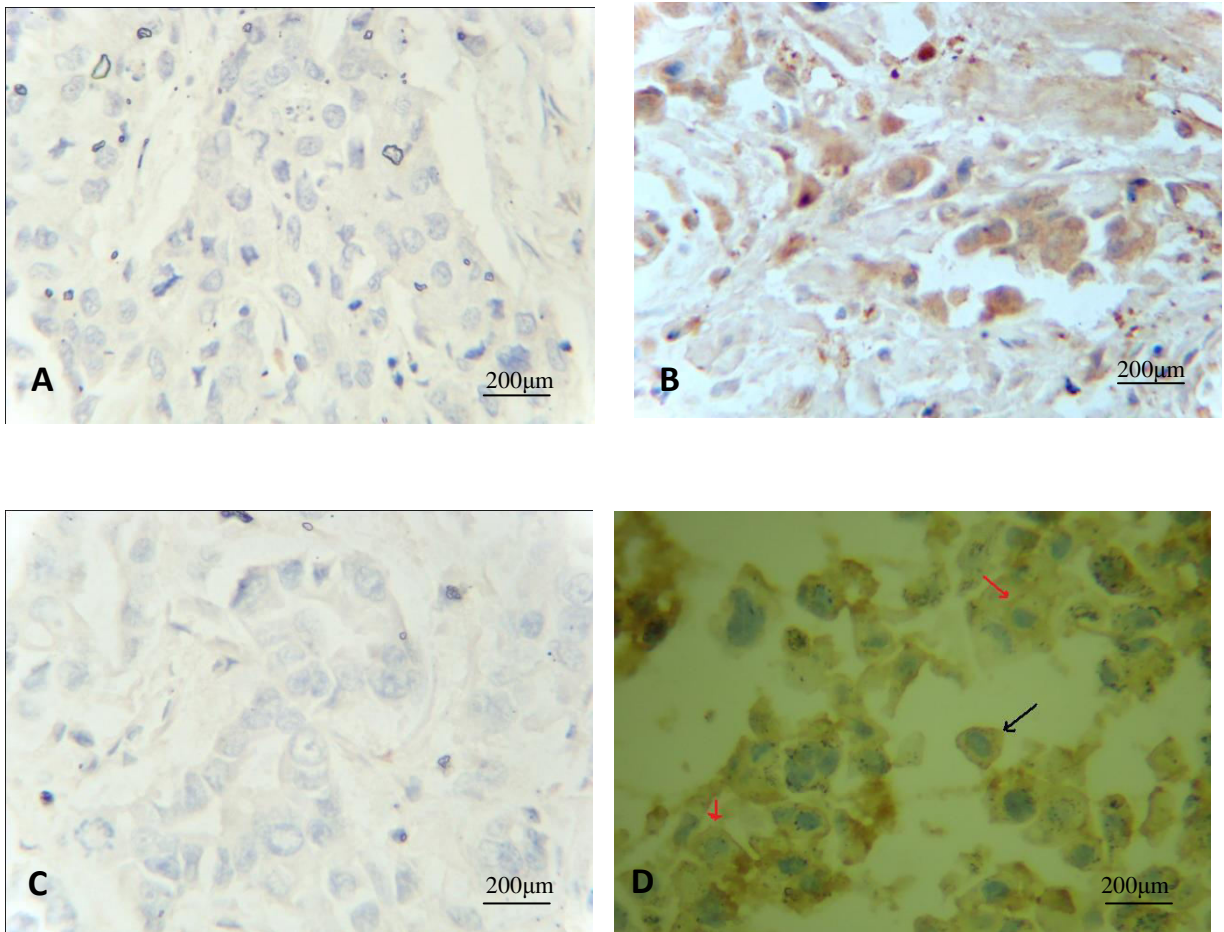


**Figure 35** Niveau d'expression du marqueur de CSC CD44 dans les différents sous-types moléculaires du cancer du sein

Des corrélations statistiquement significatives ont émergé entre CD44 et SBR grade II ( $p = 0,057$ ), le sous-type HER2+ ( $p = 0,001$ ) et le sous-type TNBC ( $p = 0,049$ ). Aucune association significative n'a été observée entre la positivité CD44 et le type histologique, la taille de la tumeur, le statut des ganglions lymphatiques, l'ER, le PR et le statut Ki67. (Tableau 05).

**Tableau 05** Corrélation entre l'expression de CD44 et les différents facteurs histocloniques et moléculaires

Caractéristiques	CD44 négatif	CD44 positif	p-VALUE
<b>Age</b>			
≤ 50	17 (61%)	8 (73%)	0.482
>50	11 (39%)	3 (27%)	
<b>Type histologique</b>			
CAN	27 (96%)	9 (82%)	0.202
LOB	1 (4%)	1 (9%)	
Autres		1 (9%)	
<b>Taille tumorale</b>			
< 2CM	4 (14%)	4 (36%)	0.139
≥ 2 CM	23 (82%)	7 (64%)	
<b>Infiltration des ganglions lymphatiques</b>			
N-	7 (25%)	4 (36%)	0.478
N+	21 (75%)	7 (64%)	
<b>Grade SBR</b>			
II	16 (57%)	10 (91%)	<b>0.057</b>
III	11 (39%)	1 (9%)	
<b>RE</b>			
RE-	10 (36%)	2 (18%)	0.286
RE+	18 (64%)	9 (82%)	
<b>RP</b>			
RP-	13 (46%)	2 (18%)	0.876
RP+	15 (54%)	9 (82%)	
<b>HER2</b>			
HER2-	21 (75%)	10 (91%)	0.268
HER2+	7 (25%)	1 (9%)	
<b>KI67</b>			
KI67 < 14%	8 (29%)	4 (36%)	1.000
KI67 ≥ 14%	12 (43%)	6 (54%)	
<b>Sous-types moléculaires des cancers du sein</b>			
RH+ (27)	17 (63%)	10 (37%)	<b>0.001</b> <b>0,049</b>
HER2+ (4)	4 (100%)		
TNBC (8)	7 (87,5%)	1 (12,5%)	



**Figure 36** Expression des marqueurs des CSC ALDH1 et CD44 dans les cancers du sein Gr X40.

- A Exemple d'absence d'immunomarquage dans les cellules tumorales (ALDH1-)
- B: Marquage positif dans les cellules tumorales (ALDH1 +)
- C: absence d'immunomarquage dans les cellules tumorales (CD44-)
- D: Marquage positif dans les cellules tumorales (CD44 +)

### Discussion

Le cancer du sein, avec 1.7 millions de cas à travers le monde en 2012, soit un cancer féminin sur quatre, et 552 000 décès en 2014, représente l'une des principales causes du décès des femmes (Ferlay *et al.*, 2015). En effet, malgré les efforts et les avancées réalisées en termes de prévention et de dépistage, le cancer du sein reste une maladie complexe, très hétérogène et encore peu connue. Cependant, des études transcriptomiques menées ces dernières années ont permis de caractériser cinq sous-types moléculaires du cancer du sein : Luminal A, Luminal B, HER2+, Normal-like et Basal-like (Perou *et al.*, 2000 ; Herschkowitz *et al.*, 2007, Sorlie *et al.*, 2001 ; Sotiriou *et al.*, 2003).

Dans le traitement des tumeurs mammaires, différentes stratégies thérapeutiques sont couramment utilisées, comprenant des interventions locales (chirurgie, radiothérapie) et des traitements systémiques (chimiothérapie ou traitement ciblé) (Siegel *et al.*, 2014). Cependant, les rechutes et les métastases surviennent couramment (EBCTCG, 2005) en raison de la présence d'un sous-ensemble de cellules tumorales connues sous le nom de cellules souches du cancer du sein. Celles-ci représentent une petite population cellulaire présentant des caractéristiques uniques telles que l'auto-renouvellement, le taux de prolifération élevé et la capacité de générer des lignées hétérogènes de cellules cancéreuses (Clarke *et al.*, 2006), attirant l'attention de nombreux chercheurs pour leur potentiel d'utilisation comme cible pour le traitement du cancer.

Au cours des deux dernières décennies, la recherche sur le cancer du sein s'est concentrée principalement sur l'identification, l'isolement et la caractérisation des cellules souches du cancer du sein (CSCs). Pour ce faire, certains gènes ayant des propriétés de cellules souches ont été étudiés et leurs protéines correspondantes ont ensuite été validées comme marqueurs de CSCs (Al Hajj *et al.*, 2003 ; Ginestier *et al.*, 2007). En conséquence, une multitude d'études ont été publiées décrivant l'impact des CSCs identifiées par ces marqueurs établis, (tels que le CD44, le CD24 et l'ALDH1), en tant que cellules initiatrices de tumeur dans la progression du cancer du sein avec une forte tendance à métastaser et à résister aux traitements thérapeutiques (Ginestier *et al.*, 2007 ; Sheridan *et al.*, 2006 ; Li *et al.*, 2008). Toutefois, une préoccupation a changé la définition des CSCs: l'hétérogénéité des cancers du sein (Martelotto *et al.*, 2014). En raison des observations selon lesquelles tous les marqueurs CSCs ne sont pas exprimés dans tous les sous-types du cancer du sein, la recherche de différents marqueurs de CSCs et différentes combinaisons de ces marqueurs pouvant être

limitées à un sous-type spécifique ou associées à des formes agressives de cette maladie est en cours (Neumeister *et al.*, 2010 ; Xiao *et al.*, 2008). Il est donc important de définir quels phénotypes de CSCs ont un potentiel tumorigène élevé et une grande capacité à résister aux agents thérapeutiques (Croker *et al.*, 2009).

Les cellules souches cancéreuses, contrairement aux cellules souches normales, peuvent se diviser de façon illimitée avec une vitesse de prolifération très faible. Elles sont identifiables grâce à différents marqueurs de cellules souches cancéreuses, notamment dans le cas des cancers du sein dont les marqueurs d'identification les plus utilisés sont l'ALDH1, le CD44 et le CD24.

L'identification de marqueurs de cellules souches cancéreuses tels que ALDH1 et CD44 serait d'un grand intérêt car cela pourrait mener à une thérapie sur mesure pour des patientes atteintes par les sous-types de cancer du sein les plus agressifs pour lesquels aucune thérapie ciblée n'existe à ce jour.

*Ginestier et al.* ont été les premiers à démontrer l'activité ALDH1 comme marqueur de cellules souches dans les cellules mammaires normales et tumorales (*Ginestier et al.*, 2007). L'importance de l'activité ALDH1 dans le cancer du sein a été explorée seule et en combinaison avec le phénotype CD44<sup>+</sup> / CD24<sup>-/ faible</sup>.

De nombreuses études révèlent que la surexpression des marqueurs de cellules souches du cancer du sein ALDH1 et CD44 serait impliquée dans les mécanismes de rechute et de récurrence tumorale (Park *et al.*, 2010 ; Trumpp *et al.*, 2008 ; Meyer *et al.*, 2010), la résistance aux radiothérapies ainsi que les traitements standards (*Li et al.*, 2008) et une forte propension métastatique (Park *et al.*, 2010 ; Lagadec *et al.*, 2010 ; Charafe-Jauffret *et al.*, 2009 ; Croker *et al.*, 2012)

Dans notre étude, nous avons exploré l'expression des marqueurs de cellules souches ALDH1 et CD44 sur un échantillon de 46 patientes algériennes de l'Ouest et avons tenté de corrélérer cette expression avec les caractéristiques clinicopathologiques ainsi que les sous-types moléculaires du cancer du sein.

Nos résultats ont révélé que 89% des patientes ALDH1 positifs (ALDH1 +) avaient moins de 50 ans. En effet, l'expression de l'ALDH1 était significativement plus élevée chez les patients jeunes que chez les personnes âgées ( $p = 0,05$ ). Ceci est conforme à *Mieog et al.* (2012) qui ont été les premiers à démontrer que l'expression de l'ALDH1 dépend de l'âge chez les patientes atteintes de cancer du sein. Des résultats similaires ont récemment été rapportés

par Tan *et al.* (2013) et Kang (2014). Il a également été observé que les patientes atteintes du cancer du sein à un jeune âge ont un mauvais pronostic par rapport aux patientes diagnostiquées à un âge plus avancé (Assi *et al.*, 2013). Ceci sera soutenu par nos résultats qui suivront.

Les paramètres histologiques du cancer du sein tels que la taille de la tumeur, le grade SBR et la présence ou non d'infiltrations (ou de métastases) au niveau des ganglions lymphatiques sont des facteurs pronostics essentiels, ils permettent en effet de définir le degré d'agressivité auquel est confrontée la patiente. Notre analyse rapporte que sur les cas dans lesquels ALDH1 est surexprimé (ALDH1+), la taille tumorale est supérieure ou égale à 2 cm chez 89% des patientes, aussi 4% des cas présentent des infiltrations ganglionnaires et 56% sont de grade SBR II (grade intermédiaire). Nos résultats sont conformes à ceux d'une méta-analyse publiée en 2014 (Liu *et al.*, 2014) et, plus récemment, Kida *et al.*, en 2016 ont eu des résultats similaires, concluant ainsi que la surexpression de ALDH1 corrélée à ces paramètres clinicopathologiques élevés était associée à un mauvais pronostic.

