

**TLEMCCEN**  
**N° d'Ordre**



***UNIVERSITÉ DE TLEMCCEN – ABOU-BEKRBELKAÏD***

***FACULTÉ SNV-STU – DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE***

**LABORATOIRE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE APPLIQUEE ET IMMUNOLOGIE - BIOMOLIM**

***THÈSE***

présentée pour l'obtention du diplôme de

**Doctorat 3<sup>ème</sup> Cycle LMD en Biologie**

**Spécialité Immunologie Appliquée**

par :

**Zoheir DAHMANI**

**Soutenue publiquement le 14 Février 2022**

***Intitulé :***

---

**Biomarqueurs de l'activité antitumorale des monocytes en interaction avec les cellules primaires autologues du cancer du sein après traitement par la metformine**

---

**Jury :**

<b>Pr. BOUCHERIT OTMANI Zahia</b>	Université de Tlemcen, Algérie	Présidente
<b>Pr. KLOUCHE Lynda</b>	Université de Sidi-Bel-Abbès, Algérie	Directrice de Thèse
<b>Pr. ARIBI Mourad</b>	Université de Tlemcen, Algérie	Co-Directeur de Thèse
<b>Pr. MERAD Ilham</b>	Université de Tlemcen, Algérie	Examinatrice
<b>Pr. TOUIL-BOUKOFFA Chafia</b>	USTHB d'Alger, Algérie	Examinatrice
<b>Dr. MENNECHET Franck</b>	Université de Montpellier, France	Examinateur

14 Février 2022

TLEMCCEN  
N° d'Ordre



*UNIVERSITÉ DE TLEMCCEN – ABOU-BEKRBELKAÏD*

*FACULTÉ SNV-STU – DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE*

**LABORATOIRE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE APPLIQUEE ET IMMUNOLOGIE - BIOMOLIM**

***THÈSE***

présentée pour l'obtention du diplôme de

**Doctorat 3<sup>ème</sup> Cycle LMD en Biologie**

**Spécialité Immunologie Appliquée**

par :

**Zoheir DAHMANI**

**Soutenue publiquement le 14 Février 2022**

***Intitulé :***

---

**Biomarqueurs de l'activité antitumorale des monocytes en interaction avec les cellules primaires autologues du cancer du sein après traitement par la metformine**

---

**Jury :**

<b>Pr. BOUCHERIT OTMANI Zahia</b>	Université de Tlemcen, Algérie	Présidente
<b>Pr. KLOUCHE Lynda</b>	Université de Sidi-Bel-Abbès, Algérie	Directrice de Thèse
<b>Pr. ARIBI Mourad</b>	Université de Tlemcen, Algérie	Co-Directeur de Thèse
<b>Pr. MERAD Ilham</b>	Université de Tlemcen, Algérie	Examinatrice
<b>Pr. TOUIL-BOUKOFFA Chafia</b>	USTHB d'Alger, Algérie	Examinatrice
<b>Dr. MENNECHET Franck</b>	Université de Montpellier, France	Examinateur

14 Février 2022

**Résumé**

**Introduction :** Les activités immunitaires des monocytes (MOs) peuvent être modifiées dans le microenvironnement des tumeurs malignes solides, y compris le cancer du sein. Il a été démontré que la metformine (1,1-diméthylbiguanide hydrochloride, MET) diminue la prolifération des cellules tumorales, mais ses effets doivent encore être explorés en ce qui concerne les activités des MOs lors de leur interaction avec les cellules cancéreuses du sein. Nous avons évalué les effets de la MET sur les activités fonctionnelles phénotypiques globales des MOs autologues avant et pendant leur interaction avec les cellules primaires du cancer du sein (ER-/PR-/HER2+).

**Matériels et méthodes :** Des cellules de cancer du sein primaires obtenues à partir de biopsies humaines ont été cultivées seules ou co-cultivées avec des MOs autologues dans un milieu de culture supplémenté ou non avec de la MET. Différents biomarqueurs des activités fonctionnelles phénotypiques des MOs avant et pendant leur interaction avec les cellules primaires du cancer du sein ER-/PR-/HER2+ ont été mesurés.

**Résultats:** La MET a diminué la prolifération des cellules cancéreuses du sein ainsi que la phagocytose, alors qu'elle n'avait aucun effet significatif sur le rapport de Akt phosphorylé (p-Akt)/Akt total ( $p > 0,05$ ). De plus, nous avons observé qu'en absence de traitement par la MET, les niveaux de cytotoxicité à base de lactate déshydrogénase (LDH), d' $_{if}Ca^{2+}$ , d'IL-10 ainsi que les activités de catalase et d'arginase étaient significativement réduits dans les co-cultures par rapport à ceux des MOs cultivés seuls, tandis que les niveaux d'activité de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) étaient significativement augmentés (pour toutes les comparaisons,  $p < 0,05$ ). En revanche, le traitement par la MET pourrait inverser les effets de la co-culture sur les niveaux de cytotoxicité à base de la LDH, d' $_{if}Ca^{2+}$ , d'IFN- $\gamma$  et les activités de l'arginase et de catalase. La MET a également induit une augmentation des activités d'iNOS et d'arginase dans les MOs, bien que les différences n'étaient pas significatives pour l'activité d'iNOS ( $p > 0,05$ ). De plus, la MET a induit une forte augmentation de l'activité du superoxyde dismutase (SOD) dans les MOs, mais pas dans les MOs co-cultivées avec des cellules cancéreuses du sein. En outre, la MET a induit une forte augmentation des niveaux de production d'IFN- $\gamma$  et une diminution de ceux de l'IL-10 dans les MOs isolés, tout en induisant un léger effet d'inversion sur la production d'IL-10 dans les co-cultures ( $p > 0,05$ ).

**Conclusion :** Nos résultats montrent que les biomarqueurs des activités fonctionnelles phénotypiques des MOs changent après la co-culture avec des cellules primaires de cancer du sein. Ainsi, le traitement avec la MET pourrait améliorer les effets sur la production d'IFN- $\gamma$  (cytokine anti-tumorale) et d' $_{if}Ca^{2+}$ , ainsi que sur l'induction de la nécrose cellulaire lors de l'interaction cellules cancéreuses du sein-MOs.

**Mots clés:** activation d'Akt; metformine; interaction monocyte/cellule du cancer du sein humain primaire; modifications de l'activité fonctionnelle phénotypique des monocytes; prolifération et viabilité de cellule du cancer du sein primaire; Activité anti-tumorale des monocytes associée à l'IFN- $\gamma$ .

**Abstract**

**Background:** Immune activities of monocytes (MOs) can be altered within the microenvironment of solid malignancies, including breast cancer. Metformin (1,1-dimethylbiguanide hydrochloride, MET), has been shown to decrease tumor cell proliferation, but its effects have yet to be explored with respect to the MOs (monocytes) activities during their crosstalk with breast cancer cells. Here, we investigated the effects of MET on overall phenotypic functional activities, including cellular immunometabolism and protective redox signaling based-biomarkers, intracellular free calcium ions ( $_{i}Ca^{2+}$ ), phagocytosis and cooperative cytokines (IFN- $\gamma$  and IL-10) of autologous MOs before and during their interplay with primary breast cancer cells (ER $^{-}$ /PR $^{-}$ /HER2 $^{+}$ ).

**Methods:** Human primary breast cancer cells were either cultured alone or co-cultured with autologous MOs before treatment with MET.

**Results:** MET downregulated breast cancer cell proliferation and phagocytosis, while had no significant effect on the ratio of phosphorylated Akt (p-Akt)-to-total Akt ( $p > 0.05$ ). Additionally, we observed that, in the absence of MET treatment, the levels of lactate dehydrogenase (LDH)-based cytotoxicity, catalase,  $_{i}Ca^{2+}$ , IL-10 and arginase activity were significantly reduced in co-cultures compared to those of MOs cultivated alone whereas levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity were significantly increased (for all comparisons,  $p < 0.05$ ). In contrast, MET treatment might reverse the co-culture effects on the levels of LDH-based cytotoxicity, arginase activity, catalase,  $_{i}Ca^{2+}$ , and IFN- $\gamma$ . MET also induced upregulation of both iNOS and arginase activities in MO cells, although the differences did not reach significant levels for iNOS activity ( $p > 0.05$ ). Moreover, MET induced a robust increase of superoxide dismutase (SOD) activity in MOs, but not in MOs co-cultured with breast cancer cells. Furthermore, MET markedly upregulated the levels of IFN- $\gamma$  production and downregulated those of IL-10 in isolated MOs, while inducing a slight reversing effect on IL-10 production in co-cultures ( $p > 0.05$ ).

**Conclusions:** Our results show that the biomarkers of phenotypic functional activities of MOs change after co-culturing with primary human breast cancer cells. So, treatment with MET might ameliorate effects on the production of antitumor cytokine IFN- $\gamma$  and  $_{i}Ca^{2+}$ , as well as cell necrosis during breast cancer cells-MOs crosstalk.

**Keywords:** Akt activation; metformin; monocyte/primary human breast cancer cell crosstalk; monocyte phenotypic functional activity changes; primary breast cancer cell proliferation and viability; MO IFN- $\gamma$ -associated anti-tumor activity.

## ملخص

**مقدمة:** الأنشطة المناعية للخلايا الأحادية يمكن لها أن تتغير في البيئة المكروية للأورام الخبيثة الصلبة، بما في ذلك سرطان الثدي. ثبت أن المتفورمين يقلل من تكاثر الخلايا السرطانية، ولكن لم يتم استكشاف آثاره بعد فيما يتعلق بأنشطة الخلية الأحادية أثناء تفاعلها مع خلايا سرطان الثدي. لقد بحثنا في تأثيرات المتفورمين على الأنشطة الوظيفية الشاملة للنمط الظاهري، بما في ذلك الاستقلاب المناعي الخلوي والمؤشرات الحيوية القائمة على إشارات الأكسدة والاختزال الواقية، أيونات الكالسيوم داخل الخلايا ( $Ca^{2+}$ )، البلمعة، والسيتوكينات التعاونية ( $IFN-\gamma$  و  $IL-10$ ) للخلايا الأحادية ذاتية المنشأ قبل وأثناء تفاعلها مع خلايا سرطان الثدي الأولية (ER-/PR-/HER2+).

**الوسائل و الطرق:** تمت زراعة خلايا سرطان الثدي البشرية الأولية بمفردها أو مع الخلايا الأحادية ذاتية المنشأ قبل العلاج بالمتفورمين.

**النتائج:** قلل المتفورمين من تكاثر خلايا سرطان الثدي والبلمعة، بينما لم يكن له تأثير كبير على نسبة الفسفرة Akt/p-Akt الإجمالي ( $p > 0.05$ ). بالإضافة إلى ذلك، لاحظنا أنه في حالة عدم وجود علاج ب-MET، انخفضت مستويات كل من السمية الخلوية، نشاط الكاتالاز (catalase)،  $Ca^{2+}$ ،  $IL-10$ ، نشاط الأرجيناز (arginase) في الخلايا المشتركة مقارنة مع الخلايا الأحادية المزروعة بمفردها. بينما زادت مستويات نشاط سينتاز أكسيد النيتريك المحرض (iNOS) بشكل كبير ( $p < 0.05$ ، لجميع المقارنات). في المقابل، يمكن أن يعكس العلاج باستخدام المتفورمين آثار الخلايا المشتركة على مستويات السمية الخلوية، نشاط الأرجيناز، نشاط الكاتالاز،  $Ca^{2+}$  و  $IFN-\gamma$ . تسبب المتفورمين أيضاً في زيادة أنشطة iNOS و arginase في الخلايا الأحادية، على الرغم من أن الاختلافات لم تكن كبيرة بالنسبة لنشاط الـ iNOS ( $p > 0.05$ ). بالإضافة إلى ذلك، تسبب MET في زيادة قوية في نشاط الديسموتاز الفائق (SOD) في الخلايا الأحادية، ولكن ليس في تلك المزروعة بالاشتراك مع خلايا سرطان الثدي. تسبب MET أيضاً في زيادة حادة في مستويات إنتاج  $IFN-\gamma$  وانخفاض مستويات إنتاج  $IL-10$  في الخلايا الأحادية المعزولة، مع إحداث تأثير انعكاس طفيف على إنتاج  $IL-10$  في الثقافة المشتركة ( $p > 0.05$ ).

**الاستنتاجات:** أظهرت نتائجنا أن المؤشرات الحيوية للأنشطة الوظيفية النمطية للخلايا الأحادية تتغير بعد الزراعة المشتركة مع خلايا سرطان الثدي البشرية الأولية. يؤدي العلاج باستخدام MET إلى تحسين التأثيرات على إنتاج السيتوكين المضاد للورم  $IFN-\gamma$  و  $Ca^{2+}$ ، بالإضافة إلى النخر الخلوي أثناء التبادل المشترك بين الخلايا الأحادية وخلايا سرطان الثدي.

**الكلمات المفتاحية:** تنشيط Akt، مينفورمين، الحديد المتبادل الخلية الوحيدة/خلايا سرطان الثدي البشرية الأولية، تغييرات النشاط الوظيفي للنمط الظاهري للخلية الأحادية؛ تكاثر و حيوية خلايا سرطان الثدي الأولية، نشاط مضاد للورم مرتبط ب- $IFN-\gamma$ .

## Avant-propos

Ce travail de thèse a été réalisé au niveau du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie (BIOMOLIM) Université de Tlemcen, sous la direction de Madame le Professeur Lynda KLOUCHE et la co-direction de Monsieur le Professeur Mourad ARIBI.

Je remercie Madame le Professeur Lynda KLOUCHE ma directrice de thèse pour tous ses précieux conseils qui m'ont été très utiles et m'ont permis d'avancer tout au long de ces années de travail, à ses côtés, j'ai pu approfondir mes connaissances dans le domaine de la biologie tumorale et de l'oncologie moléculaire.

Je tiens à remercier, également, Monsieur le Professeur Mourad ARIBI de toute l'aide et assistance qu'il m'a procurées pendant toutes ces années de travail. J'ai beaucoup appris dans le domaine de l'immunologie et ses précieux conseils m'ont guidé.

Je remercie Monsieur le Professeur Gérard LEFRANC pour toute son aide lors de mon séjour à Montpellier, Monsieur le Dr. Ned LAMB et Madame le Dr. Anne FERNANDEZ de m'avoir accueilli au sein de leur équipe dans un climat très favorable et amical lors de mon stage, Madame le Dr. Florence GEZARD pour ses conseils et son amitié.

Je remercie également tous les membres de mon jury. Je remercie Madame le Professeur BOUCHERIT OTMANI Zahia d'avoir accepté de présider ce jury de thèse. Mes remerciements vont également aux Pr. MERAD Ilham, Pr. TOUIL-BOUKOFFA Chafia et le Dr. **MENNECHET Franck** d'avoir accepté d'examiner ce travail de thèse.

J'aimerais aussi remercier toute l'équipe du Laboratoire du Pr. Mourad ARIBI et plus particulièrement: Sara DAHOU, Aida MESSAOUD, Wafa NOUARI, Maroua MILIANI, Nihel Chahinez DJEBRI, Rabia MESSALI, Zineb HADJIDJ, Warda MEZIANE, Iméne BELHASSENA, Ahlem FATMI, Hafsa AZAOUI, Zeyneb MEKKAOUI, Mouna NOUAR, Lamia ISMAIL-DAHLOUK, Manel GHERNOUG, ainsi que les mastérants Mahmoud Idris BENAISSTI, Meriem MOSTEFAOUI, Hadjer TERBECHE.

**Dédicaces**

Je remercie Allah de tous ses bienfaits.

Avec l'aide de Dieu tout puissant, j'ai pu achever cette thèse que je dédie :

A ma grand-mère Hadja Yamna, ma mère, mon père toujours présents à mes côtés, mon frère Mohamed Driouche pour son soutien tout le long de mes études, ma sœur Wafâa pour ses encouragements, son mari Abderrezak et leur petit ange Mohammed, mes oncles et mes tantes, mes cousins et mes cousines, à toute la famille.

A mes amis Hocine, Samir, Mohamed DEROUICHE, Kada, Djamel, Imed, Zakaria, Abdelhaq, Hocine ZIDOURI, Mohamed HAMOUMI, Youcef, Mohamed DAHMANI, Omar, Rabih.

Zoheir DAHMANI

## TABLE DES MATIÈRES

Résumé	Iii
Abstract	Iv
Résumé en arabe	V
Avant-propos	Vi
Table des matières	Vii
Liste des Figures	X
Liste des Tableaux	Xi
Liste des Abréviations	Xii
Introduction	1
<b>Chapitre 1 : Revue de la littérature</b>	
<b>1.1. Cancer du sein</b>	3
1.1.1. Epidémiologie	3
1.1.2. Classification du cancer du sein	3
1.1.2.1. Classification conventionnelle	3
1.1.2.1.1. Les types histologiques	3
1.1.2.1.2. Le grade histologique	4
1.1.2.1.3. Stades du cancer du sein	5
1.1.2.2. Classification moléculaire	5
1.1.2.2.1. Les tumeurs de sous-type Luminal-A	6
1.1.2.2.2. Les tumeurs de sous-type Luminal-B	7
1.1.2.2.3. Les tumeurs HER2/ <i>neu</i>	7
1.1.2.2.4. Le sous-type <i>basal-like</i>	7
1.1.2.2.5. Les tumeurs de sous-type <i>normal-like</i>	7
1.1.2.2.6. Les tumeurs <i>claudin-low</i>	8
1.1.3. Les différents traitements du cancer du sein	8
1.1.3.1. La chirurgie	8
1.1.3.2. La chimiothérapie	8
1.1.3.3. La radiothérapie	9
1.1.3.4. L'hormonothérapie	9



1.1.3.5. L'immunothérapie	9
1.1.3.6. Les thérapies ciblées	10
1.1.4. Immunogénicité du cancer du sein	10
<b>1.2. Immunoédition du cancer du sein</b>	<b>11</b>
1.2.1. Phase d'élimination	12
1.2.2. Phase d'équilibre	13
1.2.3. Phase d'échappement	14
1.2.3.1. Une reconnaissance immunitaire réduite	15
1.2.3.1.1. Types d'antigènes associés aux tumeurs	15
1.2.3.1.2. Expression anormale du CMH-1	16
1.2.3.1.3. Une surexpression des HLA-1 non-classiques	16
1.2.3.2. Perturbation de la fonction anti-apoptotique	16
1.2.3.2.1. Fas/Fas-L	16
1.2.3.2.2. Bcl-2, survivine et caspase	17
1.2.3.3. Etablissement d'un microenvironnement tumoral immunosuppresseur	17
1.2.3.3.1. Production des cytokines immunosuppressives et des facteurs métaboliques	17
1.2.3.3.2. Expression des molécules co-inhibitrices	17
1.2.3.3.3. Recrutement des cellules immunosuppressives	18
<b>1.3. Monocytes et cancer du sein</b>	<b>19</b>
1.3.1. Développement et ontogénie des monocytes	19
1.3.2. Hétérogénéité des monocytes	20
1.3.2.1. Les monocytes classiques	21
1.3.2.2. Les monocytes intermédiaires	21
1.3.2.3. Les monocytes non classiques	22
1.3.3. Monocytes et microenvironnement tumoral	22
1.3.3.1. Recrutement des monocytes au site de la tumeur	22
1.3.3.2. Fonctions des monocytes dans le microenvironnement tumoral	22
1.3.3.2.1. Fonctions anti-tumorales	23
1.3.3.2.2. Fonctions pro-tumorales	24
1.3.3.2.3. Recrutement des lymphocytes	24
1.3.3.2.4. Différenciation des monocytes en macrophages et CD associés aux tumeurs	24

<b>1.4. Metformine</b>	25
1.4.1. Metformine comme médicament antidiabétique	25
1.4.2. Liens entre le cancer du sein et le diabète de type 2	26
1.4.3. Metformine et cancer du sein	27
1.4.4. Mécanismes antinéoplasiques de la metformine	28
1.4.4.1. Effets indirects	28
1.4.4.2. Effets directs sur les cellules cancéreuses	29
1.4.4.2.1. Mécanismes d'action dépendants de l'AMPK	29
1.4.4.2.1.1. Effet sur le métabolisme	29
1.4.4.2.1.2. Inhibition du cycle cellulaire	30
1.4.4.2.1.3. Inhibition de l'angiogenèse	30
1.4.4.2.1.4. Effet sur l'inflammation et l'immunité	30
1.4.4.2.2. Mécanismes d'action indépendants de l'AMPK	31
<b>1.5. Problématique et objectifs</b>	32
1.5.1. Problématique	32
1.5.2. Objectifs	32
1.5.3. But	32
<b>Chapitre 2 : La metformine inverse partiellement l'effet inhibiteur de la co-culture des cellules cancéreuses du sein ER-/ PR-/HER2+ sur les biomarqueurs de l'activité antitumorale des monocytes</b>	
<b>2.1. Matériels et méthodes</b>	35
2.1.1. Conception de l'étude	35
2.1.2. Echantillons cellulaires	36
2.1.3. Isolement des cellules adhérentes épithéliales tumorales du sein	36
2.1.4. Culture cellulaire	37
2.1.5. Isolement des cellules mononucléées du sang périphérique	37
2.1.6. Isolement des monocytes	37
2.1.7. Culture cellulaire et systèmes de co-culture	38
2.1.8. Traitement cellulaire par la metformine	38
2.1.9. Test de viabilité cellulaire	38
2.1.10. Test de prolifération cellulaire	38

2.1.11. Analyse par <i>Western blotting</i>	39
2.1.12. Essai de la phagocytose	39
2.1.13. Détermination de l'activité de l'arginase	40
2.1.14. Détermination de l'activité d'iNOS	40
2.1.15. Evaluation de la nécrose cellulaire	40
2.1.16. Signalisation calcique : mesure du niveau des ions calcium divalents libres	41
2.1.17. Mesure des taux des cytokines relâchées	41
2.1.18. Evaluation de l'activité protectrice redox	41
2.1.18.1. Détermination de l'activité de catalase	41
2.1.18.2. Détermination de l'activité de SOD	41
2.1.19. Analyses statistiques	42
<b>2.2. Résultats</b>	43
2.2.1. Effets de la MET sur les cellules individuelles dans les systèmes de monoculture	43
2.2.1.1. Effet de la MET sur la viabilité, la prolifération et le rapport Akt1/2 phosphorylé/Akt1/2 total des cellules cancéreuses du sein	43
2.2.1.2. Effet de la MET sur l'activité phagocytaire des MOs	44
2.2.2. Effets de la MET sur les MOs dans les systèmes de monoculture et de co-culture	44
2.2.2.1. Effet de la MET sur les niveaux de cytotoxicité à base de LDH	44
2.2.2.2. Effet de la MET sur les activités iNOS et arginase	45
2.2.2.3. Effet de la MET sur les activités de catalase et de SOD	46
2.2.2.4. Effet de la MET sur les niveaux les ions calcium divalents libres	46
2.2.2.5. Effet de la MET sur la production d'IFN- $\gamma$ et d'IL-10	47
<b>2.3. Discussion</b>	49
<b>Chapitre 3 : Conclusions et perspectives</b>	55
<b>Chapitre 4 : Bibliographie</b>	57
<b>Annexe</b>	

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.1.</b> Classification histologique des sous-types de cancer du sein	4
<b>Figure 1.2.</b> Classification moléculaire du cancer du sein	6
<b>Figure 1.3.</b> Immunoédition du cancer	11
<b>Figure 1.4.</b> Phase d'élimination d'immunoédition du cancer	13
<b>Figure 1.5.</b> Phase d'équilibre d'immunoédition du cancer	14
<b>Figure 1.6.</b> Différents mécanismes d'échappement des cellules cancéreuses	15
<b>Figure 1.7.</b> Interaction entre les composants du microenvironnement tumoral et les cellules cancéreuses du sein.	18
<b>Figure 1.8.</b> Origine des monocytes	20
<b>Figure 1.9.</b> Recrutement et fonctions des sous-types de monocytes dans les tumeurs primaires et les sites métastatiques	23
<b>Figure 1.10.</b> Mécanismes moléculaires potentiels de l'action de la metformine sur la gluconéogenèse hépatique	26
<b>Figure 1.11.</b> Liens entre le cancer et le diabète de type 2	27
<b>Figure 1.12.</b> Les activités anti-tumorales de la metformine	28
<b>Figure 2.1.</b> Organigramme de l'étude	35
<b>Figure 2.2.</b> Effet de la MET sur la prolifération, la viabilité, le rapport Akt phosphorylé/Akt total des cellules cancéreuses du sein et la capacité phagocytaire des MOs	43
<b>Figure 2.3.</b> Effet cytotoxique de la MET sur les MOs et le système de co-culture.	44
<b>Figure 2.4.</b> Effet de la MET sur les activités iNOS et arginase dans les MOs et le système de co-culture	45
<b>Figure 2.5.</b> Effet de la MET sur les activités de catalase et de SOD dans les MOs et le système de co-culture	46
<b>Figure 2.6.</b> Effet du MET sur les niveaux d' $Ca^{2+}$ dans les MOs et le système de co-culture	47
<b>Figure 2.7.</b> Effet de la MET sur la production d'IL-10 et d'IFN- $\gamma$ dans les MO et le système de co-culture	48

**LISTE DES TABLEAUX**

<b>Tableau 1.1. Classification TNM des cancers du sein</b>	<b>5</b>
<b>Tableau 1.2. Les sous-types des monocytes humains</b>	<b>21</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

**A**

ACC : acétyl-CoA carboxylase

ADCC : cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps

ADN: acide désoxyribonucléique

AGE : produits finaux de glycation avancée

AI : inhibiteurs de l'aromatase

Akt : protéine kinase B, PKB

AMP : adénosine monophosphate

AMPK : *AMP-activated protein kinase*

ANOVA : analyse de la variance unidirectionnelle

ARG : arginase

ARN: acide ribonucléique

ATP : adénosine triphosphate

**B**

Bcl-2 : *B-cell Lymphoma 2*

BrdU : bromodeoxyuridine [5-bromo-2'-deoxyuridine]

BSA : *bovine serum albumin*

**C**

CCIS : carcinome canalaire in situ

CCL : *CC-chemokine ligand*

CCNE1 : la cycline E1

CCR: les récepteurs aux chimiokines CC

CD: *clusters of differentiation*

CDH1: la cadhérine 1

CDP : progéniteurs communs de cellules dendritiques

CD62L : L-sélectine

CEA : antigène carcinoembryonnaire

CK : cytokératines

c-kit : *proto-oncogene receptor tyrosine kinase*

CLDN : claudine

CLIS : carcinome lobulaire in situ

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

cMoP : progéniteur commun monocytaire

CMP : progéniteur commun myéloïde

c-myc : *proto-oncogene, bHLH transcription factor*

COX : la Cyclooxygénase

CPA : cellules présentatrices d'antigènes

CSF : facteur de stimulation des colonies

CSH : cellules souches hématopoïétique

CTLA-4 : *T-lymphocyte antigen 4*

CX3CR1 : récepteur 1 de chimiokine CX3C

CXCL: *chemokine (C-X-C motif) ligand*

## **D**

DC: cellules dendritiques

DO : densité optique

DT2 : diabète de type 2

DTT : dithiothréitol

## **E**

EDTA : acide éthylènediamine tétraacétique

EGFR : récepteur du facteur de croissance épidermique

ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*

ER : récepteurs d'œstrogène

*ERBB2: erb-b2 receptor tyrosine kinase 2*

**F**

FAS : acide gras synthase

Fas-L : le ligand de Fas

Fc $\gamma$ RIII : récepteur de faible affinité de la partie constante des immunoglobulines IgG

FCS : sérum de veau fœtal

FOXA1: *forkhead box protein A1*

**G**

GATA3: *trans-acting T-cell-specific transcription factor*

G3PDH: glycérol-3-phosphate déshydrogénase

G6Pase: glucose 6 phosphatase

G-CSF: *granulocyte colony-stimulating factor*

GGH: *gamma glutamyl hydrolase*

GnRH : hormone de libération des gonadotrophines

GMP : progéniteurs de granulocytes-macrophages

**H**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène

HER2 : *human epidermal growth receptor 2*

HK2 : hékokinase 2

HLA : *human Leucocyte Antigen*

HMG-CoA : hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A réductase

HRP : peroxydase de raifort

HSC : cellules souches hématopoiétiques

HSPs : *heat-shock proteins*

hTERT : *human telomerase reverse transcriptase*

**I**

IDO : l'indoleamine 2,3-dioxygénase



$_{if}Ca^{2+}$  : ions calcium libres intracellulaires

IFN : interféron

Ig : immunoglobuline

IGF-1 : facteur de croissance 1 ressemblant à l'insuline (*Insulin-like growth factor-1*)

IL : interleukine

ILT : *Ig-Like Transcript*

iNOS : oxyde nitrique synthase inductible

IR: récepteur d'insuline

IRF (8): *interferon regulatory factor 8*

## K

Ki67 : *proliferating cell nuclear antigen*

KIR2DL4: *killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL4*

KLF4 : *kruppel-like factor 4*

## L

LAG3 : *lymphocyte activation gene-3*

LB : lymphocytes B

LDH : lactate déshydrogénase

LFA-1 : antigène 1 associé aux fonctions lymphocytaires

LKB-1 : protéine hépatique kinase B1

LTC : lymphocytes T cytotoxiques

## M

MAP3K1: *mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1*

MCP-1 : *monocyte chemoattractant protein-1*

M-CSF : facteur stimulant les colonies de macrophages

MDP : progéniteurs commun des macrophages et des cellules dendritiques

MDSC: les cellules myéloïdes suppressives

MDM2 : *mouse double minute 2 homolog*

MET : metformine

miARNs : microARNs

MMP : la métalloprotéinase matricielle

moDC : cellules dendritiques dérivées de monocytes

MOI : *multiplicity of infection*

moM1 : monocytes inflammatoires classiques

moM2 : monocytes intermédiaires

moM3 : monocytes non classiques en patrouille

MOs : monocytes

mTOR : cible de la rapamycine chez les mammifères (*mammalian target of rapamycin*)

MTT : 3-(4,5-Diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium

MUC1 : mucine 1

## N

NAD : nicotinamide adénine dinucléotide

NADH : hydrure de nicotinamide adénine dinucléotide

NaNO<sub>2</sub> : nitrite de sodium

NF-κB : facteur nucléaire kappa B

NK : cellules tueuses naturelles

NKT : cellules T tueuses naturelles

NO : oxyde nitrique

NO<sub>2</sub><sup>-</sup> : nitrite

NOS : oxyde nitrique synthase

NSEP1: *nuclease sensitive element binding protein 1*

## O

O<sub>2</sub><sup>-</sup> : superoxyde

O<sub>2</sub>: dioxygène

oCPC: orthocrésolphtaléine complexone

**P**

p53: *tumor protein 53*

PAI-1: *plasmino-gen activator inhibitor-1*

p-Akt: Akt phosphorylé

PBMC : cellules mononucléées du sang périphérique (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

PBS : *phosphate saline buffer*

PC : pyruvate carboxylase

PD- L1: *programmed cell death 1 ligand 1*

PD-1 : *programmed death receptor 1*

PE : *phycoErytherin*

PEPCK : phosphoénolpyruvate carboxykinase

PGE2: prostaglandine E2

PI3K : phosphoinositide 3-Kinase

PI3K: phosphoinositol-3-kinase

PIK3CA: *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha*

PR : récepteurs progestérone

PU.1 : *purine-rich box-1*

**R**

RAGE : récepteur de produits finaux de glycation avancée

PARP: poly-ADP-ribosyl polymérase

RNI : intermédiaires réactifs de l'azote

RNS : espèces réactives d'azote

ROI : intermédiaires réactifs d'oxygène

ROS : espèces réactives d'oxygène

**S**

SDS : dodécyl-sulfate de sodium

SDS-PAGE : gel de polyacrylamide dodécyl-sulfate de sodium

SEM : erreurs standard de la moyenne

Ser : sérine

SOD : superoxyde dismutase

STAT : *signal Transducers and Activators of Transcription*

## **T**

TAM : macrophage associé aux tumeurs

TBET : test d'exclusion du bleu Trypan (*Trypan Blue Exclusion Test*)

TDF : *tumor derived factors*

TEK: *tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains*

TEM : monocytes exprimant le TIE-2

TGF- $\beta$  : facteur de croissance transformant  $\beta$

Th : cellules T auxiliaires

TIE-2 : *tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains*

TIL : lymphocytes infiltrant la tumeur

TIM-3 : *T cell immunoglobulin and mucin domain-3*

TiOSO4 : titanyle

TLR : récepteur de type Toll (*Toll-Like Receptor*)

TMB : tétraméthylbenzidine

TNF : les facteurs de nécrose tumorale (*tumor necrosis factors*)

TRAIL : *tumor necrosis factor [TNF]-related apoptosis-inducing ligand*

Treg : cellules T régulatrices

## **U**

UFC : unités formant des colonies

## **V**

VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

v-MYB: *avian myeloblastosis viral oncogene homolog*

**W**

WST-1: 2-(4-Iodophényl)-3-(4-nitrophényl)-5-(2,4-disulfophényl)-2H-tétrazolium, sel monosodique

WT1 : *wilms tumour gene*

### Introduction

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué et l'une des principales causes de mortalité dans le monde (Ghoncheh *et al.*, 2016). Comparé à d'autres types de cancer considérés comme plus réactifs à l'immunothérapie, le cancer du sein n'a pas été considéré comme une tumeur immunogène (Soliman, 2013). Cependant, des recherches récentes ont montré la relation entre les réponses immunitaires intra-tumorales et le développement du cancer du sein (Gingras *et al.*, 2015). Ainsi, des études ont rapporté que l'infiltration de cellules immunitaires dans le microenvironnement tumoral et la présence de signatures génétiques liées à l'immunité contribuent au pronostic du cancer du sein (Sabatier *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2017).

Le microenvironnement entourant les cellules cancéreuses du sein joue un rôle important dans la modulation de la croissance et de la progression du cancer (Gingras *et al.*, 2015). Il contient plusieurs types de cellules inflammatoires, y compris les MOs et les macrophages. Les MOs représentent une population hétérogène dérivée des lignées myéloïdes (Doseff and Parihar, 2012), qui sont recrutées de la circulation sanguine vers le site tumoral suite à l'action paracrine des cytokines et des chimiokines libérées par les cellules cancéreuses du sein (Ben-Baruch, 2002). Des rapports antérieurs suggéraient que l'infiltration des MOs dans les microenvironnements de tumeurs du sein, en réponse à une stimulation paracrine, était en corrélation avec un mauvais pronostic et à la promotion de la croissance tumorale, l'invasion et les métastases (Evani *et al.*, 2013; Mohamed *et al.*, 2010).

Selon leur plasticité phénotypique fonctionnelle, les MOs peuvent être ciblés par plusieurs molécules thérapeutiques qui les orientent vers des cellules tueuses pro-inflammatoires/anti-tumorales (Chiang *et al.*, 2017a; Stout and Suttles, 2004), qui sont principalement impliquées dans la réponse inflammatoire, ayant ainsi une capacité phagocytaire réduite (Idzkowska *et al.*, 2015). Dans le contexte du cancer, ces cellules exercent leurs effets inhibiteurs par la production accrue de cytokines pro-inflammatoires, comme l'IFN- $\gamma$ , la sécrétion de médiateurs tumoricides, des espèces réactives d'oxygène (ROS) et d'azote (RNS), y compris la production d'oxyde nitrique (NO) comme produit d'activation de NOS (Oxyde nitrique synthase) (Szaflarska *et al.*, 2004).

Il est bien connu que l'insuline est un facteur de croissance important, qui joue un rôle critique dans la régulation de la prolifération cellulaire. En tant que telle, l'amélioration de la sensibilité à l'insuline peut entraîner une inhibition de la croissance tumorale et un arrêt du

## Introduction

---

cycle cellulaire. En effet, la metformine (chlorhydrate de 1,1-diméthylbiguanide, MET), un médicament antidiabétique prescrit aux patients atteints de diabète de type 2 (DT2) (Fan *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2011), aurait un effet marqué sur la sensibilité à l'insuline par inhibition de la voie de signalisation impliquant le phosphoinositol-3-kinase (PI3K) et Akt (également appelée protéine kinase B, PKB), conduisant, par conséquent, à une diminution de la prolifération des cellules tumorales (Camacho *et al.*, 2015; Queiroz *et al.*, 2014). Les effets de la MET sur les cellules cancéreuses du sein ont également été associés à l'inhibition de la polarisation pro-tumorale des macrophages de type M2 (Ding *et al.*, 2015a).

Dans ce contexte, ce projet de thèse de Doctorat a pour objectifs d'étudier, pour la première fois, les effets de la MET sur les activités fonctionnelles phénotypiques globales, y compris les biomarqueurs immunométaboliques (activité d'arginase, activité d'iNOS et libération de LDH) (O'Neill *et al.*, 2016) et les biomarqueurs d'activité protectrice redox (activités de catalase et de SOD) (Ferret *et al.*, 2002), l' $\text{Ca}^{2+}$ , la phagocytose et les cytokines coopératives (IFN- $\gamma$  et IL-10) (Yanagawa *et al.*, 2009) des MOs autologues avant et pendant leur interaction avec les cellules cancéreuses du sein de type (ER-/PR-/HER2+).

### Chapitre 1

#### Revue de la littérature

##### 1.1. Cancer du sein

###### 1.1.1. Epidémiologie

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez les femmes dans le monde, il touche environ 2,3 millions de femmes chaque année (représentant 24,5 % de la totalité des cancers) et responsable de 15,5 % (685000) de décès dus au cancer en 2020 (Lei et al., 2021a; Łukasiewicz et al., 2021). Son incidence est plus élevée dans les régions développées, y compris les pays d'Amérique du Nord, l'Australie, la Nouvelle-Zélande, l'Europe occidentale et l'Europe du Nord. Cependant, l'incidence est plus faible dans les régions moins développées telles que l'Afrique, l'Asie et l'Amérique de Sud (Huang *et al.*, 2021; Lei *et al.*, 2021b). En Algérie, le cancer du sein représente le problème majeur de santé publique, avec 35628 nouveaux cas de femmes atteintes enregistrés en 2015 (Benarba *et al.*, 2014).

###### 1.1.2. Classification du cancer du sein

Le cancer du sein est une maladie complexe et hautement hétérogène, comprenant différents sous-types ayant des caractéristiques morphologiques, cliniques et moléculaires distinctes (Kwa *et al.*, 2017). La classification histologique conventionnelle a permis de subdiviser le cancer du sein en se basant sur les caractéristiques morphologiques de la tumeur (Viale, 2012), cependant, cette classification a ses limites, ces sous-types morphologiques peuvent être subdivisés par une classification plus complète et pertinente basée sur leurs signatures moléculaires, permettant une meilleure compréhension de l'hétérogénéité inter-tumorale du cancer du sein (Zardavas *et al.*, 2015).

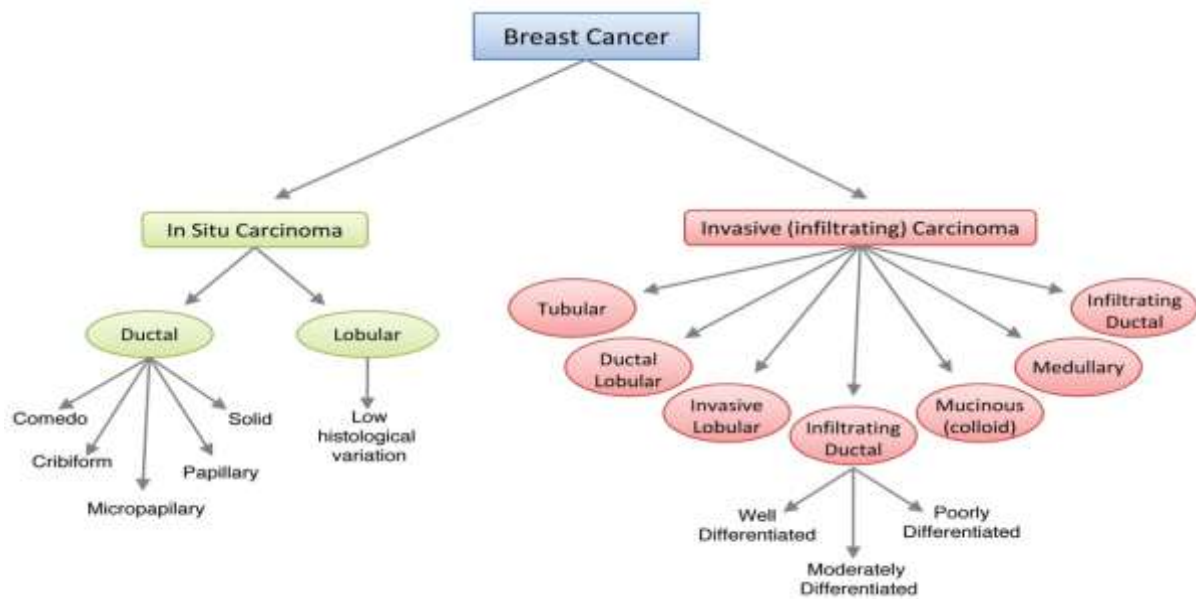
###### 1.1.2.1. Classification conventionnelle

###### 1.1.2.1.1. Les types histologiques

La classification histologique du cancer du sein permet de subdiviser le cancer du sein en carcinome mammaire in situ et carcinome mammaire invasif (infiltrant), ainsi ces deux groupes sont subdivisés en plusieurs sous-types morphologiquement distincts (Vuong *et al.*, 2014). Le carcinome mammaire in situ représente une prolifération maligne non invasive des cellules épithéliales dans les canaux et les lobules (Makki, 2015), dont le carcinome canalaire



in situ (CCIS) est considérablement plus courant que son homologue du carcinome lobulaire in situ (CLIS), et englobe un groupe hétérogène de tumeurs de cinq sous types : cribiforme, micropapillaire, papillaire, solide et le comédocarcinome (Figure 1.1) (Malhotra *et al.*, 2010). Le carcinome mammaire invasif constitue lui aussi un groupe hétérogène comprenant plus de 21 sous-types histologiques distincts (Vuong *et al.*, 2014), où le carcinome canalaire infiltrant constitue la forme la plus courante (70-80 %) (Malhotra *et al.*, 2010). Les autres types invasifs sont notamment le carcinome invasif lobulaire (10 %), mucineux, cribriforme, micropapillaire, papillaire, tubulaire, médullaire, métaplasique et inflammatoire (Rivenbark *et*



*al.*, 2013).

**Figure 1.1. Classification histologique des sous-types de cancer du sein (Malhotra *et al.*, 2010).**

### 1.1.2.1.2. Le grade histologique

L'évaluation du grade histologique est une méthode de classification qui correspond au degré de différenciation du tissu tumoral (Rakha and Ellis, 2011). Dans le cancer du sein, cette classification est effectuée à l'aide d'un système de Nottingham qui repose sur l'évaluation semi-quantitative des caractéristiques morphologiques des coupes de tissus tumoraux colorées à l'hématoxyline-éosine (Lal *et al.*, 2017; Rakha *et al.*, 2010). Il s'agit d'un système de notation à trois niveaux qui évalue le nombre de mitoses visibles, la présence de cellules tumorales créant des structures tubulaires et le pléomorphisme nucléaire (Lal *et al.*, 2017). Le grade histologique de la tumeur constitue un facteur pronostic important qui fait partie intégrante d'un certain nombre d'outils de décision clinique (Rakha *et al.*, 2010).

### 1.1.2.1.3. Stades du cancer du sein

Le cancer du sein est stadifié en un des 5 stades (0, I, II, III et IV) à l'aide d'un système de stadification TNM, qui repose sur des informations cliniques et pathologiques, y compris la taille de la tumeur (T), l'état des ganglions lymphatiques régionaux (N) et les métastases à distance (M) (Rakha *et al.*, 2010; Vuong *et al.*, 2014). Cette stadification fournit également des informations précieuses sur la détection, la prise en charge et les traitements appropriés pour chaque stade du cancer du sein (Singletary and Connolly, 2006).

**Tableau 1.1. Classification TNM des cancers du sein (Feng *et al.*, 2018).**

Stade	Définition
Stade 0:	Carcinome canalaire in situ
Stade I: IA	Tumeur primitive invasive d'une taille $\leq 20$ mm avec aucune atteinte ganglionnaire
IB	Micrométastases nodales ( $> 0,2$ mm, $< 2,0$ mm) avec ou sans tumeur primaire $\leq 20$ mm
Stade II: IIA	Métastases ganglionnaires ipsilatérales mobiles de niveau I, II avec tumeur primaire $\leq 20$ mm; ou tumeur $> 20$ mm, $\leq 50$ mm sans atteinte ganglionnaire
IIB	Métastases ganglionnaires ipsilatérales mobiles de niveau I, II avec tumeur $> 20$ mm, $\leq 50$ mm; ou tumeur $> 50$ mm sans atteinte ganglionnaire
Stage III: IIIA	Métastases ganglionnaires ipsilatérales mobiles de niveau I, II avec tumeur $> 50$ mm; ou tumeur primaire de toute taille avec métastases ipsilatérales fixes de niveau I, II ou ganglionnaires lymphatiques internes.
IIIB	Tumeur primaire avec paroi thoracique et/ou invasion cutanée
IIIC	Tumeur primaire de toute taille avec métastases ganglionnaires supraclaviculaires ou ipsilatérales de niveau III; ou avec métastases homolatérales de niveau I, II et ganglionnaires lymphatiques internes
Stade IV:	Tout cas avec métastase d'organe à distance

### 1.1.2.2. Classification moléculaire

L'analyse par clustering hiérarchique des profils d'expression génique à l'aide des puces à ADN a permis d'identifier cinq sous-types moléculaires principaux intrinsèques de cancer du sein : luminal A, luminal B, Her2/*neu*, basal-like et normal-like, ainsi qu'un sous-type supplémentaire récemment identifié, appelé le « claudin-low » (Figure 1.2) (Sorlie *et al.*, 2003; Sims *et al.*, 2007; Malhotra *et al.*, 2010; Rivenbark *et al.*, 2013). Ces sous-types diffèrent par leur complexité génomique, leurs altérations moléculaires spécifiques, leur pronostic et leur réponses aux traitements (Fumagalli *et al.*, 2012; Vuong *et al.*, 2014).



### 1.1.2.2.2. Les tumeurs de sous-type Luminal B

Les tumeurs de sous-type luminal B (ER<sup>+</sup>/PR<sup>+</sup>/HER2<sup>+</sup>) représentent 10 à 20% des tumeurs du sein, Elles ont un phénotype plus agressif caractérisé par une forte prolifération, un mauvais pronostic, un taux de récurrence plus élevé et des taux de survie inférieurs après une rechute par rapport au sous-type luminal-A (Eroles *et al.*, 2012; Yersal and Barutca, 2014). Ces tumeurs sont caractérisées par une forte expression des gènes impliqués dans la prolifération tels que, la cycline *D1*, *MDM2* (*Mouse double minute 2 homolog*), *v-MYB* (*avian myeloblastosis viral oncogene homolog*), *GGH* (*gamma glutamyl hydrolase*), *NSEPI* (*nuclease sensitive element binding protein 1*) et la cycline E1 (*CCNE1*) et des mutations de *TP53* et de *PIK3CA* (Fragomeni *et al.*, 2018; Yersal and Barutca, 2014).

### 1.1.2.2.3. Les tumeurs HER2/*neu*

Elles représentent 15-20 % des carcinomes mammaires, et sont généralement définies par l'absence de récepteurs hormonaux (PR et ER) et la surexpression de récepteur HER2 (Eroles *et al.*, 2012). Cette surexpression due à une amplification de proto-oncogène *ERBB2* (*erb-b2 receptor tyrosine kinase 2*) active certaines voies oncogéniques impliquées dans la prolifération, l'angiogenèse et l'invasion, entraînant par la suite un néoplasme très agressif caractérisé par une évolution péjorative et un taux de croissance plus rapide (Bernhardt *et al.*, 2016; Godoy-Ortiz *et al.*, 2019).

### 1.1.2.2.4. Les tumeurs sous-type *basal-like*

Les tumeurs de sous-type *basal-like* ont un phénotype (ER<sup>-</sup>, PR<sup>-</sup> et de HER2<sup>-</sup>), et surexpriment des cytokératines (CK-5/6, 14 et 17) ainsi que certains marqueurs favorisant la prolifération cellulaire et la cancérogenèse tels que, c-kit, c-myc et EGFR (Trop *et al.*, 2014). Ces tumeurs ont une fréquence élevée de mutations de *TP53* et *BRCA1*, ce qui pourrait expliquer leur énorme agressivité et leur mauvais pronostic (Eroles *et al.*, 2012). Elles sont plus susceptibles de développer des métastases (Bernhardt *et al.*, 2016).

### 1.1.2.2.5. Les tumeurs de sous-type *normal-like*

Elles sont caractérisées par l'expression des gènes associés à des cellules épithéliales normales, du tissu adipeux et du stroma (Norum *et al.*, 2014). Elles présentent un pronostic intermédiaire entre le sous-type luminal et basal, cependant, elles ne sont pas considérées comme un véritable sous-type intrinsèque en raison d'une forte contamination avec des tissus normaux (Eroles *et al.*, 2012; Trop *et al.*, 2014).

### 1.1.2.2.6. Les tumeurs *claudin-low*

Ces tumeurs sont un type rare des tumeurs du sein triple négatives (ER-, PR-, HER2-), représentant 10 % des cancers du sein. Elles sont caractérisées par une faible expression des gènes impliqués dans les jonctions serrées et l'adhésion intercellulaire, y compris la claudine (*CLDN3*, *CLDN4* et *CLDN7*), la cinguline, l'occludine et la E-cadhérine (Eroles *et al.*, 2012; Norum *et al.*, 2014).

### 1.1.3. Différents traitements du cancer du sein

Il existe un certain nombre de traitements pour les patientes atteintes du cancer du sein qui varient en fonction du type et du stade de la tumeur. La prise en charge actuelle du cancer du sein comprend : la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, traitement hormonal, l'immunothérapie et les thérapies ciblées.

#### 1.1.3.1. La chirurgie

Le traitement chirurgical permet d'obtenir un contrôle local, de prévenir les récurrences locorégionales et d'améliorer la survie des patientes atteintes du cancer du sein (Riis, 2020). Les différentes approches chirurgicales varient selon le stade et le type de la tumeur, elles comprennent la chirurgie mammaire conservatrice appelée la tumorectomie permettant une ablation uniquement de la masse tumorale, et une mastectomie qui correspond à l'ablation chirurgicale de tout le tissu mammaire (Fraser *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2010). Plus récemment, la technique de dissection des ganglions sentinelles est devenue populaire, car elle nécessite l'ablation de beaucoup moins de ganglions lymphatiques, ce qui entraîne moins d'effets secondaires (Sharma *et al.*, 2010). Le traitement chirurgical du cancer du sein s'accompagne d'un traitement adjuvant ou néoadjuvant, y compris l'hormonothérapie, la chimiothérapie et/ou la radiothérapie.

#### 1.1.3.2. La chimiothérapie

La chimiothérapie est un traitement systémique du cancer du sein (Leclerc *et al.*, 2016). Elle utilise certains médicaments anticancéreux qui peuvent être administrés avant la chirurgie pour réduire les cancers volumineux afin qu'ils puissent être facilement éliminés par tumorectomie, ou après une intervention chirurgicale pour traiter des cellules cancéreuses du sein non détectées (Dhankhar *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2010). Elle est recommandée pour la

grande majorité des cancers du sein triples négatifs, HER2-positifs et dans les tumeurs luminales à haut risque (Nounou *et al.*, 2015).

### **1.1.3.3. La Radiothérapie**

La radiothérapie est une composante essentielle du traitement pour la majorité des femmes atteintes d'un cancer du sein, en particulier celles qui subissent une chirurgie mammaire conservatrice (Schnur *et al.*, 2009). Elle joue un rôle essentiel dans la prise en charge du cancer du sein en éradiquant la maladie subclinique après l'ablation chirurgicale d'une tumeur manifestement évidente en réduisant les taux de récurrence locale et augmentant la survie des patientes à un stade précoce après chirurgie mammaire conservatrice et chez les patientes ganglionnaires positives qui ont subi une mastectomie (Yang and Ho, 2013). La radiothérapie consiste à utiliser des rayons X à haute énergie ou des rayons gamma qui ciblent une tumeur ou un site tumoral post-chirurgical. Ces radiations sont très efficaces pour tuer les cellules cancéreuses qui peuvent rester après la chirurgie ou réapparaître là où la tumeur a été retirée (Sharma *et al.*, 2010).

### **1.1.3.4. L'hormonothérapie**

L'hormonothérapie constitue un traitement spécifique pour les patientes ayant des néoplasmes mammaires exprimant des récepteurs hormonaux (Drăgănescu and Carmocan, 2017). Ce traitement endocrinien utilise plusieurs types de médicaments, qui sont destinés à empêcher la croissance tumorale *via* la réduction ou l'arrêt de la production d'œstrogènes, ou en bloquant la signalisation par le récepteur d'œstrogène (Rajappa *et al.*, 2018). Il s'agit notamment des inhibiteurs de l'aromatase (AI) et des agonistes de l'hormone de libération des gonadotrophines (GnRH) qui réduisent la biosynthèse des œstrogènes, ainsi que des modulateurs sélectifs des récepteurs des œstrogènes, tels que le tamoxifène, principalement prescrits aux femmes pré-ménopausées atteintes d'un cancer du sein qui inhibent l'activité des œstrogènes en se liant de manière compétitive au récepteur (Bender *et al.*, 2014; Rugo *et al.*, 2016).

### **1.1.3.5. L'immunothérapie**

L'immunothérapie anticancéreuse englobe un éventail de stratégies visant à exploiter le système immunitaire d'un patient pour attaquer et tuer spécifiquement les cellules tumorales (Williams *et al.*, 2017). elle englobe à la fois des vaccins qui dirigent les réponses immunitaires face aux antigènes associés aux tumeurs et des anticorps bloquant les points de

contrôle impliqués dans suppression du système immunitaire tels CTLA-4 (T-lymphocyte antigen 4), PD-1 (*Programmed death receptor 1*) et PD-L1 (McArthur and Page, 2016).

### 1.1.3.6. Les thérapies ciblées

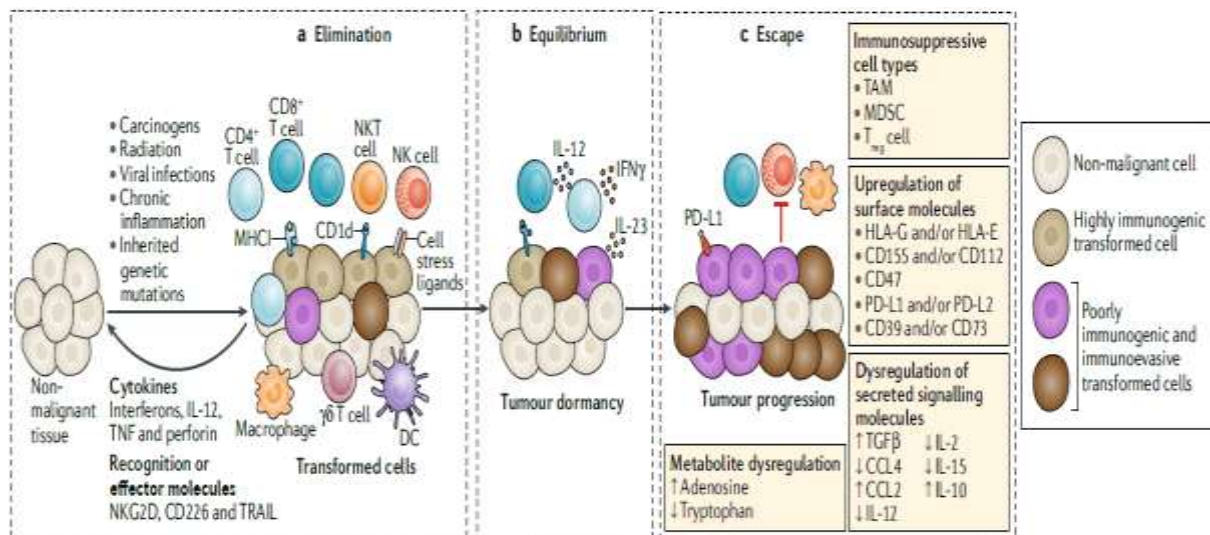
Les thérapies ciblées contre le cancer du sein impliquent divers substances ou médicaments qui inhibent sélectivement divers récepteurs surexprimés par les cellules tumorales lors de leur développement, envahissement et métastases. L'activation de ces récepteurs initie une cascade de signalisations aboutissant à la prolifération, la croissance, la survie, la migration, l'angiogenèse et d'autres voies fondamentales du cycle cellulaire (Akram and Siddiqui, 2012; Masoud and Pagès, 2017). Les sous-types de cancer du sein exprimant HER2 bénéficient de certaines thérapies ciblées y compris l'introduction d'anticorps monoclonaux tels que le trastuzumab, le pertuzumab et le trastuzumab emtansine ainsi que des inhibiteurs de tyrosine kinase y compris, le lapatinib, le nératinib et l'afatinib (Li and Li, 2013). Pour les patientes atteintes d'un cancer du sein triple négatif, certaines thérapies ciblées ont été développées y compris les inhibiteurs de la poly-ADP-ribosyl polymérase (PARP), les inhibiteurs de la voie PI3K, les inhibiteurs du point de contrôle immunitaire et les inhibiteurs de la kinase dépendante de la cycline (CDK) (McCann *et al.*, 2019).

### 1.1.4. Immunogénicité du cancer du sein

Le cancer du sein n'a pas été considéré comme une tumeur immunogène, c'est pour cette raison qu'il n'a pas été étudié de manière approfondie pour sa sensibilité aux immunothérapies (Hammerl *et al.*, 2018). Cependant, au cours des dernières années, plusieurs études ont démontré que certains types de cancer du sein sont capables de stimuler le système immunitaire (Swoboda and Nanda, 2018), ainsi, qu'il existe une relation entre la réaction immunitaire intra-tumorale et l'évolution du cancer du sein (Sun *et al.*, 2014). L'immunogénicité du cancer du sein varie entre les différents sous-types moléculaires, elle dépend du taux d'infiltration des TIL (Lymphocytes infiltrant la tumeur) dans le microenvironnement tumoral. Les tumeurs de sous-type triple négative et HER2+ sont plus immunogènes que les tumeurs lumineales A et B en raison d'une forte infiltration de TIL dans le site tumoral (Harbeck *et al.*, 2019; Luen *et al.*, 2016).

1.2. Immunoédition du cancer du sein

Le système immunitaire joue un double rôle dans le contrôle des différentes étapes de développement du cancer du sein (Jiang and Shapiro, 2014), il peut non seulement éliminer les cellules cancéreuses avant l'établissement d'une tumeur, mais il peut aussi favoriser leur progression en sélectionnant les cellules cancéreuses moins immunogènes et aptes à survivre dans un hôte immunocompétent ou en favorisant les conditions nécessaires dans le microenvironnement tumoral qui facilitent leur croissance (Criscitello *et al.*, 2014; Nagarajan and McArdle, 2018). Ce processus dynamique d'interaction entre le système immunitaire et les cellules cancéreuses est connu sous le nom « cancer immunoediting » appelé aussi « théorie des 3 E », il comporte 3 phases : élimination, équilibre et échappement (Edechi *et al.*, 2019; Tu *et al.*, 2017). Au cours de ces phases, l'immunogénicité de la tumeur est modifiée et des mécanismes immunosuppresseurs permettant la progression de la tumeur sont acquis (O'Donnell *et al.*, 2019) (Figure 1.3).



**Figure 1.3. Immunoédition du cancer (O'Donnell *et al.*, 2019).** L'immunoédition du cancer se déroule en trois phases: élimination, équilibre et échappement. **a.** Pendant la phase d'élimination, les systèmes immunitaires innés et adaptatifs coopèrent pour reconnaître les cellules transformées qui ont échappé à la suppression tumorale intrinsèque et pour les éliminer avant que les tumeurs ne deviennent cliniquement détectables. **b.** Les tumeurs capables de survivre à la phase d'élimination peuvent progresser vers la phase d'équilibre, dans laquelle la croissance nette est limitée et l'immunogénicité cellulaire est éditée par le système immunitaire adaptatif. **c.** Les tumeurs éditées peuvent alors entrer dans la phase d'échappement, dans laquelle leur croissance n'est pas freinée en raison de l'activation des voies immunosuppresseurs. Les cellules cancéreuses qui se sont échappées sont celles qui sont cliniquement détectables en tant que tumeurs visibles. DC: cellules dendritiques, MDSC: Les cellules myéloïdes suppressives, MHCI: CMH de classe I, NK cell: cellules tueuses naturelles, NKT cell: cellules T tueuses naturelles, PD- L1: *programmed death ligand 1*, TAM: macrophage associé aux tumeurs, Treg cell: cellules T régulatrices.



### 1.2.1. Phase d'élimination

Au cours de cette phase (appelée aussi « immunosurveillance ») et selon l'immunogénicité de la tumeur, différents effecteurs de l'immunité innée et adaptative sont impliqués dans la reconnaissance et la destruction des cellules transformées naissantes qui ont échappé aux mécanismes intrinsèques cellulaires de la suppression des tumeurs (O'Donnell *et al.*, 2019; Teng *et al.*, 2015; Tu *et al.*, 2017). Ce processus d'élimination est initié par la libération des cytokines pro-inflammatoires par les cellules tumorales en croissance ainsi que d'autres composants de microenvironnement tumoral (Kim *et al.*, 2007), conduisant à l'activation et le recrutement des cellules immunitaires innées dans le site tumoral telles que, les cellules NK, les NKT et les cellules T $\gamma\delta$  (Bates *et al.*, 2018). Ces cellules nouvellement recrutées reconnaissent et détruisent les cellules tumorales par l'intermédiaire des perforines, Fas/Fas-L, TRAIL (*tumor necrosis factor [TNF]-related apoptosis-inducing ligand*) et de l'IFN- $\gamma$  (Kim *et al.*, 2007). L'IFN- $\gamma$  induit ainsi la sécrétion de certaines chimiokines (CXCL9, CXCL10 et CXCL11) permettant l'inhibition de l'angiogenèse et le recrutement des cellules dendritiques (CD), des macrophages ainsi que d'autres cellules immunitaires (Dunn *et al.*, 2002). Les antigènes tumoraux libérés HSPs (*heat-shock proteins*) par les cellules tumorales nécrotiques sont capturés par les CD, qui migrent vers les ganglions lymphatiques drainant la tumeur, entraînant l'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïves (Smyth *et al.*, 2006). Ces cellules activées sont essentielles dans l'activation de certaines cellules y compris, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques (LTC), les cellules NK, les macrophages et les lymphocytes B (LB). Les LTC infiltrent dans l'environnement tumoral en éliminant le reste des cellules cancéreuses (Cali *et al.*, 2017; Mittal *et al.*, 2014), ainsi, les macrophages activés phagocytent et détruisent les cellules tumorales par l'intermédiaire des radicaux libre tels que, O<sub>2</sub><sup>-</sup> (superoxyde), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peroxyde d'hydrogène) et NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (nitrite). La réponse anti-tumorale implique aussi le système de complément, la cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC) et la lyse médiée par les cellules NK (Rezaei, 2015) (Figure 1.4).

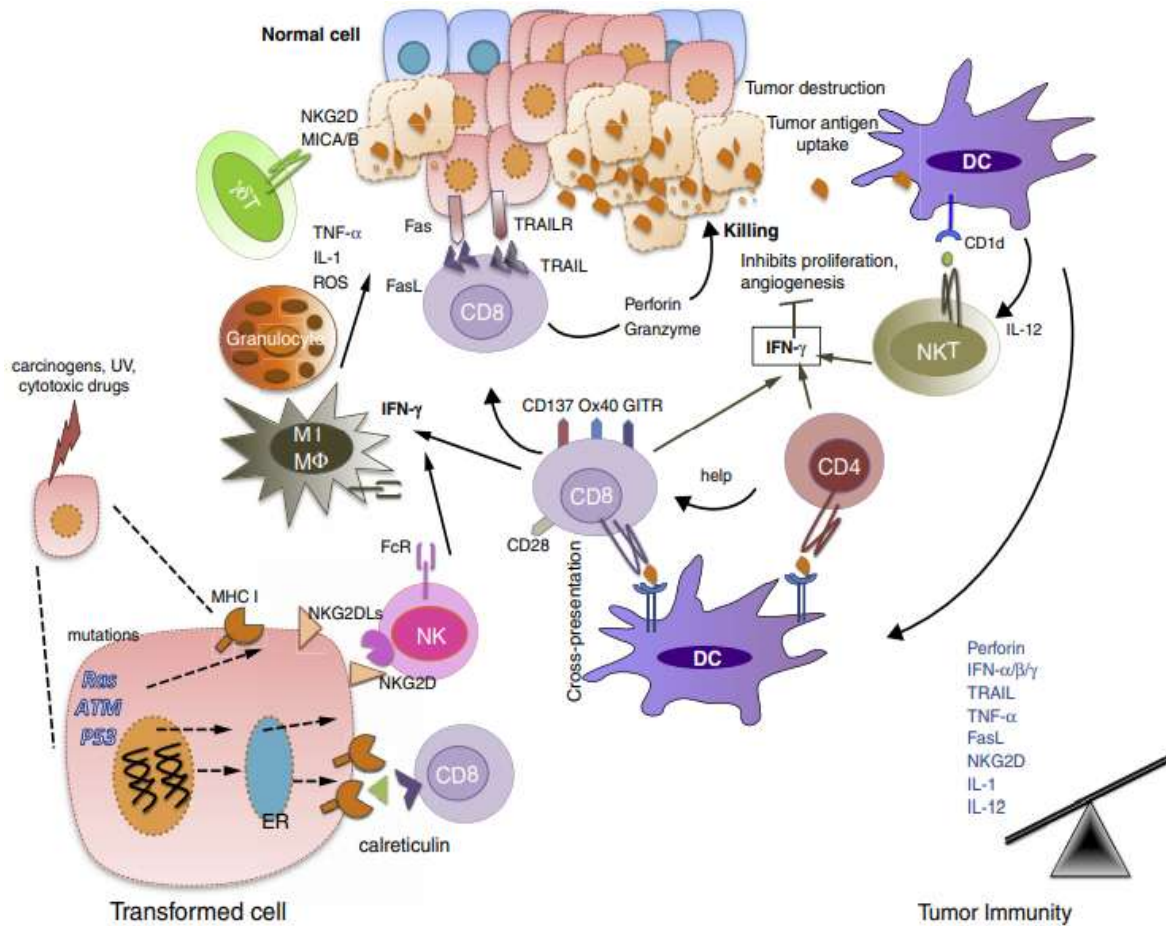
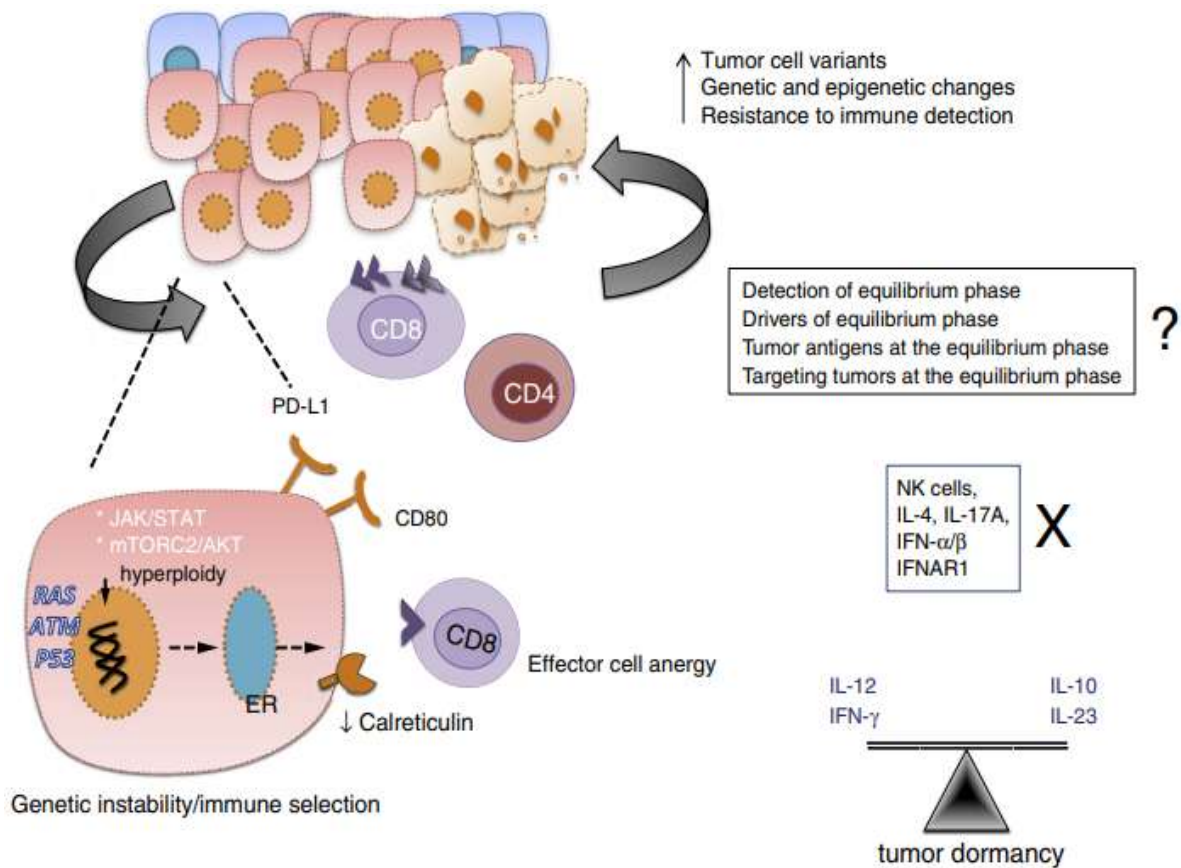


Figure 1.4. Phase d'élimination d'immunoédition du cancer (Mittal *et al.*, 2014).

### 1.2.2. Phase d'équilibre

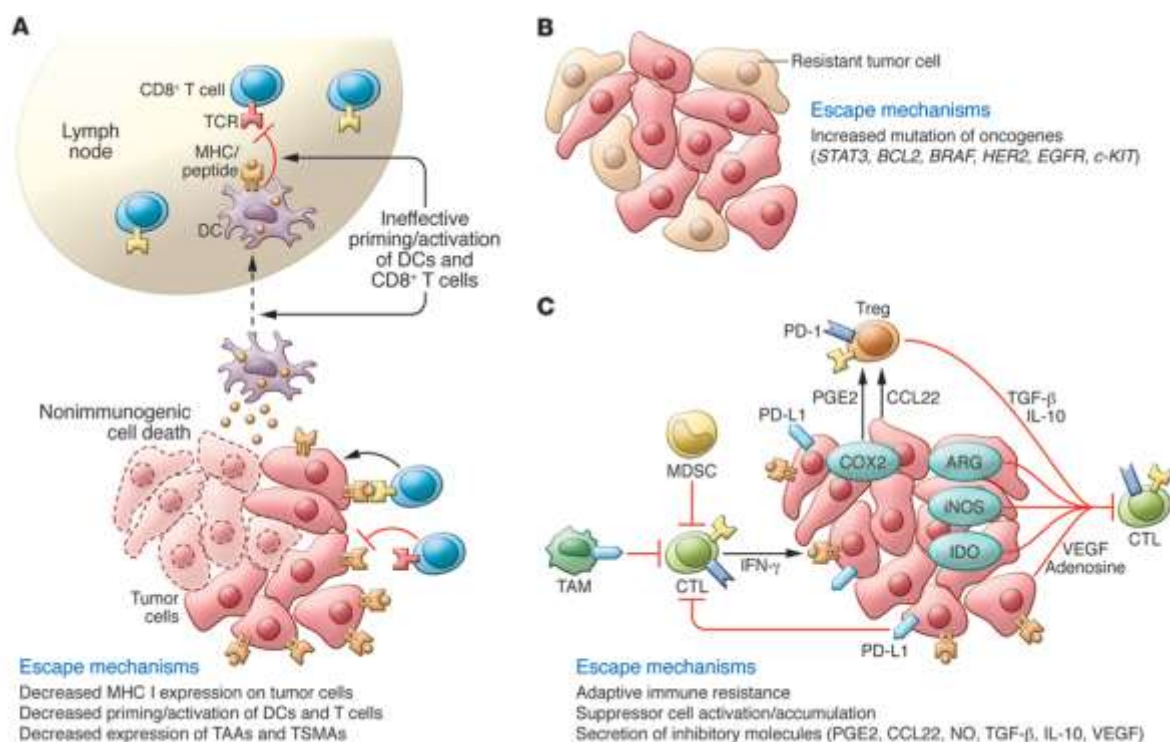
Bien que la plupart des cellules tumorales ont été détruites au cours de la phase d'élimination, de nouvelles cellules tumorales persistent et acquièrent grâce à des mutations une résistance aux attaques de système immunitaire (Smyth *et al.*, 2006). Ces nouvelles variantes de cellules tumorales entrent dans un état de dormance et d'équilibre dynamique avec le système immunitaire (Dunn *et al.*, 2004). Durant cette phase, le système immunitaire exerce une pression sélective, permettant non seulement l'élimination des cellules cancéreuses d'origine, mais aussi la génération de nouvelles populations de cellules tumorales capables de survivre et de résister à la surveillance immunitaire (Mittal *et al.*, 2014).



**Figure 1.5. Phase d'équilibre d'immunoédition du cancer (Mittal *et al.*, 2014).** Dans cette phase, le système immunitaire maintient la tumeur dans un état de dormance fonctionnelle. Certaines cellules tumorales subissent des changements génétiques et épigénétiques et, en raison d'une pression immunitaire constante, des variantes de cellules tumorales évoluent et résistent à la reconnaissance immunitaire (perte d'antigène ou défauts de présentation de l'antigène) et induisent une immunosuppression (PDL1). Cette phase est un équilibre entre les cytokines anti-tumorales (IL-12, IFN- $\gamma$ ) et pro-tumorales (IL-10, IL-23). Le système immunitaire adaptatif est nécessaire pour maintenir la tumeur dans un état de dormance fonctionnelle.

### 1.2.3. Phase d'échappement

Les cellules tumorales qui ont réussi à survivre et à contourner le système immunitaire pendant la phase d'équilibre, entrent dans une phase d'échappement, où elles deviennent cliniquement détectables en tant que tumeurs visibles (O'Donnell *et al.*, 2019; Teng *et al.*, 2015). Ces cellules tumorales échappent à la défense immunitaire en raison d'une instabilité du génome qui leur confèrent une résistance à la reconnaissance et la destruction par les cellules immunitaires effectrices, ou par des mécanismes immunosuppresseurs induits par la tumeur (Smyth *et al.*, 2006). Ces mécanismes d'échappement peuvent être classés en 3 catégories (Figure 1.6).



**Figure 1.6. Différents mécanismes d'échappement des cellules cancéreuses (Teng *et al.*, 2015).** Les mécanismes d'échappement des cellules tumorales peuvent être classés en trois grandes catégories: (A) Réduction de la reconnaissance et la stimulation des cellules immunitaires par une régulation négative, une perte d'antigènes tumoraux ou par l'absence de molécules costimulatrices; (B) Acquisition des mécanismes de résistance contre les effecteurs cytotoxiques de l'immunité (comme, STAT3) ou une surexpression des gènes de survie ou de facteur de croissance tels que Bcl-2, Her2/neu; et (C) l'établissement d'un microenvironnement tumoral immunosuppresseur *via* (a) la production de cytokines (VEGF, TGF- $\beta$ ) et de facteurs métaboliques (adénosine, PGE2 (Prostaglandine E2)); (b) induction et/ou recrutement des Treg et MDSC; ou (c) l'induction d'une résistance immunitaire adaptative par liaison des récepteurs inhibiteurs (CTLA-4, PD-1, Tim-3) sur des cellules effectrices immunitaires.

### 1.2.3.1. Une reconnaissance immunitaire réduite

#### 1.2.3.1.1. Types d'antigènes associés aux tumeurs

Les cellules cancéreuses peuvent exprimer certains antigènes spécifiques de surface, permettant d'altérer le système immunitaire. Ces antigènes sont de 3 types : (i) les auto-antigènes exprimés de manière excessive ou anormale ; (ii) les auto-antigènes modifiés qui sont exprimés spécifiquement en présence de tumeurs et (iii) les néo-antigènes, qui sont des produits de gènes mutés (Wang *et al.*, 2017). Parmi les antigènes tumoraux surexprimés par les cellules cancéreuses du sein : HER2, MUC1 (mucine 1), CEA (l'antigène carcinoembryonnaire), STn (Sialyl-Tn), CLDN (claudine), hTERT (*human telomerase reverse transcriptase*) et WT1 (*Wilms tumour gene*) (Criscitiello, 2012; Steven and Seliger, 2018; Varn *et al.*, 2017).

### 1.2.3.1.2. Expression anormale de CMH-1

Les cellules tumorales expriment d'autres antigènes de surface telles que les molécules de CMH-1, qui permettent la présentation des épitopes antigéniques tumoraux aux lymphocytes T effectrices (Garrido, 2019). Cependant, la perte ou la modification de ces molécules de CMH-1 est souvent fréquente dans différents types de tumeurs, y compris le cancer du sein, et constitue l'un des moyens d'échappement des cellules tumorales à la surveillance immunitaire par inhibition d'activation des mécanismes immunitaires cytotoxiques (Garrido *et al.*, 2010; Law *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017).

### 1.2.3.1.3. Une surexpression des HLA-1 non-classiques

La surexpression des molécules non-classiques d'HLA-1 (*Human Leucocyte Antigen-1*) (HLA-G et d'HLA-E) par les cellules cancéreuses du sein leur permettent d'échapper à la surveillance immunitaire (da Silva *et al.*, 2013). Les molécules d'HLA-G inhibent certaines cellules effectrices en interagissant avec des récepteurs inhibiteurs tels que : ILT-2 (*Ig-Like Transcript-2*), ILT-4, KIR2DL4 (*Killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL4*) et CD160 exprimés sur les cellules NK, les lymphocytes T et B ainsi que les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (Kochan *et al.*, 2013; O'Donnell *et al.*, 2019). Ainsi, les HLA-E inhibent l'activité cytolytique des cellules NK en se liant avec le récepteur inhibiteur NKG2A (da Silva *et al.*, 2013).

### 1.2.3.2. Perturbation de la fonction anti-apoptotique

La perturbation des différentes voies d'apoptose constitue l'un des moyens d'échappement des cellules cancéreuses, y compris celles du cancer du sein à la surveillance immunitaire (Wang *et al.*, 2017).

#### 1.2.3.2.1. Fas/Fas-L

L'interaction de récepteur de la mort cellulaire Fas (Apo-1 ou CD95) avec son ligand (FasL) déclenche une cascade de réactions induisant la mort cellulaire par voie extrinsèque (Hashemi *et al.*, 2013). La dérégulation de cette voie au sein des cellules cancéreuses leur permettent d'échapper à l'apoptose et à la reconnaissance par le système immunitaire (Li *et al.*, 2015). La surexpression des molécules Fas-L par les cellules cancéreuses du sein induit l'apoptose des lymphocytes T exprimant le récepteur Fas et l'induction des lymphocytes T régulatrices qui permettent la suppression des réponses anti-tumorales. Par ailleurs, ces cellules cancéreuses

peuvent ainsi résister à cette voie d'apoptose en diminuant l'expression des récepteur Fas (Rezaei, 2015; Steven and Seliger, 2018).

### 1.2.3.2.2. Bcl-2, survivine et caspase

D'autres protéines peuvent être aussi impliquées dans la régulation de l'apoptose, la surexpression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 (B-cell Lymphoma 2) et la survivine par les cellules cancéreuses du sein conduit à l'inhibition de l'apoptose en favorisant la transformation néoplasique (Chen *et al.*, 2016; Steven and Seliger, 2018). Ainsi, ces cellules cancéreuses peuvent résister à la voie extrinsèque ou intrinsèque de l'apoptose par diminution d'activation de caspase-3 (Devarajan *et al.*, 2002).

### 1.2.3.3. Etablissement d'un microenvironnement tumoral immunosuppresseur

#### 1.2.3.3.1. Production des cytokines immunosuppressives et des facteurs métaboliques

Une variété de cytokines immunosuppressives (VEGF (Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire), IL-4, IL10, IL-13, IL-33, IL-35, IL-37 et TGF- $\beta$ ) et de chimiokines (CCL2, CCL17, CCL22) produites par les cellules cancéreuses du sein et les cellules immunitaires du microenvironnement tumoral, contribuent également à l'échappement et à la croissance tumorale en affectant négativement la maturation et la fonction des cellules immunitaires (Gatti-Mays *et al.*, 2019; Nicolini and Carpi, 2009; Soysal *et al.*, 2015). La libération d'autres facteurs inflammatoires contribue ainsi à la création d'un microenvironnement suppressif y compris, la production des radicaux libres, la prostaglandine E2, des facteurs de transcription (NF- $\kappa$ B (facteur de transcription nucléaire- $\kappa$ B) et STAT3), des microARNs ainsi que des enzymes telles que l'arginase (ARG), l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO), la cyclooxygénase (COX), la métalloprotéinase matricielle (MMP) et le NOS (Fernandes *et al.*, 2015).

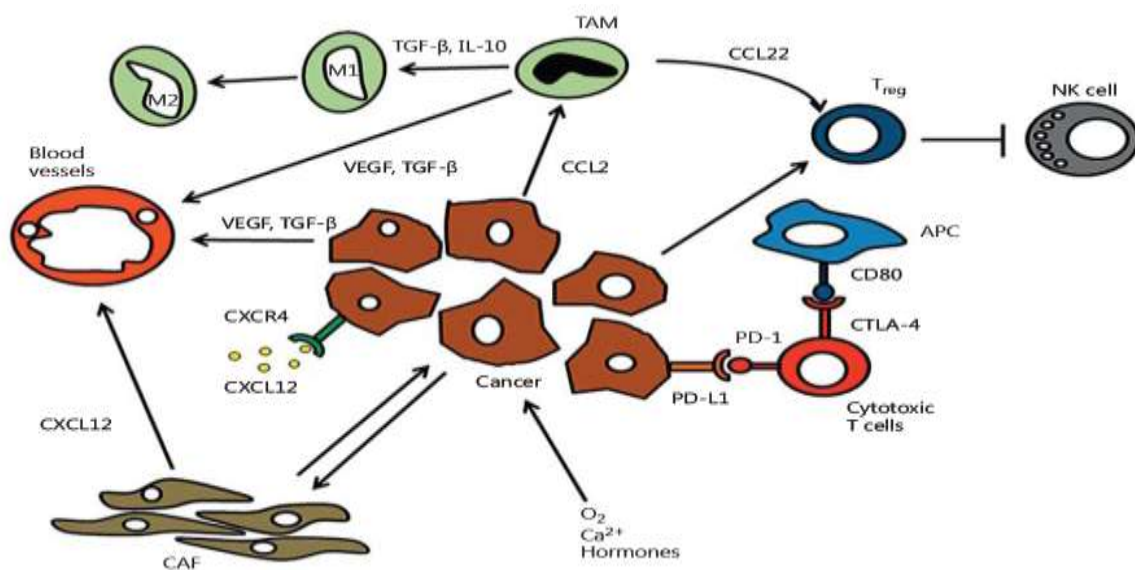
#### 1.2.3.3.2. Expression des molécules co-inhibitrices

Les cellules cancéreuses du sein utilisent certaines voies immunitaires afin d'échapper aux réponses anti-tumorales médiées par les lymphocytes T effectrices. L'une des voies principales est la voie de la mort programmée PD-1 (Baptista *et al.*, 2016). Les protéines inhibitrices transmembranaires PD-1 sont exprimées par certaines cellules immunitaires activées, leur interaction avec les molécules de PDL-1 surexprimées sur les cellules tumorales conduit également à l'inhibition et la lyse des lymphocytes T effectrices, diminution de production des cytokines et l'induction d'une tolérance aux antigènes (Ghebeh *et al.*, 2010;

Schütz *et al.*, 2017). D'autres molécules inhibitrices peuvent être aussi associées à l'inhibition de l'activité des lymphocytes T ainsi qu'à l'induction d'une anergie lymphocytaire, telles que CTLA-4, LAG3 (*lymphocyte activation gene-3*) et TIM-3 (*T cell immunoglobulin and mucin domain-3*) (Barrueto *et al.*, 2020; Dushyanthen *et al.*, 2015).