En outre, nous avons observé que l'ALDH1+ était positivement corrélé avec le sous-type triple négatif ( $p = 0,045$ ), ce qui rejoint les résultats de plusieurs études (Nalwoga *et al.*, 2010 ; Schwartz *et al.*, 2013 ; Kim *et al.*, 2014). Le cancer du sein triple négatif est largement décrit comme étant de mauvais pronostic (Dent *et al.*, 2007 ; Bauer *et al.*, 2007, Gluz *et al.*, 2009). En fait, les femmes présentant le sous-type triple négatif sont plus susceptibles d'être plus jeunes que les femmes avec d'autres sous-types du cancer du sein (Morris *et al.*, 2007) et leurs tumeurs sont généralement de plus grande taille, sont de grade supérieur et présentent déjà une atteinte ganglionnaire au moment du diagnostic (Haffty *et al.*, 2006) ce qui les caractéristiques de nos patientes. Ces femmes présentent un taux plus élevé d'échec au traitement et une apparition de métastases à distance, malgré une réponse initiale plus élevée à la chimiothérapie néoadjuvante que les patients d'autres sous-types de cancer du sein (Lehmann *et al.*, 2011 ; O'Reilly *et al.*, 2015). Ainsi, la surexpression du marqueur de cellules souches ALDH1 dans les triples négatifs de notre recherche pourrait révéler une association entre les populations de cellules souches cancéreuses et les comportements agressifs du cancer du sein triple négatif, y compris leur chimiorésistance. Cependant, d'autres recherches sont nécessaires pour appuyer cette hypothèse.

L'étude actuelle a révélé une association significative entre ALDH1+ et les tumeurs PR+ ( $p = 0,014$ ) et tous ces cancers étaient du sous-type Luminal. Ceci est soutenu par les

travaux publiés par Kida *et al.* en 2016 qui ont trouvé une surexpression de ALDH1 dans les tumeurs de type luminal et leurs résultats ont révélé que les cellules souches cancéreuses étaient un indicateur de pronostic particulièrement pessimiste chez les patientes de ce sous-type.

Dans la littérature, il a été démontré qu'une association entre l'expression du marqueur de cellules souches ALDH1 et une évolution clinique péjorative existait (Ginestier *et al.*, 2007 ; Tanei *et al.*, 2009 ; Neumeister *et al.*, 2010). Des études plus récentes ont montré une tendance significative à la récurrence, une survie sans maladie ainsi qu'une survie globale plus courtes dans le groupe avec des tumeurs ALDH1 + que dans le groupe avec des tumeurs ALDH1- (Ohi *et al.*, 2011 ; Zhong *et al.*, 2014 ; Chatterjee *et al.*, 2015). En outre, les résultats d'analyses cliniques ont démontré une chimiorésistance chez les patientes atteintes de cancer du sein avancé et une augmentation de l'expression du marqueur de cellules souches ALDH1 après un traitement de chimiothérapie néoadjuvante, ce qui suggère un potentiel d'auto-renouvellement des cellules cancéreuses (Lee *et al.*, 2011 ; Alameer *et al.*, 2014 ; Miyoshi *et al.*, 2016). Il existe plusieurs façons possibles d'expliquer comment la résistance à la thérapie par les cellules souches du cancer se manifeste ; un mécanisme possible incluant l'expression de pompes de surface cellulaire telles que ABCG2 / BCRP1, capable d'expulser les médicaments de la chimiothérapie offrant un périmètre protecteur autour des cellules souches cancéreuses (Zhou *et al.*, 2001 ; Bram *et al.*, 2007 ; Bram *et al.*, 2009 ; McIntosh *et al.*, 2016). En outre, la présence et l'activité d'ALDH peuvent conférer aux CSC la capacité de métaboliser les molécules telles que le cyclophosphamide et ses dérivés (Moreb *et al.*, 2008). De ce fait, des recherches plus poussées sont nécessaires pour comprendre l'hétérogénéité des cellules souches cancéreuses et pour clarifier leur rôle dans le développement de la résistance à la chimiothérapie.

La principale limitation de la présente étude est le manque de données concernant les patientes atteintes de cancer du sein après le traitement. Dans ce contexte, il est nécessaire de définir l'ALDH1 comme biomarqueur de rechute chez des patientes algériennes afin qu'un traitement approprié puisse être développé le plus tôt possible. De ce point de vue, l'étude immunohistochimique d'ALDH1 pourrait en faire un nouveau marqueur pronostic du cancer du sein.

CD44 est une molécule d'adhésion cellulaire connue pour être exprimée dans la plupart des types de cellules (Goodison *et al.*, 1999) et a été associée à des cellules souches

dans des tissus mammaires normaux et cancéreux (Hebbard *et al.*, 2000 ; Mani *et al.*, 2008 ; Dontu *et al.*, 2008). Il s'agit en effet d'un autre biomarqueur potentiel de cellules souches du cancer du sein sur lequel notre recherche était centrée.

Nos résultats indiquent que le CD44 était significativement associé au sous-type triple négatif ( $p = 0,049$ ). Une étude de Wu *et al.* (2013) soutient ce résultat et une étude plus récente en 2015 a été menée par Zheng *et al.* qui ont signalé que les cas positifs pour CD44 dans le groupe de cancer du sein triple négatif (TNBC) étaient plus élevés que ceux du groupe non-TNBC. D'autre part, ils ont constaté que le statut positif de CD44 était inversement corrélé avec le sous-type HER2+ ce qui est en accord avec nos observations, puisque tous les cas HER2+ étaient CD44- avec une signifiante de  $p = 0,001$ . Nous avons également constaté que le CD44 élevé était plus susceptible d'être de grade SBR II avec 91% de CD44 + ( $p = 0,057$ ). Des informations différentes ont été rapportées dans une très récente analyse de données (Xu *et al.*, 2016). L'explication de ces relations inverses n'est pas connue.

Certaines analyses ont démontré que l'expression de CD44 était négativement associée au statut RE (Ahmed *et al.*, 2011 ; Adamczyk *et al.*, 2013) et au statut RP (McFarlane *et al.*, 2015). Notre étude n'a par contre montré aucune signifiante entre la positivité de CD44 et le statut hormonal des patientes atteintes de carcinome mammaire.

Nous avons observé que 54% des cas CD44+ présentaient un indice de prolifération Ki-67 supérieur ou égal à 14%. Ce résultat corrobore celui de Cui *et al.* qui a retrouvé une corrélation entre l'expression positive CD44 et un score élevé de Ki-67 (Cui *et al.*, 2015). Des études antérieures ont déterminé que les patientes atteintes de cancer du sein présentant un indice de prolifération élevé de Ki-67 présentaient un taux faible de survie sans maladie (Keam *et al.*, 2011). La surexpression de Ki-67 étant un marqueur de mauvais pronostic chez les patientes atteintes de cancer du sein (Trihia *et al.*, 2003), ces résultats témoignent donc du caractère hautement prolifératif et de l'agressivité des tumeurs surexprimant CD44.

Aucune signifiante n'a été retrouvée entre la surexpression de CD44 et les paramètres histologiques tels que la taille tumorale, le grade SBR et l'infiltration ganglionnaire, ce résultat rejoint celui d'autres auteurs (Athanasidou *et al.*, 2009 ; Horiguchi *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2011).

En conclusion, dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'implication potentielle des marqueurs de cellules souches ALDH1 et CD44 dans les cancers du sein. Nous avons démontré pour la première fois en Algérie que l'expression de ces 2 marqueurs était significativement élevée dans le cancer du sein de sous-type triple négatif, un sous-type particulièrement agressif qui touche principalement les femmes jeunes en Algérie. De plus, l'ensemble de nos résultats suggère que l'évaluation des marqueurs de cellules souches cancéreuses ALDH1 et CD44 dans les tissus mammaires des femmes algériennes avec un cancer aux stades II et III pourrait non seulement servir de marqueur pronostic mais cela expliquerait également la rechute de ces patientes et la résistance à la radiothérapie ainsi qu'à la chimiothérapie. Par conséquent, les marqueurs de cellules souches ALDH1 et CD44 pourrait représenter une cible thérapeutique potentielle très prometteuse pour les sous-types moléculaires les plus agressifs et hétérogènes du cancer du sein pour lesquels aucune thérapie ciblée n'existe à ce jour.

A decorative border resembling a scroll, with a vertical strip on the left and a horizontal strip at the top, both ending in rounded, curled ends.

# **CHAPITRE III :**

## **Conclusion et perspectives**

### Conclusion et perspectives

Les récentes avancées dans le domaine de l'oncologie ont démontré l'existence d'une sous-population de cellules tumorales, les cellules souches cancéreuses, comme ayant un rôle central dans la naissance, la propagation et la résistance des tumeurs ; ces cellules se divisent très lentement ; elles sont identifiables grâce à différents marqueurs de CSC dont les plus référencés dans le cancer du sein sont ALDH1, CD24 et CD44. Les cellules souches cancéreuses sont également radio et chimio-résistantes aux principes actifs des médicaments.

Les sous-types enrichis en cellules souches cancéreuses nécessitent des thérapies ciblées spécifiques, afin d'améliorer la survie sans rechute des patientes, en particulier le cancer du sein triple-négatif, un sous-type particulièrement agressif, souvent diagnostiqué à un stade avancé, qui affecte les jeunes femmes et qui reste étroitement associé à un manque de thérapies ciblées.

Les résultats obtenus dans nos travaux de recherche, abordés pour la première fois en Algérie, suggèrent que ALDH1 et CD44 pourraient servir de biomarqueurs pour identifier les cellules souches du cancer en utilisant la technique d'immunohistochimie chez les patientes algériennes atteintes de cancer du sein. Ces marqueurs permettraient également de prédire le pronostic de la maladie et représenteraient donc des cibles thérapeutiques potentielles très intéressantes pour nos patientes. Cependant, notre étude doit être confirmée par des analyses sur un plus grand nombre d'échantillons et une meilleure compréhension des mécanismes de régulation de la résistance des cellules souches cancéreuses au traitement est nécessaire. Il est également recommandé d'établir une corrélation entre les résultats de l'immunomarquage avec des courbes de survies, permettant ainsi de trouver le moyen d'améliorer les résultats cliniques de nos patientes et de prévenir la rechute tumorale et l'apparition des métastases à distance.

Les thérapies conventionnelles utilisées actuellement dans nos centres de soins traitent toutes les cellules tumorales de la même façon. Avec ces thérapies, la tumeur régresse effectivement, mais les cellules initiatrices de cancer ne sont pas toujours atteintes. En effet, elles sont très généralement chimiorésistantes et radiorésistantes et nous assistons quasi inmanquablement à une récurrence à plus ou moins longue échéance. Le défi des prochaines années est de mettre au point des traitements capables d'éliminer les cellules souches cancéreuses sans affecter les cellules souches normales de l'organisme.

Le ciblage des cellules souches cancéreuses devrait permettre de limiter la croissance de la tumeur et de prévenir les métastases. La compréhension des phénomènes contrôlant la biologie des cellules souches cancéreuses pourrait avoir des conséquences importantes sur le pronostic clinique. La perspective de thérapies ciblant spécifiquement ces cellules souches cancéreuses offre de nouveaux espoirs dans le traitement anti-cancéreux.

---

---

## PUBLICATION

---

---

Ces travaux ce sont concrétisés par une publication internationale auprès d'un journal avec comité de lecture spécialisé: **Journal of International Research in Medical and Pharmaceutical Sciences** 12(3): 84-93, 2017 *ISSN: 2395-4477 (P), ISSN: 2395-4485 (O)*

### **ASSOCIATION OF CANCER STEM CELLS IDENTIFIED BY ALDH1 AND CD44 EXPRESSION WITH BREAST CANCER SUBTYPES IN WEST ALGERIAN PATIENTS**



---

## **ASSOCIATION OF CANCER STEM CELLS IDENTIFIED BY ALDH1 AND CD44 EXPRESSION WITH BREAST CANCER SUBTYPES IN WEST ALGERIAN PATIENTS**

**MERIE M KAOUTER BENYELLES<sup>1</sup>, LY NDA ADDOU-KLOUCHE<sup>1,2\*</sup>,  
AMINA BENDA OUD<sup>1</sup>, AMINA BELHADJ<sup>1</sup>, MILOUD MEDJAMIA<sup>3</sup>,  
MOHAMED BENALI<sup>1,4</sup> AND SORAYA MOULESSEHOUL<sup>1,4</sup>**

<sup>1</sup>Department of Biology, Djillali Liabes University of Sidi bel Abbes, Algeria.

<sup>2</sup>Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, University of Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, Algeria.

<sup>3</sup>Anatomy and Pathology Laboratory, Regional Military Hospital, Algeria.

<sup>4</sup>Laboratory of Biototoxicology, Djillali Liabes University of Sidi bel Abbes, Algeria.

### **AUTHORS' CONTRIBUTIONS**

This work was carried out in collaboration between all authors. Author LAK designed the study. Authors LAK and MKB performed the statistical analysis, wrote the protocol and wrote the first draft of the manuscript. Authors LAK and MM managed the analyses of the study. Authors MKB and AB managed the literature searches. All authors read and approved the final manuscript.

**Received: 18<sup>th</sup> October 2017**

**Accepted: 3<sup>rd</sup> December 2017**

**Published: 1<sup>st</sup> January 2018**

**Original Research Article**

---

### **ABSTRACT**

Breast cancer represents the most common malignancy and leading cause of death among women worldwide and particularly in Algeria. Some breast cancer subtypes are of poor prognosis causing drug resistance that has become the major cause of treatment failure. The cancer stem cell (CSC) hypothesis has important clinical implications for cancer therapeutics because of the proposed role of CSCs in chemoresistance. Putative breast cancer stem cells might express surface markers such as aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) and Cluster of differentiation 44 (CD44) proteins. The aim of this study was to explore the expression of these proteins in breast cancers from an Algerian population and their associations with the clinicopathological characteristics and breast cancer subtypes.

**Methods:** Clinical information was obtained by reviewing preoperative and postoperative medical records for 4 years, then 46 paraffin-embedded breast carcinoma samples were analyzed by immunohistochemical methods. Finally, statistical analyses were to evaluate associations between CD44 and ALDH1 expressions and various clinicopathological parameters including breast cancer subgroups

**Results:** In total, 9 tumors (21%) expressed ALDH1, whereas 11 (28%) expressed CD44 protein. Expression of ALDH1 was associated with high young age ( $P = 0.05$ ), Progesterone receptor positivity ( $P = 0.014$ ) and triple negative breast cancer ( $P = 0.045$ ). On the other hand, CD44 expression was associated with SBR grade II ( $P = 0.057$ ), HER2 subtype ( $P = 0.001$ ) and the triple negative subtype ( $P = 0.049$ ).