### 1.2.3.3. Recrutement des cellules immunosuppressives

L'inhibition des réponses anti-tumorales peut être induite par le recrutement dans le microenvironnement tumoral du cancer du sein de certaines cellules immunosuppressives (Soysal *et al.*, 2015) telles que les macrophages associés aux tumeurs (TAMs), les cellules myéloïdes suppressives (MDSCs) et les lymphocytes T régulateurs (Treg) (Schreiber *et al.*, 2011). Les TAMs infiltrés dans le microenvironnement tumoral du cancer du sein, produisent certaines cytokines immunosuppressives telles que le TGF- $\beta$  et l'IL-10, qui inhibent des LTC et induisent la différenciation et le recrutement des lymphocytes Th2 (cellules T auxiliaires 2), favorisant le développement des cellules Treg (de la Cruz-Merino *et al.*, 2013). Les MDSCs recrutées via la production des G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*) par les cellules cancéreuses du sein, inhibent l'activation et le recrutement des lymphocytes T effecteurs via la production des ROS et l'activation de certaines enzymes telles que, ARG-1, iNOS et IDO (Nagarajan and McArdle, 2018). Les cellules Treg stimulées, inhibent les LTC en produisant l'IL-10 et le TGF- $\beta$ , et en exprimant des molécules inhibitrices (CTLA-4, PD-1 et PDL-1) (Schreiber *et al.*, 2011).



**Figure 1.7. Interaction entre les composants du microenvironnement tumoral et les cellules cancéreuses du sein.** APC = cellules présentatrice d'antigène; CTLA-4 = protéine 4 associée aux lymphocytes T cytotoxiques; NK = tueur naturel.

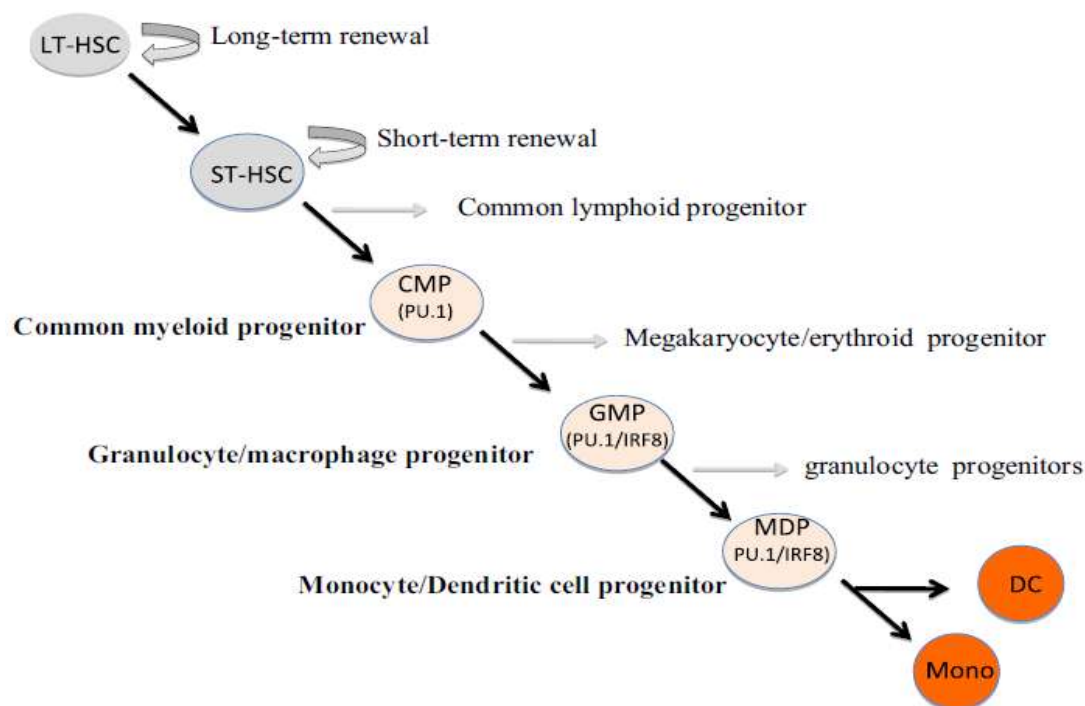
### 1.3. Monocytes et Cancer du sein

Le microenvironnement entourant les cellules cancéreuses du sein joue un rôle important dans la modulation de la croissance et de la progression du cancer (Gingras *et al.*, 2015). Il contient plusieurs types de cellules inflammatoires, y compris les MOs et les macrophages. Les MOs représentant une population hétérogène dérivée de la lignée myéloïde (Doseff and Parihar, 2012), sont recrutés de la circulation sanguine vers le site tumoral grâce à l'action paracrine des cytokines et des chimiokines libérées par les cellules cancéreuses du sein (Ben-Baruch, 2002).

#### 1.3.1. Développement et ontogénie des monocytes

Les MOs sont un groupe de cellules circulantes, représentant 10 % des leucocytes humains (Das *et al.*, 2015). Ils se développent à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH) dans la moelle osseuse via une série d'étapes de différenciations séquentielles (Figure 1.8) (Italiani and Boraschi, 2014). Ces différentes étapes de développement sont hautement régulées par certains facteurs de transcription, y compris, PU.1 (*Purine-rich box-1*), IRF (8) (*Interferon regulatory factor 8*) et KLF4 (*Kruppel-like factor 4*), ainsi que par des facteurs de croissance, tels que CSF-1 (M-CSF) et IL-34 (Terry and Miller, 2014). L'engagement des CSH vers une lignée myéloïde nécessite l'activation des récepteurs présents à la surface des cellules progénitrices par l'IL-34 et par leur ligand CSF-1 produit par les cellules stromales. Les progéniteurs communs myéloïdes (CMP) se différencient ensuite de manière séquentielle en progéniteurs de granulocytes-macrophages (GMP), puis en progéniteurs communs des macrophages et des CD (MDP), et enfin en progéniteurs communs monocytaires (cMoP) qui sont à l'origine des MOs (Mitchell *et al.*, 2014).





**Figure 1.8. Origine des monocytes (Rees, 2010).** HSC : cellules souches hématopoïétiques, CMP : progéniteurs communs myéloïdes, GMP : progéniteurs des granulocytes-macrophages, MDP : Progéniteurs communs des macrophages et des cellules dendritiques.

### 1.3.2. Hétérogénéité des monocytes

Les MOs humains représentent une population hétérogène comportant trois sous-groupes fonctionnellement et phénotypiquement différents, identifiés et caractérisés par cytométrie en flux en fonction de l'expression de marqueurs de surface CD14 (récepteur de polysaccharides) et CD16 (récepteur Fc $\gamma$ RIII) (Sprangers *et al.*, 2016; Wouters *et al.*, 2017). Les MOs classiques (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>) représentent le sous-ensemble majeur des MOs humains (85%), cependant, les 10% restants ayant les marqueurs CD14 et CD16, sont subdivisés en MOs intermédiaires (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) et MOs non classiques (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) (Sprangers *et al.*, 2016). Les deux sous-types classiques et intermédiaires possèdent des propriétés inflammatoires, qui leur permettent de passer de la circulation vers les tissus en réponse à des signaux appropriés, tandis que, les MOs non classiques patrouillent les capillaires en éliminant des débris cellulaires et permettant le soutien des cellules endothéliales (Das *et al.*, 2015). Un sous-ensemble mineur des MOs appelés TEM (monocytes exprimant le TIE-2) exprimant le récepteur tyrosine kinase (TEK ou TIE-2), représentent 2% des monocytes circulants. Ces cellules sont recrutées dans le microenvironnement des tumeurs en induisant l'angiogenèse et la croissance tumorale (Dalton *et al.*, 2014).

**Tableau 1.2. Les sous-types des monocytes humains (Italiani and Boraschi, 2014).**

Sous-types	% dans les monocytes sanguins	Marqueurs	Récepteurs de chimiokines	Autres marqueurs de surface	Fonctions
Classiques	85%	CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>-</sup>	CCR2 <sup>+</sup> CCX3CR1 <sup>-</sup>	CD62L <sup>+</sup> , CD64 <sup>-</sup> , MHCII <sup>+</sup> ,CD163 <sup>+</sup>	Phagocytose, effecteurs inflammatoires
Intermédiaires	5%	CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>+</sup>	CCR2 <sup>-</sup> CCX3CR1 <sup>+</sup>	CD62L <sup>+</sup> , CD64 <sup>-</sup> , MHCII <sup>++</sup> ,CD163 <sup>+</sup>	effecteurs inflammatoires
Non classiques	10%	CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>++</sup>	CCR2 <sup>-</sup> CCX3CR1 <sup>+</sup>	CD62L <sup>-</sup> , CD64 <sup>+</sup> , MHCII <sup>++</sup> ,CD163 <sup>-</sup>	Patrouille, rôle antiviral

### 1.3.2.1. Les monocytes classiques

Les MOs classiques sont des cellules hautement phagocytaires et non inflammatoires (Al Dubayee *et al.*, 2018), exprimant des niveaux élevés des récepteurs des chimiokines de type 2 (CCR2), de CD62L (L-sélectine), CD11b et TLR4 et de faibles niveaux de CX3CR1 (Wacleche *et al.*, 2018). Ces cellules produisent une gamme de cytokines, notamment l'IL-10, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ , ainsi que des ROS, et présentent une forte activité de peroxydase (Idzkowska *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2014). Avant de quitter la circulation, une faible proportion de ces MOs évoluent en MOs intermédiaires, puis la plupart de ces cellules se convertissent finalement en MOs non classiques (Patel *et al.*, 2017). Les récepteurs CCR2 présents à la surface de MOs classiques sont spécifiques des MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1) produites durant l'inflammation et qui assurent leur migration vers les sites d'infection où elles exercent différentes réponses immunologiques, y compris, la reconnaissance et l'élimination des microorganismes et des cellules mortes.

### 1.3.2.2. Les monocytes intermédiaires

Les MOs intermédiaires représentent 2 à 8 % des MOs circulants, ils sont caractérisés par une forte expression en CMH de classe II (HLA-DR), CD11c, CD36, CCR2 et CCR5 (Loke and Niewold, 2017; Sampath *et al.*, 2018; Stansfield and Ingram, 2015). Ces cellules ont la capacité de produire des taux élevés des ROS ainsi que des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$  et de TNF- $\alpha$  et présentent une faible activité de peroxydase. Ce sous-type des MOs est impliqué principalement dans la présentation antigénique, la phagocytose, la

reconnaissance des parasites, la cicatrisation des plaies, la prolifération et la stimulation des lymphocytes T (Sampath *et al.*, 2018).

### 1.3.2.3. Les monocytes non classiques

Ce sous-ensemble des monocytes représente 2 à 11% des MOs circulants, ayant des caractéristiques inflammatoires (Al Dubayee *et al.*, 2018; Sampath *et al.*, 2018), caractérisés par une forte expression en CX3CR1, CXCR4, HLA-DR et l'antigène 1 associé aux fonctions lymphocytaires (LFA-1) et par une absence de CCR2 et de CD62L (Idzkowska *et al.*, 2015; Wacleche *et al.*, 2018). Ils produisent une faible quantité de ROS, de myéloperoxydase et de lysosyme. Ces MOs explorent le système vasculaire en éliminant les cellules mortes, les cellules infectées ou endommagées, les virus ainsi que les cellules tumorales (Hamers *et al.*, 2019).

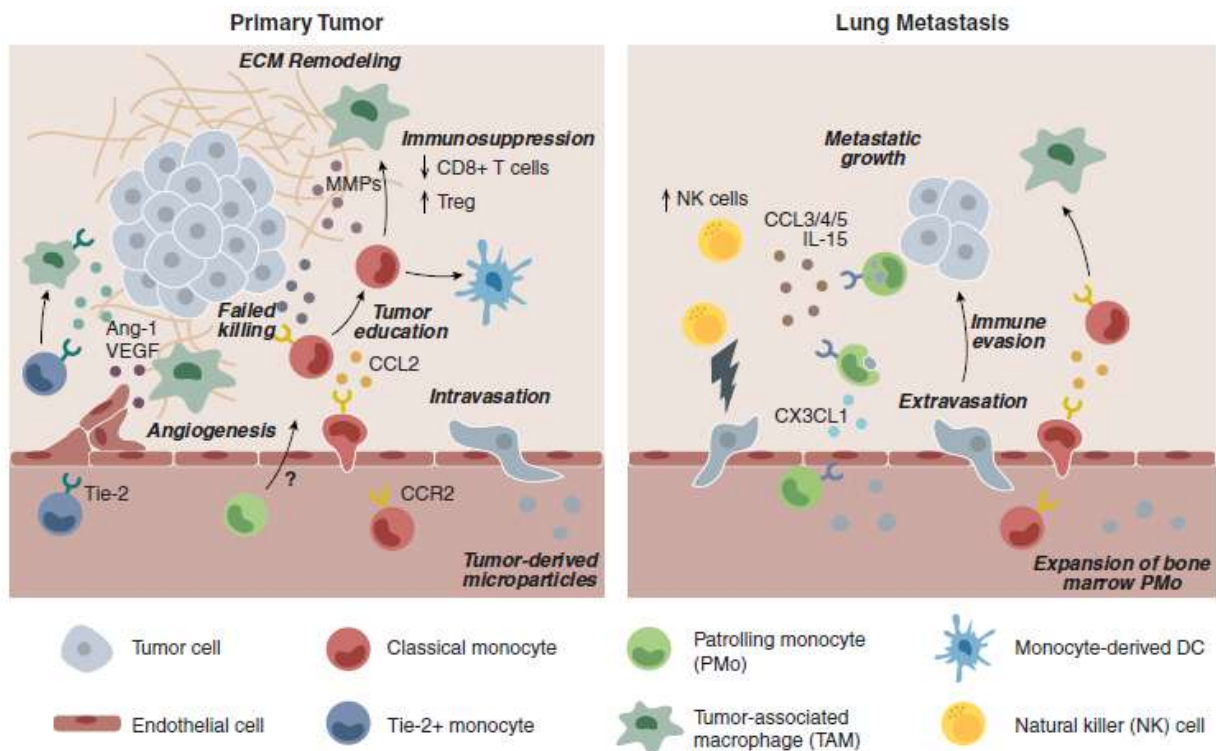
### 1.3.3. Monocytes et microenvironnement tumoral

#### 1.3.3.1. Recrutement des monocytes au site de la tumeur

L'infiltration des MOs circulants dans le microenvironnement tumoral du cancer du sein est assurée par certains facteurs dérivés des tumeurs appelés TDF (*Tumor derived factors*), principalement la chimiokine ligand 2 (CCL-2 ou MCP-1) sécrétée par les cellules cancéreuses ainsi que par certains constituants de microenvironnement tumoral tels que les fibroblastes, les cellules endothéliales et certains leucocytes (Ben-Baruch, 2003; Qiu *et al.*, 2018). D'autres TDF peuvent être aussi impliquées dans le recrutement des MOs, y compris d'autres chimiokines telles que la CCL3, CCL4, CCL5, et CXCL12, ainsi que certains facteurs de croissance y compris, CSF-1 (*colony stimulating factor*), TGF- $\beta$ , VEGF (Sica *et al.*, 2012).

#### 1.3.3.2. Fonctions des monocytes dans le microenvironnement tumoral

Une fois recrutés dans le microenvironnement tumoral, les MOs pourraient jouer un rôle très important dans la régulation de la progression tumorale. Les différents sous-types de ces cellules exercent diverses fonctions effectrices contribuant à la fois à des réponses immunitaires pro- et anti-tumorales, y compris la phagocytose, la sécrétion de médiateurs tumoricides, promotion de l'angiogenèse, recrutement de lymphocytes et différenciation en TAM et CD (Olingy *et al.*, 2019a) (Figure 1.9).



**Figure 1.9. Recrutement et fonctions des sous-types de monocytes dans les tumeurs primaires et les sites métastatiques (Olingy *et al.*, 2019a).** Les MOs classiques s'infiltrent dans les sites tumoraux primaires en réponse à CCL2 où ils sont capables de produire des médiateurs tumorigènes. Les monocytes éduqués par la tumeur se différencient en TAM ou moDC. Les TAM dérivés de monocytes facilitent la tumorigénèse en favorisant la suppression immunitaire (inhibition du recrutement/activités des lymphocytes T CD8+ et le recrutement de Treg), l'angiogénèse et l'intravasation des cellules tumorales dans le système vasculaire. Les monocytes Tie-2+ affichent des fonctions pro-angiogéniques dans les tumeurs primaires, bien que le rôle des monocytes de patrouille non classiques (PMo) dans les tumeurs primaires reste incertain. Dans les sites métastatiques pulmonaires, les monocytes classiques sont recrutés de manière dépendante de CCL2, favorisant l'ensemencement métastatique et ont des effets protumoraux similaires. PMo héberge les métastases tumorales de manière dépendante de CX3CL1/CX3CR1, où elles englobent le matériel tumoral et produisent des chimiokines qui stimulent le recrutement de cellules NK cytotoxiques.

### 1.3.3.2.1. Fonctions anti-tumorales

Les MOs peuvent être impliqués dans les réponses anti-tumorales de l'hôte, en exerçant à la fois une activité cytotoxique importante contre les cellules cancéreuses et en présentant des antigènes tumoraux aux lymphocytes infiltrant la tumeur (Mytar *et al.*, 2003). Ils tuent directement les cellules cancéreuses par phagocytose et par libération de certaines cytokines induisant la mort cellulaire (Olingy *et al.*, 2019a). La sous-population des MOs non classiques constitue les principales MOs sanguins impliqués dans la réponse anti-tumorale, leur activation, suite au contact avec les cellules cancéreuses, conduit à une production accrue de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$  et IL-12), des ROI (intermédiaires réactifs d'oxygène)

et des RNI (intermédiaires réactifs de l'azote), qui sont cytotoxiques pour les cellules cibles (Szaflarska *et al.*, 2004). Ces MOs peuvent aussi induire la mort des cellules cancéreuses via l'expression des molécules TRAIL ou par ADCC (Griffith *et al.*, 1999; Yeap *et al.*, 2016).

### 1.3.3.2.2. Fonctions pro-tumorales

Les MOs classiques exercent principalement un rôle pro-tumoral, leur infiltration dans le site tumoral contribue également à la croissance tumorale, l'angiogenèse et les métastases *via* la libération de certains facteurs tels que le TNF, l'IL-6, le VEGF, l'IL-8 et les MMP (Hanna *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2012). Ces cellules sont aussi recrutées dans les sites métastatiques de cancer du sein *via* la production de CCL-2, où elles favorisent l'extravasation et la survie des cellules cancéreuses (Qian *et al.*, 2011). D'autres types de MOs circulants exprimant Tie-2 [angiopoïétine-2 (Ang-2)] appelés TEM, sont recrutés dans le microenvironnement tumoral où ils induisent l'inhibition de l'apoptose des cellules cancéreuses et l'induction de l'angiogenèse (Canè *et al.*, 2019).

### 1.3.3.2.3. Recrutement des lymphocytes

Les MOs interagissent avec l'immunité adaptative en tant que cellules présentatrices d'antigènes, en induisant le recrutement et l'activation des lymphocytes dans le microenvironnement tumoral (Olingy *et al.*, 2019b). Contrairement aux MOs classiques recrutant les lymphocytes Treg impliqués dans la progression tumorale (Schlecker *et al.*, 2012), les MOs non classiques recrutent les lymphocytes NK vers les sites métastatiques par la sécrétion des chimiokines telles que CCL3, CCL4 et CCL5 (Olingy *et al.*, 2019b) et les activent en libérant l'IL-15, une cytokine déterminante pour l'homéostasie, l'activation et la fonction anti-tumorale des cellules NK, empêchant ainsi les métastases (Jeong *et al.*, 2019). Le recrutement de ces deux sous-populations des MOs dans les tumeurs est associé négativement à l'infiltration des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques (Jung *et al.*, 2017; Lesokhin *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2017).

### 1.3.3.2.4. Différenciation des monocytes en macrophages et CD associés aux tumeurs

Une fois recrutés dans le microenvironnement tumoral, les MOs peuvent se différencier en CD dérivées de MOs (moDC) ou en TAM (Olingy *et al.*, 2019b). Les moDC exercent leur fonction anti-tumorale par la sécrétion des ROS et par l'activation des lymphocytes T cytotoxiques (Pommier *et al.*, 2013). Selon les signaux présents dans le microenvironnement tumoral, les TAM peuvent se polariser soit en type M1 possédant la capacité de favoriser

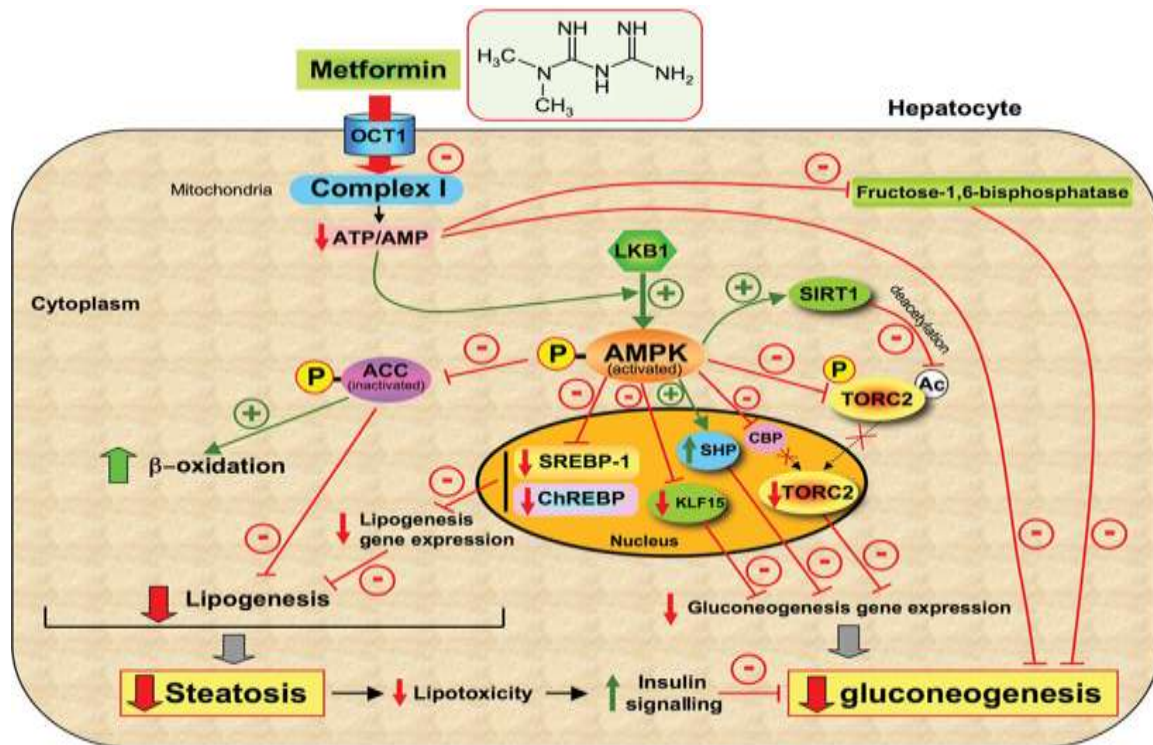
l'activation de l'immunité anti-tumorale par la sécrétion des médiateurs pro-inflammatoires (Biswas and Mantovani, 2010) ou en type M2 caractérisé par la sécrétion des facteurs pro-tumoraux, angiogéniques et immunosuppresseurs (Jayasingam *et al.*, 2019).

### 1.4. Metformine

La MET est un médicament antidiabétique appartenant à la classe des biguanides, couramment utilisé dans le traitement du diabète de type 2. Elle affecte le métabolisme cellulaire en provoquant une altération de l'équilibre énergétique cellulaire et en déclenchant plusieurs effets qui varient en fonction du contexte cellulaire ou environnemental (Sacco *et al.*, 2016).

#### 1.4.1. Metformine comme médicament antidiabétique

La MET exerce son effet anti-hyperglycémiant principalement sur les cellules hépatiques, les myocytes, les adipocytes et les cellules  $\beta$  de Langerhans. Elle agit en inhibant la néoglucogenèse hépatique (Figure 1.10) et en induisant l'absorption de glucose par les muscles squelettiques et les tissus adipeux, ce qui conduit à la réduction des taux circulants de glucose et d'insuline (Gong *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2017). La suppression de la production hépatique de glucose est induite par des voies de signalisation dépendantes et indépendantes d'AMPK (*AMP-activated protein kinase*) (Lv and Guo, 2020). D'une part, la MET inhibe le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, conduisant au blocage de la phosphorylation oxydative et par conséquent entraînant une augmentation des niveaux d'AMP (adénosine monophosphate) nécessaire à l'activation de la voie AMPK via la protéine hépatique kinase B1 (LKB-1), inactivant ainsi l'expression de gènes gluconéogéniques, tels que G6Pase (glucose 6 phosphatase), PEPCCK (phosphoénolpyruvate carboxykinase) et PC (pyruvate carboxylase) (Duca *et al.*, 2015; Lv and Guo, 2020). D'autre part, la MET inhibe la néoglucogenèse de manière indépendante d'AMPK en atténuant le glucagon ou en inhibant directement la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (G3PDH) mitochondriale, entraînant une perturbation de la production de glucose à partir de glycérol et une augmentation du potentiel redox cytosolique (NADH: NAD<sup>+</sup>), qui empêche l'utilisation du lactate pour la néoglucogenèse (Foretz *et al.*, 2019; Lv and Guo, 2020).



**Figure 1.10. Mécanismes moléculaires potentiels de l'action de la metformine sur la gluconéogenèse hépatique** (Viollet *et al.*, 2012). Après absorption hépatique par l'OCT1, les mitochondries sont la principale cible de la MET, exerçant une inhibition spécifique et indépendante de l'AMPK du complexe I de la chaîne respiratoire. La légère diminution résultante de l'état énergétique conduit à une inhibition aiguë et transitoire de la voie gluconéogénique consommatrice d'énergie. De plus, grâce à des points de régulation dépendants et indépendants de l'AMPK, la MET peut conduire à l'inhibition de la production de glucose en perturbant l'expression du gène de la gluconéogenèse. En parallèle, l'activation de l'AMPK dépendante de LKB1 déclenchée par une déplétion en ATP pourrait réduire la lipogenèse hépatique et exercer un effet indirect sur la sensibilité hépatique à l'insuline pour contrôler la production hépatique de glucose.

#### 1.4.2. Liens entre le cancer du sein et le diabète de type 2

Le DT2 est une maladie métabolique associée à plusieurs cancers, y compris le cancer du sein. Elle se caractérise par une hyperglycémie, une résistance à l'insuline et une hyperinsulinémie (Roshan *et al.*, 2019a). Ces facteurs interagissent pour favoriser la prolifération cellulaire grâce à l'effet mitogène du récepteur de l'insuline et des facteurs de croissance de type insuline (IGF), tandis que l'hyperglycémie offre un environnement favorable à la croissance et à la survie des cellules cancéreuses du sein (Figure 1.11) (Flores-López *et al.*, 2016; Roshan *et al.*, 2019a). L'hyperglycémie induit la production des ROS directement via le métabolisme du glucose et l'auto-oxydation, et indirectement par la formation de produits finaux de glycation avancée (AGE) et de leur liaison aux récepteurs RAGE (Ferroni *et al.*, 2015). Des niveaux élevés de ROS peuvent conduire à des mutations de

l'ADN cellulaire via l'activation des molécules de signalisation telles que la NF- $\kappa$ B et la transcription des gènes codant pour des cytokines inflammatoires, et par conséquent, entraînant l'initiation et la progression de la carcinogenèse (Duan *et al.*, 2014; Ferroni *et al.*, 2015). L'hyperinsulinémie et la résistance à l'insuline favorisent potentiellement la progression tumorale (Ryu *et al.*, 2014). L'insuline stimule la survie et la prolifération des cellules tumorales via le récepteur de l'insuline (IR), en activant les voies de signalisation PI3K/AKT and MAPK (Senapati *et al.*, 2019).

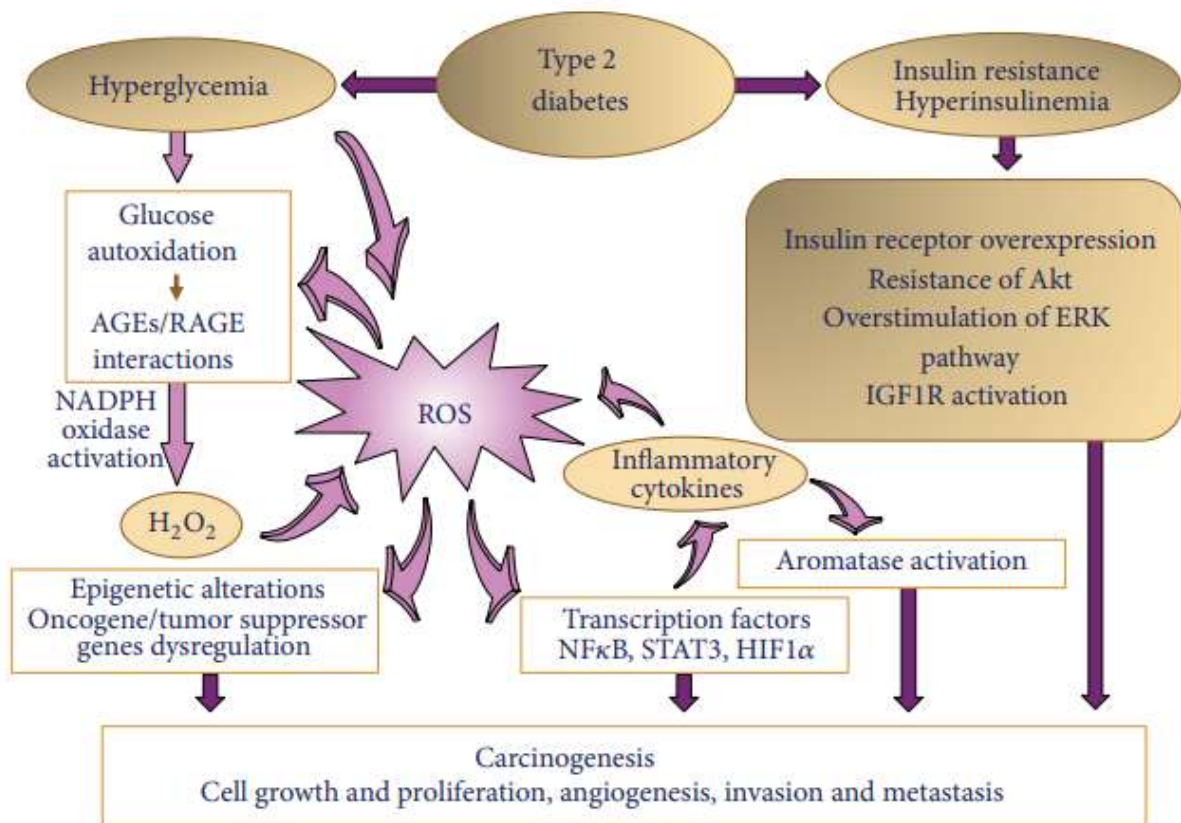


Figure 1.11. Liens entre le cancer et le diabète de type 2 (Ferroni *et al.*, 2015).

### 1.4.3. Metformine et cancer du sein

Plusieurs études précliniques, cliniques (De and Kuppusamy, 2020) et *in vitro* (Faria *et al.*, 2019a) ont montré l'effet anti-tumoral de la MET sur le cancer du sein. Cet effet est obtenu via divers mécanismes notamment le blocage du cycle cellulaire, l'induction du stress oxydatif (Roshan *et al.*, 2019b), l'activation de l'AMPK, l'inhibition de mTOR (De and Kuppusamy, 2020), la modulation de la respiration mitochondriale et l'induction de l'apoptose ou l'autophagie des cellules cancéreuses (S. Wahdan-Alaswad and D. Thor, 2020). En outre,



la MET sensibilise les cellules cancéreuses du sein aux agents chimio-thérapeutiques (Zi *et al.*, 2017).

### 1.4.4. Mécanismes antinéoplasiques de la metformine

La MET exerce ses effets anti-tumoraux via son action indirecte (systémique) en réduisant les taux sanguins de glucose et d'insuline, ou par son action directe sur les cellules cancéreuses en inhibant certaines voies de signalisation impliquées dans la survie et les métastases (Del Barco *et al.*, 2011) (Figure 1.12).

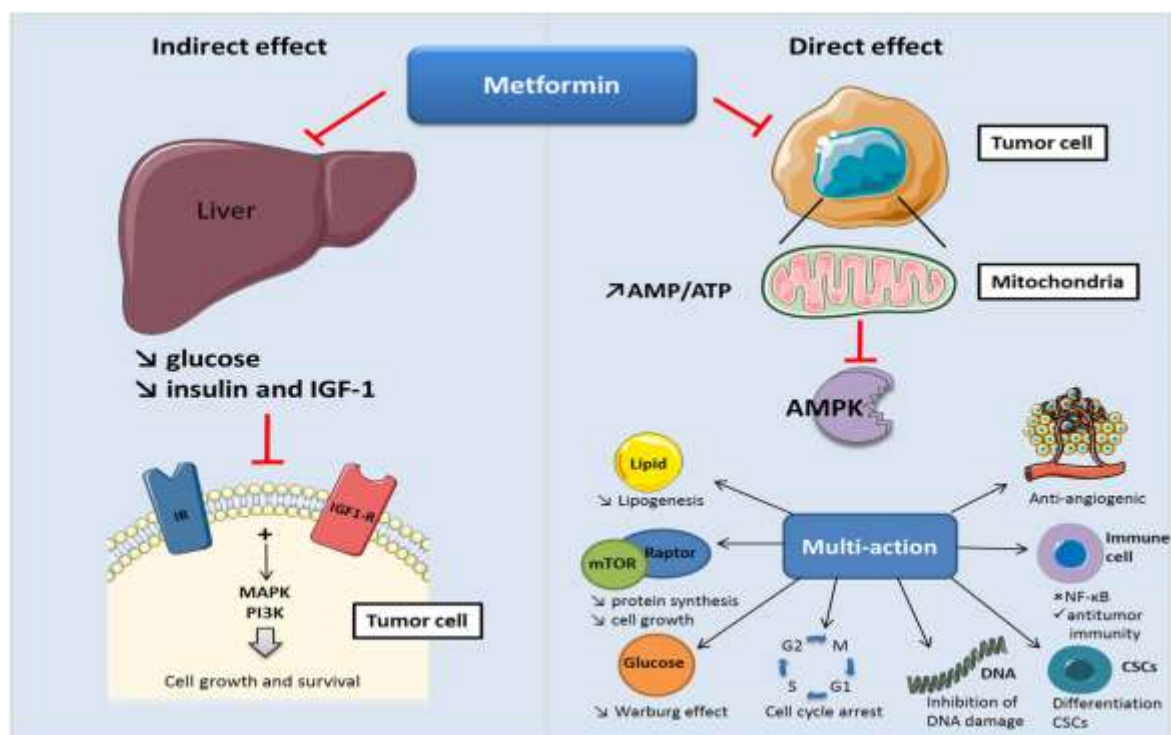


Figure 1.12. Les activités anti-tumorales de la metformine (Daugan *et al.*, 2016).

#### 1.4.4.1. Effets indirects

L'insuline est considérée comme un facteur de croissance impliqué dans la survie et la prolifération des cellules cancéreuses. La MET exerce ses effets systémiques indirects en inhibant la néoglucogenèse hépatique. L'activation d'AMPK entraîne une suppression de l'activité des deux enzymes clés impliqués dans la synthèse du glucose : la glucose-6-phosphatase et la glucokinase, ce qui conduit à l'absorption de glucose par le muscle squelettique et réduisant ainsi le taux de glucose et d'insuline (Daugan *et al.*, 2016). La MET inverse l'effet Warburg en réduisant systématiquement la production des facteurs de croissance tels que, le glucose, l'insuline, l'IGF-1 (*Insulin-like growth factor-1*) et la leptine,

inhibant finalement la synthèse des protéines et la prolifération des cellules cancéreuses (Zhang and Guo, 2016).

### 1.4.4.2. Effets directs sur les cellules cancéreuses

Les mécanismes d'action moléculaires directs de la MET peuvent être dépendants ou indépendants de l'activation de l'AMPK.

#### 1.4.4.2.1. Mécanismes d'action dépendants de l'AMPK

La MET perturbe le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses par inhibition de complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, ce qui conduit à une réduction du taux de ROS et une augmentation du rapport AMP/ATP, qui à son tour affecte directement la prolifération et l'apoptose des cellules cancéreuses via l'activation de la voie LBK1-AMPK (Zhang and Guo, 2016). Cette voie de signalisation est impliquée dans la régulation d'un certain nombre de processus physiologiques, y compris la  $\beta$ -oxydation des acides gras, la lipogenèse, la synthèse des protéines et du cholestérol, ainsi que l'inhibition du cycle cellulaire et induction d'apoptose (Brown *et al.*, 2013).

##### 1.4.4.2.1.1. Effet sur le métabolisme

Plusieurs mécanismes moléculaires sont impliqués par les cellules cancéreuses afin de modifier leur métabolisme, y compris l'augmentation de production d'énergie, la biosynthèse des macromolécules et le maintien d'un statut redox cellulaire approprié (Cairns *et al.*, 2011). Les cellules cancéreuses présentent un métabolisme altéré qui favorise la glycolyse comme source d'énergie par rapport à la phosphorylation oxydative, même en présence d'O<sub>2</sub> (Pernicova and Korbonits, 2014). Il a été montré que la MET active l'AMPK, ce qui conduit à l'inversion de l'effet Warburg en diminuant la glycolyse via l'inhibition d'activité d'héxokinase 2 (HK2) et en augmentant la phosphorylation oxydative, ce qui conduit à la suppression de la croissance tumorale (Daugan *et al.*, 2016; Faubert *et al.*, 2013). L'activation de la voie AMPK entraîne aussi l'inhibition de mTOR (*mammalian target of rapamycin*), perturbant la synthèse des protéines et, par conséquent, la prolifération des cellules tumorales (Pernicova and Korbonits, 2014). En plus de ces effets, La MET affecte négativement la biosynthèse des lipides et des stérols via l'activation d'AMPK, en inhibant certaines enzymes telles que l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), l'acide gras synthase (FAS) et la HMG-CoA réductase (hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A réductase), conduisant à une diminution de

la production de nouvelles membranes cellulaires, essentielles à la progression du cycle cellulaire et à la prolifération tumorale (Daugan *et al.*, 2016; Faria *et al.*, 2019b).

### 1.4.4.2.1.2. Inhibition du cycle cellulaire

La progression du cycle cellulaire est souvent modifiée dans les cellules cancéreuses, permettant une régulation aberrante de la division cellulaire et de la réplication de l'ADN (Sacco *et al.*, 2016). L'activation de l'AMPK par la MET induit la phosphorylation de la protéine p53 au niveau de Ser15 (sérine15), et conduit à l'arrêt du cycle cellulaire, l'autophagie, l'apoptose et la sénescence cellulaire (Daugan *et al.*, 2016; Zhang and Guo, 2016). La MET peut induire aussi un arrêt en phase G1 du cycle cellulaire en inhibant l'expression de la protéine cycline D1, conduisant à une perte de prolifération (Alimova *et al.*, 2009).

### 1.4.4.2.1.3. Inhibition de l'angiogenèse

La MET exerce ses effets anti-angiogéniques via l'activation d'AMPK en diminuant certains médiateurs pro-angiogéniques et inflammatoires tels que VEGF, PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*), TNF $\alpha$  et NF- $\kappa$ B (Dallaglio *et al.*, 2014; Daugan *et al.*, 2016), réduisant par la suite les formes solubles des molécules d'adhésion ICAM-1, VCAM-1 et E-sélectine, ainsi que l'expression des MMP impliquées dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (Dallaglio *et al.*, 2014).