**Conclusion:** CD44<sup>+</sup> and ALDH1<sup>+</sup> phenotypes seem to identify CSC with distinct levels of differentiation. It seems that the biomarkers that identify breast CSC within the breast cancer subtypes need to be better explored,

---

\*Corresponding author: Email: [addouklouche.lynda@yahoo.fr](mailto:addouklouche.lynda@yahoo.fr);

because it is pivotal to translate the CSC concept to clinical practice. In the future, the recognition of reliable markers to distinguish the CSC pool in each molecular subtype will be decisive for the development of specific target therapies.

**Keywords:** Cancer stem cells; breast cancer subtypes; ALDH1; CD44; chemoresistance.

## 1. INTRODUCTION

Several researches have reported the molecular heterogeneity of breast cancers [1,2]. Studies on gene expression profile have established five major breast cancer molecular subtypes: luminal A, luminal B, ERBB2-overexpressing, basal-like and the normal-like group. Characterized by their clinical differences in incidence, survival and response to therapeutics agents, the molecular subtyping of breast cancer has greatly improved our understanding of the the heterogeneity of breast cancer [3].

Some breast cancers subtypes are characterized by very aggressive features and poor patient outcomes. These tumors exhibit resistance to most treatments and chemotherapy [4,5,6]. Accumulating evidence indicates that a population of cells with stem cell like properties might be responsible for the treatment failures. Cancer stem cells (CSCs) are defined as rare tumor cells representing a minor subset of cells in the tumor. They are operationally defined by the ability to self-renew, and lead to the multipotent progenitor cells, a process that drives tumorigenesis and differentiation, which contributes to tumor cellular heterogeneity [4].

Breast cancer stem cells were first described in 2003 by *Al-hajj* and colleagues [5], who provided the existence of a cell population with stem cell properties in human breast cancer, highly tumorigenic and characterized by CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> phenotype. Subsequently, Ginestier et al. [6] revealed that normal and cancer human mammary epithelial cells with increased aldehyde dehydrogenase activity (ALDH<sup>+</sup>) show stem/progenitor cell properties and they detected ALDH1 expressing breast tumor cells by immunohistochemical staining [7].

ALDH is a detoxifying enzyme required for the oxidation of intracellular aldehydes, it also contributes to the metabolism of retinol (Vitamine A) to retinoic acid may have a role in stem cell differentiation and proliferation [8].

CD44 is the principal surface receptor of the hyaladherin-receptor family for the components of the extracellular matrix (ECM) and is involved in cancer invasion, metastasis, and tumor initiation [9].

There is increasing evidence that these CSCs induce tumor recurrence and resistance to chemotherapy and radiation therapy which has been implicated in treatment failure and increase breast cancer mortality [10]. Based on these observations, the CSC model became the foundation for new preventive and therapeutic targets in breast cancer.

In the present study, we analyzed two of the main established breast cancer stem cell markers, CD44 and ALDH1 in a series of invasive breast carcinomas of West Algerian patients, in order to evaluate their distribution among the molecular subtypes. We also carried out the correlation between ALDH1 and CD44 immunohistochemical staining and clinicopathological features.

Our study is the first to identify breast cancer stem cells in tumors of West Algerian patients and to show that their distribution is particularly associated with aggressive phenotype of a breast cancer subtype.

## 2. SAMPLES AND METHODS

### 2.1 Patients and Breast Tumor Tissues

Forty six selected cases of breast carcinoma from 2009 to 2013 were retrieved from regional military hospital of Oran for immunohistochemical studies with information for 4 years. Clinical information was obtained by reviewing preoperative and postoperative medical records.

In our study, we included all women with breast cancer from western Algeria, we excluded men with breast cancer, patients whose medical records lacked information and those who died.

### 2.2 Molecular Subtype Classification

Molecular subtypes of breast cancer were determined by immunostaining of ER, PR and HER2 markers as previously described [11,12].

We defined breast cancer molecular subtypes as follow:

Luminal A (ER +, PR +/-, HER2-), luminal B (ER +, PR +/-, HER2 +), Triple negative (ER-, PR-, HER2-), HER2 + (ER-, PR-, HER2 +).

## 2.3 Immunohistochemistry

The formalin-fixed paraffin embedded tumor tissue slides of breast tumors were deparaffinized in xylene and rehydrated in graded alcohol. Antigen retrieval was achieved by heating slides in citrate buffer (pH 6.0, Dako Glostrup, Denmark) in a boiling water-bath for 40 minutes. The slides were cooled for 25 minutes. Following washing in phosphate-buffered saline (PBS), slides were incubated in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 5 minutes to block endogenous peroxidase activity, washed in PBS and then incubated with a blocking serum for 30 minutes. The slides were incubated with primary antibodies Aldehyde dehydrogenase-1 (Thermo-Fisher scientific; clone 5A11, monoclonal, IgG isotype) and Cluster of Differentiation 44 (Thermo-Fisher scientific clone 156-3C11, monoclonal, IgG isotype) with a dilution of 1:50 and 1:100 respectively for 1 hour, washed in PBS for 5 minutes then incubated with the secondary antibody (Dako REAL™ EnVision™ Detection System) at room temperature for 30 minutes. The slides were washed and developed in 3,30-diaminobenzidine (Peroxidase\_DAB, Rabbit\_Mouse purchased from Dako.) and then the tissues were counterstained with Mayer's hematoxylin, dehydrated, and mounted. Membranous CD44 expression was scored. For ALDH1, only cytoplasmic staining was considered. Both markers were scored by a pathologist using an Allred scoring system accounting for both the intensity of staining (0 = negative, 1 = weak, 2 = moderate, 3 = strong) and the proportion of stained cells (0 = 0%, 1 < 1%, 2 = 1 to 10%, 3 = 11 to 33%, 4 = 34 to 66%, 5 > 67%). The intensity and proportion are summed for a final score with 8 possible values (Scores of 0 and 2 are considered negative. Scores of 3 to 8 are considered positive).

## 2.4 Statistical Analysis

Statistical analyses were carried out using IBM Statistics 20 software to evaluate associations between CD44 and ALDH1 expressions and various clinicopathological parameters as well as breast cancer subgroups. The  $\chi^2$  test was used and  $P < 0.05$  was considered to indicate a statistically significant difference between the mean values.

## 3. RESULTS

### 3.1 Patients and Tumors Clinical Features

Of 46 breast tumor sample which included in the present study, 42 (91%) of cases were invasive ductal carcinoma (IDC), 3 (7%) invasive lobular carcinoma (ILC), and 1 (2%) was of another histological type. Among the invasive cases, 16 (35%) were grade 3, 29 (63%) were grade 2, and only 1 (2%) case was 4 of

Chevallier classification. Tumor size was categorised in two main groups based on TNM classification of human breast cancers: group 1 tumors were 2.0 cm or less in greatest dimension (T1) comprising 10 (22%) tumors and group 2 tumors were larger than 2.0 cm in greatest dimension (T2, T3 and T4) including 36 (78%) tumors. For lymph node status, 31 (67%) of the tumors were lymph node positive, whereas 15 (33%) of the tumors were node negative. The patients ranged in age from 27 to 88 years old (mean of 51 years), of whom, 28 (61%) patients were younger or equal 50 years old, whereas 18 (39%) patients older than 50 years of age. A total of 14 (30%) of the tumors were Luminal A, 17 (37%) were Luminal B, 5 (11%) were HER2 and 10 (22%) were Triple Negative breast cancers. Patients and tumor characteristics are summarized in Table 1.

### 3.2 Expression of ALDH1 and CD44 in Breast Carcinomas

Representative results of immunohistochemical ALDH1 and CD44 staining are shown in Fig. 1 and Fig. 2.

Of 43 tumors, ALDH1 was negative in 34 (79%), 1+ in 3 (7%), 2+ in 4 (9%), and 3+ in 2 (5%). Breast cancers showing 1+ or higher staining of ALDH1 were considered to be ALDH1+ in the analysis. Of the 43 breast cancers, 9 (21%) were found to be ALDH1+, and these breast cancers were significantly associated with young women ( $P = 0.05$ ) and were significantly more likely to be PR+ ( $P = 0.014$ ) and TNBC ( $P = 0.045$ ) (Table 2). No significant association was observed between ALDH1 positivity and histological type, tumor size, lymph node status, SBR grade, ER, HER2 and Ki67 status.

CD44 overexpression was observed in 11 of the 39 cancers (28%). Statistically significant correlations emerged between CD44 and SBR grade II ( $P = 0.057$ ), HER2 subtype ( $P = 0.001$ ) and the triple negative subtype ( $P = 0.049$ ) (Table 3). No significant association was observed between CD44 positivity and histological type, tumor size, lymph node status, ER, PR and Ki67 status.

## 4. DISCUSSION

In the last decade, cancer stem cells have become one of the biggest parts of medical research and have been found in multiple malignant tumors. Cancer stem cells are considered to be intrinsically resistant to all sorts of drugs even if they are very low number. Hence, the eradication of these cells is essential to develop more effective cancer therapies and their long term success on the recurrence and metastasis of breast cancer [13,14].

**Table 1. Description of the characteristics in the population study**

Characteristics	%
<b>Age (median year, min-max)</b>	51 (27-88)
≤50	28 (61%)
> 50	18 (39%)
<b>T</b>	
T1	10 (22%)
T2	26 (56.5%)
T3	7 (15%)
T4	3 (6.5%)
<b>N</b>	
0	15 (33%)
1	14 (30%)
2	11 (24%)
3	6 (13%)
<b>M</b>	
X	32 (70%)
0	11 (24%)
1	3 (6%)
<b>Histological type</b>	
Ductal	42 (91%)
Lobular	3 (7%)
Other	1 (2%)
<b>SBR Grade</b>	
II	29 (63%)
III	16 (35%)
Other	1 (2%)
<b>Pathological axillary lymph node</b>	
Negative	15 (33%)
Positive	31 (67%)
<b>PR</b>	
Negative	19 (41%)
Positive	27 (59%)
<b>ER</b>	
Negative	16 (35%)
Positive	30 (65%)
<b>HER2</b>	
Negative	35 (76%)
Positive	11 (24%)
<b>Breast cancer molecular subtypes</b>	
HR+/HER2-	21 (46%)
HER2+	11 (24%)
TN	10 (22%)
<b>Chemotherapy</b>	
Adjuvant chemotherapy	41 (89%)
Neoadjuvant chemotherapy	5 (11%)
<b>Radiotherapy</b>	
No	25 (54%)
Yes	21 (46%)

Ginestier et al. [15] in 2007 have identified, using ALDH1, cells with characteristics of stem cells and/or progenitor cells for normal breast epithelium as well as breast cancer. This and many other studies subsequently [16,17,18], has made ALDH1 of special interest in the breast cancer researches. CD44 has also attracted much attention, because of its numerous functions, such as, mediating the cellular adhesion, supporting cell migration and transmitting survival signals, [19]. In addition, it can direct intracellular signaling for growth and motility, and thus it is

involved in many cancers, including breast, lung, prostate, ovarian, cervical, and colorectal cancers [20].

**Table 2. Relationship between ALDH1 expression and various clinicopathological features**

Characteristics	ALDH1 negative	ALDH1 positive	p-value
<b>Age (43)</b>			
≤50	18 (53%)	8 (89%)	<b>0.050</b>
>50	16 (47%)	1 (11%)	
<b>Histological type (43)</b>			
Ductal	30 (88%)	9	0.558
Lobular	3 (9%)	(100%)	
Other	1 (3%)		
<b>Pathological tumor size (42) (2% Ni)</b>			
< 2CM	8 (23%)	1 (11%)	0.395
≥ 2 CM	25 (74%)	8 (89%)	
<b>Pathological axillary lymph node status (42)</b>			
N-	10 (29%)	5 (56%)	0.143
N+	24 (71%)	4 (44%)	
<b>SBR grade (42)</b>			
II	21 (62%)	5 (56%)	0.969
III	13 (38%)	3 (33%)	
<b>Estrogen receptor status (43)</b>			
ER-	10 (29%)	5 (56%)	0.143
ER+	24 (68%)	4 (44%)	
<b>Progesterone receptor status (43)</b>			
PR-	11 (32%)	7 (78%)	<b>0.014</b>
PR+	23 (68%)	2 (22%)	
<b>HER2 status (43)</b>			
HER2-	26 (76%)	8 (89%)	0.415
HER2+	8 (24%)	1 (11%)	
<b>KI67(31) (26% NI)</b>			
KI67 < 14%	12 (35%)	1 (11%)	0.278
KI67 ≥ 14%	14 (41%)	4 (44%)	
<b>Breast cancer molecular subtypes</b>			
RH+ (29)	26 (90%)	3 (10%)	
HER2 (4)	2 (50%)	2 (50%)	
TNBC (10)	6 (60%)	4 (40%)	0,045
<b>Metastatic relapse (2)</b>			
Yes	1 (3%)		
No			
<b>CD status</b>			
CD44+	10 (29%)	1 (11%)	0,263
CD44-	24 (71%)	8 (89%)	

In our study, we explored the expression of candidate stem-cell markers ALDH1 and CD44 in a random sample of West Algerian patients and attempted to correlate this expression with clinicopathological features and breast cancer molecular subtypes.

Our results revealed that 89% of ALDH1 positive (ALDH1<sup>+</sup>) patients were younger than 50 years old. Indeed, ALDH1 expression was significantly higher in young patients than in elderly ones ( $p=0.05$ ). This is in accordance with Mieog et al. [21] who were the first to demonstrate that expression of ALDH1 is age-dependent in breast cancer patients. Similar results have recently been reported by Tan et al. [22] and

Kang [23]. It has been well documented that patients who are diagnosed with breast cancer at a young age have a relatively poor prognosis compared to patients diagnosed at an older age [24] which is further supported by our data.

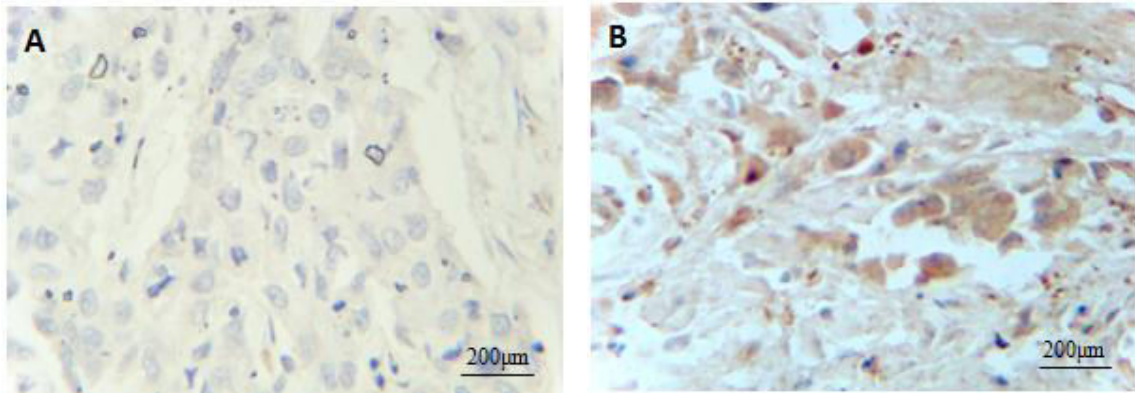
In addition, our results showed that ALDH1 was positively correlated with the triple negative subtype ( $p=0.045$ ), similar with other studies [25,26,27].

Triple negative breast cancer is widely described as a group with poor prognosis [28,29,30]. In fact, women presenting with triple negative breast cancers are

more likely to be younger than women with other subtypes of breast cancer [31] and their tumors are generally larger in size, are of higher grade and have lymph node involvement at diagnosis [32], They also have a higher rate of treatment failure and distant recurrence, despite a higher initial response to neoadjuvant chemotherapy than patients of other breast cancer subtypes [33,34]. Thereby, the overexpression of the ALDH1 stem cell marker in the triple negative breast cancers in our research might reveal an association between cancer stem-like cell populations and the aggressive behaviors of TNBC, including their chemoresistance. However, further researches are required to find it out.

**Table 3. Relationship between CD44 expression and various clinicopathological features**

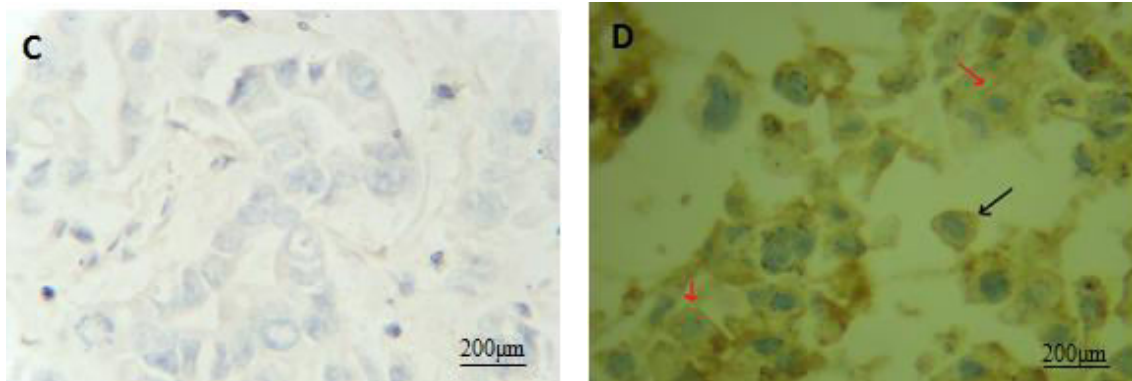
Characteristics	CD44 negative	CD44 positive	p –value
<b>Age (39)</b>			
≤ 50	17 (61%)	8 (73%)	0.482
>50	11 (39%)	3 (27%)	
<b>Histological type (39)</b>			
Ductal	27 (96%)	9 (82%)	0.202
Lobular	1 (4%)	1 (9%)	
Other		1 (9%)	
<b>Pathological tumor size (38) (3% Ni)</b>			
< 2CM	4 (14%)	4 (36%)	0.139
≥ 2 CM	23 (82%)	7 (64%)	
<b>Pathological axillary lymph node status (39)</b>			
N-	7 (25%)	4 (36%)	0.478
N+	21 (75%)	7 (64%)	
<b>SBR grade (39)</b>			
II	16 (57%)	10 (91%)	<b>0.057</b>
III	11 (39%)	1 (9%)	
<b>Estrogen receptor status (39)</b>			
ER-	10 (36%)	2 (18%)	0.286
ER+	18 (64%)	9 (82%)	
<b>Progesterone receptor status (39)</b>			
PR-	13 (46%)	2 (18%)	0.876
PR+	15 (54%)	9 (82%)	
<b>HER2 status (39)</b>			
HER2-	21 (75%)	10 (91%)	0.268
HER2+	7 (25%)	1 (9%)	
<b>KI67(30) (23% NI)</b>			
KI67 < 14%	8 (29%)	4 (36%)	1.000
KI67 ≥ 14%	12 (43%)	6 (54%)	
<b>Luminal subtypes (27)</b>			
LUMINAL A	8 (30%)	4 (15%)	0,33
LUMINAL B	9 (33%)	6 (22%)	
<b>Other molecular subtypes (12)</b>			
HER2+	4 (14%)		<b>0.001</b>
TNBC	7 (25%)	1 (9%)	
<b>Metastatic relapse (2)</b>			
Yes	2 (7%)		0,263
No			
ALDH1+	8 (28%)	1 (9%)	
ALDH1-	20 (72%)	10 (91%)	
<b>Bresat cancer molecular subtypes</b>			
RH+ (27)	17 (63%)		<b>0,049</b>
HER2+ (4)	4 (100%)	10 (37%)	
TNBC (8)	7 (87,5%)	1 (12,5%)	



**Fig. 1. ALDH1 immunohistochemical staining in breast cancers.**

*A: ALDH1-: absence of immunostaining on tumor cells*

*B: ALDH1 +: cytoplasmic staining on tumor cells*



**Fig. 2. CD44 immunohistochemical staining in breast cancers.**

*C: CD44-: absence of immunostaining on tumor cells*

*D: CD44 +: cytoplasmic staining on tumor cells*

The current study revealed a significant association between ALDH1+ and PR+ breast cancers ( $p=0.014$ ) and all of these cancers were from Luminal subtype. This is supported by the recent report published by Kida et al. who found ALDH1 positive in luminal-type tumors and cancer stem cells were shown to be an especially pessimistic prognostic indicator in patients with this subtype.

In the literature, it has been demonstrated that an association between the ALDH1 stem cell marker expression and poor clinical outcomes exists [15,35,36]. More recent studies showed a significant trend toward recurrence, shorter disease free survival (DFS) and overall survival (OS) in the group with ALDH1+ tumors than in the group with ALDH1- tumors [37,38,39]. Furthermore, Clinical observations have noted chemoresistance in advanced breast cancer patients and an increase in ALDH1 stem cell marker after neoadjuvant chemotherapy treatment, suggesting self-renewal potential of cancer stem-like cells [40,41,42]. There are several possible ways to explain

how cancer stem cell mediated therapy resistance arises, a possible mechanism include the expression of cell surface pumps, such as ABCG2/BCRP1, capable of expelling chemotherapeutic drugs providing protective perimeter around the cancer stem cells [43,44,45,46]. Additionally, the presence and activity of ALDH may confer CSCs the ability to metabolize cytotoxics such as cyclophosphamide and its derivatives [47]. Thereby, further investigations are needed to understand the heterogeneity of cancer stem cells and to clarify their role in the development of resistance to chemotherapy.

The major limitation of the present study is the lack of data concerning breast cancer patients after treatment. In this context, further are necessary to set ALDH1 as a relapse biomarker in Algerian breast cancer patients so that appropriate treatment can be selected at the earliest possible time point. From this point of view, the immunohistochemical investigation of ALDH1 may have potential as a new marker of breast cancer.

Non-significant correlation between positive ALDH1 expression and histological status, tumor size, lymph node status, SBR grade, ER, PR and Ki67 status was found. This is agrees with previous studies conduted by Resetkova et al. [48], Zhou et al. [49], Madjd et al. [50] and Hosni et al. [51] It might be attributed to a limited sample size.

CD44 was another biomarker of breast cancer stem cells our research focused on.

Our findings indicate that CD44 was significantly associated with the triple negative breast cancer subtype ( $p=0.049$ ). Wu et al. [52] have supported this result and so did a more recent investigation in 2015 conducted by Zheng et al. [53] who have reported that CD44-positive cases in the triple-negative breast cancer (TNBC) group was higher than that of the non-TNBC group. On the other hand, they found that the positive status of CD44 was inversely correlated with the HER2+ subtype, which is in agreement with our observations, since all HER2 + cases were CD44- with a significance of  $p = 0.001$ . We also found that high CD44 was more likely to be SBR grade II with 91% of CD44+ ( $p=0.057$ ) which represents the intermediate grade. Different information has been reported in a very recent data-analysis [54]. The explanation for these inverse relationships is not known.

Some analyses have demonstrated that CD44 expression was negatively associated with the ER status [55,56] and PR status [57]. Furthermore, J Cui et al. [58] have shown a correlation between CD44 positive expression and high Ki67 score. Previous studies have determined that breast cancer patients with high Ki-67 proliferation index were poor disease-free survival rate [59]. However, in our work, no significant association was observed between CD44 positivity and histological type, tumor size, lymph node status, ER, PR and Ki67 status, probably due to a reduced sample-size.

The evaluation of cancer stem cell makers ALDH1 and CD44 in breast tissues of Algerian women with stage II-III breast cancer may clarify the breast cancer relapse and chemotherapy resistance. Therefore, marking the small number of cancer stem cells, finding the corresponding target, and matching the target therapy for a malignant tumor is very important for an effective, radical cure This will pave the way for targeted and efficient treatment of breast cancer.

## 5. CONCLUSIONS

The data obtained in our study suggest that immunohistochemical evaluation of ALDH1 and

CD44 may serve as biomarkers to identify breast cancer stem cells in Algerian patients and predict prognosis. However, our study needs to be confirmed by future research with a large number of cases.

Breast cancer subtypes enriched with cancer stem cells need specific targeted therapies to improve patients relapse-free survival, especially triple-negative breast cancer, which is an aggressive form, often diagnosed at an advanced stage, affects young women and is closely associated with a lack of targeted therapy.

Approaches to target the cancer stem cell population can enhance the success of conventional therapies and change the outcomes of treatments. A novel agent of targeted therapy include "palbociclib", a cyclin CDK4 inhibitor could effectively remove paclitaxel-resistant TNBC cells and reduce their self-renewal capacity [60]. In conclusion, extensive biological investigations are required to target and eradicate breast cancer stem cells. Identification of breast cancer stem cells using immunohistochemical evaluation of cancer stem cell markers CD44 and ALDH1 in routine practice could have a therapeutic implication and may predict tumor recurrence after chemo- and radiation therapy.

## CONSENT

All authors declare that written informed consent was obtained from the patient (or other approved parties) for publication of this paper and accompanying images.

## ETHICAL APPROVAL

It is not applicable.

## ACKNOWLEDGEMENT

We are grateful to Dr Hamid Benamar for his help in the evaluation of immunohistochemical scoring.

## COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

## REFERENCES

1. Perou CM, Sürlie T, Eisen MB, Van de Rijn M, Jeffreyk SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. Nature. 2000;406: 747-752.

2. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *PNAS*. 2003;100:8418–8423.
3. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2010;1-18.
4. Tanei T, Morimoto K, Shimazu K, Kim SJ, Tanji Y, Taguchi T, et al. Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. *Clin Cancer Res*. 2009;15:4234-4241.
5. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *PNAS* 2003;100:3983-3988.
6. Ginestier C, Hee Hur M, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*. 2007; 555-567.
7. Lee H, Kim JH, Kim YJ, Choi SY, Kim SW, Kang E, et al. An increase in cancer stem cell population after primary systemic therapy is a poor prognostic factor in breast cancer. *British Journal of Cancer*. 2011 ;104:1730 -1738.
8. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Wicinski J, Cervera N, Finetti P, et al. Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Research*. 2009; 69:1302-1313.
9. Ijuin T, Takeuchi Y, Shimono Y, Fukumoto M, Tokuda E, Takenawa T. Regulation of CD44 expression and focal adhesion by Golgi phosphatidylinositol 4-phosphate in breast cancer. *Cancer Science*. 2016;107:981-990.
10. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nature Reviews*. 2005;5: 275-284.
11. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*. 2006;295:2494-2502.
12. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and Clinical Characterization of the Basal-Like Subtype of Invasive Breast Carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2004;10:5367-5374.
13. Li Song L, Miele L. Cancer stem cells – an old idea that’s new again: Implications for the diagnosis and treatment of breast cancer. *Expert Opin. Biol. Ther*. 2007;7:431-438.
14. Jordan CT. Cancer stem cell biology: From leukemia to solid tumors. *Cancer Stem Cell Biology*. 2004;7:708-712.
15. Ginestier C, Hee Hur M, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*. 2007; 555-567.
16. Balicki D. Moving forward in human mammary stem cell biology and breast cancer prognostication using ALDH1. *Cell Stem Cell*. 2007;485-487.
17. Honeth G, Lombardi S, Ginestier C, Hee Hur M, Marlow R, Buchupalli B, et al. Aldehyde dehydrogenase and estrogen receptor define a hierarchy of cellular differentiation in the normal human mammary epithelium. *Breast Cancer Research*. 2014;1-14.
18. Alison MR, Guppy NJ, Lim SM, Nicholson LJ. Finding cancer stem cells: Are aldehyde dehydrogenases fit for purpose? *The Journal of Pathology*. 2010;222:335-344.
19. Naor D, Wallach-Dayana SB, Zahalka MA, Vogt Sionov R. Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination. *Seminars in Cancer Biology*. 2008;260-267.
20. Naor D, Nedvetzki S, Golan I, Melnik L, Faitelson Y. CD44 in cancer. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2002;39:527–579.
21. Mieog JSD, De Kruijf EM, Bastiaannet E, Kuppen PJK, Sajet A, De Craen AJM, et al. Age determines the prognostic role of the cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase-1 in breast cancer. *BMC Cancer* 2012;12:1-9.
22. Tan EY, Thike AA, Breast Surgical Team at Outram, Tan PH. ALDH1 expression is enriched in breast cancers arising in young women but does not predict outcome. *British Journal of Cancer*. 2013;109:109-113.
23. Kang EJ, Jung H, Woo OH, Park KH, Woo SU, Yang DS, et al. Association of aldehyde dehydrogenase 1 expression and biologically aggressive features in breast cancer. *Neoplasma*. 2014;61:352-362.
24. Assi HA, Khoury KE, Dbouk H, Khalil LE, Mouhieddine TH, El Saghir NS. Epidemiology and prognosis of breast cancer in young women. *Journal of Thoracic Disease*. 2010;5: S2-S8.