### 1.4.4.2.1.4. Effet sur l'inflammation et l'immunité

La MET peut également cibler certains composants inflammatoires présents dans le microenvironnement de la plupart des tissus néoplasiques, conduisant à la réduction de la tumeur (Viollet *et al.*, 2012). L'activation de l'AMPK par la MET peut inhiber les voies pro-inflammatoires en désactivant la voie de signalisation NF- $\kappa$ B, qui joue un rôle important dans l'initiation et la promotion de la carcinogenèse (Zhao *et al.*, 2020). Cette inhibition s'accompagne par l'inhibition de la synthèse de nombreuses cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-6, l'IL-8 et le VEGF par plusieurs types de cellules, y compris les macrophages (Daugan *et al.*, 2016). Il a été rapporté que l'effet anti-tumoral de la MET sur les cellules cancéreuses du sein a été également associé à l'inhibition de la polarisation pro-tumorale des macrophages de type M2 (Ding *et al.*, 2015a). La MET permet de renforcer l'effet anti-tumoral des CTL infiltrant dans le microenvironnement de la tumeur (Ma *et al.*, 2020).

### 1.4.4.2.2. Mécanismes d'action indépendants de l'AMPK

La MET peut inhiber la progression tumorale indépendamment de l'AMPK, par l'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B nécessaire à la transformation et la formation des cellules souches cancéreuses (Roshan *et al.*, 2019b), l'inhibition de mTORC1 à travers Rag GTPase (Faria *et al.*, 2019a) et par le blocage de la phosphorylation de STAT3 conduisant ainsi à l'apoptose (S. Wahdan-Alaswad and D. Thor, 2020). La MET peut également altérer le métabolisme des folates dans plusieurs lignées cellulaires du cancer du sein provoquant une inhibition de la réplication d'ADN (Hatoum and McGowan, 2015). En outre, ce médicament interfère avec l'expression de plusieurs miARNs (microARNs) qui modulent l'activité de diverses molécules impliquées dans la survie et la prolifération des cellules cancéreuses (Pulito *et al.*, 2017; Wahdan-Alaswad *et al.*, 2014).

### 1.5. Problématique et objectifs

#### 1.5.1. Problématique

Le cancer du sein récemment considéré comme tumeur immunogène, est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué et l'une des principales causes de mortalité dans le monde. Le microenvironnement entourant les cellules cancéreuses du sein joue un rôle important dans le contrôle de la croissance et la progression du cancer. Il contient plusieurs types de cellules inflammatoires, y compris les MOs. Selon leur plasticité phénotypique fonctionnelle, les MOs peuvent être ciblés par plusieurs molécules thérapeutiques qui les orientent vers des cellules tueuses pro-inflammatoires/anti-tumorales. Il est bien connu que l'insuline joue un rôle critique dans la régulation de la prolifération cellulaire. L'amélioration de la sensibilité à l'insuline par la MET (médicament antidiabétique prescrit aux patients atteints de DT2) entraîne une inhibition de la croissance tumorale et un arrêt du cycle cellulaire *via* l'inhibition de certaines voies de signalisation, y compris celles impliquant le phosphoinositol-3-kinase (PI3K) et Akt. Dans cette optique, nous avons évalué les effets de la MET sur les activités fonctionnelles phénotypiques globales des MOs autologues au cours de leur crosstalk avec les cellules cancéreuses du sein (ER-/PR-/HER2+).

#### 1.5.2. Objectif

Evaluer les effets de la MET sur les activités fonctionnelles phénotypiques globales des MOs autologues au cours de leur crosstalk avec les cellules cancéreuses du sein (ER-/PR-/HER2+).

#### 1.5.3. But

Montrer que la MET pourrait jouer un rôle immunomodulateur sur les activités fonctionnelles phénotypiques globales des MOs autologues au cours de leur crosstalk avec les cellules cancéreuses du sein (ER-/PR-/HER2+).

## **Chapitre 2. La metformine inverse partiellement l'effet inhibiteur de la co-culture des cellules cancéreuses du sein ER-/PR-/HER2+ sur les biomarqueurs de l'activité antitumorale des monocytes**

---

### **Chapitre 2**

La metformine inverse partiellement l'effet inhibiteur de la co-culture des cellules cancéreuses du sein ER-/PR-/HER2+ sur les biomarqueurs de l'activité anti-tumorale des monocytes, « Metformin partially reverses the inhibitory effect of co-culture with ER-/PR-/HER2+ breast cancer cells on biomarkers of monocyte antitumor activity »

<b>2.1. Matériels et méthodes</b>	<b>35</b>
<b>2.2. Résultats</b>	<b>43</b>
<b>2.3. Discussion</b>	<b>49</b>

## Chapitre 2. La metformine inverse partiellement l'effet inhibiteur de la co-culture des cellules cancéreuses du sein ER-/PR-/HER2+ sur les biomarqueurs de l'activité antitumorale des monocytes

Ce travail fait l'objet d'une publication internationale auprès d'un journal de spécialité avec comité de lecture spécialisé, *PLOS ONE*.

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

### Metformin partially reverses the inhibitory effect of co-culture with ER-/PR-/HER2+ breast cancer cells on biomarkers of monocyte antitumor activity

Zohair Dahmani<sup>1</sup>, Lynda Addou-Klouche<sup>1</sup>, Florence Gizard<sup>2</sup>, Sara Dahou<sup>1</sup>, Aïda Messaoud<sup>1</sup>, Nihel Chahinez Djebri<sup>1</sup>, Mahmoud Idris Benaiseti<sup>1</sup>, Meriem Mostefaoui<sup>1</sup>, Hadjer Torbecho<sup>1</sup>, Wafa Nouaiti<sup>1</sup>, Marwa Millani<sup>1</sup>, Gérard Letranco<sup>3</sup>, Anne Fernandez<sup>2</sup>, Ned J. Lamb<sup>3</sup>, Mourad Arbib<sup>1</sup>\*

**1** Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, W04-14-100, University of Tiemcen, Tiemcen, Algeria, **2** Cell Biology Unit, IGH-CNRS, Université de Montpellier, (UMR 9002), Montpellier, France, **3** IGH, UMR 9002 CNRS-Université de Montpellier, Montpellier, France

\* [mourad.arbib@univ-tlemcen.dz](mailto:mourad.arbib@univ-tlemcen.dz), [z.dahmani@univ-tlemcen.dz](mailto:z.dahmani@univ-tlemcen.dz), [m.arbib@univ-tlemcen.dz](mailto:m.arbib@univ-tlemcen.dz)(MA), [ned.lamb@igh.cnrs.fr](mailto:ned.lamb@igh.cnrs.fr)(NL)



#### OPEN ACCESS

**Citation:** Dahmani Z, Addou-Klouche L, Gizard F, Dahou S, Messaoud A, Chahinez Djebri N, et al. (2020) Metformin partially reverses the inhibitory effect of co-culture with ER-/PR-/HER2+ breast cancer cells on biomarkers of monocyte antitumor activity. *PLOS ONE* 15(10): e0240582. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240582>

**Editor:** Salvatore V. Fazio, Duke University School of Medicine, UNITED STATES

**Received:** April 23, 2020

**Accepted:** October 6, 2020

**Published:** October 27, 2020

**Copyright:** © 2020 Dahmani et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was funded by the Thematic Research Agencies ATRBSA and ATRSS (Nigeria) and the Directorate General of Scientific Research and Technological Development (DGRSDT, Direction Générale de la Recherche Scientifique et du Développement Technologique, MESRS, Algeria) for financial support to ZD, LAK, SD, AM.

#### Abstract

##### Background

Immune activities of monocytes (MOs) can be altered within the microenvironment of solid malignancies, including breast cancer. Metformin (1,1-dimethylbiguanide hydrochloride, MET), has been shown to decrease tumor cell proliferation, but its effects have yet to be explored with respect to MOs (monocytes) activity during their crosstalk with breast cancer cells. Here, we investigated the effects of MET on overall phenotypic functional activities, including cellular immune metabolism and protective redox signaling based biomarkers, intracellular free calcium ions ( $\mu\text{Ca}^{2+}$ ), phagocytosis and co-operative cytokines (IFN- $\gamma$  and IL-10) of autologous MOs before and during their interplay with primary ER-/PR-/HER2+ breast cancer cells.

##### Methods

Human primary breast cancer cells were either cultured alone or co-cultured with autologous MOs before treatment with MET.

##### Results

MET downregulated breast cancer cell proliferation and phagocytosis, while having no significant effect on the ratio of phosphorylated Akt (p-Akt) to total Akt. Additionally, we observed that, in the absence of MET treatment, the levels of lactate dehydrogenase (LDH)-based cytotoxicity, catalase,  $\mu\text{Ca}^{2+}$ , IL-10 and arginase activity were significantly reduced in co-cultures compared to levels in MOs cultured alone whereas levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity were significantly increased. In contrast, MET treatment reduced the effects measured in co-culture on the levels of LDH-based cytotoxicity, arginase activity, catalase,  $\mu\text{Ca}^{2+}$ , and IFN- $\gamma$ . MET also induced upregulation of both iNOS and

PLOS ONE | <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240582> October 27, 2020

1 / 19

**Bureau éditorial :** <https://journals.plos.org/plosone/static/editorial-board>

**Editeur en chef :** Joerg Heber.

**Abstracting and indexing:**

1. PubMed
2. MEDLINE
3. PubMed Central
4. Scopus
5. Google Scholar
6. the Chemical Abstracts Service (CAS)
7. EMBASE
8. AGRICOLA
9. PsycINFO
10. Zoological Records
11. GeoRef
12. RefAware

## Chapitre 2. La metformine inverse partiellement l'effet inhibiteur de la co-culture des cellules cancéreuses du sein ER-/PR-/HER2+ sur les biomarqueurs de l'activité antitumorale des monocytes

### 2.1. Matériels et méthodes

#### 2.1.1. Conception de l'étude

Les cellules épithéliales cancéreuses ont été isolées à partir de tumeurs issues de cancer du sein, et co-cultivées avec des MOs autologues isolés à partir des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*). Dans un premier temps, les cellules tumorales ont été cultivées seules pour vérifier les effets de la MET sur la prolifération et la viabilité en utilisant BrdU (Bromodeoxyuridine [5-bromo-2'-deoxyuridine]) et le test d'exclusion au bleu Trypan (TBET, *Trypan Blue Exclusion Test*), respectivement, et sur les ratios p-Akt/Akt. De même, les MOs ont été cultivés seuls pour le test phagocytaire. Dans un second temps, la cytotoxicité à base de LDH, l'activité protectrice redox, l'activité catalase, l'activité SOD, libération de cytokines coopératives 'la cytokine anti-tumorale IFN- $\gamma$ ' et 'la cytokine immunosuppressive/régulatrice IL-10', les activités iNOS et arginase, et les niveaux d' $Ca^{2+}$  ont été mesurées dans les MOs cultivés seuls et co-cultivés avec des cellules cancéreuses du sein. Toutes les expériences ont été répétées quatre fois (figure 2.1).

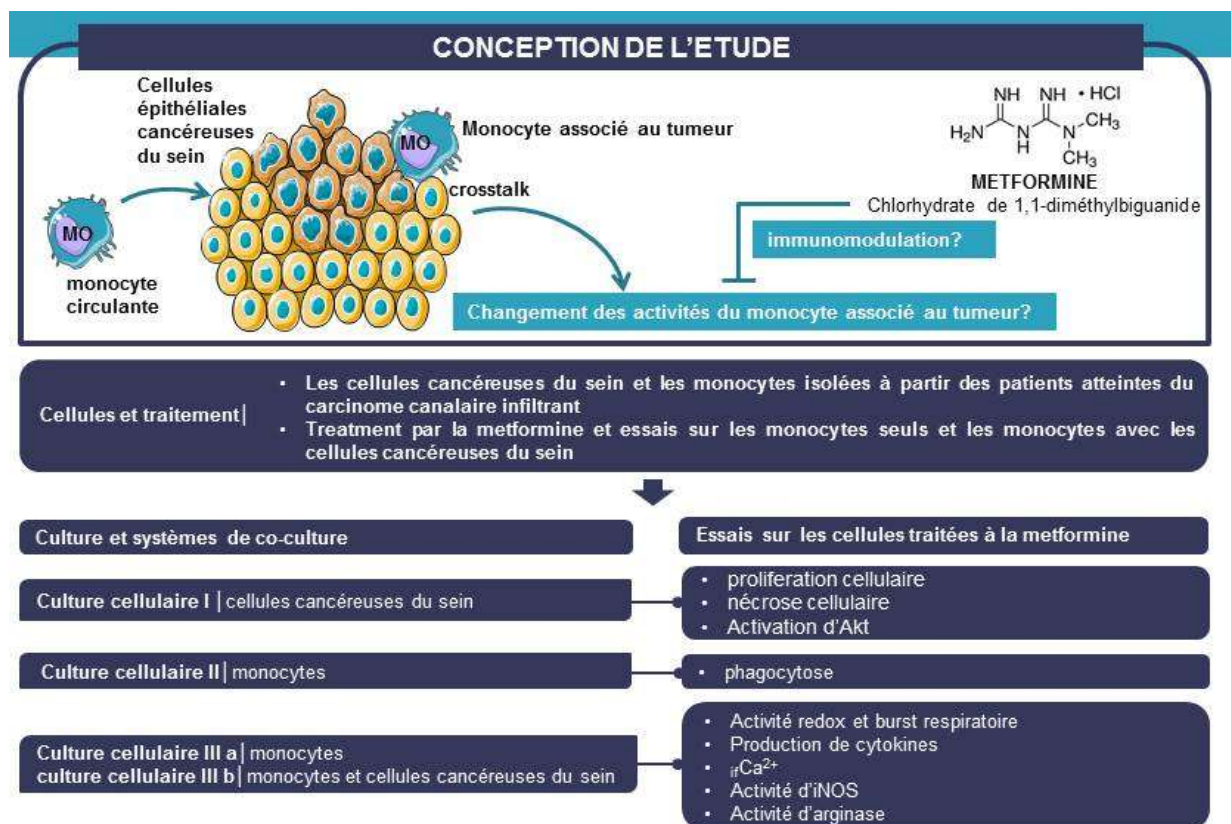


Figure 2.1. Organigramme de l'étude.



## **Chapitre 2. La metformine inverse partiellement l'effet inhibiteur de la co-culture des cellules cancéreuses du sein ER-/PR-/HER2+ sur les biomarqueurs de l'activité antitumorale des monocytes**

---

### **2.1.2. Echantillons cellulaires**

Les échantillons de tissus tumoraux primaires et de sang périphérique autologue ont été collectés au niveau du service de chirurgie du centre hospitalo-universitaire de Tlemcen (Algérie), sur trois patientes nouvellement diagnostiquées pour un cancer du sein caractérisé par la surexpression du facteur de croissance épidermique humain (HER2) et l'absence d'expression des récepteurs hormonaux ER et PR (récepteurs de l'œstrogène et de la progestérone). L'âge des patientes était compris entre 50 et 60 ans. Les patientes n'avaient pas encore bénéficié de traitement, et cette étude a été réalisée avec leur consentement éclairé. Le sang périphérique des patientes a été collecté dans des tubes héparinés (BD, Belliver Industrial Estate, UK). L'homogénéité des échantillons de biopsies et l'absence des variations inter-tumorales pour chaque tumeur destinée aux analyses expérimentales ont été vérifiées macroscopiquement à travers des examens anatomopathologiques approfondis, et par des examens basés sur la morphologie cellulaire et des analyses immunohistochimiques. Tous les échantillons de tumeurs sont des carcinomes mammaires invasifs de grade 2 classés comme pT2N0. L'étude actuelle a été approuvée par le Comité d'éthique local de l'Université de Tlemcen, conformément à la Déclaration d'Helsinki.

### **2.1.3. Isolement des cellules adhérentes épithéliales tumorales du sein**

Après élimination des tissus sains entourant le tissu tumoral, les cellules épithéliales mammaires tumorales (se présentant comme des carcinomes canauxaires infiltrants) ont été isolées à partir des échantillons tumoraux primaires par une digestion enzymatique et centrifugation différentielle selon Feller *et al.* et Speirs *et al.* (Feller *et al.*, 1972; Speirs *et al.*, 1998) avec quelques modifications. Brièvement, les échantillons de tissus tumoraux ont été rincés une fois par du PBS 1X (*phosphate saline buffer*), placés dans des boîtes de Pétri stériles et découpés en petits morceaux de 2 mm à l'aide d'un scalpel stérile. Les morceaux de tissu tumoral ont été incubés dans une solution de collagénase 0.1 % à 37°C pendant 12-20 heures. Après digestion enzymatique, les mélanges cellulaires ont été centrifugés à 40 x g pendant 1 min et les surnageants ont été transférés dans des nouveaux tubes puis centrifugés à 100 x g pendant 2 min afin d'obtenir un culot représentant les cellules épithéliales tumorales.

## **Chapitre 2. La metformine inverse partiellement l'effet inhibiteur de la co-culture des cellules cancéreuses du sein ER-/PR-/HER2+ sur les biomarqueurs de l'activité antitumorale des monocytes**

---

### **2.1.4. Culture cellulaire**

Les cellules épithéliales cancéreuses ont été rincées avec du milieu RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (FCS) et 50 µg/ml de gentamycine, par centrifugation à 40 x g pendant 5 minutes. Le culot cellulaire a été mis dans 10 mL de RPMI-1640 supplémenté avec 10% de FCS et 50 µg/mL de gentamycine puis subdivisé en deux flasques de cultures qui ont été ensuite incubés dans une atmosphère humide à 37°C et 5 % de CO<sub>2</sub>. La contamination par les fibroblastes a été éliminée à partir des cellules cancéreuses par trypsinisation différentielle (Jones, 2008). Le milieu de culture devait être changé tous les 2-5 jours (Farnie *et al.*, 2007). Lorsque les cellules arrivent à environ 80% de confluence, elles sont trypsinées par passage dans une solution contenant 0,25% de trypsine-EDTA (acide éthylènediamine tétraacétique) (Benton *et al.*, 2015).

### **2.1.5. Isolement des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC)**

Les échantillons du sang ont été dilués (1:1) avec du PBS et déposés sur de l'hystopaque-1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA) et centrifugés à 400 x g pendant 30 minutes. Les PBMC présentes dans la bande d'interface ont été récupérées puis lavées deux fois avec de PBS. Les culots cellulaires ont été mis en suspension avec 1 mL de RPMI-1640 supplémenté avec 10% de FCS et 50 µg/ml de gentamycine pour le comptage cellulaire. La viabilité cellulaire a été évaluée par le test TBET en utilisant le microscope photonique (Zeiss, Allemagne).

### **2.1.6. Isolement des monocytes**

Les MOs ont été isolés à partir des PBMCs par adhérence à des surfaces en plastique (Zheng *et al.*, 2012). Brièvement, 2 x 10<sup>6</sup> de PBMCs/mL ont été mises en culture dans du RPMI-1640 supplémenté avec 10% de FCS et 50 µg/mL de gentamycine dans une plaque à 24 puits à fond plat. Après 2 heures d'incubation à 37°C dans une atmosphère humide à 5 % de CO<sub>2</sub>, les cellules non adhérentes ont été éliminées et les MOs adhérents ont été traités par la MET. Les cellules ont été comptées au microscope (Zeiss, Allemagne) à l'aide d'un marquage au bleu de trypan et la pureté des MOs a été évaluée par un marquage fluorescent avec l'anticorps *PhycoErytherin* (PE)-anti-human CD14 (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) en utilisant une station d'imagerie Fluid Cell (Thermo Fisher Scientific, MA USA) (Pabst *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2012).

## **Chapitre 2. La metformine inverse partiellement l'effet inhibiteur de la co-culture des cellules cancéreuses du sein ER-/PR-/HER2+ sur les biomarqueurs de l'activité antitumorale des monocytes**

---

### **2.1.7. Culture cellulaire et Systèmes de co-culture**

Après le détachement des cellules par la trypsine-EDTA (Sarvaiya and Lazar, 2016), les cellules cancéreuses du sein ont été comptées avant d'être cultivées seules ou co-cultivées avec un nombre égal de MOs ( $2 \times 10^5$  cellules/mL) à un ratio de (1:1) dans du RPMI-1640 supplémenté avec 10 % de FCS et 50 µg/mL de gentamycine.

### **2.1.8. Traitement par la metformine**

Les MOs, les cellules cancéreuses du sein ou les MOs co-cultivés avec les cellules cancéreuses du sein ont été traités pendant 24 h avec du milieu frais contenant ou non de la MET à une dose de 2,5 mM.

### **2.1.9. Test de viabilité cellulaire**

L'effet du traitement par la MET sur la viabilité des cellules cancéreuses était basé sur le test TBET. Les cellules cancéreuses du sein ( $2 \times 10^5$  cellules/puit) ont été cultivées une nuit dans une plaque à 24 puits à fond plat dans une atmosphère humide à 37°C et 5 % de CO<sub>2</sub> pour qu'elles adhèrent. Après l'incubation, le milieu de culture a été remplacé par un milieu de culture RPMI-1640 contenant de la MET, puis incubé pendant 24 heures. Les cellules cancéreuses ont été lavées une fois avec du PBS 1X puis trypsinées afin de dénombrer le nombre des cellules mortes et vivantes par le test TBET.

### **2.1.10. Test de prolifération cellulaire**

La prolifération cellulaire a été mesurée via l'incorporation de BrdU en utilisant le kit commercial selon les instructions du fabricant (ab126556-BrdU Cell Proliferation kit). Brièvement, les cellules cancéreuses du sein ( $2 \times 10^5$  cellules/mL) ont été traitées par la MET dans des plaques à 96 puits pendant 24 h à 37°C dans une atmosphère humide à 5 % de CO<sub>2</sub>. Ensuite, 20 µL de 1 X BrdU dilués ont été ajoutés dans chaque puits et les cellules ont été incubées pendant une nuit. Les cellules ont été fixées et l'incorporation de BrdU a été détectée en utilisant un anticorps monoclonal anti-BrdU pendant une heure à température ambiante avant incubation avec anticorps secondaire de chèvre (IgG anti-souris) conjugué à la peroxydase. La couleur de la réaction a été développée en utilisant de la tétraméthylbenzidine (TMB) comme un substrat de la peroxydase et l'incorporation de BrdU a été mesurée à 450 nm en utilisant un lecteur ELISA (Biochrom Anthos 2020, Cambridge, UK).

## **Chapitre 2. La metformine inverse partiellement l'effet inhibiteur de la co-culture des cellules cancéreuses du sein ER-/PR-/HER2+ sur les biomarqueurs de l'activité antitumorale des monocytes**

---

### **2.1.11. Analyse par *Western blotting***

Après 24 heures d'incubation, des cellules cancéreuses du sein, traitées ou non par la MET, ont été lavées avec du PBS et lysées en utilisant le triton X-100. Les protéines présentes en quantités égales dans les lysats cellulaires ont été rapidement diluées avec un tampon d'échantillon SDS (dodécyl-sulfate de sodium) (Tris-HCL 50 mM pH 6,8, DTT (dithiothréitol) 2 mM, SDS 1,0%), et chauffées 5 minutes à 100°C dans un bain-marie. Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dodécyl-sulfate de sodium à 10% (SDS-PAGE). Les concentrations de protéines n'ont pas été déterminées avant la réduction et la dénaturation pour minimiser le risque de déphosphorylation des protéines. Après séparation, les protéines ont été transférées sur des membranes de nitrocellulose et ont été visualisées par coloration au rouge Ponceau. Par la suite, les membranes ont été saturées avec 5% de lait ou 5% de BSA (bovine serum albumin) pendant 45 minutes à température ambiante et incubées pendant une nuit à 4°C avec des anticorps primaires contre : p-Akt (Ser473) (1/1000), Akt-1 (2H10) (1/1000), Akt-2 (5B5) (1/1000) (Cell Signaling Technology Denver, MA, USA). Des IgG anti-souris et des IgG anti-lapin conjugués à de la peroxydase de raifort (HRP) ont été utilisés comme anticorps secondaires pendant 1 heure à la température ambiante. La révélation se fait par chimioluminescence (Amersham Pico) en utilisant un film radiographique. L'analyse quantitative des signaux des films scannés a été réalisée en utilisant Imgcalc2, un logiciel unix développé en interne (IGH, Montpellier) pour quantifier les pixels sur des images numériques. Les résultats de la figure 2c sont représentés sous forme de rapport au signal dans la coloration au rouge Ponceau pour corriger les différences de charge totale en protéines avec les niveaux de MET à la dose 0 fixés à 1.

### **2.1.12. Essai sur la phagocytose**

Le dosage de la capacité phagocytaire a été réalisé comme décrit précédemment (Aribi *et al.*, 2015; Nouari *et al.*, 2016; Herrera *et al.*, 2017). Brièvement, un nombre égal à  $2 \times 10^5$  de MOs ont été infectés par *Staphylococcus aureus* à une MOI (*multiplicity of infection*) de 50 dans une plaque à 24 puits, et incubés pendant 1 heure avec la MET à 37°C et 5 % de CO<sub>2</sub>. Le nombre des bactéries viables a été déterminé par une série de dilutions et comptages d'unités formant des colonies (UFC) sur un milieu Chapman. Le pourcentage de phagocytose a été calculé comme suit :

## **Chapitre 2. La metformine inverse partiellement l'effet inhibiteur de la co-culture des cellules cancéreuses du sein ER-/PR-/HER2+ sur les biomarqueurs de l'activité antitumorale des monocytes**

---

$$\text{Phagocytose \%} = \text{Mt0} - 100 \times \frac{\left( \frac{\text{NEC}}{\text{NC 1/NC 0}} \right)}{\text{Mt0}}$$

Mt0 est le nombre des bactéries dans le mélange à t0, NEC est le nombre des bactéries extracellulaires dans le mélange à t1, NC0 et NC1 correspondent aux échantillons de contrôle à t0 et t1.

### **2.1.13. Détermination de l'activité de l'arginase**

L'activité enzymatique de l'arginase (EC 3.5.3.1) a été évaluée dans les lysats cellulaires par la détermination des taux d'urée après hydrolyse de L-arginine comme précédemment décrit (Sharda *et al.*, 2011). L'activité de l'arginase a été exprimée en mU d'urée/mg de protéines/1 heure.

### **2.1.14. Détermination de l'activité d'iNOS**

La mesure de l'activité iNOS était basée sur la détermination des niveaux de génération du NO. L'accumulation de NO dans les surnageants de cultures cellulaires a été évaluée par la mesure de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en tant que produit final stable de NO, en utilisant une réaction colorimétrique sensible de Griess comme décrit en détail (Aribi, 2018; Kavooosi *et al.*, 2006). L'absorbance a été mesurée à 540 nm en utilisant un lecteur de plaques ELISA (Biochrom Anthos 2020, Cambridge, UK). Les niveaux de production de NO ont été calculés par comparaison avec une courbe standard de nitrite de sodium (NaNO<sub>2</sub>) (Blond *et al.*, 2000). L'activité iNOS a été obtenue en normalisant chaque concentration de NO en milligrammes de protéine et exprimée en picomoles/mg de protéine/30 min.

### **2.1.15. Evaluation de la nécrose cellulaire**

Les niveaux de cytotoxicité à base de LDH ont été déterminés par l'évaluation de la libération de LDH dans les surnageants de cultures cellulaires en utilisant le kit d'analyse de l'activité de lactate déshydrogénase (MAK066, Sigma-Aldrich). Brièvement, un mélange de 50 µL de surnageant et 50 µL de Master Reaction Mix a été ajouté dans chaque puits d'une plaque à 96 puits. L'absorbance a été mesurée à 450 nm après 30 minutes d'incubation à 37°C conformément aux instructions du fabricant.

## **Chapitre 2. La metformine inverse partiellement l'effet inhibiteur de la co-culture des cellules cancéreuses du sein ER-/PR-/HER2+ sur les biomarqueurs de l'activité antitumorale des monocytes**

---

### **2.1.16. Signalisation calcique : mesure du niveau des ions calcium divalents libres**

Les concentrations d' $Ca^{2+}$  ont été mesurées biochimiquement sur la base de la méthode l'orthocrésolphtaléine complexone (oCPC) comme précédemment décrit (Takano *et al.*, 2012).

### **2.1.17. Mesure des taux des cytokines**

Les concentrations de cytokine anti-tumorale (IFN- $\gamma$ ) et immunosuppressive (IL-10) dans les surnageants de milieu de culture des MOs ou de système de co-culture ont été mesurées par une technique ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) de type sandwich, en utilisant des kits commerciaux respectifs (BD Biosciences), selon les instructions du fabricant. Les densités optiques (DO) ont été mesurées à 450 nm en utilisant des courbes standard appropriées pour chaque cytokine.

### **2.1.18. Evaluation de l'activité protectrice redox**

L'activité protectrice redox a été évaluée par la détermination des niveaux d'activités de catalase et de SOD.

#### **2.1.18.1. Détermination de l'activité de catalase**

L'activité enzymatique de la catalase a été déterminée par spectrophotométrie dans les lysats cellulaires par la mesure de la décomposition de  $H_2O_2$  (Walton, 2012). Des volumes de 10  $\mu$ L de lysats cellulaires ont été ajoutés à un mélange réactionnel de  $H_2O_2$  et dans une solution saline aqueuse à 0,9% (v/v) avant incubation pendant 5 min. Les réactions ont été arrêtées par l'addition de sulfate de titanyle ( $TiOSO_4$ ), et l'absorbance a été mesurée à 410 nm.

#### **2.1.18.2. Détermination de l'activité de SOD**

L'activité de SOD dans les lysats cellulaires a été déterminée par spectrophotométrie en mesurant la production d'un colorant formazane hydrosoluble résultant de la réduction du sel de tétrazolium hautement soluble dans l'eau de Dojindo, WST-1 (2-4-Iodophényl) -3-(4-nitrophényl) -5- (2,4-disulfophényl) -2Htétrazolium, sel monosodique), en utilisant un kit de dosage de SOD (19160, Sigma Aldrich). 20  $\mu$ L de la solution de travail enzymatique ont été ajoutés à un mélange contenant 20  $\mu$ L de lysat cellulaire et 200  $\mu$ L de solution de travail

## **Chapitre 2. La metformine inverse partiellement l'effet inhibiteur de la co-culture des cellules cancéreuses du sein ER-/PR-/HER2+ sur les biomarqueurs de l'activité antitumorale des monocytes**

---

WST. La microplaque a été ensuite incubée à 37°C pendant 20 minutes et l'absorbance lue à 440 nm. L'activité de SOD (pourcentage d'inhibition de WST-1) a été calculée comme suit :

$$\text{Activité de SOD (taux d'inhibition \%)} = \frac{(\text{blanc 1} - \text{blanc 3}) - (\text{échantillon} - \text{blanc 2})}{(\text{blanc 1} - \text{blanc 3})} \times 100$$

### **2.1.19. Analyse statistique**

Les données ont été représentées sous forme de moyenne avec des erreurs standard de la moyenne (SEM). Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du test non-paramétrique d'analyse de la variance unidirectionnelle (ANOVA) de Mann-Whitney *U* ou Kruskal-Wallis avec des comparaisons par paires en utilisant l'approche Dunn-Bonferroni après vérification de la distribution des données. Les statistiques ont été effectuées à l'aide d'IBM SPSS Statistics version 20. Les valeurs *p* inférieures à 0,05 ont été considérées comme significatives.

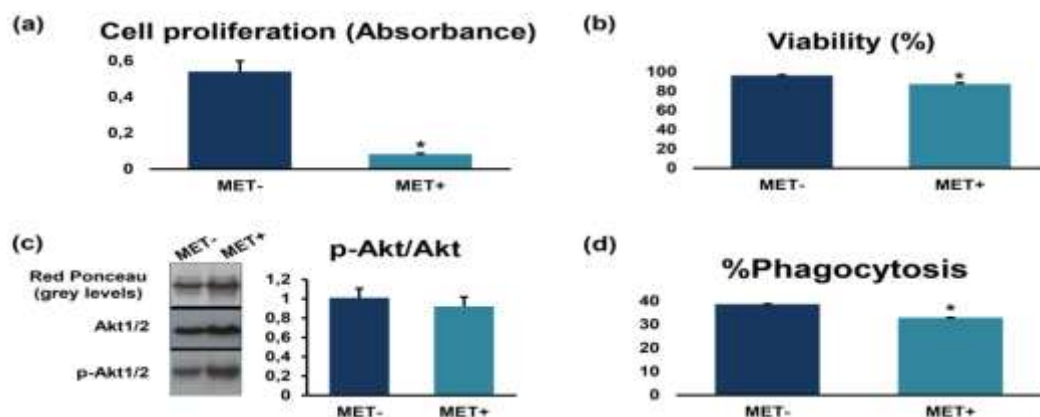
## Chapitre 2. La metformine inverse partiellement l'effet inhibiteur de la co-culture des cellules cancéreuses du sein ER-/PR-/HER2+ sur les biomarqueurs de l'activité antitumorale des monocytes

### 2.2. Résultats

#### 2.2.1. Effets de la MET sur les cellules cancéreuses et les monocytes dans les systèmes de monoculture

##### 2.2.1.1. Effet de la MET sur la viabilité, la prolifération et le rapport Akt1/2 phosphorylé/Akt1/2 total des cellules cancéreuses du sein

D'après les figures 2.2 (a) et (b), le traitement par la MET a induit une diminution significative de la prolifération des cellules cancéreuses du sein et des niveaux de la viabilité (pour les deux comparaisons,  $p < 0,05$ ). La figure 2 (c) montre les données brutes des niveaux réels de protéines (panneaux supérieurs), des niveaux totaux d'Akt1/2 (panneaux du milieu) et des niveaux de phospho Akt1/2 (activé) (panneaux inférieurs). L'histogramme montre les niveaux d'expression relatifs du rapport phospho Akt1/2-à-Akt1/2 total après normalisation à la protéine totale chargée. La figure 2 (c) montre que le traitement par la MET n'a entraîné aucune différence significative à la fois dans les niveaux d'Akt et le rapport d'Akt activé par rapport à Akt total lors de la comparaison avec les cellules non traitées MET ( $p > 0,05$ ). Ainsi les actions de la MET sur Akt1/2 sont essentiellement dues à une perte ou réduction de l'activité Akt1/2 puisque lorsque le rapport des niveaux Akt1/2 actifs (phosphorylés) sur les niveaux totaux d'Akt1/2 est calculé, nous observons une réduction de l'activité d'Akt1/2 dans les cellules cancéreuses.



**Figure 2.2. Effet de la MET sur la prolifération, la viabilité, le rapport Akt phosphorylé/Akt total des cellules cancéreuses du sein et la capacité phagocytaire des MOs.** (a) Dans les cellules cancéreuses du sein traitées ou non avec la MET, la prolifération cellulaire a été déterminée par le test BrdU et (b) la viabilité par le test TBET. (c) Les niveaux de protéines majeures colorés par le rouge Ponceau sont montrés pour être utilisé en tant que témoin de chargement. Les valeurs sont représentées



## Chapitre 2. La metformine inverse partiellement l'effet inhibiteur de la co-culture des cellules cancéreuses du sein ER-/PR-/HER2+ sur les biomarqueurs de l'activité antitumorale des monocytes

sous forme de rapport aux niveaux de protéines en rouge Ponceau et la valeur de zéro MET est fixée à 1. MET: metformine, p-Akt: Akt phosphorylé. (d) Les MOs ont été infectés par *Staphylococcus aureus* avant le traitement avec la MET. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de phagocytose. Les valeurs sont présentées comme moyenne avec erreur standard de la moyenne pour quatre expériences indépendantes réalisées sur trois échantillons ( $n = 12$  pour chaque groupe). Les astérisques indiquent des différences significatives entre les cellules traitées et les témoins non traités par le test U de Mann-Whitney ( $* p < 0,05$ ).

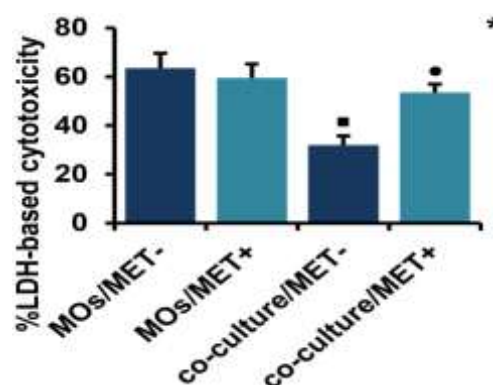
### 2.2.1.2. Effet de la MET sur l'activité phagocytaire des MOs

Comme le montre la figure 2 (d), l'activité phagocytaire des MOs a significativement diminué après le traitement par la MET ( $p < 0,05$ ).

### 2.2.2. Effets de la MET sur les MOs dans les systèmes de monoculture et de co-culture

#### 2.2.2.1. Effet de la MET sur les niveaux de cytotoxicité à base de LDH

Comme indiqué sur la figure 2.3, le traitement par la MET n'a induit aucun effet cytotoxique à base de LDH sur les MOs cultivés seuls ( $p > 0,05$ ). En outre, la MET pourrait inverser l'effet de co-culture sur les niveaux de cytotoxicité basée sur la mesure de l'activité de LDH. À l'inverse, ce niveau de cytotoxicité était significativement diminué dans les co-cultures de MOs avec des cellules cancéreuses du sein non traitées par la MET par rapport aux MOs cultivés seuls et non traités par la MET ( $p < 0,05$ ).



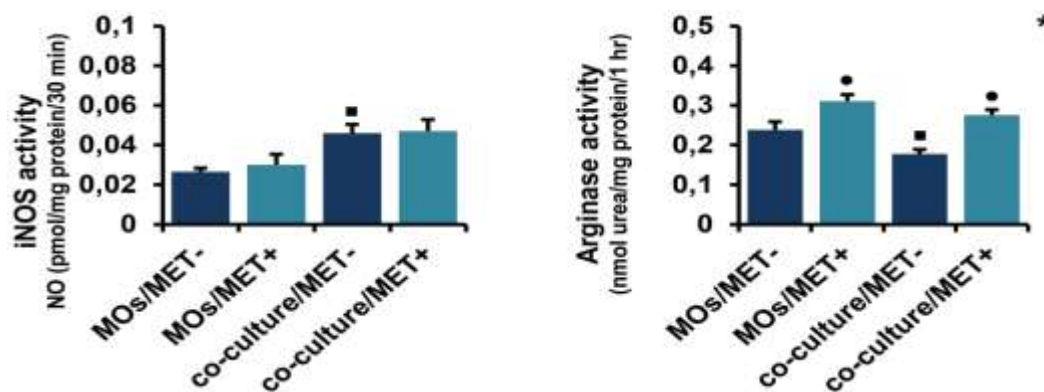
**Figure 2.3. Effet cytotoxique de la MET sur les MOs et le système de co-culture.** MET: metformine, LDH: lactate déshydrogénase, MOs: monocytes, MOs/MET-: MOs non traités par la MET, MOs/MET+: MOs traités par la MET, co-culture/MET-: système de co-culture non traité par la MET, co-culture/MET+: système de co-culture traité par la MET. Les points noirs indiquent des différences significatives lors de la comparaison de chaque groupe traité avec des témoins non traités (0 mM MET) en utilisant le test U de Mann-Whitney ( $\bullet p < 0.05$ ). Les boîtes noires indiquent des différences significatives mises en évidence entre les MOs non traités avec la MET et le système de co-culture non traité avec la MET en utilisant le test U de Mann-

## Chapitre 2. La metformine inverse partiellement l'effet inhibiteur de la co-culture des cellules cancéreuses du sein ER-/PR-/HER2+ sur les biomarqueurs de l'activité antitumorale des monocytes

Whitney ( $\blacksquare p < 0.05$ ). Les astérisques indiquent des différences significatives mises en évidence entre tous les groupes par le test de Kruskal-Wallis avec ajustement par paire de Dunn-Bonferroni ( $*p < 0.05$ ).

### 2.2.2.2. Effet de la MET sur les activités iNOS et arginase

Comme le montre la figure 2.4, la MET a induit une augmentation de l'activité d'iNOS dans le système de co-culture par rapport aux MOs cultivés seuls traités et non traités par la MET, tandis que la différence n'était pas significative pour la comparaison avec les MOs traités avec la MET (respectivement,  $p > 0,05$  et  $p < 0,05$ ). De plus, l'activité iNOS a été significativement augmentée dans les MOs co-cultivés avec des cellules cancéreuses du sein et non traités avec la MET par rapport aux MOs cultivés seuls et non traités avec la MET ( $p < 0,05$ ). De même, la MET pourrait améliorer l'effet de co-culture sur l'activité de l'arginase et augmenter significativement l'activité de l'arginase des MOs cultivés seuls ( $p < 0,05$ ). Cependant, l'activité de l'arginase a été significativement diminuée dans les MOs co-cultivés avec des cellules cancéreuses du sein et non traités avec la MET par rapport aux MOs cultivés seuls et non traités avec MET ( $p < 0,05$ ).