25. Nalwoga H, Arnes JB, Wabinga H, Akslen LA. Expression of aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) is associated with basal-like markers and features of aggressive tumours in African breast cancer. *British Journal of Cancer*. 2010; 102:369-375.
26. Schwartz T, Stark A, Pang J, Awuah B, Kleer CG, Quayson S, et al. Expression of aldehyde dehydrogenase 1 as a marker of mammary stem cells in benign and malignant breast lesions of Ghanaian women. *Cancer*. 2013;488-494.
27. Kim YS, Jung MJ, Ryu DW, Lee CH. Clinicopathologic characteristics of breast cancer stem cells identified on the basis of aldehyde dehydrogenase 1 expression. *Journal Breast Cancer*. 2014;17:121-128.
28. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, et al. Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence. *Clinical Cancer Research*. 2007;13:4429-4434.
29. Bauer KR, Brown K, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor negative, progesterone receptor negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype. *Cancer*. 2007;109:1721-1728.
30. Gluz O, Liedtke C, Gottschalk N, Pusztai L, Nitz U, Harbeck N. Triple-negative breast cancer—current status and future directions. *Annals of Oncology*. 2009;20:1913-1927.
31. Morris GJ, Naidu S, Topham AK, Guiles F, Xu Y, McCue P, et al. Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African-American and Caucasian patients. *Cancer*. 2007;110:876-884.
32. Haffty BG, Yang Q, Reiss M, Kearney T, Higgins SA, Weidhaas J, et al. Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2006; 24:5652- 5657.
33. Lehmann BD, Bauer JA, Chen Xi, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of Clinical Investigation*. 2011;121:2750-2767.
34. O'Reilly EA, Gubbins L, Sharma S, Tully R, Guang MHZ, Weiner-Gorzel K, et al. The fate of chemoresistance in triple negative breast cancer (TNBC). *BBA Clinical*. 2015;3:257-275.
35. Tanei T, Morimoto K, Shimazu K, Kim SJ, Tanji Y, Taguchi T, et al. Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. *Clinical Cancer Research*. 2009;15:4234-4241.
36. Neumeister V, Agarwal S, Bordeaux J, Camp RL, Rimm DL. *In situ* identification of putative cancer stem cells by multiplexing ALDH1, CD44, and cytokeratin identifies breast cancer patients with poor prognosis. *The American Journal of Pathology*. 2010;176:2131-2138.
37. Ohi Y, Umekita Y, Yoshioka T, Souda M, Rai Y, Sagara Y, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 expression predicts poor prognosis in triple-negative breast cancer. *Histopathology*. 2011; 59:776-780.
38. Zhong Y, Shen S, Zhou Y, Mao F, Guan JF, Lin Y, et al. ALDH1 is a better clinical indicator for relapse of invasive ductal breast cancer than the CD44+/CD242 phenotype. *Med Oncol* 2014;31(864):1-8.
39. Chatterjee D, Bal A, Das A, Singh G. Proliferation rate and breast cancer subtype, but not ALDH1 expression, predict pathological response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Virchows Arch*. 2015;467:303-310.
40. Lee HE, Kim JH, Kim YJ, Choi SY, Kim SW, Kang E, et al. An increase in cancer stem cell population after primary systemic therapy is a poor prognostic factor in breast cancer. *British Journal of Cancer*. 2011;104:1730-1738.
41. Alamgeer M, Ganju V, Kumar B, Fox J, Hart S, White M, et al. Changes in aldehyde dehydrogenase-1 expression during neoadjuvant chemotherapy predict outcome in locally advanced breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2014;1-13.
42. Miyoshi Y, Shien T, Ogiya A, Ishida N, Yamazaki K, Horii R, et al. Differences in expression of the cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1 among estrogen receptor-positive/human epidermal growth factor receptor type 2-negative breast cancer cases with early, late, and no recurrence. *Breast Cancer Research*. 2016;18:73.
43. Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side population phenotype. *Nature Medicine*. 2001;7:1028-1034.
44. Bram EE, Ifergan I, Grimberg M, Lemke K, Skladanowski A, Assaraf YG. C421 allele-specific ABCG2 gene amplification confers resistance to the antitumor triazoloacridone C-1305 in human lung cancer cells. *Biochemical Pharmacology*. 2007;74:41-53.
45. Bram EE, Stark M, Raz S, Assaraf YG. Chemotherapeutic Drug-Induced ABCG2

- Promoter demethylation as a novel mechanism of acquired multidrug resistance. *NEOPLASIA*. 2009;11:1359–1370.
46. McIntosh K, Balch C, Tiwari AK. Tackling multidrug resistance mediated by efflux transporters in tumor-initiating cells. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*. 2016;11:02-09.
  47. Moreb JS, Baker HV, Chang LJ, Amaya M, Lopez MC, Ostmark B, et al. ALDH isozymes downregulation affects cell growth, cell motility and gene expression in lung cancer cells. *Molecular Cancer*. 2008;7:87.
  48. Resetkova E, Reis-Filho JS, Jain RK, Mehta R, Thorat MA, Nakshatri H, et al. Prognostic impact of ALDH1 in breast cancer: A story of stem cells and tumor microenvironment. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;123:97-108.
  49. Zhou L, Jiang Y, Yan T, Di G, Shen Z, Shao Z, et al. The prognostic role of cancer stem cells in breast cancer: A meta-analysis of published literatures. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;122: 795-801.
  50. Madjd Z, Ramezani B, Molanae S, Asadi-Lari M. High expression of stem cell marker ALDH1 is associated with reduced BRCA1 in invasive breast carcinomas. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2012;13:2971-2975.
  51. Hosni HN, Daoud SA, Bassam AM. Immunohistochemical study of stem cell marker ALDH1 and BRCA1 in breast cancer. *Academic Journal of Cancer Research*. 2014;7: 01-07.
  52. Wu Y, Sarkissyan M, Elshimali Y, Vadgama JV. Triple negative breast tumors in african-American and Hispanic/Latina women are high in CD44+, Low in CD24+, and have loss of PTEN. *Plos One*. 2013;8:1-12.
  53. Zheng Z, Shao N, Weng H, Li W, Zhang J, Zhang L, et al. Correlation between epidermal growth factor receptor and tumor stem cell markers CD44/CD24 and their relationship with prognosis in breast invasive ductal carcinoma. *Med Oncol*. 2015;32:275.
  54. Xu H, Tian Y, Yuan X, Liu Y, Wu H, Liu Q, et al. Enrichment of CD44 in basal-type breast cancer correlates with EMT, cancer stem cell gene profile, and prognosis. *Onco Targets and Therapy*. 2016;9:431-444.
  55. Ahmed MAH, Aleskandarany MA, Rakha EA, Moustafa RZA, Benhasouna A, Nolan C, et al. A CD44-/CD24+ phenotype is a poor prognostic marker in early invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;133: 979-995.
  56. Adamczyk A, Niemiec JA, Ambicka A, Mucha-Malecka A, Mitus J, et al. CD44/CD24 as potential prognostic markers in node-positive invasive ductal breast cancer patients treated with adjuvant chemotherapy. *J Mol Hist*; 2013.
  57. McFarlane S, Coulter JA, Tibbits P, O'Grady A, McFarlane C, Montgomery N, et al. CD44 increases the efficiency of distant metastasis of breast cancer. *Oncotarget*. 2015;6:11466-11476.
  58. Cui J, Li P, Liu X, Hu H, Wie W. Abnormal expression of the Notch and Wnt/B-catenin signaling pathways in stem-like ALDHhiCD44+ cells correlates highly with Ki-67 expression in breast cancer. *Oncology Letters*. 2015;9:1600-1606.
  59. Keam B, Im SA, Lee KH, Han SW, Oh DY, Kim JH, et al. Ki-67 can be used for further classification of triple negative breast cancer into two subtypes with different response and prognosis. *Breast Cancer Research*. 2011;13-22.
  60. Dandawate PR, Subramaniam D, Jensen RA, Anant S. Targeting cancer stem cells and signaling pathways by phytochemicals: Novel approach for breast cancer therapy. *Seminars in Cancer Biology*; 2016.

A decorative border resembling a scroll, with a vertical strip on the left and a horizontal strip at the top, both with rounded ends and small circular details at the corners.

**CHAPITRE IV :**  
**Références Bibliographiques**

**A**

Adamczyk A, Niemiec JA, Ambicka A, *et al.* CD44/CD24 as potential prognostic markers in node-positive invasive ductal breast cancer patients treated with adjuvant chemotherapy. *J Mol Histol.* 2014; 45(1): 35–45.

Ahmed MA, Aleskandarany MA, Rakha EA *et al.*. A CD44(-)/CD24(+) phenotype is a poor prognostic marker in early invasive breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 2012 ; 133(3) : 979–995.

Akisik E, Bavbek S, Dalay N. CD44 variant exons in leukemia and lymphoma. *Pathol Oncol Res.* 2002; 8:36–40

Ákos F, György V, János S. The hitchhikers guide to cancer stem cell theory: Markers, pathways and therapy. *Cytometry Part A.* 2012; 83(1): 62-71.

Al-Hajj M, MS Wicha, Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the national academy of sciences of the USA.* 2003; 100(7): 3983-3988.

Al-Hajj M, Whicha MS, Bentio-Hernandez A, Morrison SJ and Clarke MF: Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100: 3983-3988.

Alamgeer M, Ganju V, Kumar B, Fox J, Hart S, White M *et al.* Changes in aldehyde dehydrogenase-1 expression during neoadjuvant chemotherapy predict outcome in locally advanced breast cancer. *Breast Cancer Research* 2014; 1-13.

Alison M, Lin W.R, Lim S.M.L, Nicholson L.J. Cancer stem cells : In the line of fire. *Cancer Treatment reviews*, 2012; 38, (6) :589-598.

Alison MR , S Islam, NA Wright, Stem cells in cancer: instigators and propagators?, *Journal of Cell Sciences.* 2010; 123: 2357-2368.

Altaba AR i , C Mas, B Stecca. The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer. *Trends in cell biology.* 2007; 17(9): 438-447.

Altaba Ruiz i, A., Palma, V., and Dahmane, N. Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain. *Nature reviews Neuroscience.* 2002; 3: 24-33.

Alvarez CV , M Garcia-Lavandeira *et al.*, Defining stem cell types: understanding the therapeutic potential of ESCs, ASCs, and iPS cells. *Journal of molecular endocrinology.* 2012; 49: 89-111.

Alvi AJ, Clayton H, Joshi C, Enver T, Ashworth A, Vivanco MM, Dale TC, Smalley MJ. Functional and molecular characterisation of mammary side population cells. *Breast cancer research.* 2003; 5(1).

Amaral, B.B., Meurer L, Whitman G.J, *et al.*, Lymph node status in the breast cancer patient: sampling techniques and prognostic significance. *Seminars in Roentgenology*. 2007. 42: 253-264.

Assi H.A., K.E. Khoury , H. Dbouk , L.E. Khalil , T.H. Mouhieddine ,Epidemiology and prognosis of breast cancer in young women. *J. Thorac. Dis.*, 5,Suppl. 2013; S2–8.

Atahan, I.L., Ozyigit G, Yildiz, F *et al.*, Percent positive axillary involvement predicts for the development of brain metastasis in high-risk patients with nonmetastatic breast cancer receiving post-mastectomy radiotherapy. *The Breast Journal*, 2008; 14(3): 245-249.

Athanassiadou P, Grapsa D, Gonidi M, Athanassiadou AM, Tsipis A, Patsouris E. CD24 expression has a prognostic impact in breast carcinoma. *Pathol Res Pract*. 2009; 205(8):524–533

### **B**

Balicki D. Moving forward in human mammary stem cell biology and breast cancer prognostication using ALDH1. *Cell Stem Cell*. 2007; 1: 485-487.

Baselga J, Cortés J, Kim SB, Im SA. Pertuzumab plus Trastuzumab plus Docetaxel for Metastatic Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2012; 366: 109-119.

Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive Analysis of Estrogen Receptor (ER)- Negative, Progesterone Receptor (PR)-Negative, and HER2-Negative Invasive Breast Cancer, the So-called Triple-Negative Phenotype. *Cancer* 2007; 109 : 1721-1728.

Bharat, A., F. Gao, and J.A. Margenthaler, Tumor characteristics and patient outcomes are similar between invasive lobular and mixed invasive ductal/lobular breast cancers but differ from pure invasive ductal breast cancers *The American journal of Surgery*. 2009; 198(4): 516-519.

Blank, U., Karlsson, G., and Karlsson, S. Signaling pathways governing stem-cell fate. *Blood*. 2008; 111: 492-503.

Bonnet D , JE Dick Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine*. 1997; 3: 730-737.

Borovski T, EM Felipe De Sousa, L Vermeulen *et al.* Cancer stem cell niche: the place to be. *Cancer research*, 2011; 71(3): 634-639.

Bram EE, Ifergan I, Grimberg M, Lemke K, Skladanowski A, Assaraf YG. C421 allele-specific ABCG2 gene amplification confers resistance to the antitumor triazoloacridone C-1305 in human lung cancer cells. *Biochem Pharmacol*. 2007; 74:41–53

Bram EE, Stark M, Raz S, Assaraf YG. Chemotherapeutic drug-induced ABCG2 promoter demethylation as a novel mechanism of acquired multidrug resistance. *Neoplasia*. 2009; 11:1359–1370

Britton, K.M., Eyre, R., Harvey, I.J., Stemke-Hale, K., Browell, D., Lennard, T.W.J., and Meeson, A.P. Breast cancer, side population cells and ABCG2 expression. *Cancer Lett*. 2012; 323: 97–105.

Brizzi MF , G Tarone, P Defilippi, Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche. *Current opinion in cell biology*. 2012; 24(5): 645-651.

Burness, M.L., T.A. Grushko, and O.I. Olopade, Epidermal growth factor receptor in triple-negative and basal-like breast cancer: promising clinical target or only a marker? *Cancer J*, 2010; 16(1): 23-32.

Burstein HJ, Temin S, Anderson H, Buchholz TA, Davidson NE, Gelmon KE .Adjuvant Endocrine Therapy for Women With Hormone Receptor–Positive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Focused Update. *Journal of clinical oncology*. 2014; 32(21): 2255-2270.

### *e*

Calabrese C, H Poppleton, M Kocak, TL Hogg, C Fuller *et al*. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer cell*. 2007; 11(1): 69-82.

Calza S, Hall P, Auer G, *et al.*, Intrinsic molecular signature of breast cancer in a population based cohort of 412 patients. *Breast Cancer Research*. 2006; 8(4): R34.

Carey, L.A., C.M. Perou, C.A. Livasy, *et al.*, Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *Jama*, 2006; 295(21): 2492-2502.

Carter, C.L., C. Allen, and D.E. Henson, Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer*. 1989; 63(1): 181-187.

Ceder JA , L Jansson, RA Ehrnström, L Rönstrand *et al*. The characterization of epithelial and stromal subsets of candidate stem/progenitor cells in the human adult prostate. *European urology*, 2008; 53(3): 524-532.

Chatterjee D, Bal A, Das A and Singh G. Proliferation rate and breast cancer subtype, but not ALDH1 expression, predict pathological response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Virchows Arch* 2015; 467:303-310.

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

Chen, M.C., Hsu, S.L., Lin, H., and Yang, T.Y. Retinoic acid and cancer treatment. *BioMedicine.* 2014; 4 (22).

Choi, W.W., M.M. Lewis, D. Lawson, *et al.*, Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and VEGF-family gene expression. *Modern Pathology*, 2005; 18(1): 143-152.

Chow DC, LA Wenning, WM Miller, ET Papoutsakis, Modeling pO<sub>2</sub> distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models. *Biophysical journal*, 2001; 81(2): 685-696.

Chow DC, LA Wenning, WM Miller, ET Papoutsakis. Modeling pO<sub>2</sub> distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. I. Krogh's model, *Biophysical journal*, 2001; 81(2): 675-684.

Clarke MF, JE Dick, PB Dirks, CJ Eaves *et al.* Cancer stem cells perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer research.* 2006; 66(19): 9339-9344.

Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, *et al.* Cancer stem cells: perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 2006; 66: 9339-44.

Cottu P. Hormonothérapie des cancers du sein au stade précoce. *La revue du praticien.* 2013

Creighton CJ, Li X, Landis M, *et al.* Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:13820–13825.

Croker AK and Allan AL: Inhibition of aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity reduces chemotherapy and radiation resistance of stem-like ALDH<sup>hi</sup>CD44<sup>+</sup> human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 133: 75-87.

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

Croker AK, Goodale D, Chu J, Postenka C, Hedley BD, Hess DA, and Allan AL: High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 2236-2252.

Cui J, Li P, Liu X, Hu H, Wei W. Abnormal expression of the Notch and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathways in stem-like ALDHhiCD44+ cells correlates highly with Ki-67 expression in breast cancer. *Oncol Lett.* 2015; 9(4): 1600–1606

### **D**

Dang TP, AF Gazdar, AK Virmani *et al.* Chromosome 19 translocation, overexpression of Notch3, and human lung cancer, - *Journal of the national cancer institute.* 2000; 92(16): 1355-1357.

De Cremoux P, Debled M, Bonnefoi H, Cottu P. Marqueurs biologiques de résistance à l'hormonothérapie dans les cancers du sein. *Bulletin du cancer.* 2010; 97(8): 951-963.

De Ronde, J.J., J. Hannemann, H. Halfwerk, *et al.* Concordance of clinical and molecular breast cancer subtyping in the context of preoperative chemotherapy response. *Breast Cancer Res Treat.* 2010. 119(1): p. 119-26.

Dean M. ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. *Journal of mammary gland biology and neoplasia.* 2009 ; 14(1) : 3-9.

Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, *et al.* Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clinical Cancer Research* 2007; 13(15) : 4429- 4434.

Deome, K.B., Faulkin, L.J., Jr, Bern, H.A., And Blair, P.B. Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice. *Cancer Res.* 1959; 19: 515–520.

Deonarain M.P, Kousparou C.A., Epenetos A.A, Antibodies targeting cancer stem cells: a new paradigm in immunotherapy? *MAbs*, 1. 2009; 12-25.

Dolnikov, A., Xu, N., Shen, S., Song, E., Holmes, T., Klamer, G., and O'Brien, T.A. GSK-3 $\beta$  inhibition promotes early engraftment of ex vivo-expanded haematopoietic stem cells. *Cell proliferation.* 2014; 47: 113-123.

Dontu G. Breast cancer stem cell markers - the rocky road to clinical applications. *Breast Cancer Res.* 2008; 10:110.

Dontu, G., Al-Hajj, M., Abdallah, W.M., Clarke, M.F., and Wicha, M.S.. Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif.* 2003b; 36 *Suppl 1*, 59–72.

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

Du L, Wang H, He L, Zhang J, Ni B, Wang X *et al.* CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 6751–6760.

Dylla SJ, L Beviglia, IK Park, C Chartier, J Raval *et al.* Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. *PloS one.* 2008; 3(6): 2428-2440.

### **e**

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005; 365:1687-717.

Edwards DP, Chamness GC, McGuire WL. Estrogen and progesterone receptor proteins in breast cancer. *Biochimica et biophysica Acta.* 1979; 560(4): 457-486.

Eirew, P., Stingl, J., Raouf, A., Turashvili, G., Aparicio, S., Emerman, J.T., and Eaves, C.J. A method for quantifying normal human mammary epithelial stem cells with in vivo regenerative ability. *Nat. Med.* 2008; 14: 1384–1389.

Elston CW and Ellis IO, Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. C. W. Elston & I. O. Ellis. *Histopathology* 1991; 19; 403-410. *Histopathology*, 2002. 41(3A): 151-2, discussion 152-3.

Eramo A, F Lotti, G Sette, E Pillozzi, M Biffoni *et al.* Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death & differentiation.* 2008; 15: 504-514.

Evans MJ, MH Kaufman. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981.

### **f**

Fan X, Khaki L, Zhu TS, Soules M.E, Talsma C.E, Gul N, Koh C, Zhang J, Li Y.M, Maciaczyk J, Nikkhah G, Dimeco F, Piccirillo S, Vescovi A.L, Eberhart C.G. NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts. *Stem Cells.* 2010 ; 28, (1): 5-16.

Fan, C., D.S. Oh, L. Wessels, *et al.* Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med*, 2006. 355(6): p. 560-9.

Fedyanin M., Anna P., Elizaveta P., Sergei T. Role of stem cells in colorectal cancer progression and prognostic and predictive characteristics of stem cell markers in colorectal cancer, *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 2017; 12:19–30.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 201 Int J Cancer. 2015; 136(5):359-86.

Fiúza UM , AM Arias. Cell and molecular biology of Notch. *Journal of Endocrinology.* 2007; 194 : 459-474.

Frank, N.Y., Margaryan, A., Huang, Y., Schatton, T., Waaga-Gasser, A.M., Gasser, M., Sayegh, M.H., Sadee, W., and Frank, M.H. ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer research.* 2005; 65: 4320-4333.

Fuch E, Chen T, A matter of life and death: self-renewal in stem cells, - *EMBO reports*, 2013; 14, 39-48.

### G

Gee K, Kryworuchko M, Kumar A. Recent advances in the regulation of CD44 expression and its role in inflammation and autoimmune diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2004; 52:13–26

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

Gluz O, C. Liedtke, N. Gottschalk, L. Pusztai, U. Nitz and N. Harbeck. Triple-negative breast cancer current status and future directions. *Annals of Oncology* 2009 ; 20 : 1913-1927.

Goodison S, Urquidi V, Tarin D. CD44 cell adhesion molecules. *Mol Pathol.* 1999; 52: 189-196.

Gordon WR , D Vardar-Ulu, G Histen *et al.* Structural basis for autoinhibition of Notch. *Nature structural & molecular biology.* 2007; 14: 295-300.

Grotenhuis BA , BPL Wijnhoven *et al.* Cancer stem cells and their potential implications for the treatment of solid tumors. *Journal of surg onc.* 2012

### H

Haffty BG, Yang Q, Reiss M, Kearney T, Higgins SA, Weidhaas J *et al.* Locoregional Relapse and Distant Metastasis in Conservatively Managed Triple Negative Early-Stage Breast Cancer. *Journal Of Clinical Oncology* 2006 ; 24 : 5652- 5657.

Hahnel R, Twaddle E. Estrogen receptors in human breast cancer : 1. Methodology and characterization of receptors. *Steroids*. 1971; 18(6): 653-680.

Haldosén LA, Zhao C, Dahlman-Wright K. Estrogen receptor beta in breast cancer. *Molecular and cellular endocrinology*. 2014; 382(1): 665-672.

Hanahan D , RA Weinberg. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100(1): 57-70.

Haq, B and Geyer CE, Role of trastuzumab in the adjuvant treatment of HER2-positive early breast cancer. *Womens Health*. 2009; 5(2): 135-147.

Harada, H., Kizaka-Kondoh, S., Li, G., Itasaka, S., Shibuya, K., Inoue, M., and Hiraoka, M. Significance of HIF-1-active cells in angiogenesis and radioresistance. *Oncogene*. 2007; 26: 7508-7516.

Harmes, D.C., and DiRenzo, J. Cellular quiescence in mammary stem cells and breast tumor stem cells: got testable hypotheses? *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. 2009; 14: 19–27.

He, Y.C., Zhou, F.L., Shen, Y., Liao, D.F., and Cao, D. Apoptotic death of cancer stem cells for cancer therapy. *International journal of molecular sciences*. 2014; 15: 8335-8351.

Hebbard L, Steffen A, Zawadzki V, *et al.* CD44 expression and regulation during mammary gland development and function. *J Cell Sci*. 2000;113 (Pt 14):2619-2630.

Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, Rasmussen KE, Jones LP, Assefnia S, Chandrasekharan S, Backlund MG, Yin Y *et al.* Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol*. 2007, 8: R76-10.1186

Horiguchi K, Toi M, Horiguchi S *et al.* Predictive value of CD24 and CD44 for neoadjuvant chemotherapy response and prognosis in primary breast cancer patients. *J Med Dent Sci*. 2010; 57(2):165–175

Hossain F , C Sorrentino, A Bilyeu, J Crabtree, A Pannuti, A Golde, B Osborne and L Miele. Targeting cancer stem-like cells in triple negative breast cancer cells through non-canonical notch signaling. *Cancer research*. 2017; 77(13).

Howard BA, Gusterson BA. Human Breast Development. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 2000; 5(2): 119-137.

Hu, C., Li, H., Li, J., Zhu, Z., Yin, S., Hao, X., Yao, M., Zheng, S., and Gu, J. Analysis of ABCG2 expression and side population identifies intrinsic drug efflux in the HCC cell line MHCC-97L and its modulation by Akt signaling. *Carcinogenesis*. 2008; 29: 2289-2297.

Hu, Z., C. Fan, D.S. Oh, *et al.* The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics*, 2006. 7: p. 96.

Huang E.H., Hynes M.J, Zhang T., Ginestier C., Dontu G., Appelman H., et al., Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis, *Cancer Res*. 2009; 69: 3382e9.

Huang B, Warner M, Gustafsson JÅ. Estrogen receptors in breast carcinogenesis and endocrine therapy. *Molecular and cellular endocrinology*. 2015; 418(3) : 240-244.

### J

Ihemelandu CU, Leffall LD, Dewitty RL, *et al.* Molecular breast cancer subtypes in premenopausal African-American women, tumor biologic factors and clinical outcome. *Annals of Surgical Oncology*, 2007. 14(10): 2994-3003.

Ingham PW , AP McMahon Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes & development*. 2001; 15:3059-3087.

Irollo E., Pirozzi G. CD133: to be or not to be, is this the real question? *Am J Transl Res*. 2013; 563-581.

Islam F , V Gopalan, RA Smith, AKY Lam. Translational potential of cancer stem cells: A review of the detection of cancer stem cells and their roles in cancer recurrence and cancer treatment. *Experimental cell research*. 2015; 335(1): 135-147.

Islam F. Cancer stem cell: Fundamental experimental pathological concepts and updates. *Experimental and molecular pathology*. 2015; 98(2): 184-191.

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

### J

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

Jain S, Gradishar WJ. Male breast cancer. *The Breast (Fifth edition)*. 2018; 974-980.

Jayasinghe, U.W., Bilous A.M, and Boyages J. Is survival from infiltrating lobular carcinoma of the breast different from that of infiltrating ductal carcinoma? *The breast journal*. 2007; 13(5): 479-85.