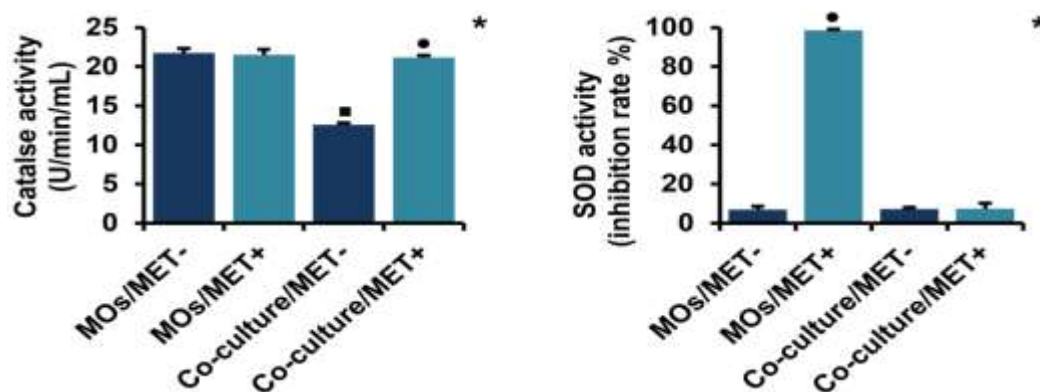


**Figure 2.4. Effet de la MET sur les activités iNOS et arginase dans les MOs et le système de co-culture.** MET: metformine, NO: oxyde nitrique, iNOS: oxyde nitrique synthase inductible, MOs: monocytes, MOs/MET-: MOs non traités par la MET, MOs/MET+: MOs traités par la MET, co-culture/MET-: système de co-culture non traité par la MET, co-culture/MET+: système de co-culture traité par la MET. Les points noirs indiquent des différences significatives lors de la comparaison de chaque groupe traité avec des témoins non traités (0 mM MET) en utilisant le test *U* de Mann-Whitney ( $\bullet p < 0.05$ ). Les boîtes noires indiquent des différences significatives mises en évidence entre les MOs non traités avec la MET et le système de co-culture non traité avec la MET en utilisant le test *U* de Mann-Whitney ( $\blacksquare p < 0.05$ ). Les astérisques indiquent des différences significatives mises en évidence entre tous les groupes par le test de Kruskal-Wallis avec ajustement par paire de Dunn-Bonferroni ( $*p < 0.05$ ).

## Chapitre 2. La metformine inverse partiellement l'effet inhibiteur de la co-culture des cellules cancéreuses du sein ER-/PR-/HER2+ sur les biomarqueurs de l'activité antitumorale des monocytes

### 2.2.2.3. Effet de la MET sur les activités de catalase et de SOD

Comme le montre la figure 2.5, la MET n'a eu aucun effet significatif sur l'activité de catalase dans les MOs cultivés seuls, alors qu'il pourrait inverser l'effet de co-culture sur l'activité de catalase. De plus, l'activité de la catalase était significativement diminuée dans les co-cultures de MOs avec des cellules cancéreuses du sein non traitées avec la MET que dans les MOs cultivés seuls non traités avec la MET ( $p < 0,05$ ). De même, l'activité de SOD était fortement augmentée chez les MOs traités avec la MET par rapport aux MOs non traités avec la MET ( $p < 0,05$ ). Contrairement aux MOs cultivés seuls, la MET n'a eu aucun effet significatif sur l'activité de SOD dans les systèmes de co-culture.



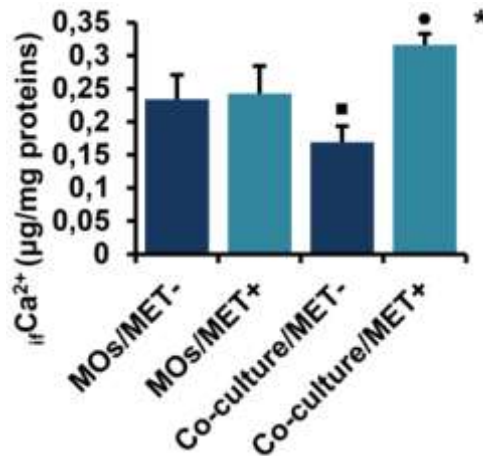
**Figure 2.5. Effet de la MET sur les activités de catalase et de SOD dans les MOs et le système de co-culture.** MET: metformine, MOs: monocytes, SOD: superoxide dismutase, MOs/MET-: MOs non traités par la MET, MOs/MET+: MOs traités par la MET, co-culture/MET-: système de co-culture non traité par la MET, co-culture/MET+: système de co-culture traité par la MET. Les points noirs indiquent des différences significatives lors de la comparaison de chaque groupe traité avec des témoins non traités (0 mM MET) en utilisant le test  $U$  de Mann-Whitney ( $\bullet p < 0.05$ ). Les boîtes noires indiquent des différences significatives mises en évidence entre les MOs non traités avec la MET et le système de co-culture non traité avec la MET en utilisant le test  $U$  de Mann-Whitney ( $\blacksquare p < 0.05$ ). Les astérisques indiquent des différences significatives mises en évidence entre tous les groupes par le test de Kruskal-Wallis avec ajustement par paire de Dunn-Bonferroni ( $\ast p < 0.05$ ).

### 2.2.2.4. Effets de la MET sur des niveaux les ions calcium divalents libres

Comme le montre la figure 2.6, la MET n'avait aucun effet significatif sur les niveaux d' $_{iF}Ca^{2+}$  dans les MOs cultivés seuls alors qu'il pourrait inverser l'effet de co-culture sur les niveaux d' $_{iF}Ca^{2+}$  ( $p < 0,05$ ). À l'inverse, le traitement par la MET a diminué les niveaux d' $_{iF}Ca^{2+}$  dans

## Chapitre 2. La metformine inverse partiellement l'effet inhibiteur de la co-culture des cellules cancéreuses du sein ER-/PR-/HER2+ sur les biomarqueurs de l'activité antitumorale des monocytes

les MOs co-cultivés avec des cellules cancéreuses du sein et non traités avec MET de manière plus significative que dans les MOs cultivés seuls non traités avec MET ( $p < 0,05$ ).

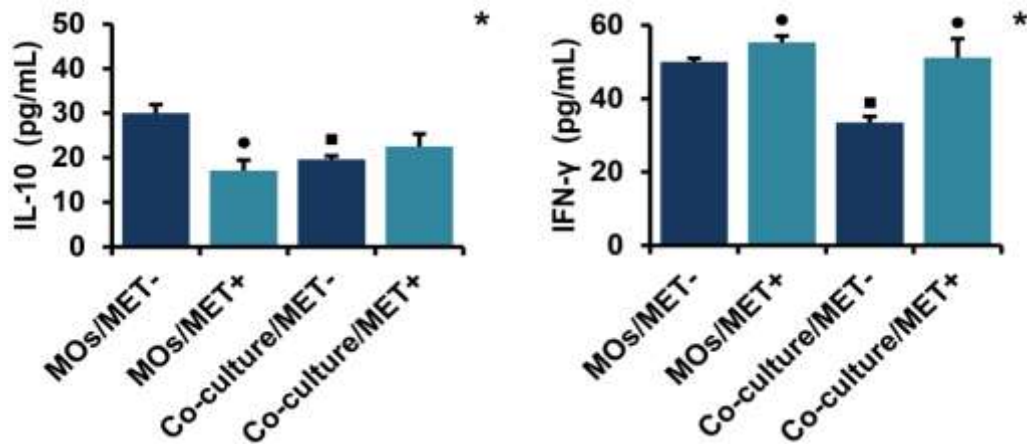


**Figure 2.6. Effet de la MET sur les niveaux d' $iCa^{2+}$  dans les MOs et le système de co-culture.** MET: metformine, MOs: monocytes,  $iCa^{2+}$ : ions calcium libres intracellulaires, MOs/MET-: MOs non traités par la MET, MOs/MET+: MOs traités par la MET, co-culture/MET-: système de co-culture non traité par la MET, co-culture/MET+: système de co-culture traité par la MET. Les points noirs indiquent des différences significatives lors de la comparaison de chaque groupe traité avec des témoins non traités (0 mM MET) en utilisant le test  $U$  de Mann-Whitney ( $\bullet p < 0,05$ ). Les boîtes noires indiquent des différences significatives mises en évidence entre les MOs non traités avec la MET et le système de co-culture non traité avec la MET en utilisant le test  $U$  de Mann-Whitney ( $\blacksquare p < 0,05$ ). Les astérisques indiquent des différences significatives mises en évidence entre tous les groupes par le test de Kruskal-Wallis avec ajustement par paire de Dunn-Bonferroni ( $\ast p < 0,05$ ).

### 2.2.2.5. Effet de la MET sur la production d'IFN- $\gamma$ et d'IL-10

Comme le montre la figure 2.7, la MET a induit une augmentation significative des niveaux d'IFN- $\gamma$  et une diminution significative des niveaux d'IL-10 dans les MOs cultivés seuls (pour les deux comparaisons,  $p < 0,05$ ). De plus, la co-culture a induit une diminution significative des niveaux d'IFN- $\gamma$  et d'IL-10 ( $p < 0,05$ ), qui se sont inversés après le traitement par la MET.

## Chapitre 2. La metformine inverse partiellement l'effet inhibiteur de la co-culture des cellules cancéreuses du sein ER-/PR-/HER2+ sur les biomarqueurs de l'activité antitumorale des monocytes



**Figure 2.7. Effet de la MET sur la production d'IL-10 et d'IFN- $\gamma$  dans les MO et le système de co-culture.** MET: metformine, MOs: monocytes, IFN: interféron, IL: interleukine, MOs/MET-: MOs non traités par la MET, MOs/MET+: MOs traités par la MET, co-culture/MET-: système de co-culture non traité par la MET, co-culture/MET+: système de co-culture traité par la MET. Les points noirs indiquent des différences significatives lors de la comparaison de chaque groupe traité avec des témoins non traités (0 mM MET) en utilisant le test  $U$  de Mann-Whitney ( $p < 0.05$ ). Les boîtes noires indiquent des différences significatives mises en évidence entre les MOs non traités avec la MET et le système de co-culture non traité avec la MET en utilisant le test  $U$  de Mann-Whitney ( $\blacksquare p < 0.05$ ). Les astérisques indiquent des différences significatives mises en évidence entre tous les groupes par le test de Kruskal-Wallis avec ajustement par paire de Dunn-Bonferroni ( $*p < 0.05$ ).

## **Chapitre 2. La metformine inverse partiellement l'effet inhibiteur de la co-culture des cellules cancéreuses du sein ER-/PR-/HER2+ sur les biomarqueurs de l'activité antitumorale des monocytes**

---

### **2.3. Discussion**

Le MET a récemment reçu une attention croissante en tant que traitement thérapeutique potentiel contre le cancer (Zhuang and Miskimins, 2011). Ici, nous avons examiné les effets de la MET dans un nouveau système de co-culture comprenant des MOs primaires et des cellules de cancer du sein de sous-type ER-/PR-/HER2+.

Les tumeurs du sein caractérisées par une surexpression de HER2 sont associées à une augmentation de l'agressivité de la tumeur, à une invasion et à un mauvais pronostic (Eroglu *et al.*, 2014).

En mesurant plusieurs biomarqueurs différents des activités fonctionnelles phénotypiques des MOs avant et pendant leur interaction avec les cellules primaires du cancer du sein ER-/PR-/HER2+, nous confirmons la pertinence scientifique du système de co-culture sur l'utilisation de types de cellules isolées pour analyser les effets inverses de la MET dans un microenvironnement semblable à une tumeur, où les cellules cancéreuses altèrent généralement les fonctions des cellules immunitaires, affectant en particulier leur métabolisme cellulaire et leur capacité à produire des cytokines anti-tumorales, comme les cytokines coopératives IFN- $\gamma$  et IL-10.

La dose de la MET utilisée dans ces expériences (2,5 mM) est relativement plus élevée que celle utilisée en clinique pour le traitement du DT2 (environ 0,5 mM). Cependant, il est important de noter que les cellules cultivées *in vitro* sont maintenues dans des conditions moins physiologiques. En particulier, les cellules cultivées ne bénéficient pas des effets anti-tumoraux indirects de la MET survenant *in vivo* tels que la réduction des niveaux d'insuline - où l'insuline est connue pour avoir un effet mitogène - et les cellules cultivées sont exposées à des concentrations élevées de facteurs de croissance et de glucose présent dans le milieu de culture, ce qui peut aider à expliquer les doses plus élevées requises de MET (Garofalo *et al.*, 2013).

Les propriétés anti-tumorales de la MET ont été rapportées dans plusieurs études, elles ont été associées à une action indirecte (réduction des taux d'insuline) ou à des actions directes sur les voies de signalisation qui régulent la croissance et la mort des cellules cancéreuses du sein (Xin *et al.*, 2018). La MET peut exercer ses effets par des actions sur différentes cellules du microenvironnement tumoral, y compris les MOs-macrophages qui seraient impliqués dans le

## **Chapitre 2. La metformine inverse partiellement l'effet inhibiteur de la co-culture des cellules cancéreuses du sein ER-/PR-/HER2+ sur les biomarqueurs de l'activité antitumorale des monocytes**

---

contrôle de la croissance et de la progression des cellules tumorales. Cependant, les activités des cellules immunitaires pourraient, sans aucun doute, changer lorsqu'elles sont en contact avec des cellules tumorales. Dans ce contexte, nous avons étudié l'effet de la MET sur les activités fonctionnelles des MOs autologues cultivés seuls et lorsqu'ils sont co-cultivés avec des cellules primaires de cancer du sein. En conclusion, nos résultats démontrent un effet significatif de la MET lors de l'interaction entre les MOs et les cellules cancéreuses du sein de sous-type ER-/PR-/HER2+.

Nous avons d'abord évalué les effets de la MET sur la prolifération et la viabilité des cellules cancéreuses. Nous avons constaté que la MET diminue à la fois la prolifération et la viabilité des cellules cancéreuses du sein. Nos résultats sont cohérents avec ceux obtenus récemment en utilisant les tests BrdU et 3-(4,5-Diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT) sur les lignées cellulaires de cancer du sein MCF-7, MDA-MB-231 et MDA-MB-435 (Gao *et al.*, 2016; Queiroz *et al.*, 2014). Les mêmes effets ont été observés sur la viabilité cellulaire des MCF-7 et MDA-MB-231 traitées avec des doses de 1 mM et 5 mM de MET en utilisant le test TBET après 24 h et 48 h de traitement (Marinello *et al.*, 2016). En termes d'activation et de prolifération cellulaire, la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR a été mise en évidence pour jouer un rôle important dans les fonctions cellulaires vitales, y compris la croissance cellulaire, la prolifération, la différenciation et la survie (Mendoza *et al.*, 2011). Son hyperactivation peut entraîner une prolifération excessive des cellules tumorales, une inhibition de l'apoptose, une angiogénèse, une invasion et des métastases (Miller *et al.*, 2010; Mutlu *et al.*, 2016; Sadeghi and Gerber, 2012). Dans notre étude, nous avons constaté que le traitement par MET n'avait pas d'effet significatif sur la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR dans les cellules cancéreuses du sein de sous-type ER-/PR-/HER2+. Cependant, plusieurs études ont indiqué que la MET réduit le taux de survie et de prolifération des cellules cancéreuses du sein grâce à l'inhibition de la voie de signalisation PI3K/Akt (Alimova *et al.*, 2009; Al-Zaidan *et al.*, 2017).

L'activité phagocytaire des MOs fait l'objet de plusieurs études dans des conditions normales et pathologiques, y compris le cancer du sein (Baskić *et al.*, 2003). Dans notre étude, nous avons observé que le prétraitement avec la MET a diminué la capacité phagocytaire des MOs, ce qui est intéressant, sachant qu'une capacité phagocytaire élevée est associée à des MOs dits

## **Chapitre 2. La metformine inverse partiellement l'effet inhibiteur de la co-culture des cellules cancéreuses du sein ER-/PR-/HER2+ sur les biomarqueurs de l'activité antitumorale des monocytes**

---

classiques chez l'homme, qui favorisent la survie et l'extravasation des cellules cancéreuses (Al Dubayee *et al.*, 2018; Cassetta and Pollard, 2016).

Il est bien connu que la nécrose et l'iNOS sont tous deux impliqués dans des lésions tissulaires survenant au cours de l'inflammation. Nos résultats ont montré que le traitement avec la MET n'avait aucun effet sur la mort nécrotique des MOs, comme le démontre la cytotoxicité basée sur l'activité de la LDH. Cependant, la MET pourrait améliorer l'effet de la co-culture sur la nécrose, ce qui est en accord avec des études antérieures *in vitro*, menées sur la lignée cellulaire BT-20 du cancer du sein (Szewczyk *et al.*, 2012). Dans les MOs, ainsi que dans d'autres cellules en particulier les macrophages, l'acide aminé L-arginine est également utilisé comme un substrat par l'arginase pour produire des polyamines (Rath *et al.*, 2014) qui contribuent à la progression tumorale (Avtandilyan *et al.*, 2018), et par l'iNOS pour produire du NO (Rath *et al.*, 2014), qui présente des effets anti-tumoraux à des niveaux élevés (Keshet and Erez, 2018). Cette étude fournit la preuve que les MOs cultivés avec des cellules cancéreuses du sein présentaient des niveaux élevés d'iNOS, mais restent sans changement marqué lorsqu'ils sont traités avec la MET. Nos observations sont en accord avec les résultats antérieurs démontrant que la MET induit une activité anti-tumorale des macrophages pendant le cancer du sein (Chiang *et al.*, 2017b) et supprime la polarisation vers des phénotypes pro-tumoraux (Ding *et al.*, 2015b). Bien que l'activité de l'arginase a été diminuée dans les cellules co-cultivées et non traitées, cette activité a été inversée après le traitement par la MET. Par conséquent, il a été rapporté que la MET présente des effets opposés dans des conditions normales ou pathologiques, elle peut à la fois atténuer la production de NO et améliorer l'activation de l'arginase dans les MOs et les macrophages (Buldak *et al.*, 2014; Kato *et al.*, 2010). Il serait intéressant de vérifier simultanément l'impact du traitement par la MET sur les activités iNOS et arginase.

Le lien entre le cancer et l'altération du métabolisme a été déjà suggéré comme une caractéristique commune des tissus cancéreux, comme l'effet Warburg, dans lequel certaines molécules anti-oxydantes peuvent être utilisées dans des mécanismes de protection contre le stress oxydatif et les ROS qui sont produits lors d'une prolifération cellulaire rapide (Zahzeh *et al.*, 2015). Des niveaux élevés des ROS peuvent causer des dommages macromoléculaires, qui peuvent conduire à l'apoptose et à la sénescence (Cairns *et al.*, 2011). Nos résultats ont démontré que l'activité de la catalase a été diminuée dans les co-cultures non traitées avec



## **Chapitre 2. La metformine inverse partiellement l'effet inhibiteur de la co-culture des cellules cancéreuses du sein ER-/PR-/HER2+ sur les biomarqueurs de l'activité antitumorale des monocytes**

---

MET, alors que l'effet de la co-culture sur l'activité de la catalase peut être inversé après traitement par la MET. De plus, l'activité de SOD a été modifiée uniquement dans les MOs traités avec la MET. En résumé, le traitement par la MET n'a pas montré d'altérations métaboliques en ce qui concerne les niveaux des molécules anti-oxydantes catalase et SOD dans les co-cultures des MOs avec des cellules cancéreuses du sein par rapport aux MOs cultivés seuls.

L' $Ca^{2+}$  est un second messager qui contrôle divers processus cellulaires et des voies de signalisation, y compris ceux liés au cancer, tels que l'apoptose, la prolifération et les métastases (Monteith *et al.*, 2012; Muhammad *et al.*, 2016), et ceux impliqués dans les réponses immunitaires des MOs, y compris la production de cytokines et l'activation de la phagocytose (Brown *et al.*, 2004; Gronski *et al.*, 2009). Nous avons d'abord observé que les niveaux d' $Ca^{2+}$  étaient réduits lors de la co-culture des MOs avec des cellules cancéreuses du sein. En revanche, le traitement par la MET a induit une augmentation d' $Ca^{2+}$  dans les MOs et pourrait inverser l'effet de la co-culture. Ainsi, il a été rapporté que des niveaux accrus d'ions de calcium sont liés à la fois à l'activation du MO et à l'induction de l'apoptose dans les cellules cancéreuses du sein (Cross *et al.*, 2014; França *et al.*, 2016; Muhammad *et al.*, 2016).

Il est maintenant admis que l'IL-10 améliore la surveillance immunitaire du cancer et la suppression de l'inflammation associée au cancer (Dennis *et al.*, 2013), ainsi que l'induction de l'expression de l'IFN- $\gamma$  (Mumm *et al.*, 2011), qui exerce des activités anti-tumorales directement en augmentant l'antigénicité des cellules tumorales, l'inhibition de prolifération cellulaire, l'induction de l'apoptose ou indirectement par inhibition de l'angiogenèse (Mojic *et al.*, 2017). Nos résultats indiquent que les niveaux d'IL-10 et d'IFN- $\gamma$  ont diminué pendant l'interaction entre les MOs et les cellules cancéreuses du sein. Sauf pour l'IL-10, le traitement avec la MET a montré des différences marquées entre son action lorsque les MOs sont cultivés seuls et lorsqu'ils sont co-cultivés avec des cellules cancéreuses du sein. La MET a induit une diminution des niveaux d'IL-10 dans les MOs et, inversement, une augmentation des niveaux d'IFN- $\gamma$ . Cependant, le traitement par la MET pourrait améliorer l'effet de la co-culture sur la production des deux cytokines, bien que les différences n'étaient pas significatives pour l'IL-10. Ainsi, les résultats n'ont pas montré de différences significatives pour l'IL-10 entre les cultures de MOs seuls, en l'absence de traitement, et les cultures de MOs avec des cellules cancéreuses du sein et traitées avec la MET. Ceux-ci suggèrent que la MET

## **Chapitre 2. La metformine inverse partiellement l'effet inhibiteur de la co-culture des cellules cancéreuses du sein ER-/PR-/HER2+ sur les biomarqueurs de l'activité antitumorale des monocytes**

---

pourrait contribuer à la conservation des niveaux d'expression d'IL-10 lorsque le MO entre en contact avec des cellules cancéreuses, sans induire des changements habituellement observés après une interaction avec les cellules cancéreuses. Nos résultats démontrent que le traitement par la MET est clairement efficace et important dans un système qui partage certaines similitudes avec le système biologique où les cellules mononucléées ne sont pas seules mais peuvent être confrontées à des cellules malignes.

Il est à noter que les MOs en circulation peuvent exercer différents rôles en fonction de la caractérisation phénotypique. Par conséquent, il a été rapporté que des sous-ensembles de MOs circulants, dits MOs inflammatoires classiques (moM1, CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>-</sup>) et MOs non classiques en patrouille (moM3, CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>++</sup>) exercent des effets opposés après leur recrutement dans le microenvironnement tumoral via la chimiokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2), également appelée MCP-1 et petite cytokine inductible A2 qui est sécrétée par des cellules malignes. Les moM1 peuvent être recrutés dans le microenvironnement tumoral où ils peuvent être transformés en TAM, qui facilitent la tumorigenèse par suppression de la fonction des lymphocytes T CD8, recrutement des Treg, angiogenèse, intravasation des cellules tumorales et métastases (Olingy *et al.*, 2019a), tandis que les moM3 ont un rôle anti-tumoral, en englobant directement les cellules cancéreuses et en libérant les chimiokines CCL3, CCL4 et CCL5, qui à leur tour induisent le recrutement et l'activation de cellules cytotoxiques tueuses naturelles (NK) (Cassetta and Pollard, 2016). Un autre sous-ensemble de MOs circulants et associés aux tumeurs dotées d'une activité proangiogénique, sont caractérisés par l'expression du récepteur de l'angiopoïétine TIE-2/Tek, Endoglin et VEGF-R2 dans le sous-ensemble des MOs intermédiaires (moM2, CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>+</sup>) comme confirmé par une analyse génomique (Turrini *et al.*, 2017). Les TEM sont recrutés sur le site tumoral où ils permettent l'angiogenèse et inhibent l'apoptose des cellules tumorales par des mécanismes dépendant de la libération de TNF- $\alpha$ . Ils possèdent aussi la capacité la plus élevée d'induire l'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Ibberson *et al.*, 2013). Par conséquent, il serait très intéressant de voir les effets de la MET sur tous les sous-ensembles des MOs caractérisés avant et après leur interaction avec les cellules autologues du cancer du sein étudiées. L'objectif étant de voir si le traitement par la MET inverserait ou non les activités pro-tumorales de moM1 et moM2, sachant que les monocytes sont dotés de plasticité et de polyvalence quel que soit leur phénotype (Das *et al.*, 2015; Mitchell *et al.*, 2014).

## **Chapitre 3**

### **Conclusions et perspectives**

### Chapitre 3

#### Conclusions et perspectives

Les MOs constituent l'une des principales cellules inflammatoires infiltrées dans le microenvironnement tumoral au cours de cancer du sein, et jouent un rôle important dans la modulation de la croissance et de la progression des cellules cancéreuses. La plasticité phénotypique fonctionnelle des MOs leur permettent d'être ciblés par plusieurs molécules thérapeutiques qui les orientent vers des cellules tueuses pro-inflammatoires/anti-tumorales. La MET connue pour ses effets anti-hyperglycémiques, a récemment reçu une attention croissante en tant que traitement thérapeutique potentiel contre le cancer.

Dans un premier temps, nous avons effectué des tests préliminaires afin d'évaluer l'effet de la MET sur les cellules en monoculture. Les résultats ont montré que la MET avait un effet inhibiteur sur la prolifération et la viabilité des cellules cancéreuses du sein de sous-type ER-/PR-/HER2+ ainsi que sur la capacité phagocytaire des MOs.

Afin de mimer le système biologique, nous avons effectué une co-culture entre les MOs autologues et les cellules cancéreuses primaires du sein ER-/PR-/HER2+. Plusieurs biomarqueurs des activités fonctionnelles phénotypiques des MOs ont été mesurés avant et pendant leur interaction avec les cellules cancéreuses, les résultats obtenus ont montré que les activités fonctionnelles des MOs changent lors de leur interaction avec les cellules cancéreuses.

Après traitement des cellules avec la MET, nous avons eu l'opportunité, à notre connaissance, d'être les premiers à montrer que le traitement par la MET avait un rôle puissant dans l'inversion des effets de l'interaction entre les MOs et les cellules cancéreuses du sein de sous-type ER-/PR-/HER2+ sur la production de cytokines coopératives 'anti-tumorales IFN- $\gamma$ ' et 'régulatrices IL-10', les signaux calciques intracellulaires, ainsi que les biomarqueurs de l'activité protectrice redox.

Cette étude ouvre un volet sur la compréhension du mécanisme d'action de la MET sur le microenvironnement tumoral. Le traitement par la MET est clairement efficace et important dans un système qui partage certaines similitudes avec le système biologique où les cellules mononucléées ne sont pas seules mais peuvent être confrontées à des cellules malignes.

Des études complémentaires sont nécessaires pour clarifier les effets observés. Il serait très intéressant de caractériser phénotypiquement les différents sous-types des MOs entrant en contact avec les cellules cancéreuses du sein, étudier certaines voies de signalisation impliquées dans le changement des activités fonctionnelles des MOs, y compris celle de NF- $\kappa$ B, qui joue un rôle important dans la carcinogénèse ainsi que l'évaluation de la production de certaines cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-6, l'IL-8 et le VEGF aussi impliquées dans la croissance tumorale. Evaluer l'effet de la MET sur l'autophagie des cellules cancéreuses du sein, l'inversement de l'effet Warburg ainsi que sur d'autres cellules immunitaires qui peuvent être infiltrées dans le microenvironnement tumoral du cancer du sein. Enfin, il serait indispensable de confirmer les effets observés de la MET en l'utilisant *in-vivo*.

## **Chapitre 4**

### **Bibliographie**

### Chapitre 4

#### Bibliographie

##### A

Akram, M., and Siddiqui, S.A. (2012). Breast cancer management: past, present and evolving. *Indian J. Cancer* 49, 277–282.

Al Dubayee, M.S., Alayed, H., Almansour, R., Alqaoud, N., Alnamlah, R., Obeid, D., Alshahrani, A., Zahra, M.M., Nasr, A., Al-Bawab, A., et al. (2018). Differential Expression of Human Peripheral Mononuclear Cells Phenotype Markers in Type 2 Diabetic Patients and Type 2 Diabetic Patients on Metformin. *Front. Endocrinol.* 9, 537.

Alimova, I.N., Liu, B., Fan, Z., Edgerton, S.M., Dillon, T., Lind, S.E., and Thor, A.D. (2009). Metformin inhibits breast cancer cell growth, colony formation and induces cell cycle arrest in vitro. *Cell Cycle* 8, 909–915.

Al-Zaidan, L., El Ruz, R.A., and Malki, A.M. (2017). Screening Novel Molecular Targets of Metformin in Breast Cancer by Proteomic Approach. *Front. Public Health* 5, 277.

Aribi, M. (2018). Macrophage Bactericidal Assays. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1784, 135–149.

Aribi, M., Meziane, W., Habi, S., Boulatika, Y., Marchandin, H., and Aymeric, J.-L. (2015). Macrophage Bactericidal Activities against *Staphylococcus aureus* Are Enhanced In Vivo by Selenium Supplementation in a Dose-Dependent Manner. *PLOS ONE* 10, e0135515.

Avtandilyan, N., Javrushyan, H., Petrosyan, G., and Trchounian, A. (2018). The Involvement of Arginase and Nitric Oxide Synthase in Breast Cancer Development: Arginase and NO Synthase as Therapeutic Targets in Cancer. *BioMed Res. Int.* 2018, 1–9.

##### B

Baptista, M.Z., Sarian, L.O., Derchain, S.F.M., Pinto, G.A., and Vassallo, J. (2016). Prognostic significance of PD-L1 and PD-L2 in breast cancer. *Hum. Pathol.* 47, 78–84.

Barrueto, L., Caminero, F., Cash, L., Makris, C., Lamichhane, P., and Deshmukh, R.R. (2020). Resistance to Checkpoint Inhibition in Cancer Immunotherapy. *Transl. Oncol.* 13, 100738.

Baskić, D., Aćimović, L.D., and Arsenijević, N. (2003). [The phagocytic activity of monocytes in different stages of breast cancer]. *Med. Pregl.* 56 Suppl 1, 103–107.

Bates, J.P., Derakhshandeh, R., Jones, L., and Webb, T.J. (2018). Mechanisms of immune evasion in breast cancer. *BMC Cancer* 18, 556.

Benarba, B., Meddah, B., and Hamdani, H. (2014). Cancer incidence in North West Algeria (Mascara) 2000-2010: results from a population-based cancer registry. *EXCLI J.* 13, 709–723.

Ben-Baruch, A. (2002). Host microenvironment in breast cancer development: Inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor–microenvironment interactions. *Breast Cancer Res.* 5.

Ben-Baruch, A. (2003). Host microenvironment in breast cancer development: inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor–microenvironment interactions. *Breast Cancer Res.* BCR 5, 31–36.

Bender, C.M., Gentry, A.L., Brufsky, A.M., Casillo, F.E., Cohen, S.M., Dailey, M.M., Donovan, H.S., Dunbar-Jacob, J., Jankowitz, R.C., Rosenzweig, M.Q., et al. (2014). Influence of patient and treatment factors on adherence to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *Oncol. Nurs. Forum* 41, 274–285.

Benton, G., DeGray, G., Kleinman, H.K., George, J., and Arnaoutova, I. (2015). In Vitro Microtumors Provide a Physiologically Predictive Tool for Breast Cancer Therapeutic Screening. *PLOS ONE* 10, e0123312.

Bernhardt, S.M., Dasari, P., Walsh, D., Townsend, A.R., Price, T.J., and Ingman, W.V. (2016). Hormonal Modulation of Breast Cancer Gene Expression: Implications for Intrinsic Subtyping in Premenopausal Women. *Front. Oncol.* 6, 241.

Biswas, S.K., and Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat. Immunol.* 11, 889–896.

Blond, D., Raoul, H., Le Grand, R., and Dormont, D. (2000). Nitric Oxide Synthesis Enhances Human Immunodeficiency Virus Replication in Primary Human Macrophages. *J. Virol.* 74, 8904–8912.

Britten, A., Rossier, C., Taright, N., Ezra, P., and Bourcier, C. (2013). Genomic classifications and radiotherapy for breast cancer. *Eur. J. Pharmacol.* 717, 67–70.

Brown, D., Donaldson, K., and Stone, V. (2004). Effects of PM10 in human peripheral blood monocytes and J774 macrophages. *Respir. Res.* 5.

Brown, K.A., Samarajeewa, N.U., and Simpson, E.R. (2013). Endocrine-related cancers and the role of AMPK. *Mol. Cell. Endocrinol.* 366, 170–179.

Bułdak, Ł., Łabuzek, K., Bułdak, R.J., Kozłowski, M., Machnik, G., Liber, S., Suchy, D., Duława-Bułdak, A., and Okopień, B. (2014). Metformin affects macrophages' phenotype and improves the activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase and decreases malondialdehyde concentration in a partially AMPK-independent manner in LPS-stimulated human monocytes/macrophages. *Pharmacol. Rep.* 66, 418–429.

## C

Cairns, R.A., Harris, I.S., and Mak, T.W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer* 11, 85–95.

Calì, B., Molon, B., and Viola, A. (2017). Tuning cancer fate: the unremitting role of host immunity. *Open Biol.* 7.



Camacho, L., Dasgupta, A., and Jiralerspong, S. (2015). Metformin in breast cancer - an evolving mystery. *Breast Cancer Res.* *17*.

Canè, S., Ugel, S., Trovato, R., Marigo, I., De Sanctis, F., Sartoris, S., and Bronte, V. (2019). The Endless Saga of Monocyte Diversity. *Front. Immunol.* *10*, 1786.

Cassetta, L., and Pollard, J.W. (2016). Cancer immunosurveillance: role of patrolling monocytes. *Cell Res.* *26*, 3–4.

Chen, X., Duan, N., Zhang, C., and Zhang, W. (2016). Survivin and Tumorigenesis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. *J. Cancer* *7*, 314–323.

Chiang, C.-F., Chao, T.-T., Su, Y.-F., Hsu, C.-C., Chien, C.-Y., Chiu, K.-C., Shiah, S.-G., Lee, C.-H., Liu, S.-Y., and Shieh, Y.-S. (2017a). Metformin-treated cancer cells modulate macrophage polarization through AMPK-NF- $\kappa$ B signaling. *Oncotarget* *8*.

Chiang, C.-F., Chao, T.-T., Su, Y.-F., Hsu, C.-C., Chien, C.-Y., Chiu, K.-C., Shiah, S.-G., Lee, C.-H., Liu, S.-Y., and Shieh, Y.-S. (2017b). Metformin-treated cancer cells modulate macrophage polarization through AMPK-NF- $\kappa$ B signaling. *Oncotarget* *8*.

Criscitiello, C. (2012). Tumor-associated antigens in breast cancer. *Breast Care Basel Switz.* *7*, 262–266.

Criscitiello, C., Esposito, A., Gelao, L., Fumagalli, L., Locatelli, M., Minchella, I., Adamoli, L., Goldhirsch, A., and Curigliano, G. (2014). Immune approaches to the treatment of breast cancer, around the corner? *Breast Cancer Res.* *16*.

Cross, B.M., Breitwieser, G.E., Reinhardt, T.A., and Rao, R. (2014). Cellular calcium dynamics in lactation and breast cancer: from physiology to pathology. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* *306*, C515–C526.

de la Cruz-Merino, L., Barco-Sánchez, A., Henao Carrasco, F., Nogales Fernández, E., Vallejo Benítez, A., Brugal Molina, J., Martínez Peinado, A., Grueso López, A., Ruiz Borrego, M., Codes Manuel de Villena, M., et al. (2013). New insights into the role of the immune microenvironment in breast carcinoma. *Clin. Dev. Immunol.* *2013*, 785317.

## D

Dallaglio, K., Bruno, A., Cantelmo, A.R., Esposito, A.I., Ruggiero, L., Orecchioni, S., Calleri, A., Bertolini, F., Pfeffer, U., Noonan, D.M., et al. (2014). Paradoxical effects of metformin on endothelial cells and angiogenesis. *Carcinogenesis* *35*, 1055–1066.

Dalton, H.J., Armaiz-Pena, G.N., Gonzalez-Villasana, V., Lopez-Berestein, G., Bar-Eli, M., and Sood, A.K. (2014). Monocyte subpopulations in angiogenesis. *Cancer Res.* *74*, 1287–1293.

Das, A., Sinha, M., Datta, S., Abas, M., Chaffee, S., Sen, C.K., and Roy, S. (2015). Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration. *Am. J. Pathol.* *185*, 2596–2606.

Daugan, M., Dufay Wojcicki, A., d'Hayer, B., and Boudy, V. (2016). Metformin: An anti-diabetic drug to fight cancer. *Pharmacol. Res.* *113*, 675–685.

- De, A., and Kuppusamy, G. (2020). Metformin in breast cancer: preclinical and clinical evidence. *Curr. Probl. Cancer* 44, 100488.
- Del Barco, S., Vazquez-Martin, A., Cufí, S., Oliveras-Ferraros, C., Bosch-Barrera, J., Joven, J., Martin-Castillo, B., and Menendez, J.A. (2011). Metformin: multi-faceted protection against cancer. *Oncotarget* 2, 896–917.
- Dennis, K.L., Blatner, N.R., Gounari, F., and Khazaie, K. (2013). Current status of interleukin-10 and regulatory T-cells in cancer. *Curr. Opin. Oncol.* 25, 637–645.
- Devarajan, E., Sahin, A.A., Chen, J.S., Krishnamurthy, R.R., Aggarwal, N., Brun, A.-M., Sapino, A., Zhang, F., Sharma, D., Yang, X.-H., et al. (2002). Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. *Oncogene* 21, 8843–8851.
- Dhankhar, R., Vyas, S.P., Jain, A.K., Arora, S., Rath, G., and Goyal, A.K. (2010). Advances in novel drug delivery strategies for breast cancer therapy. *Artif. Cells. Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 38, 230–249.
- Ding, L., Liang, G., Yao, Z., Zhang, J., Liu, R., Chen, H., Zhou, Y., Wu, H., Yang, B., and He, Q. (2015a). Metformin prevents cancer metastasis by inhibiting M2-like polarization of tumor associated macrophages. *Oncotarget* 6.
- Ding, L., Liang, G., Yao, Z., Zhang, J., Liu, R., Chen, H., Zhou, Y., Wu, H., Yang, B., and He, Q. (2015b). Metformin prevents cancer metastasis by inhibiting M2-like polarization of tumor associated macrophages. *Oncotarget* 6.
- Doseff, A., and Parihar, A. (2012). Monocyte Subsets and Their Role in Tumor Progression. In *Tumor Microenvironment and Myelomonocytic Cells*, S. Biswas, ed. (InTech), p.
- Drăgănescu, M., and Carmocan, C. (2017). Hormone Therapy in Breast Cancer. *Chir. Buchar. Rom.* 1990 112, 413–417.
- Duan, W., Shen, X., Lei, J., Xu, Q., Yu, Y., Li, R., Wu, E., and Ma, Q. (2014). Hyperglycemia, a neglected factor during cancer progression. *BioMed Res. Int.* 2014, 461917.
- Duca, F.A., Côté, C.D., Rasmussen, B.A., Zadeh-Tahmasebi, M., Rutter, G.A., Filippi, B.M., and Lam, T.K.T. (2015). Metformin activates a duodenal Ampk-dependent pathway to lower hepatic glucose production in rats. *Nat. Med.* 21, 506–511.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* 3, 991–998.
- Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004). The three Es of cancer immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 329–360.
- Dushyanthen, S., Beavis, P.A., Savas, P., Teo, Z.L., Zhou, C., Mansour, M., Darcy, P.K., and Loi, S. (2015). Relevance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *BMC Med.* 13.

### E

Edechi, C.A., Ikeogu, N., Uzonna, J.E., and Myal, Y. (2019). Regulation of Immunity in Breast Cancer. *Cancers* 11.

Eroglu, Z., Tagawa, T., and Somlo, G. (2014). Human epidermal growth factor receptor family-targeted therapies in the treatment of HER2-overexpressing breast cancer. *The Oncologist* 19, 135–150.

Eroles, P., Bosch, A., Pérez-Fidalgo, J.A., and Lluch, A. (2012). Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat. Rev.* 38, 698–707.

Evani, S.J., Prabhu, R.G., Gnanaruban, V., Finol, E.A., and Ramasubramanian, A.K. (2013). Monocytes mediate metastatic breast tumor cell adhesion to endothelium under flow. *FASEB J.* 27, 3017–3029.

### F

Fan, C., Wang, Y., Liu, Z., Sun, Y., Wang, X., Wei, G., and Wei, J. (2015). Metformin exerts anticancer effects through the inhibition of the Sonic hedgehog signaling pathway in breast cancer. *Int. J. Mol. Med.* 36, 204–214.

Faria, J., Negalha, G., Azevedo, A., and Martel, F. (2019a). Metformin and Breast Cancer: Molecular Targets. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 24, 111–123.

Faria, J., Negalha, G., Azevedo, A., and Martel, F. (2019b). Metformin and Breast Cancer: Molecular Targets. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 24, 111–123.

Farnie, G., Clarke, R.B., Spence, K., Pinnock, N., Brennan, K., Anderson, N.G., and Bundred, N.J. (2007). Novel Cell Culture Technique for Primary Ductal Carcinoma In Situ: Role of Notch and Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Pathways. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 99, 616–627.

Faubert, B., Boily, G., Izreig, S., Griss, T., Samborska, B., Dong, Z., Dupuy, F., Chambers, C., Fuerth, B.J., Viollet, B., et al. (2013). AMPK is a negative regulator of the Warburg effect and suppresses tumor growth in vivo. *Cell Metab.* 17, 113–124.

Feller, W.F., Stewart, S.E., and Kantor, J. (1972). Primary tissue culture explants of human breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 48, 1117–1120.

Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B., Luo, W., et al. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes Dis.* 5, 77–106.

Fernandes, J.V., Cobucci, R.N.O., Jatobá, C.A.N., Fernandes, T.A.A. de M., de Azevedo, J.W.V., and de Araújo, J.M.G. (2015). The role of the mediators of inflammation in cancer development. *Pathol. Oncol. Res. POR* 21, 527–534.

Ferret, P.-J., Soum, E., Negre, O., and Fradelizi, D. (2002). Auto-protective redox buffering systems in stimulated macrophages. *BMC Immunol.* 3, 3.