Jin, F., Zhao, L., Guo, Y.J., Zhao, W.J., Zhang, H., Wang, H.T., Shao, T., Zhang, S.L., Wei, Y.J., Feng, J., *et al.* Influence of Etoposide on anti-apoptotic and multidrug resistance associated protein genes in CD133 positive U251 glioblastoma stem-like cells. *Brain research*. 2010; 1336: 103-111.

Jones DL , AJ Wagers, No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008; 9 : 11–21

### **K**

Kaiser J. The cancer stem cell gamble. *Science*. 2015; 347(6219): 226-229.

Kaklamani, V.G. and W.J. Gradishar, Gene expression in breast cancer. *Curr Treat Options Oncol*, 2006; 7(2): p. 123-8.

Kang, E.J., Jung, H., Woo, O.H., Park, K.H., Woo, S.U., Yang, D.S., Kim, A.R., Lee, J.B., Kim, Y.H., Kim, J.S., Seo, J.H., Association of aldehyde dehydrogenase 1 expression and biologically aggressive features in breast cancer. *Neoplasma*. 2014; 61, 352–362.

Katayama, R., Koike, S., Sato, S., Sugimoto, Y., Tsuruo, T., and Fujita, N. Dofequidar fumarate sensitizes cancer stem-like side population cells to chemotherapeutic drugs by inhibiting ABCG2/BCRP-mediated drug export. *Cancer Sci*. 2009; 100: 2060-2068.

Knoblich JA, Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell*. 2008; 132(4): 583-597.

Keam B, Im SA, Lee KH, Han SW, Oh DY, Kim JH, Lee SH, Han W, Kim DW, *et al.* Ki-67 can be used for further classification of triple negative breast cancer into two subtypes with different response and prognosis. *Breast Cancer Res*. 2011; 13(2):R22.

Kida K, Ishikawa T, Yamada A, Shimada K, Narui K, Sugae S, Shimizu D, Tanabe M, Sasaki T, Ichikawa Y, Endo I. Effect of ALDH1 on prognosis and chemoresistance by breast cancer subtype. *Breast Cancer Res Treat*. 2016;156:261–9.

Kim YS, Jung MJ, Ryu DW, Lee CH. Clinicopathologic characteristics of breast cancer stem cells identified on the basis of aldehyde dehydrogenase 1 expression. *J Breast Cancer* 2014;17:121–128.

Kopan R , MXG Ilagan. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*. 2009; 137 (2): 216-233.

Kopper L , M Hajdú Tumor stem cells. *Pathology & Oncology Research*. 2004; 10: 69–73.

Kordon, E.C., and Smith, G.H. An entire functional mammary gland may comprise the progeny from a single cell. *Dev. Camb. Engl*. 1998; 125: 1921–1930.

Kornegoor R, Verschuur-Maes AHJ, Buerger H *et al.*, Molecular subtyping of male breast cancer by immunohistochemistry. *Modern Pathology*. 2012; 25: 398-404.

Kwan, M.L., L.H. Kushi, E. Weltzien, *et al.* Epidemiology of breast cancer subtypes in two prospective cohort studies of breast cancer survivors. *Breast Cancer Res*, 2009. 11(3): R31.

### L

Laakso, M., M. Tanner, J. Nilsson, *et al.* Basolumental carcinoma: a new biologically and prognostically distinct entity between basal and luminal breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2006. 12(14 Pt 1): p. 4185-91.

Lagadec C, Vlashi E, Donna LD, Meng YH, Dekmezian C, Kim K and Pajonk F: Survival and self-renewing capacity of breast cancer initiating cells during fractionated radiation treatment. *Breast Cancer Res* 2010; 12: R13.

Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. WHO classification of tumours of the breast. World Health Organization classification of tumours. 4th ed. Lyon: IARC Press. 2012.

Lee HE, JH Kim, YJ Kim, SY Choi, S-W Kim, E Kang *et al.* An increase in cancer stem cell population after primary systemic therapy is a poor prognostic factor in breast cancer. *British Journal of Cancer* 2011; 104 : 1730 – 1738.

Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy B, Shyr Y *et al.* Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of Clinical Investigation*. 2011; 121: 2750- 2767.

Li C , DG Heidt, P Dalerba, CF Burant, L Zhang *et al.* Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer research*, 2007; 67(3):1038–1045.

Li L , WB Neaves. Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters. *Cancer research*, 2006; 66(9).

LI L, XIE T. Stem cell niche: structure and function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2005; 21: 605- 631.

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

Lim, E., Vaillant, F., Wu, D., Forrest, N.C., Pal, B., Hart, A.H., Asselin-Labat, M.-L., Gyorki, D.E., Ward, T., Partanen, A., *et al.* Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat. Med.* 2009; 15: 907-913.

Liu S , G Dontu, ID Mantle, S Patel, N Ahn, KW Jackson *et al.* Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer research.* 2006; 66(12).

Liu Y, Lv DL, Duan JJ, Xu SL, Zhang JF, Yang XJ, Zhang X, Cui YH, Bian XW, Yu SC. ALDH1A1 expression correlates with clinicopathologic features and poor prognosis of breast cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer.* 2014; 14:444.

Lobo NA , Y Shimono, D Qia *et al.* The biology of cancer stem cells, - *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* 2007; 23: 675-699.

Louie E , S Nik, J Chen. Identification of a stem-like cell population by exposing metastatic, breast cancer cell lines to repetitive cycles of hypoxia and reoxygenation. *Breast Cancer Research.* 2010; 12:R94.

## M

Mani SA, Guo W, Liao MJ, *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.* 2008; 133:704-715.

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

Martello, G., Sugimoto, T., Diamanti, E., Joshi, A., Hannah, R., Ohtsuka, S., Gottgens, B., Niwa, H., and Smith, A. Esrrb is a pivotal target of the Gsk3/Tcf3 axis regulating embryonic stem cell self-renewal. *Cell stem cell* 2012; 11: 491-504.

Martelotto LG, Ng CK, Piscuoglio S, Weigelt B and Reis-Filho JS: Breast cancer intra-tumor heterogeneity. *Breast Cancer Res* 2014; 16: 210.

Masood S, Bui MM. Prognostic and predictive value of HER2/neu oncogene in breast cancer. *Microscopy research and technique.* *Microsc Res Tech* 2002; 59:102-108.

Matsuda H., Parsons M.J., Leach S.D. Aldh1-expressing endocrine progenitor cells regulate secondary islet formation in larval zebrafish pancreas, PLoS One. 2013; e74350.

Maumus M, Caractérisation des cellules souches/ progénitrices CD34+ / CD31- du tissu adipeux humain et influence du microenvironnement sur leur prolifération, migration et différenciation. 2009.

McFarlane S, McFarlane C, Montgomery N, Hill A, Waugh DJ. CD44-mediated activation of alpha5beta1-integrin, cortactin and paxillin signaling underpins adhesion of basal-like breast cancer cells to endothelium and Fibronectin-enriched matrices. Oncotarget. 2015; 6(34): 36762–36773.

McIntosh K, Balch C, Tiwari AK. Tackling multidrug resistance mediated by efflux transporters in tumor-initiating cells. Expert Opin Drug Metab Toxicol 2016; 12:633-44;

McMillan R , W Matsui. Molecular pathways: the hedgehog signaling pathway in cancer. Clinical cancer research. 2012; 18(18).

Mieog JS, de Kruijf EM, Bastiaannet E, Kuppen PJ, Sajet A, de Craen AJ, Smit VT, van de Velde CJ, Liefers GJ. Age determines the prognostic role of the cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase-1 in breast cancer. BMC Cancer. 2012; 12: 42.

Merchant A.A, Matsui W. Targeting Hedgehog - a Cancer Stem Cells Pathway. Clinical Cancer Research. 2010 ; 16(12) : 3130-3140.

Meyer MJ, Fleming JM, Lin AF, Hussnain SA, Ginsburg E and Vonderhaar BK: CD44+CD49fhiCD133/2hi defines xenograftinitiating cells in estrogen receptor–negative breast cancer. Cancer Res. 2010; 70: 4624-4633.

Millikan, R.C., B. Newman, C.K. Tse, *et al.* Epidemiology of basal-like breast cancer. Breast Cancer Res Treat, 2008; 109(1): p. 123-39

Mitsiadis TA , Barrandon O, Rochat A, Barrandon Y, De Bari C, Stem cell niches in mammals,. Experimental cell research. 2007; 313 (16): 3377-3385.

Mitsuyama S , Anan K, Toyoshima S, *et al.* Histopathological Predictors of Axillary Lymph Node Metastases in Patients with Breast Cancer. Breast Cancer, 1999. 6(3): 237-241.

Miyoshi Y, Shien T, Ogiya A, *et al.* Differences in expression of the cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1 among estrogen receptor-positive/human epidermal growth factor receptor type 2-negative breast cancer cases with early, late, and no recurrence. Breast Cancer Res 2016; 18:73.

Moon, R.T., Kohn, A.D., De Ferrari, G.V., and Kaykas, A. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. Nature reviews Genetics 2004; 5: 691-701.

Moore KA , IR Lemischka. Stem cells and their niches. *Science*. 2006; 311(5769): 1880-1885.

Moran, MS, Yang Q, and Haffty BG. The Yale University experience of early-stage invasive lobular carcinoma (ILC) and invasive ductal carcinoma (IDC) treated with breast conservation treatment (BCT): analysis of clinical-pathologic features, long-term outcomes, and molecular expression of COX-2, Bcl-2, and p53 as a function of histology. *The breast journal*. 2009; 15(6): 571-578.

Moreb JS, Baker HV, Chang LJ, *et al.* ALDH isozymes downregulation affects cell growth, cell motility and gene expression in lung cancer cells. *Mol Cancer* 2008; 7:87

Morris GJ, Naidu S, Topham AK, Guiles F, Xu Y, McCue P *et al.* Differences in Breast Carcinoma Characteristics in Newly Diagnosed African–American and Caucasian Patients. *Cancer* 2007 ; 110 : 876- 884.

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

Morrison SJ , Spradling AC, Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*. 2008; 132(4): 598-611.

Mueller MT , PC Hermann, J Witthauer *et al.* Combined targeted treatment to eliminate tumorigenic cancer stem cells in human pancreatic cancer. *Gastroenterology*. 2009; 137(3): 1102-1113.

Mumprecht, V. and Detmar M., Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2009; 13(8): 1405-1416.

## N

Naccarato AG, Viacava P, Vignati S, Fanelli *et al.* Bio-morphological events in the development of the human female mammary gland from fetal age to puberty. *Virchows Archiv*. 2000 ; 436(5) : 431-438.

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

Nalwoga H, Arnes JB, Wabinga H, Akslen LA: Expression of aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) is associated with basal-like markers and features of aggressive tumours in African breast cancer. *Br J Cancer*. 2010, 102 (2): 369-75.

Neumeister V, Agarwal S, Bordeaux J, Camp RL and Rimm DL: In situ identification of putative cancer stem cells by multiplexing ALDH1, CD44, and cytokeratin identifies breast cancer patients with poor prognosis. *Am J Pathol.* 2010; 176: 2131- 2138.

Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The role of overexpressed HER2 in transformation. *Annals of oncology.* 2001; 12(1): S9-S13.

Nielsen, T.O., F.D. Hsu, K. Jensen, *et al.* Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2004. 10(16): p. 5367-74

### O

O'Brien CA , A Pollett, S Gallinger, JE Dick A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature.* 2007; 445: 106-110.

O'Connor TP, Crystal RG. Genetic medicines: treatment strategies for hereditary disorders. *Nature Reviews Genetics.* 2006; 7: 261-276.

O'Reilly EA, Gubbins L, Sharma S, Tully R, Guang MHZ, Weiner-Gorzel K *et al.* The fate of chemoresistance in triple negative breast cancer (TNBC). *BBA Clinical* 2015 ; 257-275.

Ohata H, Ishiguro T, Aihara Y, Sato A, Sakai H, Sekine S *et al.* Induction of the stem-like cell regulator CD44 by Rho kinase inhibition contributes to the maintenance of colon cancer-initiating cells. *Cancer Res* 2012; 72: 5101–5110.

Ohi Y, Umekita Y, Yoshioka T, Souda M, Rai Y, Sagara Y *et al.* Aldehyde dehydrogenase 1 expression predicts poor prognosis in triple-negative breast cancer. *Histopathology* 2011; 59 : 776-780.

Ohlstein B , T Kai, E Decotto, A Spradling, The stem cell niche: theme and variations, - *Current opinion in cell biology.* 2004; 16(6): 693-699.

Olsson H. Tumour biology of a breast cancer at least partly reflects the biology of the tissue/epithelial cell of origin at the time of initiation - a hypothesis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology.* 2000; 74(5): 345-350.

Olsson E, Honeth G, Bendahl PO, Saal LH, Gruvberger-Saal S, Ringnér M, *et al.* CD44 isoforms are heterogeneously expressed in breast cancer and correlate with tumor subtypes and cancer stem cell markers. *BMC Cancer.* 2011; 11:418.

### **P**

Park S, Kim D, Kaneko S, Szewczyk K.M, Nicosia S.V, Yu H, Jove R, Cheng J.Q. Molecular cloning and characterization of the human AKT1 promoter uncovers its up-regulation by the Src/Stat3 pathway. *The Journal of Biological and Chemistry*. 2005; 280(47): 38932-38941.

Park SY, Lee HE, Li H, Shipitsin M, Gelman R and Polyak K: Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 876-887.

Parmar K , P Mauch, JA Vergilio, Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proceedings of the national academy of sciences of the USA*. 2007; 104(13): 5431-5436.

Patani, NR, Dwek MV, and Douek M. Predictors of axillary lymph node metastasis in breast cancer: a systematic review. *European Journal of Surgical Oncology*, 2007. 33(4): 409-419.

Pattabiraman DR , RA Weinberg. Tackling the cancer stem cells—what challenges do they pose?. *Nature reviews Drug discovery*. 2014; 13: 497-512.

Perou CM, Sùrlie T, Eisen MB, Van de Rijn M, Jeffreyk SS, Rees CA, Pollack JR. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000; 406: 747-752.

Ponti, D., Costa, A., Zaffaroni, N., Pratesi, G., Petrangolini, G., Coradini, D., Pilotti, S., Pierotti, M.A., and Daidone, M.G. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res*. 2005; 65: 5506–5511.

Pors K, Moreb JS. Aldehyde dehydrogenases in cancer: an opportunity for biomarker and drug development? *Drug Discov Today*. 2014; 19: 1953-1963.

Porter GJR, Evans AJ, Pinder SE, James JJ, Cornford EC, Burrell HC. Patterns of metastatic breast carcinoma: influence of tumour histological grade. *Clinical Radiology*. 2004; 59(12): 1094-1098.

Pritchard KI, The best use of adjuvant endocrine treatments. *Breast*, 2003 ; 12(6): 497-508.

Purow BW , RM Haque, MW Noel, Q Su, MJ Burdick *et al*. Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation. *Cancer research*. 2005; 65(6).

**Q**

Qi, W., Chen, J., Cheng, X., Huang, J., Xiang, T., Li, Q., Long, H., and Zhu, B. Targeting the Wnt-regulatory protein CTNNBIP1 by microRNA-214 enhances the stemness and self-renewal of cancer stem-like cells in lung adenocarcinomas. *Stem cells*. 2015

Qiu, D., Ye, S., Ruiz, B., Zhou, X., Liu, D., Zhang, Q., and Ying, Q.L.. Klf2 and Tfcp2l1, Two Wnt/beta-Catenin Targets, Act Synergistically to Induce and Maintain Naïve Pluripotency. *Stem cell reports* 2015; 5: 314-322.

**R**

Rakha EA, El-Sayed ME, Lee AHS, Elston CW, Grainge MJ, Hodi Z. *et al.* Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. *Journal of clinical oncology*. 2008; 26(19): 3753-3759.

Rakha, E.A., T.C. Putti, D.M. Abd El-Rehim, *et al.* Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation. *J Pathol*, 2006. 208(4): p. 495-506.

Reya T , SJ Morrison, MF Clarke, IL Weissman. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001; 414:105–111.

Rudzki Z, et S Jothy. CD44 and the adhesion of neoplastic cells. *Molecular Pathology: MP*. 1997; 50 (2): 57-71.

Russo J, Moral R, Balogh GA, Mailo D and, Russo IH. The protective role of pregnancy in breast cancer. *Breast cancer research*. 2005; 7:131.

Russo J, Russo IH. Development of the human breast. *Maturitas*. 2004 ; 49(1) : 2-15.

**S**

Sandhu, R., J. Parker, W. Jones, *et al.* Microarray-based gene expression profiling for molecular classification of breast cancer and identification of new targets for therapy. *Lab med*, 2010; 41: p. 364-372.

Schofield R, The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood cells*. 1978 ; 4(1-2):7-25.

Schwartz, T., Stark, A., Pang, J. *et al.* Expression of aldehyde dehydrogenase 1 as a marker of mammary stem cells in benign and malignant breast lesions of Ghanaian women. *Cancer*. 2013; 119:488–494.

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.

Shackleton, M., Vaillant, F., Simpson, K.J., Stingl, J., Smyth, G.K., Asselin-Labat, M.-L., Wu, L., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature*; 2006; 439, 84–88.

Shafee N, Smith CR, Wei S *et al.* Cancer stem cells contribute to cisplatin resistance in Brca1/p53- mediated mouse mammary tumors. *Cancer Res*; 2008; 68:3243– 3250.

Shah DS, D Wyatt, A Baker, A Green *et al.* A Filipovic Targeting HER2 enriches Jagged1 high cancer stem cells in breast cancer. *Cancer research*. 2017; 77(13).

Shenghui HE , Nakada D, Morrison SJ. Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2009; 25:377-406.

Shipitsin M , K Polyak The cancer stem cell hypothesis: in search of definitions, markers, and relevance. *Laboratory Investigation*. 2008; 88: 459-463.

Shipitsin M, Campbell LL, Argani P, Weremowicz S, Bloushtain-Qimron N, Yao J, Nikolskaya T, Serebryiskaya T, Beroukhim R, *et al.* Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell*. 2007; 11: 259-273.

Siddique H.R, Saleem M. Role of BMI1, a Stem Cell Factor, in Cancer Recurrence and Chemoresistance : Preclinical and Clinical Evidences. *Stem Cell*. 2012; 30(3): 372–378.

Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014; 64 :9-29.

Siller KH ,Doe CQ , Spindle orientation during asymmetric cell division. *Nature cell biology*, 2009; 11: 365-374.

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

Sobin LH , Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours, 7th edition. 2011.

Song L.B, Li J, Liao W.T, Feng Y, Yu C.P, Hu L.J, Kong Q.L, Xu L.H, Zhang X, Liu W.L, Li M.Z *et al.*. The polycomb group protein Bmi-1 represses the tumor suppressor PTEN and induces epithelial-mesenchymal transition in human nasopharyngeal epithelial cells. *The Journal of Clinical Investigation*. 2009; 119(12): 3626-3636.

Sorlie, T., C.M. Perou, R. Tibshirani, *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001; 98(19): 10869-74.

Sotiriou C, Neo SY, McShane LM. *et al.*. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100:10393-10398

Spardling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature*. 2001; 414: 98-104.

Spitale A, Mazzola P, Soldini D, *et al.* Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from the South of Switzerland. *Annals of oncology*. 2009; 20(4): 628-35.

Stern HM, Gardner H, Burzykowski T, Elatre W, O'Brien C, Lackner MR. PTEN Loss Is Associated with Worse Outcome in HER2-Amplified Breast Cancer Patients but Is Not Associated with Trastuzumab Resistance. *Clinical cancer research*. 2015; 21(9).

Stingl, J. Detection and analysis of mammary gland stem cells. *J. Pathol*. 2009; 217: 229–241.

Sugihara E , H Saya, Complexity of cancer stem cells. *International journal of cancer*. 2013; *Int J Cancer* 2013; 132:1249-1259.

### **T**

Takebe N, L Miele, PJ Harris, W Jeong *et al.* Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update. *Nature reviews Clinical*. 2015; 12: 445-464.

Tan EY, Thike AA, Tan PH: ALDH1 expression is enriched in breast cancers arising in young women but does not predict outcome. *Br J Cancer*. 2013, 109 (1): 109-113.

Tanei T, Morimoto K, Shimazu K, Kim SJ, Tanji Y, Taguchi T *et al.* Association of Breast Cancer Stem Cells Identified by Aldehyde Dehydrogenase 1 Expression with Resistance to Sequential Paclitaxel and Epirubicin-Based Chemotherapy for Breast Cancers. *Clinical Cancer Research* 2009; 15(12) : 4234- 4241.

Tavassoli, FA. and P Devilee, *Pathology and Genetics Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. Lyon. IARC Press. 2003.

Thomson JA, J Itskovitz-Eldor, SS Shapiro *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998; 282 (5391): 1145-1147.

Tirino V, V Desiderio, F Paino, A De Rosa, F Papaccio *et al.* Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization. *The FASEB Journal*. 2013; 27(1): 13-24.

Trihia H, Murray S, Price K, Gelber RD, Golouh R, Goldhirsch A, Coates AS, Collins J, Castiglione-Gertsch M, Gusterson BA. Ki-67 expression in breast carcinoma: its association with grading systems, clinical parameters, and other prognostic factors – a surrogate marker? *Cancer*. 2003; (97): 1321–1331

Trumpp A and Wiestler OD: Mechanisms of disease: cancer stem cells–targeting the evil twin. *Nat Clin Pract Oncol* 2008; 5: 337- 347.

### V

Van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., van der Horn, K., Batlle, E., Coudreuse, D., Haramis, A.P., *et al.* The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell*. 2002; 111: 241-250.

Van Keymeulen, A., Rocha, A.S., Ousset, M., Beck, B., Bouvencourt, G., Rock, J., Sharma, N., Dekoninck, S., and Blanpain, C. Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance. *Nature*. 2011; 479: 189–193.

Varga, Z. and Mallon E, Histology and Immunophenotype of Invasive Lobular Breast Cancer. *Daily Practice and Pitfalls. Breast Disease*, 2009. 30: 15-19.

Venugopal, A., Subramaniam, D., Balmaceda, J., Roy, B., Dixon, D.A., Umar, S., Weir, S.J., and Anant, S. RNA binding protein RBM3 increases beta-catenin signaling to increase stem cell characteristics in colorectal cancer cells. *Molecular carcinogenesis*. 2015.

Vermeulen L, De Sousa e Melo F, Richel D.J, Medema J.P. The developing cancer stem-cell model: clinical challenges and opportunities. *The Lancet Oncology*. 2012; 13(2): 83-89.

Villadsen R. In search of a stem cell hierarchy in the human breast and its relevance to breast cancer evolution. *Apmis*, 2005. 113(11-12): 903-921.

Villadsen, R., Fridriksdottir, A.J., Rønnov-Jessen, L., Gudjonsson, T., Rank, F., LaBarge, M.A., Bissell, M.J., and Petersen, O.W. Evidence for a stem cell hierarchy in the adult human breast. *J. Cell Biol*. 2007; 177: 87–101.

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

Visvader, J.E. Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes Dev*. 2009; 23: 2563–2577.

Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S, et al., Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *Journal of Clinical Oncology*, 2010; 28(10): 1684-1691.

Volpi A, Bacci F, Paradiso A, Saragoni L, Scarpi E, Ricci M. Prognostic relevance of histological grade and its components in node-negative breast cancer patients. *Modern pathology*. 2004; 17: 1038-1044.

### W

Wang J , C Wang, Q Meng, S Li, X Sun, Y Bo. siRNA targeting Notch-1 decreases glioma stem cell proliferation and tumor growth. *Molecular biology reports*.2012; 39(3): 2497-2503.

Wang Z, Shi Q, Wang Z *et al*. Clinicopathologic correlation of cancer stem cell markers CD44, CD24, VEGF and HIF-1a in ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of breast: an immunohistochemistry-based pilot study. *Pathol Res Pract* 2011; 207(8):505–513

Weigelt, B., H.M. Horlings, B. Kreike, *et al*. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J Pathol*, 2008; 216(2): 141-150.

Wellings SR. A hypothesis of the origin of human breast cancer from the terminal ductal lobular unit. *Pathology-Research and Practice*. 1980; 166(4) : 515-535.

Werling, R.W., H. Hwang, H. Yaziji, *et al*. Immunohistochemical distinction of invasive from noninvasive breast lesions: a comparative study of p63 versus calponin and smooth muscle myosin heavy chain. *Am J Surg Pathol*, 2003; 27(1): 82-90.

Wiechmann, L., M. Sampson, M. Stempel, *et al*. Presenting features of breast cancer differ by molecular subtype. *Ann Surg Oncol*, 2009; 16(10): 2705-10.

Woodward, W.A., Chen, M.S., Behbod, F., Alfaro, M.P., Buchholz, T.A., and Rosen, J.M. WNT/beta-catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007; 104: 618-623.

Wu, C., and B.A. Alman. Side population cells in human cancers. *Cancer letters*. 2008; 268:1-9.

Wu, S., Wang, X., Chen, J., and Chen, Y. Autophagy of cancer stem cells is involved with chemoresistance of colon cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2013; 434: 898-903.

Wu Y, Sarkissyan M, Elshimali Y, Vadgama JV. Triple negative breast tumors in African-American and Hispanic/Latina women are high in CD44+, low in CD24+, and have loss of PTEN. *PLoS One*. 2013; 8(10):e78259.

### X

Xiao Y, Ye Y, Yearsley K, Jones S and Barsky SH: The lymphovascular embolus of inflammatory breast cancer expresses a stem cell-like phenotype. *Am J Pathol* 2008; 173: 561-574.

Xu H, Tian Y, Yuan X, *et al*. Enrichment of CD44 in basal-type breast cancer correlates with EMT, cancer stem cell gene profile, and prognosis. *Onco Targets Ther* 2016; 9:431–444

### Y

Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2001; 127-137.

### Z

Zagouras P , S Stifani, CM Blaumueller *et al*. Alterations in Notch signaling in neoplastic lesions of the human cervix. *Proceedings of the national academy of sciences of the USA*. 1995; 92(14): 6414-6418.

Zhao C , A Chen, CH Jamieson, M Fereshteh *et al*. Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature*. 2009; 458 : 776–779.

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

Zheng Z, Shao N, Weng H, Li W, Zhang J, Zhang L, Yang L and Ye S. Correlation between epidermal growth factor receptor and tumor stem cell markers CD44/CD24 and their relationship with prognosis in breast invasive ductal carcinoma. *Med Oncol*. 2015; 32:275.

Zhong Y, Shen S, Zhou Y, Mao F, Guan J, Lin Y *et al.* ALDH1 is a better clinical indicator for relapse of invasive ductal breast cancer than the CD44+/CD242 phenotype. *Med Oncol* 2014 ; 31:864 ;1-8.

Zhou L, Li K, Luo Y, Tian L, Wang M, *et al.* Novel prognostic markers for patients with triple-negative breast cancer. *Hum Pathol.* 2013; 44: 2180–2187.

Zhou L., Yu L., Zhu B., Wu S., Song W., Gong X, Wang D., Metastasis-associated in colon cancer-1 and aldehyde dehydrogenase 1 are metastatic and prognostic biomarker for non-small cell lung cancer, *BMC Cancer.* 2016; 16: 876.

Zhu P , Y Wang, Y Du, L He, G Huang, G Zhang *et al.* C8orf4 negatively regulates self-renewal of liver cancer stem cells via suppression of NOTCH2 signalling, *Nature communication.* 2015.

Zhu TS , MA Costello, CE Talsma, CG Flack *et al.* Endothelial cells create a stem cell niche in glioblastoma by providing, NOTCH ligands that nurture self-renewal of cancer stem-like cells. *Cancer research.* 2011; 71(18).