Ferroni, P., Riondino, S., Buonomo, O., Palmirotta, R., Guadagni, F., and Roselli, M. (2015). Type 2 Diabetes and Breast Cancer: The Interplay between Impaired Glucose Metabolism and Oxidant Stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015, 183928.

Flores-López, L.A., Martínez-Hernández, M.G., Viedma-Rodríguez, R., Díaz-Flores, M., and Baiza-Gutman, L.A. (2016). High glucose and insulin enhance uPA expression, ROS formation and invasiveness in breast cancer-derived cells. *Cell. Oncol. Dordr.* 39, 365–378.

Foretz, M., Guigas, B., and Viollet, B. (2019). Understanding the glucoregulatory mechanisms of metformin in type 2 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Endocrinol.* 15, 569–589.

Fragomeni, S.M., Sciallis, A., and Jeruss, J.S. (2018). Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast Cancer. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 27, 95–120.

França, E., Honorio-França, A., Nunes, G., Fagundes, D., Marchi, P., Fernandes, R., França, J., Botelho, A., Varotti, F., and Moraes, L. (2016). Intracellular calcium is a target of modulation of apoptosis in MCF-7 cells in the presence of IgA adsorbed to polyethylene glycol. *OncoTargets Ther.* 617.

Fraser, V.J., Nickel, K.B., Fox, I.K., Margenthaler, J.A., and Olsen, M.A. (2016). THE EPIDEMIOLOGY AND OUTCOMES OF BREAST CANCER SURGERY. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 127, 46–58.

Fumagalli, D., Andre, F., Piccart-Gebhart, M.J., Sotiriou, C., and Desmedt, C. (2012). Molecular biology in breast cancer: should molecular classifiers be assessed by conventional tools or by gene expression arrays? *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 84 Suppl 1, e58-69.

## G

Gao, Z.-Y., Liu, Z., Bi, M.-H., Zhang, J.-J., Han, Z.-Q., Han, X., Wang, H.-Y., Sun, G.-P., and Liu, H. (2016). Metformin induces apoptosis via a mitochondria-mediated pathway in human breast cancer cells in vitro. *Exp. Ther. Med.* 11, 1700–1706.

Garofalo, C., Capristo, M., Manara, M.C., Mancarella, C., Landuzzi, L., Belfiore, A., Lollini, P.-L., Picci, P., and Scotlandi, K. (2013). Metformin as an adjuvant drug against pediatric sarcomas: hypoxia limits therapeutic effects of the drug. *PloS One* 8, e83832.

Garrido, F. (2019). MHC/HLA Class I Loss in Cancer Cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1151, 15–78.

Garrido, F., Algarra, I., and García-Lora, A.M. (2010). The escape of cancer from T lymphocytes: immunoselection of MHC class I loss variants harboring structural-irreversible “hard” lesions. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 59, 1601–1606.

Gatti-Mays, M.E., Balko, J.M., Gameiro, S.R., Bear, H.D., Prabhakaran, S., Fukui, J., Disis, M.L., Nanda, R., Gulley, J.L., Kalinsky, K., et al. (2019). If we build it they will come: targeting the immune response to breast cancer. *NPJ Breast Cancer* 5, 37.

Ghebeh, H., Lehe, C., Barhoush, E., Al-Romaih, K., Tulbah, A., Al-Alwan, M., Hendrayani, S.-F., Manogaran, P., Alaiya, A., Al-Tweigeri, T., et al. (2010). Doxorubicin downregulates

cell surface B7-H1 expression and upregulates its nuclear expression in breast cancer cells: role of B7-H1 as an anti-apoptotic molecule. *Breast Cancer Res. BCR* 12, R48.

Ghoncheh, M., Pournamdar, Z., and Salehiniya, H. (2016). Incidence and Mortality and Epidemiology of Breast Cancer in the World. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 17, 43–46.

Gingras, I., Azim, H.A., Ignatiadis, M., and Sotiriou, C. (2015). Immunology and breast cancer: toward a new way of understanding breast cancer and developing novel therapeutic strategies. *Clin. Adv. Hematol. Oncol. HO* 13, 372–382.

Godone, R.L.N., Leitão, G.M., Araújo, N.B., Castelletti, C.H.M., Lima-Filho, J.L., and Martins, D.B.G. (2018). Clinical and molecular aspects of breast cancer: Targets and therapies. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* 106, 14–34.

Godoy-Ortiz, A., Sanchez-Muñoz, A., Chica Parrado, M.R., Álvarez, M., Ribelles, N., Rueda Dominguez, A., and Alba, E. (2019). Deciphering HER2 Breast Cancer Disease: Biological and Clinical Implications. *Front. Oncol.* 9, 1124.

Gong, J., Kelekar, G., Shen, J., Shen, J., Kaur, S., and Mita, M. (2016). The expanding role of metformin in cancer: an update on antitumor mechanisms and clinical development. *Target. Oncol.* 11, 447–467.

Griffith, T.S., Wiley, S.R., Kubin, M.Z., Sedger, L.M., Maliszewski, C.R., and Fanger, N.A. (1999). Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. *J. Exp. Med.* 189, 1343–1354.

Gronski, M.A., Kinchen, J.M., Juncadella, I.J., Franc, N.C., and Ravichandran, K.S. (2009). An essential role for calcium flux in phagocytes for apoptotic cell engulfment and the anti-inflammatory response. *Cell Death Differ.* 16, 1323–1331.

## H

Hamers, A.A.J., Dinh, H.Q., Thomas, G.D., Marcovecchio, P., Blatchley, A., Nakao, C.S., Kim, C., McSkimming, C., Taylor, A.M., Nguyen, A.T., et al. (2019). Human Monocyte Heterogeneity as Revealed by High-Dimensional Mass Cytometry. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 39, 25–36.

Hammerl, D., Smid, M., Timmermans, A.M., Sleijfer, S., Martens, J.W.M., and Debets, R. (2018). Breast cancer genomics and immuno-oncological markers to guide immune therapies. *Semin. Cancer Biol.* 52, 178–188.

Hanna, R.N., Cekic, C., Sag, D., Tacke, R., Thomas, G.D., Nowyhed, H., Herrley, E., Rasquinha, N., McArdle, S., Wu, R., et al. (2015). Patrolling monocytes control tumor metastasis to the lung. *Science* 350, 985–990.

Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., and Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nat. Rev. Dis. Primer* 5, 66.

Hashemi, M., Fazaeli, A., Ghavami, S., Eskandari-Nasab, E., Arbabi, F., Mashhadi, M.A., Taheri, M., Chaabane, W., Jain, M.V., and Łos, M.J. (2013). Functional polymorphisms of FAS and FASL gene and risk of breast cancer - pilot study of 134 cases. *PLoS One* 8, e53075.

Hatoum, D., and McGowan, E.M. (2015). Recent Advances in the Use of Metformin: Can Treating Diabetes Prevent Breast Cancer? *BioMed Res. Int.* 2015, 1–13.

Herrera, M.T., Gonzalez, Y., Hernández-Sánchez, F., Fabián-San Miguel, G., and Torres, M. (2017). Low serum vitamin D levels in type 2 diabetes patients are associated with decreased mycobacterial activity. *BMC Infect. Dis.* 17.

Huang, J., Chan, P.S., Lok, V., Chen, X., Ding, H., Jin, Y., Yuan, J., Lao, X.-Q., Zheng, Z.-J., and Wong, M.C. (2021). Global incidence and mortality of breast cancer: a trend analysis. *Aging* 13, 5748–5803.

### I

Ibberson, M., Bron, S., Guex, N., Faes-van't Hull, E., Ifticene-Treboux, A., Henry, L., Lehr, H.-A., Delaloye, J.-F., Coukos, G., Xenarios, I., et al. (2013). TIE-2 and VEGFR Kinase Activities Drive Immunosuppressive Function of TIE-2-Expressing Monocytes in Human Breast Tumors. *Clin. Cancer Res.* 19, 3439–3449.

Idzkowska, E., Eljaszewicz, A., Miklasz, P., Musial, W.J., Tycinska, A.M., and Moniuszko, M. (2015). The Role of Different Monocyte Subsets in the Pathogenesis of Atherosclerosis and Acute Coronary Syndromes. *Scand. J. Immunol.* 82, 163–173.

Italiani, P., and Boraschi, D. (2014). From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front. Immunol.* 5, 514.

### J

Jayasingam, S.D., Citartan, M., Thang, T.H., Mat Zin, A.A., Ang, K.C., and Ch'ng, E.S. (2019). Evaluating the Polarization of Tumor-Associated Macrophages Into M1 and M2 Phenotypes in Human Cancer Tissue: Technicalities and Challenges in Routine Clinical Practice. *Front. Oncol.* 9, 1512.

Jeong, J., Suh, Y., and Jung, K. (2019). Context Drives Diversification of Monocytes and Neutrophils in Orchestrating the Tumor Microenvironment. *Front. Immunol.* 10, 1817.

Jiang, X., and Shapiro, D.J. (2014). The immune system and inflammation in breast cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* 382, 673–682.

Jones, J.C.R. (2008). Reduction of contamination of epithelial cultures by fibroblasts. *CSH Protoc.* 2008, pdb.prot4478.

Jung, K., Heishi, T., Khan, O.F., Kowalski, P.S., Incio, J., Rahbari, N.N., Chung, E., Clark, J.W., Willett, C.G., Luster, A.D., et al. (2017). Ly6Clo monocytes drive immunosuppression and confer resistance to anti-VEGFR2 cancer therapy. *J. Clin. Invest.* 127, 3039–3051.

### K

Kato, Y., Koide, N., Komatsu, T., Tumurkhuu, G., Dagvadorj, J., Kato, K., and Yokochi, T. (2010). Metformin Attenuates Production of Nitric Oxide in Response to Lipopolysaccharide by Inhibiting MyD88-Independent Pathway. *Horm. Metab. Res.* *42*, 632–636.

Kavoosi, G., Ardestani, S.K., Kariminia, A., and Tavakoli, Z. (2006). Production of nitric oxide by murine macrophages induced by lipophosphoglycan of *Leishmania major*. *Korean J. Parasitol.* *44*, 35.

Keshet, R., and Erez, A. (2018). Arginine and the metabolic regulation of nitric oxide synthesis in cancer. *Dis. Model. Mech.* *11*, dmm033332.

Kim, R., Emi, M., and Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* *121*, 1–14.

Kochan, G., Escors, D., Breckpot, K., and Guerrero-Setas, D. (2013). Role of non-classical MHC class I molecules in cancer immunosuppression. *Oncoimmunology* *2*, e26491.

Kwa, M., Makris, A., and Esteva, F.J. (2017). Clinical utility of gene-expression signatures in early stage breast cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *14*, 595–610.

### L

Lal, S., McCart Reed, A.E., de Luca, X.M., and Simpson, P.T. (2017). Molecular signatures in breast cancer. *Methods San Diego Calif* *131*, 135–146.

Law, A.M.K., Lim, E., Ormandy, C.J., and Gallego-Ortega, D. (2017). The innate and adaptive infiltrating immune systems as targets for breast cancer immunotherapy. *Endocr. Relat. Cancer* *24*, R123–R144.

Leclerc, A.-F., Jerusalem, G., Devos, M., Crielaard, J.-M., and Maquet, D. (2016). Multidisciplinary management of breast cancer. *Arch. Public Health Arch. Belg. Sante Publique* *74*, 50.

Lee, Y., Chittechath, M., André, V., Zhao, H., Poidinger, M., Biondi, A., D'Amico, G., and Biswas, S.K. (2012). Protumoral role of monocytes in human B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: involvement of the chemokine CXCL10. *Blood* *119*, 227–237.

Lei, S., Zheng, R., Zhang, S., Wang, S., Chen, R., Sun, K., Zeng, H., Zhou, J., and Wei, W. (2021a). Global patterns of breast cancer incidence and mortality: A population-based cancer registry data analysis from 2000 to 2020. *Cancer Commun. Lond. Engl.* *41*, 1183–1194.

Lei, S., Zheng, R., Zhang, S., Chen, R., Wang, S., Sun, K., Zeng, H., Wei, W., and He, J. (2021b). Breast cancer incidence and mortality in women in China: temporal trends and projections to 2030. *Cancer Biol. Med.*

Lesokhin, A.M., Hohl, T.M., Kitano, S., Cortez, C., Hirschhorn-Cymerman, D., Avogadri, F., Rizzuto, G.A., Lazarus, J.J., Pamer, E.G., Houghton, A.N., et al. (2012). Monocytic CCR2+ Myeloid-Derived Suppressor Cells Promote Immune Escape by Limiting Activated CD8 T-cell Infiltration into the Tumor Microenvironment. *Cancer Res.* *72*, 876–886.

Li, S.G., and Li, L. (2013). Targeted therapy in HER2-positive breast cancer. *Biomed. Rep. 1*, 499–505.

Li, X., Yao, W., Yuan, Y., Chen, P., Li, B., Li, J., Chu, R., Song, H., Xie, D., Jiang, X., et al. (2017). Targeting of tumour-infiltrating macrophages via CCL2/CCR2 signalling as a therapeutic strategy against hepatocellular carcinoma. *Gut 66*, 157–167.

Li, Y., Xu, K.-P., Jiang, D., Zhao, J., Ge, J.-F., and Zheng, S.-Y. (2015). Relationship of Fas, FasL, p53 and bcl-2 expression in human non-small cell lung carcinomas. *Int. J. Clin. Exp. Pathol. 8*, 13978–13986.

Liu, B., Fan, Z., Edgerton, S.M., Yang, X., Lind, S.E., and Thor, A.D. (2011). Potent anti-proliferative effects of metformin on trastuzumab-resistant breast cancer cells via inhibition of erbB2/IGF-1 receptor interactions. *Cell Cycle 10*, 2959–2966.

Loke, P. 'ng, and Niewold, T.B. (2017). By CyTOF: Heterogeneity of Human Monocytes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 37*, 1423–1424.

Luen, S., Virassamy, B., Savas, P., Salgado, R., and Loi, S. (2016). The genomic landscape of breast cancer and its interaction with host immunity. *Breast Edinb. Scotl. 29*, 241–250.

Łukasiewicz, S., Czezelewski, M., Forma, A., Baj, J., Sitarz, R., and Stanisławek, A. (2021). Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review. *Cancers 13*.

Lv, Z., and Guo, Y. (2020). Metformin and Its Benefits for Various Diseases. *Front. Endocrinol. 11*, 191.

## M

Ma, R., Yi, B., Riker, A.I., and Xi, Y. (2020). Metformin and cancer immunity. *Acta Pharmacol. Sin.*

Makki, J. (2015). Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clin. Med. Insights Pathol. 8*, 23–31.

Malhotra, G.K., Zhao, X., Band, H., and Band, V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol. Ther. 10*, 955–960.

Marinello, P.C., da Silva, T.N.X., Panis, C., Neves, A.F., Machado, K.L., Borges, F.H., Guarnier, F.A., Bernardes, S.S., de-Freitas-Junior, J.C.M., Morgado-Díaz, J.A., et al. (2016). Mechanism of metformin action in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells involves oxidative stress generation, DNA damage, and transforming growth factor  $\beta$ 1 induction. *Tumor Biol. 37*, 5337–5346.

Masoud, V., and Pagès, G. (2017). Targeted therapies in breast cancer: New challenges to fight against resistance. *World J. Clin. Oncol. 8*, 120–134.

McArthur, H.L., and Page, D.B. (2016). Immunotherapy for the treatment of breast cancer: checkpoint blockade, cancer vaccines, and future directions in combination immunotherapy. *Clin. Adv. Hematol. Oncol. HO 14*, 922–933.



## Chapitre 4 : Bibliographie

---

McCann, K.E., Hurvitz, S.A., and McAndrew, N. (2019). Advances in Targeted Therapies for Triple-Negative Breast Cancer. *Drugs* 79, 1217–1230.

Mendoza, M.C., Er, E.E., and Blenis, J. (2011). The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem. Sci.* 36, 320–328.

Miller, T.W., Hennessy, B.T., González-Angulo, A.M., Fox, E.M., Mills, G.B., Chen, H., Higham, C., García-Echeverría, C., Shyr, Y., and Arteaga, C.L. (2010). Hyperactivation of phosphatidylinositol-3 kinase promotes escape from hormone dependence in estrogen receptor–positive human breast cancer. *J. Clin. Invest.* 120, 2406–2413.

Mitchell, A.J., Roediger, B., and Weninger, W. (2014). Monocyte homeostasis and the plasticity of inflammatory monocytes. *Cell. Immunol.* 291, 22–31.

Mittal, D., Gubin, M.M., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Curr. Opin. Immunol.* 27, 16–25.

Mohamed, M., Cavallo-Medved, D., Rudy, D., Anbalagan, A., Moin, K., and Sloane, B. (2010). Interleukin-6 Increases Expression and Secretion of Cathepsin B by Breast Tumor-Associated Monocytes. *Cell. Physiol. Biochem.* 25, 315–324.

Mojic, M., Takeda, K., and Hayakawa, Y. (2017). The Dark Side of IFN- $\gamma$ : Its Role in Promoting Cancer Immuno-evasion. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 89.

Monteith, G.R., Davis, F.M., and Roberts-Thomson, S.J. (2012). Calcium Channels and Pumps in Cancer: Changes and Consequences. *J. Biol. Chem.* 287, 31666–31673.

Muhammad, S.N.H., Mokhtar, N.F., and Yaacob, N.S. (2016). 15d-PGJ2 Induces Apoptosis of MCF-7 and MDA-MB-231 Cells via Increased Intracellular Calcium and Activation of Caspases, Independent of ER $\alpha$  and ER $\beta$ . *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 17, 3223–3228.

Mumm, J.B., Emmerich, J., Zhang, X., Chan, I., Wu, L., Mauze, S., Blaisdell, S., Basham, B., Dai, J., Grein, J., et al. (2011). IL-10 elicits IFN $\gamma$ -dependent tumor immune surveillance. *Cancer Cell* 20, 781–796.

Mutlu, M., Saatci, Ö., Ansari, S.A., Yurdusev, E., Shehwana, H., Konu, Ö., Raza, U., and Şahin, Ö. (2016). miR-564 acts as a dual inhibitor of PI3K and MAPK signaling networks and inhibits proliferation and invasion in breast cancer. *Sci. Rep.* 6.

Mytar, B., Wołoszyn, M., Szatanek, R., Baj-Krzyworzeka, M., Siedlar, M., Ruggiero, I., Wieckiewicz, J., and Zembala, M. (2003). Tumor cell-induced deactivation of human monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 74, 1094–1101.

## N

Nagarajan, D., and McArdle, S.E.B. (2018). Immune Landscape of Breast Cancers. *Biomedicines* 6.

Nicolini, A., and Carpi, A. (2009). Immune manipulation of advanced breast cancer: an interpretative model of the relationship between immune system and tumor cell biology. *Med. Res. Rev.* *29*, 436–471.

Norum, J.H., Andersen, K., and Sørli, T. (2014). Lessons learned from the intrinsic subtypes of breast cancer in the quest for precision therapy. *Br. J. Surg.* *101*, 925–938.

Nouari, W., Ysmail-Dahlouk, L., and Aribi, M. (2016). Vitamin D3 enhances bactericidal activity of macrophage against *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. Immunopharmacol.* *30*, 94–101.

Nounou, M.I., ElAmrawy, F., Ahmed, N., Abdelraouf, K., Goda, S., and Syed-Sha-Qhattal, H. (2015). Breast Cancer: Conventional Diagnosis and Treatment Modalities and Recent Patents and Technologies. *Breast Cancer Basic Clin. Res.* *9*, 17–34.

### O

O'Donnell, J.S., Teng, M.W.L., and Smyth, M.J. (2019). Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *16*, 151–167.

Olingy, C.E., Dinh, H.Q., and Hedrick, C.C. (2019a). Monocyte heterogeneity and functions in cancer. *J. Leukoc. Biol.* *106*, 309–322.

Olingy, C.E., Dinh, H.Q., and Hedrick, C.C. (2019b). Monocyte heterogeneity and functions in cancer. *J. Leukoc. Biol.* *106*, 309–322.

O'Neill, L.A.J., Kishton, R.J., and Rathmell, J. (2016). A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat. Rev. Immunol.* *16*, 553–565.

### P

Pabst, M.J., Pabst, K.M., Handsman, D.B., Beranova-Giorgianni, S., and Giorgianni, F. (2008). Proteome of monocyte priming by lipopolysaccharide, including changes in interleukin-1beta and leukocyte elastase inhibitor. *Proteome Sci.* *6*, 13.

Patel, A.A., Zhang, Y., Fullerton, J.N., Boelen, L., Rongvaux, A., Maini, A.A., Bigley, V., Flavell, R.A., Gilroy, D.W., Asquith, B., et al. (2017). The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *J. Exp. Med.* *214*, 1913–1923.

Pernicova, I., and Korbonits, M. (2014). Metformin--mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat. Rev. Endocrinol.* *10*, 143–156.

Pommier, A., Audemard, A., Durand, A., Lengagne, R., Delpoux, A., Martin, B., Douguet, L., Le Campion, A., Kato, M., Avril, M.-F., et al. (2013). Inflammatory monocytes are potent antitumor effectors controlled by regulatory CD4+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 13085–13090.

Pulito, C., Mori, F., Sacconi, A., Goeman, F., Ferraiuolo, M., Pasanisi, P., Campagnoli, C., Berrino, F., Fanciulli, M., Ford, R.J., et al. (2017). Metformin-induced ablation of microRNA 21-5p releases Sestrin-1 and CAB39L antitumoral activities. *Cell Discov.* *3*, 17022.

### Q

Qian, B.-Z., Li, J., Zhang, H., Kitamura, T., Zhang, J., Campion, L.R., Kaiser, E.A., Snyder, L.A., and Pollard, J.W. (2011). CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* 475, 222–225.

Qiu, S.-Q., Waaijer, S.J.H., Zwager, M.C., de Vries, E.G.E., van der Vegt, B., and Schröder, C.P. (2018). Tumor-associated macrophages in breast cancer: Innocent bystander or important player? *Cancer Treat. Rev.* 70, 178–189.

Queiroz, E.A.I.F., Puukila, S., Eichler, R., Sampaio, S.C., Forsyth, H.L., Lees, S.J., Barbosa, A.M., Dekker, R.F.H., Fortes, Z.B., and Khaper, N. (2014). Metformin Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest Mediated by Oxidative Stress, AMPK and FOXO3a in MCF-7 Breast Cancer Cells. *PLoS ONE* 9, e98207.

### R

Rajappa, S., Bajpai, J., Basade, M., Ganvir, M., Goswami, C., Murali, A., Rathi, A.K., Kaushal, V., Jain, S., Parikh, P.M., et al. (2018). Practical consensus recommendations regarding the use of hormonal therapy in metastatic breast cancer. *South Asian J. Cancer* 7, 137–141.

Rakha, E.A., and Ellis, I.O. (2011). Modern classification of breast cancer: should we stick with morphology or convert to molecular profile characteristics. *Adv. Anat. Pathol.* 18, 255–267.

Rakha, E.A., Reis-Filho, J.S., Baehner, F., Dabbs, D.J., Decker, T., Eusebi, V., Fox, S.B., Ichihara, S., Jacquemier, J., Lakhani, S.R., et al. (2010). Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res. BCR* 12, 207.

Rath, M., Müller, I., Kropf, P., Closs, E.I., and Munder, M. (2014). Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Front. Immunol.* 5.

Rees, A.J. (2010). Monocyte and macrophage biology: an overview. *Semin. Nephrol.* 30, 216–233.

Rezaei, N. (2015). *Cancer Immunology a Translational Medicine Context* (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg ;).

Riis, M. (2020). Modern surgical treatment of breast cancer. *Ann. Med. Surg.* 2012 56, 95–107.

Rivenbark, A.G., O'Connor, S.M., and Coleman, W.B. (2013). Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: challenges for personalized medicine. *Am. J. Pathol.* 183, 1113–1124.

Roshan, M.H., Shing, Y.K., and Pace, N.P. (2019a). Metformin as an adjuvant in breast cancer treatment. *SAGE Open Med.* 7, 2050312119865114.

Roshan, M.H., Shing, Y.K., and Pace, N.P. (2019b). Metformin as an adjuvant in breast cancer treatment. *SAGE Open Med.* 7, 205031211986511.

Rugo, H.S., Vidula, N., and Ma, C. (2016). Improving Response to Hormone Therapy in Breast Cancer: New Targets, New Therapeutic Options. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book Am. Soc. Clin. Oncol. Annu. Meet.* 35, e40-54.

Ryu, T.Y., Park, J., and Scherer, P.E. (2014). Hyperglycemia as a risk factor for cancer progression. *Diabetes Metab. J.* 38, 330–336.

### S

Sabatier, R., Finetti, P., Mamessier, E., Adelaide, J., Chaffanet, M., Ali, H.R., Viens, P., Caldas, C., Birnbaum, D., and Bertucci, F. (2015). Prognostic and predictive value of PDL1 expression in breast cancer. *Oncotarget* 6, 5449–5464.

Sacco, F., Calderone, A., Castagnoli, L., and Cesareni, G. (2016). The cell-autonomous mechanisms underlying the activity of metformin as an anticancer drug. *Br. J. Cancer* 115, 1451–1456.

Sadeghi, N., and Gerber, D.E. (2012). Targeting the PI3K pathway for cancer therapy. *Future Med. Chem.* 4, 1153–1169.

Sampath, P., Moideen, K., Ranganathan, U.D., and Bethunaickan, R. (2018). Monocyte Subsets: Phenotypes and Function in Tuberculosis Infection. *Front. Immunol.* 9, 1726.

Sarvaiya, H.A., and Lazar, I.M. (2016). Insulin stimulated MCF7 breast cancer cells: Proteome dataset. *Data Brief* 9, 579–584.

S. Wahdan-Alaswad, R., and D. Thor, A. (2020). Metformin Activity against Breast Cancer: Mechanistic Differences by Molecular Subtype and Metabolic Conditions. In *Metformin [Working Title]*, (IntechOpen), p.

Schlecker, E., Stojanovic, A., Eisen, C., Quack, C., Falk, C.S., Umansky, V., and Cerwenka, A. (2012). Tumor-Infiltrating Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Mediate CCR5-Dependent Recruitment of Regulatory T Cells Favoring Tumor Growth. *J. Immunol.* 189, 5602–5611.

Schnur, J.B., Ouellette, S.C., Bovbjerg, D.H., and Montgomery, G.H. (2009). Breast cancer patients' experience of external-beam radiotherapy. *Qual. Health Res.* 19, 668–676.

Schreiber, R.D., Old, L.J., and Smyth, M.J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331, 1565–1570.

Schütz, F., Stefanovic, S., Mayer, L., von Au, A., Domschke, C., and Sohn, C. (2017). PD-1/PD-L1 Pathway in Breast Cancer. *Oncol. Res. Treat.* 40, 294–297.

Senapati, P., Kato, H., Lee, M., Leung, A., Thai, C., Sanchez, A., Gallagher, E.J., LeRoith, D., Seewaldt, V.L., Ann, D.K., et al. (2019). Hyperinsulinemia promotes aberrant histone acetylation in triple-negative breast cancer. *Epigenetics Chromatin* 12, 44.

- Sharda, D.R., Yu, S., Ray, M., Squadrito, M.L., De Palma, M., Wynn, T.A., Morris, S.M., and Hankey, P.A. (2011). Regulation of Macrophage Arginase Expression and Tumor Growth by the Ron Receptor Tyrosine Kinase. *J. Immunol.* *187*, 2181–2192.
- Sharma, G.N., Dave, R., Sanadya, J., Sharma, P., and Sharma, K.K. (2010). Various types and management of breast cancer: an overview. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* *1*, 109–126.
- Sica, A., Porta, C., Morlacchi, S., Banfi, S., Strauss, L., Rimoldi, M., Totaro, M.G., and Riboldi, E. (2012). Origin and Functions of Tumor-Associated Myeloid Cells (TAMCs). *Cancer Microenviron. Off. J. Int. Cancer Microenviron. Soc.* *5*, 133–149.
- da Silva, G.B.R.F., Silva, T.G.A., Duarte, R.A., Neto, N.L., Carrara, H.H.A., Donadi, E.A., Gonçalves, M.A.G., Soares, E.G., and Soares, C.P. (2013). Expression of the Classical and Nonclassical HLA Molecules in Breast Cancer. *Int. J. Breast Cancer* *2013*, 250435.
- Sims, A.H., Howell, A., Howell, S.J., and Clarke, R.B. (2007). Origins of breast cancer subtypes and therapeutic implications. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* *4*, 516–525.
- Singletary, S.E., and Connolly, J.L. (2006). Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual. *CA. Cancer J. Clin.* *56*, 37-47-51.
- Smyth, M.J., Dunn, G.P., and Schreiber, R.D. (2006). Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv. Immunol.* *90*, 1–50.
- Soliman, H. (2013). Immunotherapy strategies in the treatment of breast cancer. *Cancer Control J. Moffitt Cancer Cent.* *20*, 17–21.
- Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J.S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., et al. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 8418–8423.
- Soysal, S.D., Tzankov, A., and Muenst, S.E. (2015). Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. *Pathobiol. J. Immunopathol. Mol. Cell. Biol.* *82*, 142–152.
- Speirs, V., Green, A.R., Walton, D.S., Kerin, M.J., Fox, J.N., Carleton, P.J., Desai, S.B., and Atkin, S.L. (1998). Short-term primary culture of epithelial cells derived from human breast tumours. *Br. J. Cancer* *78*, 1421–1429.
- Sprangers, S., de Vries, T.J., and Everts, V. (2016). Monocyte Heterogeneity: Consequences for Monocyte-Derived Immune Cells. *J. Immunol. Res.* *2016*, 1475435.
- Stansfield, B.K., and Ingram, D.A. (2015). Clinical significance of monocyte heterogeneity. *Clin. Transl. Med.* *4*, 5.
- Steven, A., and Seliger, B. (2018). The Role of Immune Escape and Immune Cell Infiltration in Breast Cancer. *Breast Care Basel Switz.* *13*, 16–21.
- Stout, R.D., and Suttles, J. (2004). Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J. Leukoc. Biol.* *76*, 509–513.

Sun, S., Fei, X., Mao, Y., Wang, X., Garfield, D.H., Huang, O., Wang, J., Yuan, F., Sun, L., Yu, Q., et al. (2014). PD-1(+) immune cell infiltration inversely correlates with survival of operable breast cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 63, 395–406.

Swoboda, A., and Nanda, R. (2018). Immune Checkpoint Blockade for Breast Cancer. *Cancer Treat. Res.* 173, 155–165.

Szaflarska, A., Baj-Krzyworzeka, M., Siedlar, M., Węglarczyk, K., Ruggiero, I., Hajto, B., and Zembala, M. (2004). Antitumor response of CD14+/CD16+ monocyte subpopulation. *Exp. Hematol.* 32, 748–755.

Szewczyk, M., Richter, C., Briese, V., and Richter, D.-U. (2012). A retrospective in vitro study of the impact of anti-diabetics and cardioselective pharmaceuticals on breast cancer. *Anticancer Res.* 32, 2133–2138.

### T

Takano, S., Kaji, H., Hayashi, F., Higashiguchi, K., Joukei, S., Kido, Y., Takahashi, J., and Osawa, K. (2012). A calculation model for serum ionized calcium based on an equilibrium equation for complexation. *Anal. Chem. Insights* 7, 23–30.

Teng, M.W.L., Galon, J., Fridman, W.-H., and Smyth, M.J. (2015). From mice to humans: developments in cancer immunoediting. *J. Clin. Invest.* 125, 3338–3346.

Terry, R.L., and Miller, S.D. (2014). Molecular control of monocyte development. *Cell. Immunol.* 291, 16–21.

Trop, I., LeBlanc, S.M., David, J., Lalonde, L., Tran-Thanh, D., Labelle, M., and El Khoury, M.M. (2014). Molecular classification of infiltrating breast cancer: toward personalized therapy. *Radiogr. Rev. Publ. Radiol. Soc. N. Am. Inc* 34, 1178–1195.

Tu, Y., Johnstone, C.N., and Stewart, A.G. (2017). Annexin A1 influences in breast cancer: Controversies on contributions to tumour, host and immunoediting processes. *Pharmacol. Res.* 119, 278–288.

Turrini, R., Pabois, A., Xenarios, I., Coukos, G., Delaloye, J.-F., and Doucey, M.-A. (2017). TIE-2 expressing monocytes in human cancers. *Oncoimmunology* 6, e1303585.

### V

Varn, F.S., Mullins, D.W., Arias-Pulido, H., Fiering, S., and Cheng, C. (2017). Adaptive immunity programmes in breast cancer. *Immunology* 150, 25–34.

Viale, G. (2012). The current state of breast cancer classification. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 23 Suppl 10, x207-210.

Viollet, B., Guigas, B., Sanz Garcia, N., Leclerc, J., Foretz, M., and Andreelli, F. (2012). Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 199 122, 253–270.

Vuong, D., Simpson, P.T., Green, B., Cummings, M.C., and Lakhani, S.R. (2014). Molecular classification of breast cancer. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* 465, 1–14.

### W

Wacleche, V.S., Tremblay, C.L., Routy, J.-P., and Ancuta, P. (2018). The Biology of Monocytes and Dendritic Cells: Contribution to HIV Pathogenesis. *Viruses* 10.

Wahdan-Alaswad, R.S., Cochrane, D.R., Spoelstra, N.S., Howe, E.N., Edgerton, S.M., Anderson, S.M., Thor, A.D., and Richer, J.K. (2014). Metformin-Induced Killing of Triple-Negative Breast Cancer Cells Is Mediated by Reduction in Fatty Acid Synthase via miRNA-193b. *Horm. Cancer* 5, 374–389.

Walton, P.A. (2012). Effects of peroxisomal catalase inhibition on mitochondrial function. *Front. Physiol.* 3.

Wang, M., Zhang, C., Song, Y., Wang, Z., Wang, Y., Luo, F., Xu, Y., Zhao, Y., Wu, Z., and Xu, Y. (2017). Mechanism of immune evasion in breast cancer. *OncoTargets Ther.* 10, 1561–1573.

Williams, A.D., Payne, K.K., Posey, A.D., Hill, C., Conejo-Garcia, J., June, C.H., and Tchou, J. (2017). Immunotherapy for Breast Cancer: Current and Future Strategies. *Curr. Surg. Rep.* 5.

Wouters, K., Gaens, K., Bijnen, M., Verboven, K., Jocken, J., Wetzels, S., Wijnands, E., Hansen, D., van Greevenbroek, M., Duijvestijn, A., et al. (2017). Circulating classical monocytes are associated with CD11c+ macrophages in human visceral adipose tissue. *Sci. Rep.* 7, 42665.

### X

Xin, W., Fang, L., Fang, Q., Zheng, X., and Huang, P. (2018). Effects of metformin on survival outcomes of pancreatic cancer patients with diabetes: A meta-analysis. *Mol. Clin. Oncol.* 8, 483–488.

Xu, T., He, B.-S., Liu, X.-X., Hu, X.-X., Lin, K., Pan, Y.-Q., Sun, H.-L., Peng, H.-X., Chen, X.-X., and Wang, S.-K. (2017). The Predictive and Prognostic Role of Stromal Tumor-infiltrating Lymphocytes in HER2-positive Breast Cancer with Trastuzumab-based Treatment: a Meta-analysis and Systematic Review. *J. Cancer* 8, 3838–3848.

### Y

Yanagawa, Y., Iwabuchi, K., and Onoé, K. (2009). Co-operative action of interleukin-10 and interferon-gamma to regulate dendritic cell functions. *Immunology* 127, 345–353.

Yang, T.J., and Ho, A.Y. (2013). Radiation therapy in the management of breast cancer. *Surg. Clin. North Am.* 93, 455–471.

Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X.-F., and Wang, H. (2014). Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark. Res.* 2, 1.

Yeap, W.H., Wong, K.L., Shimasaki, N., Teo, E.C.Y., Quek, J.K.S., Yong, H.X., Diong, C.P., Bertolotti, A., Linn, Y.C., and Wong, S.C. (2016). CD16 is indispensable for antibody-dependent cellular cytotoxicity by human monocytes. *Sci. Rep.* 6, 34310.

Yersal, O., and Barutca, S. (2014). Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J. Clin. Oncol.* 5, 412–424.

Yu, X., Mao, W., Zhai, Y., Tong, C., Liu, M., Ma, L., Yu, X., and Li, S. (2017). Anti-tumor activity of metformin: from metabolic and epigenetic perspectives. *Oncotarget* 8, 5619–5628.

### Z

Zahzeh, M.R., Loukidi, B., Meziane, W., Haddouche, M., Mesli, N., Zouaoui, Z., and Aribi, M. (2015). Relationship between NADPH and Th1/Th2 ratio in patients with non-Hodgkin lymphoma who have been exposed to pesticides. *J. Blood Med.* 6, 99–107.

Zardavas, D., Irrthum, A., Swanton, C., and Piccart, M. (2015). Clinical management of breast cancer heterogeneity. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 12, 381–394.

Zhang, H.-H., and Guo, X.-L. (2016). Combinational strategies of metformin and chemotherapy in cancers. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 78, 13–26.

Zhao, B., Luo, J., Yu, T., Zhou, L., Lv, H., and Shang, P. (2020). Anticancer mechanisms of metformin: A review of the current evidence. *Life Sci.* 254, 117717.

Zheng, J., Liu, Q., Yang, J., Ren, Q., Cao, W., Yang, J., Yu, Z., Yu, F., Wu, Y., Shi, H., et al. (2012). Co-culture of apoptotic breast cancer cells with immature dendritic cells: a novel approach for DC-based vaccination in breast cancer. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 45, 510–515.

Zhou, L., Somasundaram, R., Nederhof, R.F., Dijkstra, G., Faber, K.N., Peppelenbosch, M.P., and Fuhler, G.M. (2012). Impact of human granulocyte and monocyte isolation procedures on functional studies. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* 19, 1065–1074.

Zhuang, Y., and Miskimins, W.K. (2011). Metformin Induces Both Caspase-Dependent and Poly(ADP-ribose) Polymerase-Dependent Cell Death in Breast Cancer Cells. *Mol. Cancer Res.* 9, 603–615.

Zi, F., Zi, H., Li, Y., He, J., Shi, Q., and Cai, Z. (2017). Metformin and cancer: An existing drug for cancer prevention and therapy (Review). *Oncol. Lett.*



**Annexe**

---

**Annexe**

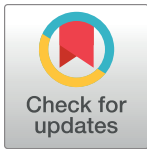
## RESEARCH ARTICLE

# Metformin partially reverses the inhibitory effect of co-culture with ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup>/HER2<sup>+</sup> breast cancer cells on biomarkers of monocyte antitumor activity

Zoheir Dahmani<sup>1</sup>, Lynda Addou-Klouche<sup>1</sup>, Florence Gizard<sup>1,2</sup>, Sara Dahou<sup>1</sup>, Aida Messaoud<sup>1</sup>, Nihel Chahinez Djebri<sup>1</sup>, Mahmoud Idris Benaissi<sup>1</sup>, Meriem Mostefaoui<sup>1</sup>, Hadjer Terbeche<sup>1</sup>, Wafa Nouari<sup>1</sup>, Marwa Miliani<sup>1</sup>, Gérard Lefranc<sup>3</sup>, Anne Fernandez<sup>2</sup>, Ned J. Lamb<sup>2\*</sup>, Mourad Aribi<sup>1\*</sup>

**1** Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, W0414100, University of Tlemcen, Tlemcen, Algeria, **2** Cell Biology Unit, IGH CNRS, Université de Montpellier, (UMR 9002), Montpellier, France, **3** IGH, UMR 9002 CNRS-Université de Montpellier, Montpellier, France

\* [mourad.aribi@univ-tlemcen.dz](mailto:mourad.aribi@univ-tlemcen.dz), [m\\_aribi@outlook.fr](mailto:m_aribi@outlook.fr), [m\\_aribi@yahoo.fr](mailto:m_aribi@yahoo.fr) (MA); [ned.lamb@igh.cnrs.fr](mailto:ned.lamb@igh.cnrs.fr) (NJL)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Dahmani Z, Addou-Klouche L, Gizard F, Dahou S, Messaoud A, Chahinez Djebri N, et al. (2020) Metformin partially reverses the inhibitory effect of co-culture with ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup>/HER2<sup>+</sup> breast cancer cells on biomarkers of monocyte antitumor activity. *PLoS ONE* 15(10): e0240982. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240982>

**Editor:** Salvatore V Pizzo, Duke University School of Medicine, UNITED STATES

**Received:** April 28, 2020

**Accepted:** October 6, 2020

**Published:** October 27, 2020

**Copyright:** © 2020 Dahmani et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was funded by the Thematic Research Agencies ATRBSA and ATRSS (Algeria) and the Directorate General of Scientific Research and Technological Development (DGRSDT, Direction Générale de la Recherche Scientifique et du Développement Technologique, MESRS, Algeria) for financial support to ZD, LA-K, SD, AM,

## Abstract

### Background

Immune activities of monocytes (MOs) can be altered within the microenvironment of solid malignancies, including breast cancer. Metformin (1,1-dimethylbiguanide hydrochloride, MET), has been shown to decrease tumor cell proliferation, but its effects have yet to be explored with respect to MOs (monocytes) activity during their crosstalk with breast cancer cells. Here, we investigated the effects of MET on overall phenotypic functional activities, including cellular immunometabolism and protective redox signaling based-biomarkers, intracellular free calcium ions ( $_{i}Ca^{2+}$ ), phagocytosis and co-operative cytokines (IFN- $\gamma$  and IL-10) of autologous MOs before and during their interplay with primary ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup>/HER2<sup>+</sup> breast cancer cells.

### Methods

Human primary breast cancer cells were either cultured alone or co-cultured with autologous MOs before treatment with MET.

### Results

MET downregulated breast cancer cell proliferation and phagocytosis, while having no significant effect on the ratio of phosphorylated Akt (p-Akt) to total Akt. Additionally, we observed that, in the absence of MET treatment, the levels of lactate dehydrogenase (LDH)-based cytotoxicity, catalase,  $_{i}Ca^{2+}$ , IL-10 and arginase activity were significantly reduced in co-cultures compared to levels in MOs cultured alone whereas levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity were significantly increased. In contrast, MET treatment reduced the effects measured in co-culture on the levels of LDH-based cytotoxicity, arginase activity, catalase,  $_{i}Ca^{2+}$ , and IFN- $\gamma$ . MET also induced upregulation of both iNOS and

NC-D, MI-B, MM, HT, WN, MM and MA. FG, GL, AF and NL were supported by CNRS core funding and AFD (Association Francaise pour la Diabete) grant 1546. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

arginase in MO cells, although the increase did not reach significant difference for iNOS activity. Moreover, MET induced a robust increase of superoxide dismutase (SOD) activity in MOs, but not in MOs co-cultured with breast cancer cells. Furthermore, MET markedly upregulated the levels of IFN- $\gamma$  production and downregulated those of IL-10 in isolated MOs, while inducing a slight opposing up-regulation of IL-10 production in co-cultures.

## Conclusions

Our results show that the biomarkers of phenotypic functional activities of MOs are modified after co-culturing with primary human breast cancer cells. Treatment of co-cultures with MET resulted in increased release of antitumor cytokine IFN- $\gamma$  and  $\text{Ca}^{2+}$ , and increased cell necrosis during breast cancer cells-MOs crosstalk.

## Introduction

Breast cancer is the most commonly diagnosed cancer and a leading cause of mortality worldwide [1]. Compared to other types of cancer that are considered as more responsive to immunotherapy, breast cancer has not been traditionally considered as an immunogenic malignancy [2]. However, recent research has shown the relationship between immune intra-tumoral responses and breast cancer development [3]. Additionally, studies reported that infiltration of immune cells within the tumor microenvironment and the presence of immunity-related gene signatures contribute to breast cancer prognosis [4,5].

The microenvironment surrounding breast cancer cells plays an important role in modulating cancer growth and progression [3]. It contains several types of inflammatory cells including MOs and macrophages. MO cells represent a heterogeneous population derived from myeloid lineages [6] that are recruited from the bloodstream to the tumor site through the paracrine action of cytokines and chemokines released by breast cancer cells [7]. Previous reports suggested that infiltration of MOs into the breast tumor microenvironments, in response to paracrine stimulation, correlates with poor prognosis and promotion of tumor growth, invasion and metastasis [8,9].

In light of their functional phenotypic plasticity, MOs can be targeted by several therapeutic molecules that switch them towards proinflammatory/anti-tumoral killer cells [10,11], which are mainly implicated in inflammatory response, thereby having reduced phagocytic capacity [12]. In context of cancer, these cells exert their inhibitory effects by enhanced production of proinflammatory cytokines, like IFN- $\gamma$ , secretion of tumoricidal mediators, reactive oxygen (ROS) and nitrogen species (RNS), including the production of nitric oxide (NO) as product of the NOS activation [13].

It is well known that insulin is an important growth factor, which plays a critical role in regulation of cell proliferation. As such, enhancing insulin sensitivity can lead to tumor growth inhibition and cell cycle arrest. Indeed, metformin (1,1-dimethylbiguanide hydrochloride, MET), an antidiabetic drug prescribed for patients with type 2 diabetes [14,15], has been reported to have a marked effect on insulin sensitivity through inhibition of the signaling pathway implicating phosphoinositol-3-kinase (PI3K) and Akt (also referred to as protein kinase B, PKB) consequently leading to decreased tumor cell proliferation [16,17]. The effects of MET on breast cancer cells has also been associated with the inhibition of pro-tumoral M2-like macrophage polarization [18]. In this context, we investigated for the first time the

effects of MET on the overall phenotypic functional activities, including immunometabolic (arginase activity, iNOS activity and LDH release) [19] and protective redox based-biomarkers (catalase and SOD activities) [20],  $_{i}Ca^{2+}$ , phagocytosis, and co-operative cytokines (IFN- $\gamma$  and IL-10) [21] of autologous MOs before and during their crosstalk with breast cancer cells (ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup>/HER2<sup>+</sup>).

## Materials and methods

### Materials

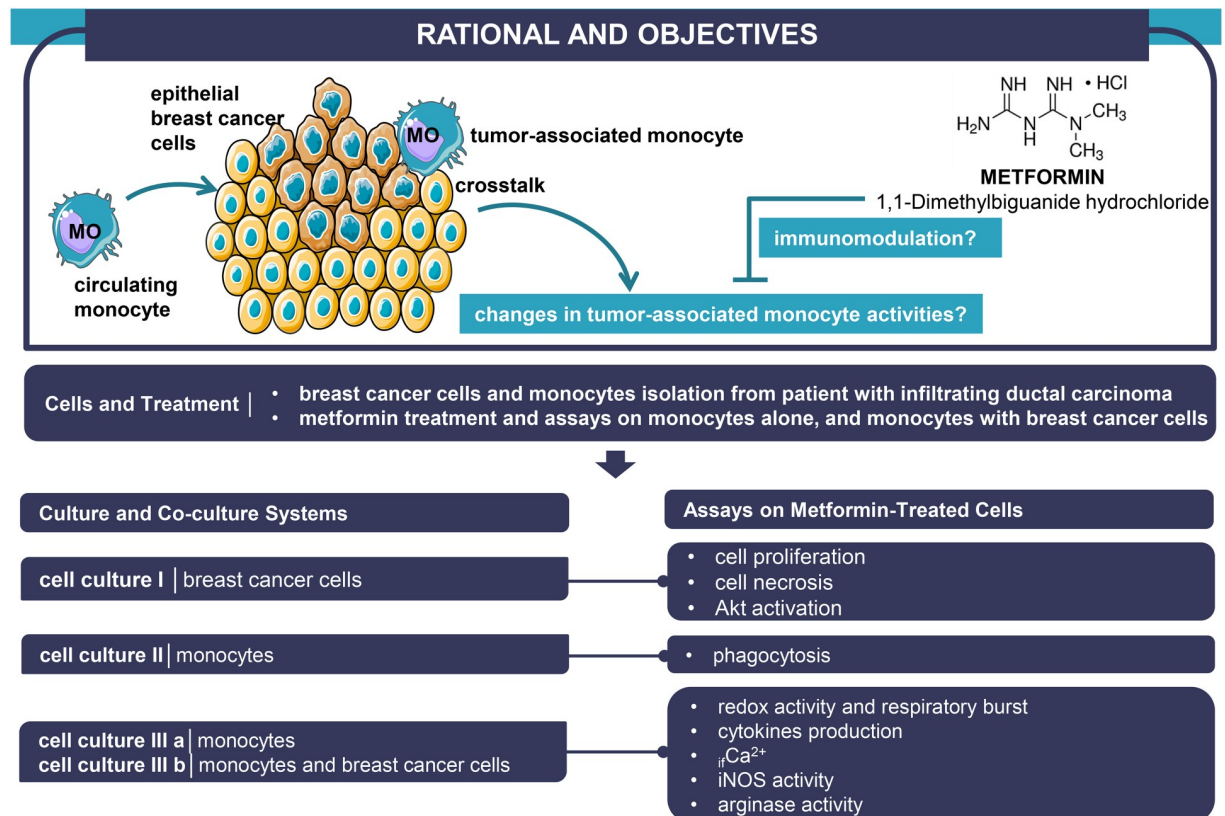
Unless specified, all materials including (MET), were obtained from Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA).

**1. Study design.** Tumor epithelial cells were isolated from breast cancer tissue specimens, and co-cultured with autologous MOs, isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). First, tumor cells were cultured alone to check the MET effects on both proliferation and viability using BrdU (Bromodeoxyuridine [5-bromo-2'-deoxyuridine]), and Trypan Blue Exclusion Test [TBET], respectively, and on p-Akt-to-Akt ratios. Similarly, MOs were cultured alone for phagocytosis capacity assays. LDH-based cytotoxicity, respiratory burst and redox activity (nitric oxide [NO], catalase, superoxide dismutase [SOD]), release of co-operative cytokines ('antitumor cytokine IFN- $\gamma$ ', and 'immunosuppressive/regulatory cytokine IL-10'), inducible nitric oxide synthase iNOS-associated proinflammatory MOs and arginase activities-associated anti-inflammatory MOs, and intracellular free calcium ions ( $_{i}Ca^{2+}$ ) were measured in MOs cultured alone and co-cultured with breast cancer cells. All experiments were repeated four times. The experimental approach is outlined in the graphical abstract, Fig 1. The purity of MOs was verified by direct immunofluorescence (S1 Fig).

**2. Specimen samples.** Primary tumor tissue specimens and autologous peripheral blood samples were collected thanks to three patient volunteers, admitted to the Surgery Department of Tlemcen Medical Centre University (Algeria), who have been newly diagnosed for human epidermal growth factor receptor 2-Positive/estrogen receptor-Negative/progesterone receptor-Negative (ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup>/HER2<sup>+</sup>) breast cancer (age group 50–60 years), and who have not yet begun treatment, after obtaining informed and written consent from each to participate to the current study. Peripheral blood was collected in heparinized *Vacutainer* tubes (BD, Bellingham Industrial Estate, UK). The homogeneity of sample biopsies and absence of intertumor variations for each tumor intended for experimental analyses were checked by macroscopical and thorough anatomopathological examinations, and based on cellular morphology and immunohistochemical analyses. All tumor samples are grade 2 nonspecific invasive mammary carcinoma classified as pT2N0. The current study was approved by local Ethics Committee of Tlemcen University, in accordance with the Declaration of Helsinki.

**3. Isolation of mammary adherent tumor epithelial cells.** After removal of the healthy tissue surrounding the tumor tissue, tumor mammary epithelial cells presenting as infiltrating ductal carcinomas were isolated from primary cancer specimens by enzymatic digestion and differential centrifugation according to Feller *et al.*, and Speirs *et al.* [22,23], with some modifications. Briefly, the tumor tissue specimens were washed extensively with 1x phosphate saline buffer (PBS), placed in sterile Petri dishes and cut into small 2 mm pieces with a sterile scalpel. The minced tissue was incubated in 0.1% collagenase solution at 37°C for 12–20 h. Following digestion, cell mixtures were centrifuged at 40 x g for 1 min and the supernatant transferred to new tubes that were then centrifuged at 100 x g for 2 min to obtain a pellet representing tumor epithelial cells.

**4. Cell culture.** Epithelial cancer cells were washed with RPMI-1640 medium, supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 50  $\mu$ g/mL gentamicin, by centrifugation at 40 x g



**Fig 1. Summary of experimental design.** Akt: protein kinase B (PKB),  $_{i}Ca^{2+}$ : intracellular free calcium ions, iNOS: nitric oxide synthase, MO: monocyte.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240982.g001>

for 5 min. The cell pellet was resuspended with 10 mL of RPMI-1640 supplemented with 10% FCS and 50  $\mu$ g/mL gentamicin and then subdivided into two culture flasks and incubated in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Fibroblast contamination was removed from epithelial cancer cells by differential trypsinization [24]. The culture medium was changed every 2–5 days [25]. Cells were passaged with 0.25% trypsin-EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) when they reached ~80% confluence [26].

**5. Peripheral blood mononuclear cells isolation.** Blood samples were diluted 1:1 with PBS and layered on Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA) and centrifuged at 400 x g for 30 min. The interface band containing PBMCs was carefully harvested washed twice with PBS. Cell pellets were suspended in 1 mL of RPMI-1640 supplemented with 10% FCS and 50  $\mu$ g/mL of gentamicin for cell counting. Cell viability was performed by TBET using photonic microscopy (Zeiss, Germany).

**6. MOs isolation.** MOs were isolated from PBMCs based on differential plastic adherence [27]. Briefly, PBMCs were cultivated in RPMI-1640 supplemented with 10% FCS and 50  $\mu$ g/mL gentamicin, and seeded at 2 x 10<sup>6</sup> cell/mL into 24-well plates. Cells were allowed to adhere for 2 h at 37°C before removal of non-adherent cells were and treatment of adherent MOs with MET. Cells were counted microscopically (Zeiss, Germany) using trypan blue staining, and the purity of monocytes was evaluated by fluorescent staining with PhycoErytherin (PE)-anti-human CD14 antibody (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) using a Floid Cell Imaging

Station (Thermo Fisher Scientific, MA USA) [28,29] and routinely exceeded over 90% purity (S1 Fig).

**7. Cell culture and co-culture systems.** After cell detachment with trypsin-EDTA [30], breast cancer cells were counted before being cultured alone or co-cultured with an equal number of MOs ( $2 \times 10^5$  cells/mL) at a ratio of 1:1 in RPMI-1640 supplemented with 10% FCS and 50  $\mu$ g/mL gentamicin.

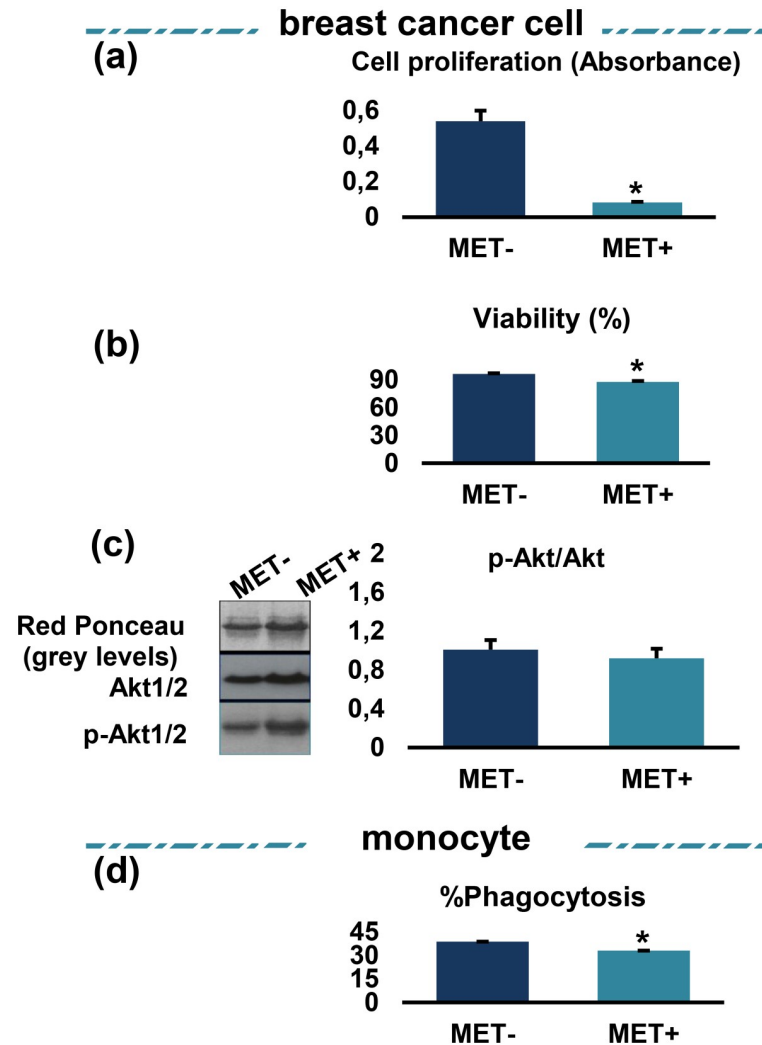
**8. MET treatment.** MOs, breast cancer cells or co-cultured MOs with breast cancer cells were treated for 24 h with fresh medium containing or not MET at the dose of 2.5 mM [15].

**9. TBET assays.** The effect of MET treatment on cancer cell viability was based on TBET. Breast cancer cells ( $2 \times 10^5$  cells per well) were grown overnight in a 24-well plate at 37°C in a humidified atmosphere and 5% CO<sub>2</sub> for adherence. Thereafter, culture medium was replaced with fresh RPMI-1640 medium containing MET and incubated a further 24 h. Cells were subsequently washed with 1x PBS, trypsinized before determination the number of viable and dead cells with TBET.

**10. BrdU assays.** Cell proliferation was measured by BrdU incorporation using a BrdU Cell Proliferation ELISA according to the manufacturer's instructions (ab126556-BrdU Cell Proliferation kit, Abcam, Germany). Briefly, breast cancer cells ( $2 \times 10^5$  cells/mL) were treated with MET in 96-well microplates for 24 h at 37°C in a humidified atmosphere and 5% CO<sub>2</sub>. Thereafter, 20  $\mu$ L of the diluted 1x BrdU was added to each well and cells were incubated overnight. Cells were then fixed and BrdU incorporation detected using anti-BrdU monoclonal Detector Antibody for 1 h at room temperature before incubation with peroxidase goat anti-mouse IgG conjugate as secondary antibody. Color was developed using tetramethylbenzidine (TMB) as a peroxidase substrate and BrdU incorporation measured at 450 nm using an ELISA reader (Biochrom Anthos 2020, Cambridge, UK).

**11. Western blotting assays.** After 24 h incubation of breast cancer cells treated or not with MET, cells were washed with PBS and lysed using Triton X-100. Proteins present in equal amounts of cell lysates were rapidly diluted with SDS-sample buffer (50 mM Tris-HCL pH 6.8, 2 mM DTT, 1.0% SDS), boiled for 5 min. Proteins were separated by 10% sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Protein concentrations were not determined before reduction and denaturation to minimize the chance of protein dephosphorylation. After separation, proteins were transferred to a nitrocellulose membranes and transferred protein were visualized by staining with Ponceau red. Thereafter, membranes were blocked with 5% nonfat milk or 5% bovine serum albumin (BSA) for 45 min at room temperature and incubated overnight at 4°C with primary antibodies against p-Akt (Ser473) (1/1000), Akt-1 (2H10) (1/1000), Akt-2 (5B5) (1/1000) Cell Signaling Technology (Denvers, MA, USA). Horseradish peroxidase-conjugated (HRP) anti-mouse IgG and anti-rabbit IgG were used as secondary antibodies for 1 h at room temperature. Blotted membranes were detected with enhanced chemiluminescence reagent (Amersham Pico) using X-ray film. Quantitative analysis of the signals from scanned films was performed using *Imgcalc2*, a unix software developed in house (IGH, Montpellier) for quantifying pixels on numerical images. The results in Fig 2 are represented as a ratio to the signal in Ponceau Red staining to correct for differences in total protein loading with the levels for MET at dose 0 set as 1.

**12. Phagocytosis assay.** Assay for phagocytosis capacity was performed as described [31–33]. Briefly, a total of  $2 \times 10^5$  MOs were infected with *Staphylococcus aureus* at multiplicity of infection (MOI) of 50 in a 24-well plate and incubated with MET for 1 h at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. The number of viable bacteria was determined by serial dilution and colony forming unit (CFU) counts on Chapman medium. The percentage of phagocytosis was calculated



**Fig 2. Effect of MET treatment on breast cancer cell proliferation, viability, ratio of phosphorylated Akt-to-total Akt and MOs phagocytosis capacity.** In breast cancer cells treated or not with MET, (a) cell proliferation was determined by BrdU assay and (b) viability by TBET assay. (c) phosphoAkt to Akt ratio: levels of major proteins stained by red Ponceau are shown as loading control. Values are represented as a ratio to the protein levels in Ponceau red and with the value for zero MET set as 1. MET: metformin, p-Akt: phosphorylated Akt. (d) MOs were infected with *Staphylococcus aureus* before treatment with MET. The results were expressed as a percentage of phagocytosis. Values are presented as the mean with standard error of mean for four independent experiments carried out on three samples (n = 12 for each group). Asterisks indicate significant differences between treated cells and untreated controls by Mann-Whitney U test (\**p* < 0.05). MET: metformin, MOs: monocytes.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240982.g002>

as follows:

$$\text{Phagocytosis\%} = M_{t_0} - 100 \times \frac{\left( \frac{NEC}{NC_1/NC_0} \right)}{M_{t_0}}$$

$M_{t_0}$  is the number of bacteria in the assay sample mixture at  $t_0$ . NEC, number of extracellular bacteria in assay mixtures sample at  $t_1$ .  $NC_0$  and  $NC_1$  correspond to control sample at  $t_0$  and  $t_1$ .

**13. Arginase activity assay.** The enzymatic activity of arginase (EC 3.5.3.1) was evaluated in cell lysates based on determination of urea levels following the L-arginine hydrolysis as described in detail [34]. The arginase activity was expressed as mU urea/mg protein/1 h.

**14. iNOS activity assay.** Measurement of iNOS activity was based on the determination of NO generation levels. The accumulation of NO in cell-free culture supernatants were evaluated by nitrite (NO<sub>2</sub>) measurement, as stable and final end-product of NO, using a sensitive colorimetric Griess reaction as described in detail [34,35]. Absorbance was measured at 540 nm using a Biochrom Anthos 2020 ELISA plate reader. NO production levels were calculated by comparison with a sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub>) curve standard [36]. iNOS activity was obtained by normalizing each NO concentration to milligrams of protein and expressed as picomoles/mg protein/30 min.

**15. LDH-based cytotoxicity assays.** LDH-based cytotoxicity levels were determined by evaluation of LDH release into the cell culture supernatants using Lactate Dehydrogenase Activity Assay kit (MAK066, Sigma-Aldrich). Briefly, 50 μL of supernatant and 50 μL of the Master Reaction Mix were mixed and added to each well of a 96-well plate. Absorbance was measured at 450 nm after 30 min incubation at 37°C in accordance with the manufacturer's instructions.

**16.  ${}_{i\text{f}}\text{Ca}^{2+}$  assay.** The concentrations of  ${}_{i\text{f}}\text{Ca}^{2+}$  were measured biochemically based on the ortho-cresolphthalein complexone (oCPC) method as described elsewhere [37].

**17. Cytokine assays.** Concentration of IFN-γ and IL-10 in cell culture media of MOs or co-culture system supernatants were measured by sandwich enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), using respective commercial kits (BD Biosciences), according to the manufacturer's instructions. Optical densities (OD) were measured at 450 nm using appropriate standard curves for each cytokine.

**18. Protective redox activity assays.** Redox activity was evaluated by determination of the levels of catalase and SOD activities.

**18.1. Catalase activity assay.** The enzymatic activity of catalase was spectrophotometrically determined in cell lysates by measurement of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) decomposition [38]. 10 μL volumes of cell lysates were added to a reaction mixture of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0.9% (v/v) aqueous saline before incubation for 5 min. The reactions were stopped by the addition of Titanyl sulfate (TiOSO<sub>4</sub>), and the absorbance measured at 410 nm.

**18.2. SOD activity assay.** SOD activity in cell lysates was determined spectrophotometrically by measuring production of a water-soluble formazan dye resulting from the reduction of Dojindo's highly water-soluble tetrazolium salt WST-1 ((2-4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt), using a SOD Assay Kit-WST (19160, Sigma Aldrich). Twenty μL of the enzyme working solution were added to a mixture containing 20 μL of cell lysate and 200 μL of WST Working Solution. The microplate was incubated at 37°C for 20 min, and the absorbance read at 440 nm. The SOD activity (percentage inhibition of WST-1 inhibition) was calculated as follows:

$$\text{SOD activity (inhibition rate \%)} = \frac{(\text{Ablank1} - \text{Ablank3}) - (\text{Asample} - \text{Ablank2})}{(\text{Ablank1} - \text{Ablank3})} \times 100$$

**19. Statistical analysis.** Data are presented as the mean with standard errors of means (SEM). Statistical analyses were performed using non-parametric Mann-Whitney *U* or Kruskal-Wallis one-way analysis of variance (ANOVA) test with pairwise comparisons using the Dunn-Bonferroni approach after checking the distribution of data. Statistics were carried out using IBM SPSS Statistics version 20. *P*-values less than 0.05 were considered significant.



## Results

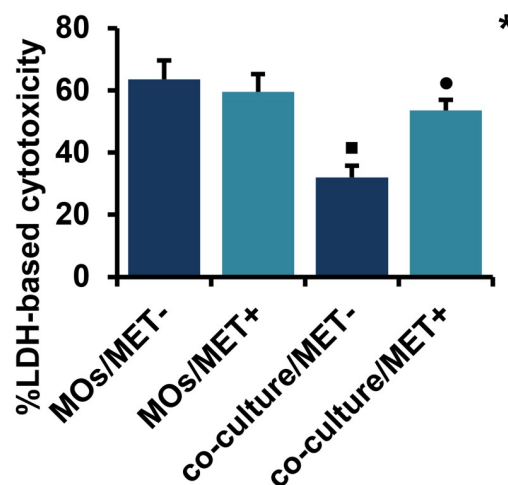
### 1. MET effects on breast cancer cells and on monocytes cultured alone

**1.1. MET downregulates breast cancer cell viability and proliferation, while has no effect on the ratio of phosphorylated Akt1/2 versus total Akt1/2.** As shown in Fig 2a and 2b, MET treatment significantly downregulated breast cancer cell proliferation and viability levels (for both comparisons,  $p < 0.05$ ). Fig 2c shows the raw data of the actual protein levels (upper panels), total Akt1/2 levels (middle panels) and levels of phospho-(activated) Akt1/2 (lower panels). The histogram shows the relative expression levels of activated Akt1/2-to-total Akt1/2 ratio after normalization to the total protein loaded. As observed in Fig 2c, MET treatment did not show a significant difference in either Akt levels and ratio of activated Akt versus total Akt when comparing with MET-untreated cells ( $p > 0.05$ ). So the actions of MET on Akt1/2 are essentially due to a loss/reduction of Akt1/2 activity since when the ratio of active Akt1/2 (phosphorylated) to total Akt1/2 levels is calculated we observed a reduction of Akt1/2 activity in cancer cells.

**1.2. MET downregulates monocyte phagocytosis.** As shown in Fig 2d, the phagocytic activity of MOs significantly decreased after MET treatment ( $p < 0.05$ ).

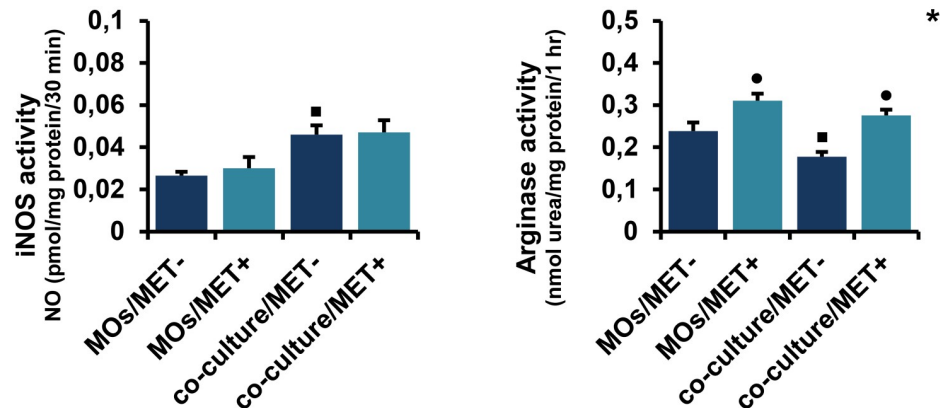
### 2. MET effects on MO cells in monoculture and co-culture systems

**2.1. MET might reverse the co-culture effect on LDH-based cytotoxicity levels, but has no cytotoxic effect on MOs cultured alone.** As shown in Fig 3, MET treatment induced no necrosis/LDH-based cytotoxicity effects on MO cells ( $p > 0.05$ ). Additionally, MET might reverse the co-culture effect on LDH-based cytotoxicity levels. Conversely, the level of LDH-based cytotoxicity was significantly downregulated in MET-untreated co-cultures of MOs with breast cancer cells when compared to MET-untreated MOs cultured alone ( $p < 0.05$ ).



**Fig 3. Cytotoxic effect of MET on MOs and co-culture system.** Necrosis levels were measured spectrophotometrically through the evaluation of LDH release. Values are presented as the mean with standard error of mean for four independent experiments carried out on three samples ( $n = 12$  for each group). MET: metformin, LDH: lactate dehydrogenase, MOs: monocytes, MOs/MET<sup>-</sup>: MET-untreated MOs, MOs/MET<sup>+</sup>: MET-treated MOs, co-culture/MET<sup>-</sup>: MET-untreated co-culture system, co-culture/MET<sup>+</sup>: MET-treated co-culture system. Black dots indicate significant differences when comparing each treated group with untreated controls (0 mM MET) using Mann-Whitney  $U$  test ( $*p < 0.05$ ). Black boxes indicate significant differences highlighted between MET-untreated MOs and MET-untreated co-culture system using Mann-Whitney  $U$  test ( $*p < 0.05$ ). Asterisks indicate significant differences highlighted between all groups by Kruskal-Wallis test with pairwise Dunn-Bonferroni adjustment ( $*p < 0.05$ ).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240982.g003>



**Fig 4. Effect of MET on iNOS and arginase activities in MOs and co-culture system.** NO levels were measured by Griess colorimetric reaction and iNOS activity was obtained by normalizing each NO to protein concentrations and time. The enzymatic activity of arginase was evaluated in cell lysates by the spectrophotometric measurement of urea concentration. Values are presented as the mean with standard error of mean for four independent experiments carried out on three samples ( $n = 12$  for each group). MET: metformin, MOs: monocytes, NO: nitric oxide, iNOS: inducible nitric oxide synthase, MOs/MET<sup>-</sup>: MET-untreated MOs, MOs/MET<sup>+</sup>: MET-treated MOs, co-culture/MET<sup>-</sup>: MET-untreated co-culture system, co-culture/MET<sup>+</sup>: MET-treated co-culture system. Black dots indicate significant differences when comparing each treated group with untreated controls (0 mM MET) using Mann-Whitney  $U$  test ( $*p < 0.05$ ). Black boxes indicate significant differences highlighted between MET-untreated MOs and MET-untreated co-culture system using Mann-Whitney  $U$  test ( $*p < 0.05$ ). Asterisks indicate significant differences highlighted between all groups by Kruskal-Wallis test with pairwise Dunn-Bonferroni adjustment ( $*p < 0.05$ ).

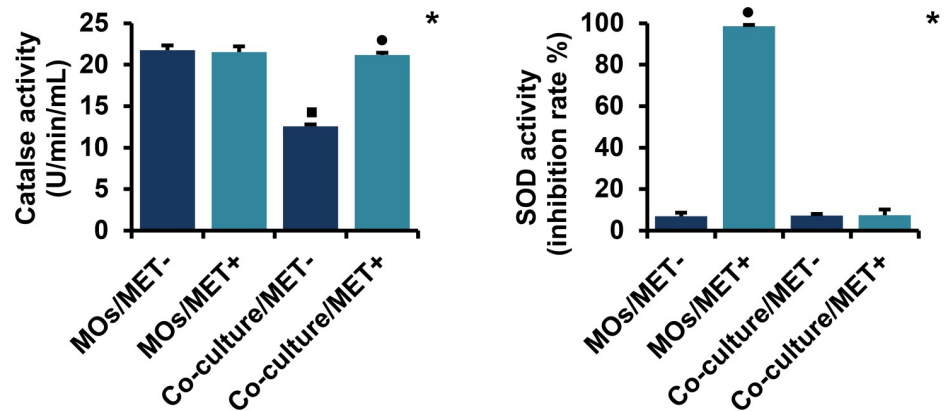
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240982.g004>

**2.2. MET ameliorates simultaneously iNOS and arginase activities in co-cultures of MOs with breast cancer cells.** As depicted in Fig 4, MET induced an increase in iNOS activity in co-culture systems, as compared to MET-treated or MET-untreated MOs cultured alone; while the difference was not significant for the comparison with MET-treated MOs (respectively,  $p > 0.05$  and  $p < 0.05$ ). Additionally, iNOS activity was significantly upregulated in MET-untreated MOs co-cultured with breast cancer cells in comparison to MET-untreated MOs cultured alone ( $p < 0.05$ ). Similarly, (Fig 4), MET might improve the co-culture effect on arginase activity and significantly increased the arginase activity of MOs cultured alone ( $p < 0.05$ ). However, arginase activity was significantly downregulated in MET-untreated MOs co-cultured with breast cancer cells compared to MET-untreated MOs cultured alone ( $p < 0.05$ ).

**2.3. MET reverses the co-culture effect on catalase activity, but not on SOD activity.** As demonstrated in Fig 5, MET had no significant effect on catalase activity in MO cells while might reverse the co-culture effect on catalase activity. Additionally, catalase activity was significantly downregulated in MET-untreated co-cultures of MOs with breast cancer cells than in MET-untreated MOs cultured alone ( $p < 0.05$ ). Moreover, SOD activity was strongly increased in MET-treated compared to MET-untreated MOs ( $p < 0.05$ ). In contrast to MOs cultured alone, MET had no significant effect on SOD activity in co-culture systems.

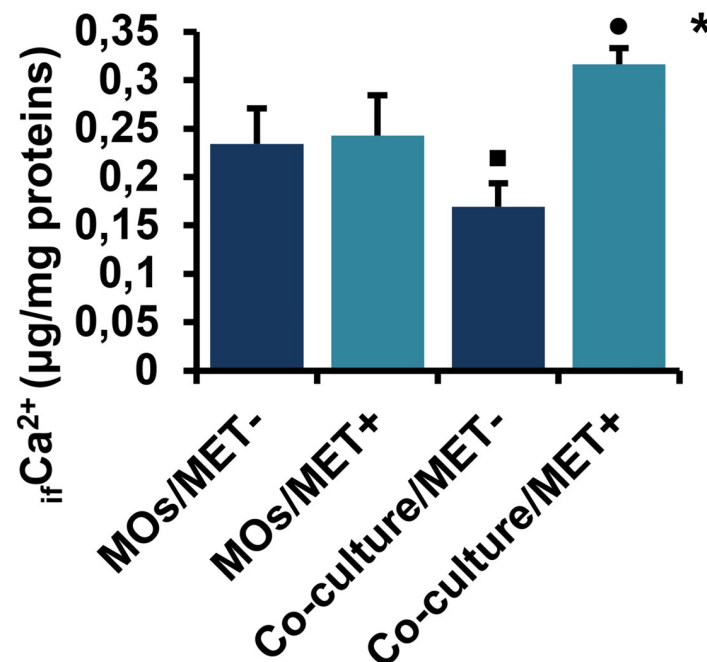
**2.4. The effects of MET on  $_{i}Ca^{2+}$  differs between MOs cultured alone and MOs co-cultured with breast cancer cells.** As shown in Fig 6, MET had no significant effect on  $_{i}Ca^{2+}$  levels in MO cells while might reverse the co-culture effect on  $_{i}Ca^{2+}$  levels ( $p < 0.05$ ). Conversely, MET treatment downregulated  $_{i}Ca^{2+}$  in MET-untreated MOs co-cultivated with breast cancer cells more significantly than in MET-untreated MOs cultured alone ( $p < 0.05$ ).

**2.5. MET reverse the effect of co-culture on the production of IFN- $\gamma$  and IL-10.** As shown in Fig 7, MET induced a significant upregulation of IFN- $\gamma$  levels and a significant downregulation of IL-10 levels in MOs cultured alone (for the two comparisons,  $p < 0.05$ ).



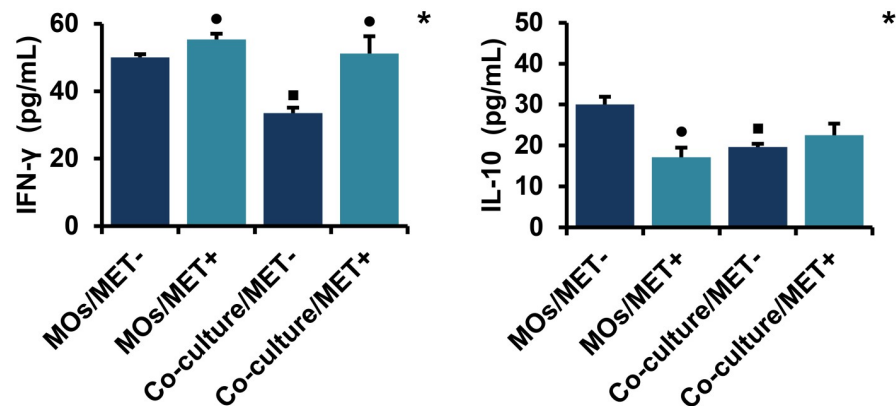
**Fig 5. Effect of MET on catalase and SOD activities in MOs and co-culture system.** Catalase activity was determined spectrophotometrically by measurement of hydrogen peroxide decomposition. SOD activity was evaluated by spectrophotometric measurement of a water-soluble formazan dye. Values are presented as the mean with standard error of mean for four independent experiments carried out on three samples ( $n = 12$  for each group). MET: metformin, MOs: monocytes, SOD: superoxide dismutase, MOs/MET<sup>-</sup>: MET-untreated MOs, MOs/MET<sup>+</sup>: MET-treated MOs, co-culture/MET<sup>-</sup>: MET-untreated co-culture system, co-culture/MET<sup>+</sup>: MET-treated co-culture system. Black dots indicate significant differences when comparing each treated group with untreated controls (0 mM MET) using Mann-Whitney  $U$  test ( $*p < 0.05$ ). Black boxes indicate significant differences highlighted between MET-untreated MOs and MET-untreated co-culture system using Mann-Whitney  $U$  test ( $*p < 0.05$ ). Asterisks indicate significant differences highlighted between all groups by Kruskal-Wallis test with pairwise Dunn-Bonferroni adjustment ( $*p < 0.05$ ).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240982.g005>



**Fig 6. Effect of MET on  $iCa^{2+}$  levels in MOs and co-culture system.** Values are presented as the mean with standard error of mean for four independent experiments carried out on three samples ( $n = 12$  for each group). MET: metformin, MOs: monocytes,  $iCa^{2+}$ : intracellular free calcium ions, MOs/MET<sup>-</sup>: MET-untreated MOs, MOs/MET<sup>+</sup>: MET-treated MOs, co-culture/MET<sup>-</sup>: MET-untreated co-culture system, co-culture/MET<sup>+</sup>: MET-treated co-culture system. Black dots indicate significant differences when comparing each treated group with untreated controls (0 mM MET) using Mann-Whitney  $U$  test ( $*p < 0.05$ ). Black boxes indicate significant differences highlighted between MET-untreated MOs and MET-untreated co-culture system using Mann-Whitney  $U$  test ( $*p < 0.05$ ). Asterisks indicate significant differences highlighted between all groups by Kruskal-Wallis test with pairwise Dunn-Bonferroni adjustment ( $*p < 0.05$ ).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240982.g006>



**Fig 7. Effect of MET on the production of IL-10 and IFN- $\gamma$  in MOs and co-culture system.** IL-10 and IFN- $\gamma$  levels were measured using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Values are presented as the mean with standard error of mean for four independent experiments carried out on three samples ( $n = 12$  for each group). MET: metformin, MOs: monocytes, IFN: interferon, IL: interleukin, MOs/MET<sup>-</sup>: MET-untreated MOs, MOs/MET<sup>+</sup>: MET-treated MOs, co-culture/MET<sup>-</sup>: MET-untreated co-culture system, co-culture/MET<sup>+</sup>: MET-treated co-culture system. Black dots indicate significant differences when comparing each treated group with untreated controls (0 mM MET) using Mann-Whitney  $U$  test ( $\bullet p < 0.05$ ). Black boxes indicate significant differences highlighted between MET-untreated MOs and MET-untreated co-culture system using Mann-Whitney  $U$  test ( $\blacksquare p < 0.05$ ). Asterisks indicate significant differences highlighted between all groups by Kruskal-Wallis test with pairwise Dunn-Bonferroni adjustment ( $*p < 0.05$ ).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240982.g007>

Additionally, co-culture induced a significant downregulation of both IFN- $\gamma$  and IL-10 levels ( $p < 0.05$ ), which are reversed after MET treatment.

## Discussion

MET has recently received increasing attention as a potential therapeutic treatment against cancer [39]. Here we have examined the effects of MET in a novel co-culture system comprising primary MOs and ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup>/HER2<sup>+</sup> breast cancer cells.

Breast tumors characterized by overexpression of HER2 have been correlated with increased tumor aggressiveness, invasiveness and poorer prognosis [40]. Measuring several different biomarkers of phenotypic functional activities of MOs before and during their interplay with primary ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup>/HER2<sup>+</sup> breast cancer cells, we confirm scientific relevance of the co-culture system over the use of isolated cell types for analyzing the reversing effects of MET in a tumor-like microenvironment, where cancer cells usually alter immune cell functions, especially affecting their cell metabolism and ability for the production of antitumor cytokines, like co-operative cytokines IFN- $\gamma$  and IL-10.

The dose of MET used in these experiments (2.5 mM) is relatively higher than those used clinically for the treatment of type 2 diabetes (ca 0.5 mM). However, it is important to note that *in vitro* cultured cells are maintained under less physiological conditions. In particular, cultured cells do not benefit from the indirect anti-tumor effects of MET occurring *in vivo* such as the reduction of insulin levels—where insulin is known to have a mitogenic effect—and cultured cells are exposed to high concentrations of growth factors and glucose present in the culture medium, which may help explain the required higher doses of MET [41].

The anti-tumorigenic properties of MET have been reported in several studies associated with indirect action (reduced insulin levels) or direct actions on molecular pathways that regulate breast tumor cell growth and death [42]. MET may mediate its effects through actions on different cells of the tumor microenvironment, including MOs-macrophages that would be involved in controlling tumor cell growth and progression. However, the activities of immune

cells could undoubtedly change when they are in contact with tumor cells. In this context, we investigated the effect of MET on functional activities of autologous MOs cultured alone and when co-cultured with primary breast cancer cells. In conclusion, our results demonstrate a significant effect of MET during MOs-breast cancer cells crosstalk.

Here, we first tested the effects of MET on proliferation and viability of cancer cells. We found that MET downregulated both the proliferation and viability of breast cancer cells. Our results are consistent with those obtained recently using BrdU and 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide for (MTT) assays on breast cancer cell lines MCF-7, MDA-MB-231 and MDA-MB-435 [17,43]. The same effects were observed on MCF-7 and MDA-MB-231 cell viability with the doses of at 1 mM and 5 mM of MET using TBET assays after 24 h and 48 h of treatment [44]. In terms of cell activation and proliferation, the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway has been highlighted to play an important role in vital cell functions including cell growth, proliferation, differentiation and survival [45]. Its hyper-activation can lead to excessive tumor cell proliferation, inhibition of apoptosis, angiogenesis, invasion and metastasis [46–48]. For our part, at the concentration of MET used (2.5 mM) we found a modest and non significant reduction of the PI3K/Akt activation in breast cancer cells. However, several studies reported that metformin reduced the survival and proliferation rate of breast cancer cells through the inhibition of PI3K/Akt signaling pathway [49,50].

The phagocytic activity of MOs is the subject of several studies under normal and pathological conditions, including breast cancer [51]. In our study, we observed that pretreatment with MET downregulated the phagocytic capacity of MOs, which is of interest, knowing that high phagocytic capacity is associated with MOs that promote survival and extravasation of cancer cells, and characterizes the so-called 'classical MOs' in humans [52,53].

Measuring levels of proliferation and phagocytosis in co-culture systems was uninformative because BrdU incorporation and anti-Akt antibodies used for viability and proliferation assays do not discriminate for one cell type or the other in the co-culture [54–56] and the bacteria used for phagocytosis assay have the ability to invade and replicate within several types of phagocytic and nonphagocytic cells, including epithelial cells and this invasion can lead to apoptosis [10,57].

It is well known that necrosis and iNOS are both involved in tissue damage occurring during inflammation. Our results showed that MET treatment had no effect on MOs necrotic death as demonstrated by LDH-based cytotoxicity. However, MET might ameliorate the co-culture effect on necrosis, which is in agreement with previous *in vitro* studies, carried out on BT-20 breast cancer cell line [18]. In MOs, as well as in other cells especially macrophages, the amino acid L-arginine is also used as a substrate by arginase to produce polyamines [58] that contribute to the tumor progression [59], and by iNOS to produce NO [58], which has antitumor effects at high levels [60]. The current study provides evidence that MOs cultured with breast cancer cells exhibited high levels of iNOS, but remain without marked change when treated with MET. Our observations are in agreement with earlier findings demonstrating that MET induces antitumoral activity of macrophages during breast cancer [61] and suppresses polarization toward pro-tumoral phenotypes [62]. Although arginase activity was downregulated in untreated co-cultured cells, it was reversed after MET treatment. Hence, MET has been reported to have opposing effects in normal or pathological conditions whereby it can both attenuate NO production and enhance arginase activation in MOs and macrophages [63,64]. It would be of interest to check the impact of MET treatment on iNOS and arginase activities simultaneously.

The link between cancer and altered metabolism has previously been suggested as a common feature of cancerous tissues, such as the Warburg effect, in which some antioxidant molecules can be used in protective mechanisms against oxidative stress and ROS that are

produced during rapid cell proliferation [65]. High levels of ROS can cause macromolecular damage, that can lead to apoptosis and senescence [66]. Our findings demonstrated that catalase activity was downregulated in MET-untreated co-cultures, whereas the co-culture effect on catalase activity can be reversed by MET treatment. Additionally, SOD activity was changed only in MET-treated MOs. In summary, MET treatment did not show metabolic alterations with regard to the levels of the antioxidant molecules catalase and SOD within the co-cultures of MOs with breast cancer cells compared to MOs cultivated alone.

$_{i}Ca^{2+}$  is an important secondary messenger that regulates various cellular processes and signaling pathways including those related to cancer, such as apoptosis, proliferation and metastasis [67,68], and those involved in immune responses of MOs, including the production of cytokines and phagocytic activation [69,70]. We first observed that  $_{i}Ca^{2+}$  levels were reduced in co-culture of MOs with breast cancer cells. In contrast, MET treatment induced  $_{i}Ca^{2+}$  upregulation in MOs and might reverse the effect of co-culture. So, it has been reported that increased levels of calcium ions are related to both MO activation and the induction of apoptosis in breast cancer cells [68,71,72].

It is now accepted that IL-10 enhances cancer immune surveillance and suppression of cancer-associated inflammation [73], as well as inducing expression of IFN- $\gamma$  [74], which exerts antitumor activities directly by enhancement of tumor cells antigenicity, inhibition of cell proliferation, the induction of apoptosis or indirectly by inhibition of angiogenesis [75]. Our results indicate that the levels of both IL-10 and IFN- $\gamma$  decreased during interplay between MOs and breast cancer cells. Except with IL-10, treatment with MET has shown marked differences between its action when MOs are cultured alone and when co-cultured with breast cancer cells. MET induced a decrease in IL-10 levels in MOs and, conversely, an increase in IFN- $\gamma$  levels. However, MET treatment might ameliorate the co-culture effect on the production of both cytokines, although the differences were not significant for IL-10. So, the results did not show significant differences for IL-10 between cultures of MOs alone, in the absence of treatment, and cultures of MOs with breast cancer cells, treated with MET. These suggest that MET could contribute to the conservation of IL-10 expression levels when MO comes into contact with cancer cells, without inducing changes usually seen after interplay with cancer cells. Our results demonstrate that MET treatment is clearly effective and important in a system that shares some similarities with the biological system where mononuclear cells are not alone but may be confronted with malignant cells.

Of note, circulating MOs can exert different roles based on phenotype characterization. Hence, it has been reported that circulating monocytes subsets so-called classical inflammatory monocytes (moM1, CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>-</sup>) and patrolling non-classical monocytes (moM3, CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>++</sup>) exert opposite effects after their recruitment in tumor microenvironment *via* the chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2), also referred to as monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1) and small inducible cytokine A2, which is secreted by malignant cells. moM1 can be recruited to the tumor microenvironment where they can be transformed into tumor-associated macrophages (TAMs) that facilitate tumorigenesis by suppression of CD8<sup>+</sup> T-cell function, recruitment of regulatory T (Treg) cells, angiogenesis, tumor cell intravasation, and metastasis [76], while moM3 display an anti-tumoral role, by directly engulfing cancer cells and by releasing CCL3, CCL4 and CCL5 chemokines, which in turn induce recruitment and activation of cytotoxic natural killer (NK) cells [52]. Another subset of circulating and tumor-associated monocytes endowed with proangiogenic activity, are characterized by the expression of the TIE-2/Tek angiopoietin receptor, Endoglin and VEGF-R2 in the intermediate monocytes subset (moM2, CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>+</sup>) as confirmed by a genomic analysis [77]. TIE-2 expressing monocytes (TEM) are recruited to the tumor site where they have been shown to be essential for angiogenesis and inhibition of tumor cell apoptosis by mechanisms depending

on TNF- $\alpha$  release. They also have the highest capacity to induce CD4<sup>+</sup> T-cell activation [78]. Therefore, it would be of interest to investigate MET effects on all characterized MO subsets before and after their individual crosstalk with the studied autologous breast cancer cells. The specific objective being to see whether or not MET treatment would reverse the pro-tumoral activities of moM1 and moM2, knowing that monocytes are endowed with plasticity and versatility in their phenotype [79,80].

## Conclusions and future prospects

*In fine*, our results not only show that the activities of human MOs change when they interact with autologous primary breast cancer cells, but also provide the first evidence that MET treatment can have a potent role in reversing the effects of the crosstalk between MOs and breast cancer cells, especially on the production of co-operative ‘antitumor IFN- $\gamma$ ’ and ‘regulatory IL-10’ cytokines, intracellular calcium signals, as well as immune-metabolic and protective redox based-biomarkers as summarized in the graphical abstract (S2 Fig). These findings open the route to further investigations including the study of MET on autophagy/reverse Warburg effects, as well as the molecular characterization of different subsets of monocytes involved in the interaction with breast cancer cells following MET treatment.

## Supporting information

### S1 Fig.

(DOCX)

### S2 Fig.

(DOCX)

### S3 Fig.

(PDF)

## Acknowledgments

The authors are grateful to the Team W0414101 of the Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology (University of Tlemcen, Algeria) for their help and technical assistance.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Zoheir Dahmani, Gérard Lefranc, Ned J. Lamb, Mourad Aribi.

**Data curation:** Zoheir Dahmani, Lynda Addou-Klouche, Aida Messaoud, Mahmoud Idris Benaissti, Hadjer Terbeche, Marwa Miliani, Anne Fernandez.

**Formal analysis:** Zoheir Dahmani, Sara Dahou, Nihel Chahinez Djebri, Wafa Nouari, Anne Fernandez, Ned J. Lamb, Mourad Aribi.

**Funding acquisition:** Mourad Aribi.

**Investigation:** Zoheir Dahmani, Lynda Addou-Klouche, Florence Gizard, Sara Dahou, Aida Messaoud, Nihel Chahinez Djebri, Mahmoud Idris Benaissti, Wafa Nouari, Marwa Miliani, Gérard Lefranc, Anne Fernandez, Mourad Aribi.

**Methodology:** Zoheir Dahmani, Florence Gizard, Mahmoud Idris Benaissti, Meriem Mostefaoui, Hadjer Terbeche, Wafa Nouari, Marwa Miliani, Anne Fernandez, Ned J. Lamb, Mourad Aribi.

**Project administration:** Gérard Lefranc, Mourad Aribi.

**Software:** Ned J. Lamb.

**Supervision:** Florence Gizard, Gérard Lefranc, Anne Fernandez, Ned J. Lamb, Mourad Aribi.

**Validation:** Zoheir Dahmani, Sara Dahou, Aida Messaoud, Nihel Chahinez Djebri, Mahmoud Idris Benaissi, Meriem Mostefaoui, Hadjer Terbeche, Mourad Aribi.

**Visualization:** Zoheir Dahmani, Lynda Addou-Klouche, Florence Gizard, Sara Dahou.

**Writing – original draft:** Zoheir Dahmani, Ned J. Lamb, Mourad Aribi.

**Writing – review & editing:** Anne Fernandez, Ned J. Lamb, Mourad Aribi.

## References

1. Ghoncheh M, Pournamdar Z, Salehiniya H. Incidence and Mortality and Epidemiology of Breast Cancer in the World. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP* (2016) 17:43–46.
2. Soliman H. Immunotherapy strategies in the treatment of breast cancer. *Cancer Control J Moffitt Cancer Cent* (2013) 20:17–21.
3. Gingras I, Azim HA, Ignatiadis M, Sotiriou C. Immunology and breast cancer: toward a new way of understanding breast cancer and developing novel therapeutic strategies. *Clin Adv Hematol Oncol HO* (2015) 13:372–382.
4. Sabatier R, Finetti P, Mamessier E, Adelaide J, Chaffanet M, Ali HR, et al. Prognostic and predictive value of PDL1 expression in breast cancer. *Oncotarget* (2015) 6:5449–5464. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3216> PMID: 25669979
5. Xu T, He B-S, Liu X-X, Hu X-X, Lin K, Pan Y-Q, et al. The Predictive and Prognostic Role of Stromal Tumor-infiltrating Lymphocytes in HER2-positive Breast Cancer with Trastuzumab-based Treatment: a Meta-analysis and Systematic Review. *J Cancer* (2017) 8:3838–3848. <https://doi.org/10.7150/jca.21051> PMID: 29151971
6. Doseff A, Parihar A. “Monocyte Subsets and Their Role in Tumor Progression,” in *Tumor Microenvironment and Myelomonocytic Cells*, ed. Biswas S. (InTech). <https://doi.org/10.5772/32615>
7. Ben-Baruch A. Host microenvironment in breast cancer development: Inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor–microenvironment interactions. *Breast Cancer Res* (2002) 5: <https://doi.org/10.1186/bcr554> PMID: 12559043
8. Evani SJ, Prabhu RG, Gnanaruban V, Finol EA, Ramasubramanian AK. Monocytes mediate metastatic breast tumor cell adhesion to endothelium under flow. *FASEB J* (2013) 27:3017–3029. <https://doi.org/10.1096/fj.12-224824> PMID: 23616566
9. Mohamed M, Cavallo-Medved D, Rudy D, Anbalagan A, Moin K, Sloane B. Interleukin-6 Increases Expression and Secretion of Cathepsin B by Breast Tumor-Associated Monocytes. *Cell Physiol Biochem* (2010) 25:315–324. <https://doi.org/10.1159/000276564> PMID: 20110692
10. Chiang C-F, Chao T-T, Su Y-F, Hsu C-C, Chien C-Y, Chiu K-C, et al. Metformin-treated cancer cells modulate macrophage polarization through AMPK-NF-κB signaling. *Oncotarget* (2017) 8: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14982> PMID: 28157701
11. Stout RD, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol* (2004) 76:509–513. <https://doi.org/10.1189/jlb.0504272> PMID: 15218057
12. Idzkowska E, Eljaszewicz A, Miklasz P, Musial WJ, Tycinska AM, Moniuszko M. The Role of Different Monocyte Subsets in the Pathogenesis of Atherosclerosis and Acute Coronary Syndromes. *Scand J Immunol* (2015) 82:163–173. <https://doi.org/10.1111/sji.12314> PMID: 25997925
13. Szaflarska A, Baj-Krzyworzeka M, Siedlar M, Węglarczyk K, Ruggiero I, Hajto B, et al. Antitumor response of CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> monocyte subpopulation. *Exp Hematol* (2004) 32:748–755. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2004.05.027> PMID: 15308326
14. Fan C, Wang Y, Liu Z, Sun Y, Wang X, Wei G, et al. Metformin exerts anticancer effects through the inhibition of the Sonic hedgehog signaling pathway in breast cancer. *Int J Mol Med* (2015) 36:204–214. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2217> PMID: 25999130
15. Liu B, Fan Z, Edgerton SM, Yang X, Lind SE, Thor AD. Potent anti-proliferative effects of metformin on trastuzumab-resistant breast cancer cells via inhibition of erbB2/IGF-1 receptor interactions. *Cell Cycle* (2011) 10:2959–2966. <https://doi.org/10.4161/cc.10.17.16359> PMID: 21862872



16. Camacho L, Dasgupta A, Jiralerspong S. Metformin in breast cancer—an evolving mystery. *Breast Cancer Res* (2015) 17: <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0598-8> PMID: 26111812
17. Queiroz EAIF, Puukila S, Eichler R, Sampaio SC, Forsyth HL, Lees SJ, et al. Metformin Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest Mediated by Oxidative Stress, AMPK and FOXO3a in MCF-7 Breast Cancer Cells. *PLoS ONE* (2014) 9:e98207. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098207> PMID: 24858012
18. Ding L, Liang G, Yao Z, Zhang J, Liu R, Chen H, et al. Metformin prevents cancer metastasis by inhibiting M2-like polarization of tumor associated macrophages. *Oncotarget* (2015) 6: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5541> PMID: 26497364
19. O'Neill LAJ, Kishton RJ, Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol* (2016) 16:553–565. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.70> PMID: 27396447
20. Ferret P-J, Soum E, Negre O, Fradelizi D. Auto-protective redox buffering systems in stimulated macrophages. *BMC Immunol* (2002) 3:3. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-3-3> PMID: 11914132
21. Yanagawa Y, Iwabuchi K, Onoé K. Co-operative action of interleukin-10 and interferon-gamma to regulate dendritic cell functions. *Immunology* (2009) 127:345–353. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02986.x> PMID: 19191915
22. Feller WF, Stewart SE, Kantor J. Primary tissue culture explants of human breast cancer. *J Natl Cancer Inst* (1972) 48:1117–1120. PMID: 4336875
23. Speirs V, Green AR, Walton DS, Kerin MJ, Fox JN, Carleton PJ, et al. Short-term primary culture of epithelial cells derived from human breast tumours. *Br J Cancer* (1998) 78:1421–1429. <https://doi.org/10.1038/bjc.1998.702> PMID: 9836473
24. Jones JCR. Reduction of contamination of epithelial cultures by fibroblasts. *CSH Protoc* (2008) 2008: pdb.prot4478. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4478> PMID: 21356842
25. Farnie G, Clarke RB, Spence K, Pinnock N, Brennan K, Anderson NG, et al. Novel Cell Culture Technique for Primary Ductal Carcinoma In Situ: Role of Notch and Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Pathways. *JNCI J Natl Cancer Inst* (2007) 99:616–627. <https://doi.org/10.1093/jnci/djk133> PMID: 17440163
26. Benton G, DeGray G, Kleinman HK, George J, Arnaoutova I. In Vitro Microtumors Provide a Physiologically Predictive Tool for Breast Cancer Therapeutic Screening. *PLOS ONE* (2015) 10:e0123312. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123312> PMID: 25856378
27. Wahl LM, Wahl SM, Smythies LE, Smith PD. “Isolation of Human Monocyte Populations,” in *Current Protocols in Immunology*, eds. Coligan J. E., Bierer B. E., Margulies D. H., Shevach E. M., Strober W. (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.). <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0706as70> PMID: 18432977
28. Pabst MJ, Pabst KM, Handsman DB, Beranova-Giorgianni S, Giorgianni F. Proteome of monocyte priming by lipopolysaccharide, including changes in interleukin-1beta and leukocyte elastase inhibitor. *Proteome Sci* (2008) 6:13. <https://doi.org/10.1186/1477-5956-6-13> PMID: 18492268
29. Zhou L, Somasundaram R, Nederhof RF, Dijkstra G, Faber KN, Peppelenbosch MP, et al. Impact of human granulocyte and monocyte isolation procedures on functional studies. *Clin Vaccine Immunol CVI* (2012) 19:1065–1074. <https://doi.org/10.1128/CVI.05715-11> PMID: 22552601
30. Sarvaiya HA, Lazar IM. Insulin stimulated MCF7 breast cancer cells: Proteome dataset. *Data Brief* (2016) 9:579–584. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2016.09.025> PMID: 27761513
31. Aribi M, Meziane W, Habi S, Boulatika Y, Marchandin H, Aymeric J-L. Macrophage Bactericidal Activities against *Staphylococcus aureus* Are Enhanced In Vivo by Selenium Supplementation in a Dose-Dependent Manner. *PLOS ONE* (2015) 10:e0135515. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135515> PMID: 26340099
32. Herrera MT, Gonzalez Y, Hernández-Sánchez F, Fabián-San Miguel G, Torres M. Low serum vitamin D levels in type 2 diabetes patients are associated with decreased mycobacterial activity. *BMC Infect Dis* (2017) 17: <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2705-1> PMID: 28882103
33. Nouari W, Ysmail-Dahlouk L, Aribi M. Vitamin D3 enhances bactericidal activity of macrophage against *Pseudomonas aeruginosa*. *Int Immunopharmacol* (2016) 30:94–101. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.11.033> PMID: 26655879
34. Aribi M. Macrophage Bactericidal Assays. *Methods Mol Biol Clifton NJ* (2018) 1784:135–149. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7837-3\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7837-3_14) PMID: 29761396
35. Kavooosi G, Ardestani SK, Kariminia A, Tavakoli Z. Production of nitric oxide by murine macrophages induced by lipophosphoglycan of *Leishmania major*. *Korean J Parasitol* (2006) 44:35. <https://doi.org/10.3347/kjp.2006.44.1.35> PMID: 16514280
36. Blond D, Raoul H, Le Grand R, Dormont D. Nitric Oxide Synthesis Enhances Human Immunodeficiency Virus Replication in Primary Human Macrophages. *J Virol* (2000) 74:8904–8912. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.19.8904-8912.2000> PMID: 10982333

37. Takano S, Kaji H, Hayashi F, Higashiguchi K, Joukei S, Kido Y, et al. A calculation model for serum ionized calcium based on an equilibrium equation for complexation. *Anal Chem Insights* (2012) 7:23–30. <https://doi.org/10.4137/ACI.S9681> PMID: 22837641
38. Walton PA. Effects of peroxisomal catalase inhibition on mitochondrial function. *Front Physiol* (2012) 3: <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00108> PMID: 22536190
39. Zhuang Y, Miskimins WK. Metformin Induces Both Caspase-Dependent and Poly(ADP-ribose) Polymerase-Dependent Cell Death in Breast Cancer Cells. *Mol Cancer Res* (2011) 9:603–615. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0343> PMID: 21422199
40. Eroglu Z, Tagawa T, Somlo G. Human epidermal growth factor receptor family-targeted therapies in the treatment of HER2-overexpressing breast cancer. *The Oncologist* (2014) 19:135–150. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2013-0283> PMID: 24436312
41. Garofalo C, Capristo M, Manara MC, Mancarella C, Landuzzi L, Belfiore A, et al. Metformin as an adjuvant drug against pediatric sarcomas: hypoxia limits therapeutic effects of the drug. *PLoS One* (2013) 8: e83832. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083832> PMID: 24391834
42. Xin W, Fang L, Fang Q, Zheng X, Huang P. Effects of metformin on survival outcomes of pancreatic cancer patients with diabetes: A meta-analysis. *Mol Clin Oncol* (2018) 8:483–488. <https://doi.org/10.3892/mco.2017.1541> PMID: 29468063
43. Gao Z-Y, Liu Z, Bi M-H, Zhang J-J, Han Z-Q, Han X, et al. Metformin induces apoptosis via a mitochondria-mediated pathway in human breast cancer cells in vitro. *Exp Ther Med* (2016) 11:1700–1706. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3143> PMID: 27168791
44. Marinello PC, da Silva TNX, Panis C, Neves AF, Machado KL, Borges FH, et al. Mechanism of metformin action in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells involves oxidative stress generation, DNA damage, and transforming growth factor  $\beta$ 1 induction. *Tumor Biol* (2016) 37:5337–5346. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4395-x> PMID: 26561471
45. Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci* (2011) 36:320–328. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.03.006> PMID: 21531565
46. Miller TW, Hennessy BT, González-Angulo AM, Fox EM, Mills GB, Chen H, et al. Hyperactivation of phosphatidylinositol-3 kinase promotes escape from hormone dependence in estrogen receptor-positive human breast cancer. *J Clin Invest* (2010) 120:2406–2413. <https://doi.org/10.1172/JCI41680> PMID: 20530877
47. Mutlu M, Saatci Ö, Ansari SA, Yurdusev E, Shehwana H, Konu Ö, et al. miR-564 acts as a dual inhibitor of PI3K and MAPK signaling networks and inhibits proliferation and invasion in breast cancer. *Sci Rep* (2016) 6: <https://doi.org/10.1038/srep32541> PMID: 27600857
48. Sadeghi N, Gerber DE. Targeting the PI3K pathway for cancer therapy. *Future Med Chem* (2012) 4:1153–1169. <https://doi.org/10.4155/fmc.12.56> PMID: 22709255
49. Alimova IN, Liu B, Fan Z, Edgerton SM, Dillon T, Lind SE, et al. Metformin inhibits breast cancer cell growth, colony formation and induces cell cycle arrest in vitro. *Cell Cycle* (2009) 8:909–915. <https://doi.org/10.4161/cc.8.6.7933> PMID: 19221498
50. Al-Zaidan L, El Ruz RA, Malki AM. Screening Novel Molecular Targets of Metformin in Breast Cancer by Proteomic Approach. *Front Public Health* (2017) 5:277. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00277> PMID: 29085821
51. Baskić D, Aćimović LD, Arsenijević N. [The phagocytic activity of monocytes in different stages of breast cancer]. *Med Pregl* (2003) 56 Suppl 1:103–107.
52. Cassetta L, Pollard JW. Cancer immunosurveillance: role of patrolling monocytes. *Cell Res* (2016) 26:3–4. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.144> PMID: 26634605
53. Al Dubayee MS, Alayed H, Almansour R, Alqaoud N, Alnamlah R, Obeid D, et al. Differential Expression of Human Peripheral Mononuclear Cells Phenotype Markers in Type 2 Diabetic Patients and Type 2 Diabetic Patients on Metformin. *Front Endocrinol* (2018) 9:537. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00537> PMID: 30356719
54. Szewczyk M, Richter C, Briese V, Richter D-U. A retrospective in vitro study of the impact of anti-diabetics and cardioselective pharmaceuticals on breast cancer. *Anticancer Res* (2012) 32:2133–2138. PMID: 22593501
55. Rath M, Müller I, Kropf P, Closs EI, Munder M. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Front Immunol* (2014) 5: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00532> PMID: 25386178
56. Avtandilyan N, Javrushyan H, Petrosyan G, Trchounian A. The Involvement of Arginase and Nitric Oxide Synthase in Breast Cancer Development: Arginase and NO Synthase as Therapeutic Targets in Cancer. *BioMed Res Int* (2018) 2018:1–9. <https://doi.org/10.1155/2018/8696923> PMID: 29854802

57. Keshet R, Erez A. Arginine and the metabolic regulation of nitric oxide synthesis in cancer. *Dis Model Mech* (2018) 11:dmm033332. <https://doi.org/10.1242/dmm.033332> PMID: 30082427
58. Bułdak Ł, Łabuzek K, Bułdak RJ, Kozłowski M, Machnik G, Liber S, et al. Metformin affects macrophages' phenotype and improves the activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase and decreases malondialdehyde concentration in a partially AMPK-independent manner in LPS-stimulated human monocytes/macrophages. *Pharmacol Rep* (2014) 66:418–429. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2013.11.008> PMID: 24905518
59. Kato Y, Koide N, Komatsu T, Tumurkhuu G, Dagvadorj J, Kato K, et al. Metformin Attenuates Production of Nitric Oxide in Response to Lipopolysaccharide by Inhibiting MyD88-Independent Pathway. *Horm Metab Res* (2010) 42:632–636. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1255033> PMID: 20560107
60. Zahzeh MR, Loukidi B, Meziane W, Haddouche M, Mesli N, Zouaoui Z, et al. Relationship between NADPH and Th1/Th2 ratio in patients with non-Hodgkin lymphoma who have been exposed to pesticides. *J Blood Med* (2015) 6:99–107. <https://doi.org/10.2147/JBM.S78759> PMID: 25878515
61. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* (2011) 11:85–95. <https://doi.org/10.1038/nrc2981> PMID: 21258394
62. Monteith GR, Davis FM, Roberts-Thomson SJ. Calcium Channels and Pumps in Cancer: Changes and Consequences. *J Biol Chem* (2012) 287:31666–31673. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.343061> PMID: 22822055
63. Muhammad SNH, Mokhtar NF, Yaacob NS. 15d-PGJ2 Induces Apoptosis of MCF-7 and MDA-MB-231 Cells via Increased Intracellular Calcium and Activation of Caspases, Independent of ER $\alpha$  and ER $\beta$ . *Asian Pac J Cancer Prev APJCP* (2016) 17:3223–3228. PMID: 27509924
64. Brown D, Donaldson K, Stone V. Effects of PM10 in human peripheral blood monocytes and J774 macrophages. *Respir Res* (2004) 5: <https://doi.org/10.1186/1465-9921-5-29> PMID: 15613243
65. Gronski MA, Kinchen JM, Juncadella IJ, Franc NC, Ravichandran KS. An essential role for calcium flux in phagocytes for apoptotic cell engulfment and the anti-inflammatory response. *Cell Death Differ* (2009) 16:1323–1331. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.55> PMID: 19461656
66. Cross BM, Breitwieser GE, Reinhardt TA, Rao R. Cellular calcium dynamics in lactation and breast cancer: from physiology to pathology. *Am J Physiol-Cell Physiol* (2014) 306:C515–C526. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00330.2013> PMID: 24225884
67. França E, Honorio-França A, Nunes G, Fagundes D, Marchi P, Fernandes R, et al. Intracellular calcium is a target of modulation of apoptosis in MCF-7 cells in the presence of IgA adsorbed to polyethylene glycol. *OncoTargets Ther* (2016) 617. <https://doi.org/10.2147/OTT.S99839> PMID: 26893571
68. Dennis KL, Blatner NR, Gounari F, Khazaie K. Current status of interleukin-10 and regulatory T-cells in cancer. *Curr Opin Oncol* (2013) 25:637–645. <https://doi.org/10.1097/CCO.000000000000006> PMID: 24076584
69. Mumm JB, Emmerich J, Zhang X, Chan I, Wu L, Mauze S, et al. IL-10 elicits IFN $\gamma$ -dependent tumor immune surveillance. *Cancer Cell* (2011) 20:781–796. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.11.003> PMID: 22172723
70. Mojic M, Takeda K, Hayakawa Y. The Dark Side of IFN- $\gamma$ : Its Role in Promoting Cancer Immuno-evasion. *Int J Mol Sci* (2017) 19:89. <https://doi.org/10.3390/ijms19010089> PMID: 29283429
71. Olingy CE, Dinh HQ, Hedrick CC. Monocyte heterogeneity and functions in cancer. *J Leukoc Biol* (2019) 106:309–322. <https://doi.org/10.1002/JLB.4RI0818-311R> PMID: 30776148
72. Turrini R, Pabois A, Xenarios I, Coukos G, Delaloye J-F, Doucey M-A. TIE-2 expressing monocytes in human cancers. *Oncoimmunology* (2017) 6:e1303585. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1303585> PMID: 28507810
73. Ibberson M, Bron S, Guex N, Faes-van't Hull E, Ifticene-Treboux A, Henry L, et al. TIE-2 and VEGFR Kinase Activities Drive Immunosuppressive Function of TIE-2-Expressing Monocytes in Human Breast Tumors. *Clin Cancer Res* (2013) 19:3439–3449. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3181> PMID: 23649001
74. Das A, Sinha M, Datta S, Abas M, Chaffee S, Sen CK, et al. Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration. *Am J Pathol* (2015) 185:2596–2606. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.06.001> PMID: 26118749
75. Mitchell AJ, Roediger B, Weninger W. Monocyte homeostasis and the plasticity of inflammatory monocytes. *Cell Immunol* (2014) 291:22–31. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.05.010> PMID: 24962351
76. Jenkins SJ, Ruckerl D, Cook PC, Jones LH, Finkelman FD, van Rooijen N, et al. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science* (2011) 332:1284–1288. <https://doi.org/10.1126/science.1204351> PMID: 21566158

77. Stephen J, Emerson B, Fox KAA, Dransfield I. The uncoupling of monocyte-platelet interactions from the induction of proinflammatory signaling in monocytes. *J Immunol Baltim Md 1950* (2013) 191:5677–5683. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301250> PMID: 24133165
78. Tachado SD, Li X, Swan K, Patel N, Koziel H. Constitutive activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway down-regulates TLR4-mediated tumor necrosis factor-alpha release in alveolar macrophages from asymptomatic HIV-positive persons in vitro. *J Biol Chem* (2008) 283:33191–33198. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805067200> PMID: 18826950
79. Kahl BC, Goulian M, van Wamel W, Herrmann M, Simon SM, Kaplan G, et al. Staphylococcus aureus RN6390 replicates and induces apoptosis in a pulmonary epithelial cell line. *Infect Immun* (2000) 68:5385–5392. <https://doi.org/10.1128/iai.68.9.5385-5392.2000> PMID: 10948168
80. Bravo-Santano N, Ellis JK, Mateos LM, Calle Y, Keun HC, Behrends V, et al. Intracellular Staphylococcus aureus Modulates Host Central Carbon Metabolism To Activate Autophagy. *mSphere* (2018) 3: <https://doi.org/10.1128/mSphere.00374-18> PMID: 30089650

## Résumé

**Introduction :** Les activités immunitaires des monocytes (MOs) peuvent être modifiées dans le microenvironnement des tumeurs malignes solides, y compris le cancer du sein. Il a été démontré que la metformine (1,1-diméthylbiguanide hydrochloride, MET) diminue la prolifération des cellules tumorales, mais ses effets doivent encore être explorés en ce qui concerne les activités des MOs (monocytes) lors de leur interaction avec les cellules cancéreuses du sein. Nous avons étudié les effets de la MET sur les activités fonctionnelles phénotypiques globales, y compris les biomarqueurs d'immunométabolisme cellulaire et les biomarqueurs de l'activité protectrice redox, les ions calcium libres intracellulaires ( $Ca^{2+}$ ), la phagocytose et les cytokines coopératives (IFN- $\gamma$  et IL-10) des MOs autologues avant et pendant leur interaction avec les cellules primaires du cancer du sein (ER-/PR-/HER2+).

**Matériels et méthodes :** Les cellules de cancer du sein primaires humaines ont été cultivées seules ou co-cultivées avec des MOs autologues avant le traitement avec la MET.

**Résultats:** La MET a diminué la prolifération des cellules cancéreuses du sein ainsi que la phagocytose, alors qu'elle n'avait aucun effet significatif sur le rapport de Akt phosphorylé (p-Akt)/Akt total ( $p > 0,05$ ). De plus, nous avons observé qu'en absence de traitement par la MET, les niveaux de cytotoxicité à base de lactate déshydrogénase (LDH), l'activité de catalase,  $Ca^{2+}$ , IL-10 et l'activité arginase étaient significativement réduites dans les co-cultures par rapport à ceux des MOs cultivés seuls, tandis que les niveaux d'activité de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) étaient significativement augmentés (pour toutes les comparaisons,  $p < 0,05$ ). En revanche, le traitement par la MET pourrait inverser les effets de la co-culture sur les niveaux de cytotoxicité basée sur la LDH, l'activité de l'arginase, l'activité de catalase,  $Ca^{2+}$  et l'IFN- $\gamma$ . La MET a également induit une augmentation des activités d'iNOS et d'arginase dans les MOs, bien que les différences n'étaient pas significatives pour l'activité d'iNOS ( $p > 0,05$ ). De plus, la MET a induit une forte augmentation de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) dans les MOs, mais pas dans les MOs co-cultivées avec des cellules cancéreuses du sein. En outre, la MET a induit une forte augmentation des niveaux de production d'IFN- $\gamma$  et une diminution de ceux de l'IL-10 dans les MOs isolés, tout en induisant un effet léger d'inversion sur la production d'IL-10 dans les co-cultures ( $p > 0,05$ ).

**Conclusion :** Nos résultats montrent que les biomarqueurs des activités fonctionnelles phénotypiques des MOs changent après la co-culture avec des cellules primaires de cancer du sein humain. Ainsi, le traitement avec la MET pourrait améliorer les effets sur la production de cytokine anti-tumorale IFN- $\gamma$  et  $Ca^{2+}$ , ainsi que sur la nécrose cellulaire lors de l'interaction cellules cancéreuses du sein-MOs.

**Mots clés:** activation d'Akt; metformine; interaction monocyte/cellule du cancer du sein humain primaire; modifications de l'activité fonctionnelle phénotypique des monocytes; prolifération et viabilité de cellule du cancer du sein primaire; Activité anti-tumorale des monocytes associée à l'IFN- $\gamma$ .

## Abstract

**Background:** Immune activities of monocytes (MOs) can be altered within the microenvironment of solid malignancies, including breast cancer. Metformin (1,1-dimethylbiguanide hydrochloride, MET), has been shown to decrease tumor cell proliferation, but its effects have yet to be explored with respect to the MOs (monocytes) activities during their crosstalk with breast cancer cells. Here, we investigated the effects of MET on overall phenotypic functional activities, including cellular immunometabolism and protective redox signaling based-biomarkers, intracellular free calcium ions ( $Ca^{2+}$ ), phagocytosis and co-operative cytokines (IFN- $\gamma$  and IL-10) of autologous MOs before and during their interplay with primary breast cancer cells (ER/PR/HER2+).

**Methods:** Human primary breast cancer cells were either cultured alone or co-cultured with autologous MOs before treatment with MET.

**Results:** MET downregulated breast cancer cell proliferation and phagocytosis, while had no significant effect on the ratio of phosphorylated Akt (p-Akt)-to-total Akt ( $p > 0.05$ ). Additionally, we observed that, in the absence of MET treatment, the levels of lactate dehydrogenase (LDH)-based cytotoxicity, catalase,  $Ca^{2+}$ , IL-10 and arginase activity were significantly reduced in co-cultures compared to those of MOs cultivated alone whereas levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity were significantly increased (for all comparisons,  $p < 0.05$ ). In contrast, MET treatment might reverse the co-culture effects on the levels of LDH-based cytotoxicity, arginase activity, catalase,  $Ca^{2+}$ , and IFN- $\gamma$ . MET also induced upregulation of both iNOS and arginase activities in MO cells, although the differences did not reach significant levels for iNOS activity ( $p > 0.05$ ). Moreover, MET induced a robust increase of superoxide dismutase (SOD) activity in MOs, but not in MOs co-cultured with breast cancer cells. Furthermore, MET markedly upregulated the levels of IFN- $\gamma$  production and downregulated those of IL-10 in isolated MOs, while inducing a slight reversing effect on IL-10 production in co-cultures ( $p > 0.05$ ).

**Conclusions:** Our results show that the biomarkers of phenotypic functional activities of MOs change after co-culturing with primary human breast cancer cells. So, treatment with MET might ameliorate effects on the production of antitumor cytokine IFN- $\gamma$  and  $Ca^{2+}$ , as well as cell necrosis during breast cancer cells-MOs crosstalk.

**Keywords:** Akt activation; metformin; monocyte/primary human breast cancer cell crosstalk; monocyte phenotypic functional activity changes; primary breast cancer cell proliferation and viability; MO IFN- $\gamma$ -associated anti-tumor activity.

## ملخص

**مقدمة:** الأنشطة المناعية للخلايا الأحادية يمكن لها أن تتغير في البيئة المكروية للأورام الخبيثة الصلبة، بما في ذلك سرطان الثدي. ثبت أن المتفورمين يقلل من تكاثر الخلايا السرطانية، ولكن لم يتم استكشاف آثاره بعد فيما يتعلق بآثاره الخلية الأحادية أثناء تفاعلها مع خلايا سرطان الثدي. لقد بحثنا في تأثيرات المتفورمين على الأنشطة الوظيفية الشاملة للنمط الظاهري، بما في ذلك الاستقلاب المناعي الخلوي والمؤشرات الحيوية القائمة على إشارات الأوكسدة والاختزال الواقية، أيونات الكالسيوم داخل الخلايا ( $Ca^{2+}$ )، والبلمعة، والسيتوكينات التعاونية (IFN- $\gamma$  و IL-10) للخلايا الأحادية ذاتية المنشأ قبل وأثناء تفاعلها مع خلايا سرطان الثدي الأولية (ER-/PR-/HER2+).

**الوسائل والطرق:** تمت زراعة خلايا سرطان الثدي البشرية الأولية بمفردها أو مع الخلايا الأحادية ذاتية المنشأ قبل العلاج بالمتفورمين.

**النتائج:** قلل المتفورمين من تكاثر خلايا سرطان الثدي والبلمعة، بينما لم يكن له تأثير كبير على نسبة الفسفرة Akt/p-Akt الإجمالي ( $p > 0,05$ ). بالإضافة إلى ذلك، لاحظنا أنه في حالة عدم وجود علاج بـ MET، انخفضت مستويات كل من السمية الخلوية، نشاط الكاتالاز (catalase)،  $Ca^{2+}$ ، IL-10، نشاط الأرجيناز (arginase) في الخلايا المشتركة مقارنة مع الخلايا الأحادية المزروعة بمفردها. بينما زادت مستويات نشاط سينثاز أكسيد النيتريك المحرض (iNOS) بشكل كبير ( $p < 0,05$ ) لجميع المقارنات. في المقابل، يمكن أن يعكس العلاج باستخدام المتفورمين آثار الخلايا المشتركة على مستويات السمية الخلوية، نشاط الأرجيناز، نشاط الكاتالاز،  $Ca^{2+}$  و IFN- $\gamma$ . تسبب المتفورمين أيضًا في زيادة أنشطة iNOS و arginase في الخلايا الأحادية، على الرغم من أن الاختلافات لم تكن كبيرة بالنسبة لنشاط الـ iNOS ( $p > 0,05$ ). بالإضافة إلى ذلك، تسبب MET في زيادة قوية في نشاط الديسموتاز الفائق (SOD) في الخلايا الأحادية، ولكن ليس في تلك المزروعة بالاشتراك مع خلايا سرطان الثدي. تسبب MET أيضًا في زيادة حادة في مستويات إنتاج IFN- $\gamma$  وانخفاض مستويات إنتاج IL-10 في الخلايا الأحادية المعزولة، مع إحداث تأثير انعكاس طفيف على إنتاج IL-10 في الثقافة المشتركة ( $p > 0,05$ ).

**الاستنتاجات:** أظهرت نتائجنا أن المؤشرات الحيوية للأنشطة الوظيفية النمطية للخلايا الأحادية تتغير بعد الزراعة المشتركة مع خلايا سرطان الثدي البشرية الأولية. يؤدي العلاج باستخدام MET إلى تحسين التأثيرات على إنتاج السيتوكين المضاد للورم IFN- $\gamma$  و  $Ca^{2+}$ ، بالإضافة إلى النخر الخلوي أثناء التبادل المشترك بين الخلايا الأحادية وخلايا سرطان الثدي.

**الكلمات المفتاحية:** تنشيط Akt، متفورمين، الحديث المتبادل الخلية الوحيدة/خلايا سرطان الثدي البشرية الأولية، تغييرات النشاط الوظيفي للنمط الظاهري للخلايا الأحادية؛ تكاثر و حيوية خلايا سرطان الثدي الأولية؛ نشاط مضاد للورم مرتبط بـ IFN- $\gamma$ .